

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 492**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/16</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/08</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/06</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2013 PCT/US2013/025997**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13123094**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2013 E 13749674 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2814513**

54 Título: **Administración sistémica y expresión regulada de genes paracrinos para enfermedades cardiovasculares y otras afecciones**

30 Prioridad:

**14.02.2012 US 201261598772 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.03.2018**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)  
1111 Franklin Street, 12th Floor  
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**HAMMOND, H. KIRK y  
GAO, MEI HUA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 660 492 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

Administración sistémica y expresión regulada de genes paracrinos para enfermedades cardiovasculares y otras afecciones

5

### Campo técnico

Esta invención se refiere a la biología celular y molecular, y a medicina. La invención proporciona composiciones para su uso en métodos de tratamiento. La invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína o un péptido paracrino para su uso en un método para tratar, mejorar o proteger a un sujeto que padece una insuficiencia cardíaca congestiva que comprende proporcionar y administrar o suministrar el vector a una célula del sujeto, o a un sujeto en necesidad del mismo, en el que la proteína o el péptido paracrino comprende una proteína o un péptido de la Urocortina-2 (UCn-2), y el vector es un virus adenoasociado (AAV).

15

### Antecedentes

Recientemente se demostró que una inyección intravenosa de un vector vírico que codifica el Factor IX humano, que es deficiente en la hemofilia B, aumenta la concentración del Factor IX en el suero de los sujetos con hemofilia B hasta un grado en el que reducía sus necesidades de infusión exógena del Factor IX. Sin embargo: 1) esta proteína no estaba bajo una expresión regulada, y por lo tanto, no permitía un ajuste óptimo de los niveles del transgen en el suero, 2) este sistema no proporciona un medio para desactivar la expresión del transgen en el caso de unos efectos indeseados o inesperados y 3) el gen, el Factor IX, no era un gen paracrino, y no tenía unos efectos cardiovasculares beneficiosos, y por lo tanto, no podía ser usado para el tratamiento de la enfermedad cardíaca.

25

Meili-Butz Silvia et al (2009) Biosciences Information Service, v. 120, nº 18, página 5868, desvelan la administración crónica de Urocortina 2 en la hipertrofia inducida por hipertensión: efectos sobre la regulación del calcio intracelular y la hemodinámica.

El documento NZ 523803 desvela un polipéptido relacionado con la urocortina humana (URP) y el uso del mismo para el tratamiento de un estado fisiopatológico, por ejemplo, estrés, ansiedad y disfunción en el apetito.

30

### Sumario

La invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína o un péptido paracrino para su uso en un método para tratar, mejorar o proteger a un sujeto que padece una insuficiencia cardíaca congestiva que comprende proporcionar y administrar o suministrar el vector a una célula del sujeto, o a un sujeto en necesidad del mismo, en el que la proteína o el péptido paracrino comprende una proteína o un péptido de la Urocortina-2 (UCn-2), y el vector es un virus adenoasociado (AAV).

40

En algunas realizaciones alternativas de la invención, el polipéptido o el péptido paracrino comprende adicionalmente una Serelaxina, una Relaxina-2, una Urocortina-1 (UCn-1), una Urocortina-3 (UCn-3), un Péptido Natriurético Cerebral, una Sintasa de Prostaciclina, una Hormona del Crecimiento, un Factor de Crecimiento Insulinoide-1, de mamífero, o cualquier combinación de los mismos; o, una Serelaxina humana, una Relaxina-2, una Urocortina-1, una Urocortina-3, un Péptido Natriurético Cerebral, una Sintasa de Prostaciclina, una Hormona del Crecimiento, un Factor de Crecimiento Insulinoide-11, o cualquier combinación de los mismos.

45

En algunas realizaciones alternativas de la invención, el vector es administrado o suministrado al individuo o a un paciente en necesidad del mismo por vía oral, mediante una inyección intramuscular (IM), mediante una inyección intravenosa (IV), mediante una inyección subcutánea (SC) o intradérmica, mediante una inyección intratecal, mediante una inyección intraarterial (IA), mediante una inyección intracoronaria, por inhalación, o mediante un sistema de administración de partículas biológico, o mediante el uso de un "cañón de genes", de una pistola de aire o de un cañón de genes HELIOS™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

50

En algunas realizaciones alternativas de la invención, a la célula del sujeto se le administra un estímulo o una señal que induce la expresión del ácido nucleico, o que induce o activa un promotor que induce la expresión del ácido nucleico.

55

En algunas realizaciones alternativas de la invención: el vector está formulado en una formulación farmacéutica.

60

En algunas realizaciones alternativas de la invención, el vector está formulado en una vesícula, un liposoma, una nanopartícula o una partícula nanolipídica (NLP).

65

En algunas realizaciones alternativas de la invención: el vector es una célula aislada o cultivada, y opcionalmente la célula es una célula de mamífero, una célula cardíaca o una célula humana, una célula de un primate no humano, una célula de mono, una célula de ratón, una célula de rata, una célula de cobaya, una célula de conejo, una célula

de hámster, una célula de cabra, una célula bovina, una célula equina, una célula ovina, una célula canina o una célula felina.

5 En algunas realizaciones alternativas de la invención, el vector está formulado o suministrada con, en o junto con, un producto de fabricación, un órgano artificial o un implante.

En algunas realizaciones alternativas de la invención, el vector expresa el polipéptido paracrino *in vitro* o *ex vivo*.

10 En algunas realizaciones alternativas de la invención, el vector AAV se selecciona entre el AAV5, el AAV6, el AAV8, el AAV9 o el AAV.rh.10.

En algunas realizaciones alternativas de la invención, el vector AAV es el AAV8 o el AAV9.

15 En algunas realizaciones alternativas, la invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína o un péptido de urocortina 2 (UCn2) humana para su uso en el aumento de la función cardíaca en un sujeto en necesidad del mismo que comprende proporcionar y administrar o suministrar el vector a una célula del sujeto, o a un sujeto en necesidad del mismo, en el que el vector es un virus adenoasociado (AAV) AAV8 o AAV9.

20 En algunas realizaciones alternativas, el vector está formulado en, o en forma de, una vesícula, de un liposoma, de una nanopartícula o de una partícula nanolipídica (NLP), o está formulado para: una administración oral, una inyección intramuscular (IM), una inyección intravenosa (IV), una inyección subcutánea (SC) o intradérmica, una inyección intratecal, una inyección intraarterial (IA), una inyección intracoronaria, inhalación o una administración mediante aerosol, opcionalmente en la que la administración es una inyección intravenosa (IV).

25 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se establecen a los dibujos anexos y en la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de los dibujos, y de las reivindicaciones.

### 30 Descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un ejemplo de construcción de la invención que comprende el AAV5 que codifica el IGF1, según se describe en el Ejemplo 2, a continuación.

35 La Figura 2A y la Figura 2B ilustran los datos de estudios en los que se infectaron miocitos cardíacos de rata neonatal cultivados con el ejemplo de construcción AAV5.IGFI.tet de la invención, y el IGF1 fue inducido, expresado y después medido, según se describe en el Ejemplo 2, a continuación.

La Figura 3 ilustra gráficamente la expresión regulada de la expresión del ARNm del IGF1 en miocitos cardíacos de rata neonatal cultivados después de la transferencia génica con el ejemplo de adición de AAV5.IGFI-tet, y su extracción, doxicilina, según se describe en el Ejemplo 2, a continuación.

40 La Figura 4A ilustra microfotografías que muestran la expresión de la EGFP en el músculo tibial anterior unilateral 3 semanas después de la transferencia génica del AAV5.EGFP en ratas; y la Figura 4B es la Tabla 4, que resume los datos de la ecocardiografía que mide los efectos de la expresión del IGF1 en el músculo esquelético en una ICC, según se describe en el Ejemplo 2, a continuación.

45 La Figura 5 ilustra el protocolo experimental de la transferencia génica del ejemplo del AAV5.IGFI.tet de la invención en músculo esquelético en una ICC, según se describe en el Ejemplo 2, a continuación.

La Figura 6 ilustra los efectos de la transferencia génica del AAV5.IGFI-tet en la apoptosis y la fibrosis cardíacas: la Figura 6A ilustra gráficamente los datos de una tinción TUNEL que indicaban que la activación de la expresión del IGF1 (IGF activado) estaba asociada con una reducida apoptosis en los miocitos cardíacos; la Figura 6B ilustra secciones teñidas con rojo de picosirius del septo intraventricular no infartado de ratas con el IGF desactivado y el IGF activado, que mostraban una reducción en la fibrosis cardíaca y se redujo el área fraccional de colágeno; y la Figura 6C ilustra gráficamente estos datos para las ratas con el IGF desactivado y el IGF activado, según se describe en el Ejemplo 2, a continuación.

50 La Figura 7 ilustra gráficamente que la administración intravenosa proporcionó unos mejores resultados que la intramuscular para aumentar los niveles del IGF1 en el suero cuando se administró un ejemplo de construcción AAV5 de la invención: administración intravenosa en ratones, administración intramuscular en ratas, según se describe en el Ejemplo 2, a continuación.

55 La Figura 8 ilustra gráficamente, y mediante imágenes, los datos que muestran la eficacia relativa de la administración intravenosa de los ejemplos de construcciones AAV5 y AAV9 de la invención usando el número de copias y la expresión del transgen en el hígado y el corazón como criterios de valoración, según se describe en el Ejemplo 2, a continuación.

La Figura 9 ilustra un ejemplo de protocolo para la determinación y el ensayo del vector más apropiado para ser usado para una indicación deseada o particular cuando se lleva a la práctica un método de la invención, según se analiza en el Ejemplo 2, a continuación.

60 Las Figuras 10A, 10B, 10C, 10D, 10E y 10F ilustran ejemplos de construcciones del vector de la invención, según se describe en el Ejemplo 2, a continuación.

La Figura 11 ilustra gráficamente los datos que muestran que el AAV8 por vía IV es el vector y la vía de

administración óptimos para alcanzar unos niveles aumentados sostenidos en el suero de urocortina-2 (UCn-2) para una metodología paracrina, según se describe en el Ejemplo 3, a continuación.

La Fig 12A ilustra gráficamente el curso temporal de la expresión del ARNm de la UCn2 en el hígado después de la administración por vía IV del ejemplo de construcción AAV8.CBA.UCn2; y la Fig 12B ilustra gráficamente los datos que muestran la expresión del ARNm de la UCn2 en el VI 6 semanas después de la administración por vía IV del AAV8.CBA.UCn2, según se describe en el Ejemplo 3, a continuación.

La Figura 13 ilustra gráficamente los datos del estudio para determinar si la transferencia génica de la UCn2 aumentaba la función del VI mediante la administración del ejemplo de construcción AAV8.UCn2 de la invención mediante una administración intravenosa (IV) en ratones normales: la Fig 13A ilustra gráficamente los datos que muestran que la transferencia génica de la UCn2 aumentó la función contráctil del VI; la Fig 13B ilustra gráficamente los datos que muestran que también se redujo la  $-dP/dt$ , lo que indica un aumento en la relajación del VI, según se describe en el Ejemplo 3, a continuación.

La Figura 14 ilustra los datos que muestran los efectos de la transferencia de la UCn2 en un corazón con insuficiencia: la Fig. 14A ilustra el protocolo del estudio; y las Figuras 14B y 14C ilustran los datos que muestran los efectos de la transferencia de la UCn2 en un corazón con insuficiencia, según se describe en el Ejemplo 3, a continuación.

La Figura 15 ilustra los datos, la Fig. 15A mediante un gráfico, la Fig. 15B mediante una inmunotransferencia, en las que ratones normales recibieron una administración por vía IV de los ejemplos AAV8.CBA.UCn2; y cuatro semanas después, las muestras del VI del grupo con la transferencia génica de la UCn2 mostró un aumento de 2 veces en la expresión de la proteína SERCA2a, según se describe en el Ejemplo 3, a continuación.

La Figura 16 muestra los datos del  $Ca^{2+}$  transitorio después de la transferencia génica de la UCn2: la Fig. 16A ilustra gráficamente que la transferencia génica de la UCn2 aumentó la tasa de disminución del  $Ca^{2+}$ ; la Fig. 16B ilustra gráficamente que la disminución transitoria con el tiempo del  $Ca^{2+}$  estaba acortada en los miocitos cardiacos de los ratones que habían recibido la transferencia génica de la UCn2 4 semanas antes, según se describe en el Ejemplo 3, a continuación.

La Figura 17 muestra los datos de que la UCn2 protege a los miocitos cardiacos de rata neonatal cultivados de una lesión hipóxica: la Fig. 17A ilustra que la UCn2 conserva la normalidad morfológica 24 h después del tratamiento con  $NaN_3$ ; la Fig. 17B ilustra gráficamente que la UCn2 redujo la liberación de LDH después del tratamiento con  $NaN_3$ , según se describe en el Ejemplo 3, a continuación.

La Figura 18 ilustra gráficamente que se detectó la fosforilación tanto del CREB (Fig. 18A) como de la  $\beta$ -catenina (Fig. 18B) en muestras del VI 4 semanas después del suministro por vía IV del ejemplo de construcción UCn2.CBA.UCn2 de la invención, según se describe en el Ejemplo 3, a continuación.

La Figura 19 ilustra los datos que muestran que la UCn2 afecta a la regulación de la glucosa: los ratones recibieron un suministro por vía IV del ejemplo de AAV8.CBA.UCn2: la Fig. 19A ilustra que se observó una pequeña reducción en la glucosa sanguínea en ayunas en el grupo con UCn2: la Fig. 19B ilustra los resultados que indican que la transferencia génica de la UCn2 favorece la utilización de la glucosa y protege frente a una hiperglicemia inducida por la dieta, según se describe en el Ejemplo 3, a continuación.

Las Figuras 20A, 20B, 20C, 20D, 20E y 20F ilustran ejemplos de construcciones de la invención, según se describe en el Ejemplo 3, a continuación.

Los símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

### Descripción detallada

La invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína o un péptido paracrina para su uso en un método para tratar, mejorar o proteger a un sujeto que padece una insuficiencia cardiaca congestiva que comprende proporcionar y administrar o suministrar el vector a una célula del sujeto, o a un sujeto en necesidad del mismo en el que la proteína o el péptido paracrina comprende una proteína o un péptido de la Urocortina-2 (UCn-2), y el vector es un virus adenoasociado (AAV).

La invención también proporciona un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína o un péptido de la urocortina 2 (UCn2) humana para su uso en el aumento de la función cardíaca en un sujeto en necesidad del mismo

que comprende proporcionar y administrar o suministrar el vector a una célula del sujeto, o a un sujeto en necesidad del mismo en el que el vector es un virus adenoasociado (AAV) AAV8 o AAV9.

En algunas realizaciones alternativas, la invención proporciona composiciones para su uso en el suministro *in vivo* o *in situ* y/o en la expresión *in vivo*, y la expresión controlada de, la Urocortina-2.

En algunas realizaciones alternativas, la invención proporciona composiciones para su uso en métodos para el suministro y la expresión controlada de un ácido nucleico o de un gen de la Urocortina-2, o de un vehículo de expresión (por ejemplo, un vector, un virus recombinante, y similares) que comprende (que tiene contenido en el mismo) un ácido nucleico o un gen de la Urocortina-2, lo que da como resultado la liberación de la Urocortina-2 en el torrente sanguíneo o en la circulación general, donde puede tener un efecto beneficioso sobre el cuerpo, por ejemplo, tal como en el corazón en el caso del tratamiento de una enfermedad cardiovascular.

- 5 En algunas realizaciones alternativas, la invención proporciona vehículos de expresión, vectores, virus recombinantes y similares para la expresión *in vivo* de un ácido nucleico o de un gen de codificación paracrina que comprende Urocortina-2 para su uso en los métodos de esta invención. En algunas realizaciones alternativas, los vehículos de expresión, los vectores, los virus recombinantes y similares que expresan el ácido nucleico o el gen de codificación paracrina pueden ser suministrados mediante una inyección intramuscular (IM), mediante una inyección intravenosa (IV), mediante una inyección subcutánea, mediante inhalación, mediante un sistema de suministro de partículas biolístico (por ejemplo, el denominado "cañón de genes"), y similares, por ejemplo, como paciente externo, por ejemplo, durante una visita a la consulta.
- 10 En algunas realizaciones alternativas, este modo de suministro "periférico", por ejemplo, vehículos de expresión, vectores, virus recombinantes y similares, inyectados por vía IM o IV, pueden sortear los problemas que se encuentran cuando los genes o los ácidos nucleicos se expresan directamente en el propio órgano (por ejemplo, el corazón, el pulmón o el riñón). La secreción sostenida de la(s) proteína(s) paracrina(s) deseada(s) en el torrente sanguíneo o en la circulación general también sortea las dificultades y el gasto de las proteínas administradas mediante infusión, que puede ser particularmente problemático para muchas proteínas que muestran unas semividas muy cortas en el cuerpo, como se resume en la Tabla 1, a continuación:

**Tabla 1. Infusión por vía IV del péptido con respecto a la transferencia génica**

<b>Característica</b>	<b>Infusión por vía IV</b>	<b>Transferencia génica</b>
Requiere hospitalización	Muy a menudo	No
Catéteres permanentes	A menudo	No
Riesgo de infección	Alto	No
Riesgo de trombosis	Alto	No
Gasto	Alto	Bajo
Facilidad de uso	Baja	Alta
"Movilidad" de la terapia	Baja	Alta
Eficacia en la ICC	Sí	No ensayada
Regulación de la dosis	Rigurosa	A través de la regulación de la expresión

*"Movilidad" se refiere a la facilidad de uso cuando se está lejos de casa (de viaje, etc.);*  
*Reg, regulada (el paciente ingiere un agente oral en una dosis que proporciona el nivel deseado de expresión del transgen)*

- 20 En algunas realizaciones alternativas, la invención proporciona métodos que son capaces de activar y desactivar fácilmente y de forma eficaz la expresión del ácido nucleico o del gen de la Urocortina-2 para unos tratamientos personalizados y para asegurar una seguridad óptima.
- 25 En algunas realizaciones alternativas, la proteína o proteínas paracrinas que comprenden la Urocortina-2 expresada por el (los) ácido(s) nucleico(s) o gen(es) de expresión paracrina tienen unos efectos beneficiosos o favorables (por ejemplo, terapéuticos o profilácticos) en un tejido o un órgano, por ejemplo, el corazón, los vasos sanguíneos, los pulmones, los riñones u otros objetivos, incluso cuando son secretados en la sangre o la circulación general a cierta distancia (por ejemplo, anatómicamente remota) de su sitio o sitios de acción.
- 30 En un ejemplo de realización de la invención, se usa un ácido nucleico o un gen de expresión paracrina que codifica la Urocortina-2.
- 35 En algunas realizaciones alternativas, la invención proporciona aplicaciones y composiciones para su uso en métodos, para un sistema de expresión regulada que proporciona la expresión controlada de la Urocortina-2 para el tratamiento de una enfermedad cardíaca, por ejemplo, de la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC).
- 40 Por ejemplo, en algunas realizaciones alternativas puede inyectarse un virus recombinante (por ejemplo, un virus a largo plazo o un vector vírico), o un vector, o un vector de expresión, y similares, por ejemplo, en una vena sistémica (por ejemplo, por vía IV), o mediante una inyección intramuscular (IM), mediante inhalación o mediante un sistema de suministro de partículas biolístico (por ejemplo, el denominado "cañón de genes"), por ejemplo, como un paciente externo, por ejemplo, en la consulta de un médico. En algunas realizaciones alternativas, varios días o semanas después (por ejemplo, cuatro semanas después), al individuo, paciente o sujeto se le administra (por ejemplo, inhala, se le inyecta o ingiere), un producto químico o farmacéutico que induce la expresión de los ácidos nucleicos o los genes de expresión paracrina; por ejemplo, se administra un antibiótico por vía oral (por ejemplo, doxiciclina o rapamicina) una vez al día (o con mayor o menor frecuencia), lo que activará la expresión del gen. En algunas realizaciones alternativas, después de la "activación", o de la inducción de la expresión (por ejemplo, mediante un promotor inducible) del ácido nucleico o del gen, se sintetiza una proteína paracrina y se libera en la circulación del sujeto (por ejemplo, en la sangre), y posteriormente tiene unos efectos fisiológicos favorables, por ejemplo, terapéuticos o profilácticos, que benefician al individuo o paciente (por ejemplo, benefician a la función del corazón, del riñón o del pulmón), dependiendo de la proteína o proteínas paracrinas expresadas. Cuando el médico o el sujeto desea interrumpir el tratamiento, el sujeto simplemente deja de tomar el producto químico o farmacéutico de activación, por ejemplo, el antibiótico.
- 50

Los inventores han usado un vector AAV que codifica la Urocortina-2, y han administrado el vector a ratones usando una administración intravenosa. Los resultados mostraron: 1) un aumento de 17 veces en los niveles del transgen en el suero 4-6 semanas después de la administración intravenosa del vector; 2) unos pronunciados efectos favorables sobre la función contráctil cardíaca (la función sistólica); y 3) unos pronunciados efectos favorables sobre la función de relajación cardíaca (la función diastólica).

En algunas realizaciones alternativas, algunas aplicaciones de la presente invención incluyen: el tratamiento de una insuficiencia cardíaca grave, con una baja fracción de eyección; el tratamiento de una insuficiencia cardíaca con la fracción de eyección conservada; la sustitución de las actuales terapias que requieren hospitalización e infusiones intravenosas sostenidas de péptidos vasoactivos para el tratamiento de una insuficiencia cardíaca.

#### Generación y manipulación de ácidos nucleicos

En algunas realizaciones alternativas, para llevar a la práctica los métodos de la invención, la invención proporciona ácidos nucleicos o genes aislados, sintéticos y/o recombinantes que codifican polipéptidos paracrinos que comprenden la Urocortina-2. En algunas realizaciones alternativas, para llevar a la práctica los métodos de la invención, la invención proporciona ácidos nucleicos o genes de expresión paracrina en forma recombinante en (por ejemplo, ajustados en) un vehículo de expresión para su expresión *in vivo*, por ejemplo, en un vector o en un virus recombinante. Se divulgan ácidos nucleicos aislados, sintéticos y/o recombinantes que codifican ácidos nucleicos inhibidores (por ejemplo, ARNip, microARN, antisentido, ribozima) que pueden inhibir la expresión de los genes o los mensajes (los ARNm) que inhiben la expresión del gen paracrino deseado.

En algunas realizaciones alternativas, los ácidos nucleicos de la invención son elaborados, aislados y/o manipulados mediante, por ejemplo, la clonación y la expresión de colecciones de ADNc, la amplificación del mensaje o del ADN genómico mediante una PCR, y similares. Los ácidos nucleicos y los genes usados para llevar a la práctica esta invención, incluyendo ADN, ARN, ARNi, ácido nucleico antisentido, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o los híbridos de los mismos, pueden ser aislados a partir de diversas fuentes, diseñados genéticamente, amplificados y/o expresados/generados recombinantemente. Los polipéptidos recombinantes (por ejemplo, las proteínas quiméricas paracrinas usadas para llevar a la práctica esta invención) generadas a partir de estos ácidos nucleicos pueden ser aislados o clonados individualmente, y ensayados para evaluar una actividad deseada. Puede usarse cualquier sistema de expresión recombinante o vehículo de suministro de terapia génica, incluyendo, por ejemplo, sistemas de expresión o vehículos de expresión víricos (por ejemplo, construcciones o híbridos de AAV) bacterianos, fúngicos, de mamífero, de levadura, de insecto o vegetales.

Alternativamente, los ácidos nucleicos usados para llevar a la práctica esta invención pueden ser sintetizados *in vitro* mediante las técnicas de síntesis química bien conocidas, según se describe, por ejemplo, en Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105: 661; en Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3440-3444; en Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19: 373-380; en Blommers (1994) Biochemistry 33: 7886-7896; en Narang (1979) Meth. Enzymol. 68: 90; en Brown (1979) Meth. Enzymol. 68: 109; en Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22: 1859; en la Patente de EE.UU. nº 4.458.066.

Las técnicas para la manipulación de los ácidos nucleicos usados para llevar a la práctica esta invención, tales como, por ejemplo, subclonación, sondas de marcaje (por ejemplo, marcaje aleatorio con cebadores usando una polimerasa Klenow, traslación de mellas, amplificación), secuenciación, hibridación y similares, están bien descritas en la bibliografía científica y patente, véase, por ejemplo, Sambrook, ed., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ª ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Parte I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Otro medio útil para la obtención y la manipulación de los ácidos nucleicos usados para llevar a la práctica los métodos de la invención es la clonación a partir de muestras genómicas, y si se desea, el cribado y la reclonación de los insertos aislados o amplificados a partir de, por ejemplo, clones genómicos o de clones de ADNc. Las fuentes del ácido nucleico usado en los métodos de la invención incluyen colecciones genómicas o de ADNc contenidas, por ejemplo, en cromosomas artificiales de mamífero (MAC), véanse, por ejemplo, las Patente de EE.UU. nº 5.721.118; 6.025.155; cromosomas artificiales humanos, véase, por ejemplo, Rosenfeld (1997) Nat. Genet. 15: 333-335; cromosomas artificiales de levadura (YAC); cromosomas artificiales bacterianos (BAC); P1 cromosomas artificiales, véase, por ejemplo, Woon (1998) Genomics 50: 306-316; vectores derivados de P1 (PAC), véase, por ejemplo, Kern (1997) Biotechniques 23: 120-124; cósmidos, virus recombinantes, fagos o plásmidos.

En algunas realizaciones alternativas, para llevar a la práctica los métodos de la invención, se usan las proteínas de fusión paracrinas que comprenden la Urocortina-2 y los ácidos nucleicos que las codifican. Algunos polipéptidos paracrinos, además de la Urocortina-2, incluyen una Urocortina-1, una Urocortina-3, un Péptido Natriurético Cerebral, una Sintasa de Prostaciclina, una Hormona del Crecimiento, una proteína del Factor de Crecimiento Insulinoide-1. En algunas realizaciones alternativas, la proteína paracrina puede estar fusionada con un péptido o polipéptido heterólogo, tal como un péptido para el direccionamiento del polipéptido a un tipo celular deseado, tal

como los miocitos cardiacos o una célula pulmonar.

En algunas realizaciones alternativas, un péptido o un polipéptido heterólogo unido o fusionado a una proteína usada para llevar a la práctica esta invención puede ser un péptido de identificación N-terminal que imparte una característica deseada, tal como una detección fluorescente, un aumento en la estabilidad y/o una purificación simplificada. Los péptidos y los polipéptidos usados para llevar a la práctica esta invención también pueden ser sintetizados y expresados en forma de proteínas de fusión con uno o más dominios adicionales unidos a las mismas, por ejemplo, para producir un péptido más inmunógeno, para aislar más fácilmente un péptido sintetizado recombinantemente, para identificar y aislar los anticuerpos y los linfocitos B que expresan los anticuerpos, y similares. Algunos dominios que facilitan la detección y la purificación incluyen, por ejemplo, péptidos quelantes de metales tales como tramos de polihistidina y módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre una inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp, Seattle WA). La inclusión de una secuencia conectora escindible, tal como el Factor Xa o la enterocinasa (Invitrogen, San Diego CA) entre un dominio de purificación y el motivo que comprende el péptido o el polipéptido, para facilitar la purificación. Por ejemplo, un vector de expresión puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un epítipo unida a seis residuos de histidina, seguido de tiorredoxina y un sitio de escisión de la enterocinasa (véase, por ejemplo, Williams (1995) *Biochemistry* 34: 1787-1797; Dobeli (1998) *Protein Expr. Purif.* 12: 404-414). Los residuos de histidina facilitan la detección y la purificación, mientras que el sitio de escisión de la enterocinasa proporciona un medio para la purificación del epítipo a partir del resto de la proteína de fusión. La tecnología relativa a los vectores que codifican proteínas de fusión y a la aplicación de las proteínas de fusión está bien descrita en la bibliografía científica y patente, véase, por ejemplo, Kroll (1993) *DNA Cell. Biol.*, 12: 441-53.

Los ácidos nucleicos o las secuencias de ácidos nucleicos usados para llevar a la práctica esta invención pueden ser un oligonucleótido, un nucleótido, un polinucleótido o un fragmento de cualquiera de estos, desde un ADN o un ARN de origen genómico o sintético que puede ser monocatenario o bicatenario y puede representar una hebra sentido o antisentido, hasta un ácido nucleico peptídico (PNA), o cualquier material similar al ADN o al ARN, de origen natural o sintético. Algunos compuestos usados para llevar a la práctica esta invención incluyen "ácidos nucleicos" o "secuencias de ácidos nucleicos" que incluyen un oligonucleótido, un nucleótido, un polinucleótido o cualquier fragmento de cualquiera de estos; e incluyen ADN o ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt, ARNi) de origen genómico o sintético que puede ser monocatenario o bicatenario; y puede ser una hebra sentido o antisentido, o un ácido nucleico peptídico (PNA), o cualquier material similar al ADN o al ARN, de origen natural o sintético, incluyendo, por ejemplo, ARNi, ribonucleoproteínas (por ejemplo, por ejemplo, ARNi bicatenarios, por ejemplo, RNPI). Algunos compuestos usados para llevar a la práctica esta invención incluyen ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de los nucleótidos naturales. Algunos compuestos usados para llevar a la práctica esta invención incluyen estructuras similares a los ácidos nucleicos con esqueletos sintéticos, véase, por ejemplo, Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144: 189-197; Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36: 8692-8698; Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6: 153-156. Algunos compuestos usados para llevar a la práctica esta invención incluyen "oligonucleótidos" que incluyen un polidesoxinucleótido monocatenario o dos hebras complementarias de un polidesoxinucleótido que pueden ser sintetizadas químicamente. Algunos compuestos usados para llevar a la práctica esta invención incluyen oligonucleótidos sintéticos que no tienen un fosfato en 5', y que por lo tanto no se unirán a otro oligonucleótido sin la adición de un fosfato con un ATP en presencia de una cinasa. Un oligonucleótido sintético puede unirse a un fragmento que no ha sido desfosforilado.

En algunos aspectos alternativos, los compuestos usados para llevar a la práctica esta invención incluyen genes o cualquier segmento de ADN implicado en la producción de una Urocortina-2; pueden incluirse las regiones que preceden y que siguen a la región codificante (líder y tráiler) así como, cuando sea aplicable, las secuencias intervinientes (intrones) entre los segmentos codificantes individuales (exones). "Unido operativamente" puede referirse a una relación funcional entre dos o más segmentos de un ácido nucleico (por ejemplo, un ADN). En algunos aspectos alternativos, puede referirse a una relación funcional entre la secuencia reguladora de la transcripción y una secuencia transcrita. Por ejemplo, un promotor puede estar unido operativamente a una secuencia codificante, tal como un ácido nucleico usado para llevar a la práctica esta invención, si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula hospedadora apropiada o en otro sistema de expresión. En algunos aspectos alternativos, las secuencias reguladoras de la transcripción del promotor pueden estar unidas operativamente a una secuencia transcrita, donde pueden estar físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es decir, pueden ser de actuación en cis. En algunos aspectos alternativos, no es necesario que las secuencias reguladoras de la transcripción, tales como los potenciadores, estén físicamente contiguas o ubicadas en estrecha proximidad de las secuencias codificantes cuya transcripción van a potenciar.

En algunos aspectos alternativos, la invención comprende el uso de "casetes de expresión" que comprenden las secuencias de nucleótido usadas para llevar a la práctica esta invención, que pueden ser capaces de afectar a la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, un gen estructural o un transcrito (por ejemplo, que codifica una proteína de Urocortina-2) en un hospedador compatible con dichas secuencias. Algunos casetes de expresión pueden incluir al menos un promotor unido operativamente a la secuencia del polipéptido codificante o a la secuencia inhibidora; y, en un aspecto, con otras secuencias, por ejemplo, señales de terminación de la transcripción. También pueden

usarse algunos factores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión, por ejemplo, potenciadores.

En algunos aspectos alternativos, algunos casetes de expresión usados para llevar a la práctica esta invención también incluyen plásmidos, vectores de expresión, virus recombinantes, cualquier forma de vector recombinante de "ADN desnudo", y similares. En algunos aspectos alternativos, un "vector" usado para llevar a la práctica esta invención puede comprender un ácido nucleico que puede infectar, transfectar, transducir de forma temporal o permanente una célula. En algunos aspectos alternativos, un vector usado para llevar a la práctica esta invención puede ser un ácido nucleico desnudo o un ácido nucleico complejado con una proteína o con un lípido. En algunos aspectos alternativos, los vectores usados para llevar a la práctica esta invención pueden comprender ácidos nucleicos y/o proteínas y/o membranas, víricos o bacterianos (por ejemplo, una membrana celular, una cubierta lipídica vírica, etc.). En algunos aspectos alternativos, los vectores usados para llevar a la práctica esta invención pueden incluir, pero no se limitan a, replicones (por ejemplo, replicones de ARN, bacteriófagos) a los que pueden unirse fragmentos de ADN y ser replicados. Algunos vectores incluyen, por lo tanto, pero no se limitan a, ARN, ADN o ARN circular o lineal, autónomos autorreplicantes (por ejemplo, plásmidos, virus y similares, véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 5.217.879), y pueden incluir plásmidos tanto de expresión como de no expresión. En algunos aspectos alternativos, el vector usado para llevar a la práctica esta invención puede ser replicado de forma estable por las células durante la mitosis como una estructura autónoma, o puede ser incorporado en el genoma del hospedador.

En algunos aspectos alternativos, los "promotores" usados para llevar a la práctica esta invención incluyen todas las secuencias capaces de guiar la transcripción de una secuencia codificante en una célula, por ejemplo, una célula de mamífero tal como una célula cardíaca, pulmonar, muscular, nerviosa o cerebral. Por lo tanto, los promotores usados en las construcciones de la invención incluyen elementos de control de la transcripción de actuación en cis, y las secuencias reguladoras que están implicadas en la regulación o en la modulación de la cronología y/o de la velocidad de la transcripción de un gen. Por ejemplo, un promotor usado para llevar a la práctica esta invención puede ser un elemento de control de la transcripción de actuación en cis, incluyendo un potenciador, un promotor, un terminador de la transcripción, un origen de replicación, una secuencia de integración cromosómica, las regiones no traducidas en 5' y en 3' o una secuencia intrónica, que están implicadas en la regulación de la transcripción. Estas secuencias de actuación en cis normalmente interactúan con las proteínas o con otras biomoléculas para llevar a cabo (activar/desactivar, regular, modular, etc.) la transcripción.

En algunas realizaciones alternativas, los promotores "constitutivos" usados para llevar a la práctica esta invención pueden ser aquellos que dirigen la expresión de forma continua en la mayoría de las condiciones ambientales y estados de desarrollo o de diferenciación de la célula. En algunas realizaciones alternativas, los promotores "inducibles" o "regulables" usados para llevar a la práctica esta invención pueden dirigir la expresión del ácido nucleico de la invención bajo la influencia de las condiciones ambientales, de los agentes químicos administrados o de las condiciones de desarrollo.

#### Terapia génica y vehículos de administración de genes

En algunas realizaciones alternativas, los métodos de la invención comprenden el uso de sistemas de suministro de un ácido nucleico (por ejemplo, de un gen o de un polipéptido que codifica un ácido nucleico) para suministrar una carga de un ácido nucleico o un gen que codifica la Urocortina-2, o un ácido nucleico que expresa un polipéptido de la Urocortina-2, un transcrito o un mensaje, a una célula o células *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, por ejemplo, como vehículos de suministro de la terapia génica.

En algunas realizaciones alternativas, el vehículo de expresión, el vector, el virus recombinante o los equivalentes usados para llevar a la práctica métodos de la invención son o comprenden: un virus adenoasociado (AAV), un vector lentivírico o un vector adenovírico; un serotipo del AAV AAV5, AAV6, AAV8 o AAV9; un AAV derivado de rhesus, o el AAV derivado de rhesus AAVrh.10hCLN2; un AAV organotrópico o un AAV cardiopático, o un AAVM41 mutante cardiopático; y/o un mutante de la cápside del AAV o un serotipo híbrido del AAV. En algunas realizaciones alternativas, el AAV está diseñado para aumentar la eficacia en su direccionamiento a un tipo celular específico que no es permisivo con un tipo natural (wt) de AAV y/o para mejorar la eficacia al infectar únicamente un tipo celular de interés. En algunas realizaciones alternativas, el AAV híbrido es redirigido o diseñado como un serotipo híbrido mediante una o más modificaciones que comprenden: 1) una transcapsidación, 2) la adsorción de un anticuerpo biespecífico a la superficie de la cápside, 3) el diseño de la cápside del mosaico, y/o 4) el diseño de una cápside quimérica. En la materia se conoce bien cómo diseñar una cápside de un virus adenoasociado (AAV) con objeto de aumentar la eficacia en su direccionamiento a un tipo celular específico que no es permisivo con el virus natural (wt) y para mejorar la eficacia al infectar únicamente un tipo celular de interés; véase, por ejemplo, Wu et al., Mol. Ther. Septiembre de 2006; 14 (3): 316-27. Publicación electrónica del 7 de julio de 2006; Choi, et al., Curr. Gene Ther. Junio de 2005; 5 (3): 299-310.

Por ejemplo, puede usarse el AAV derivado de rhesus AAVrh.10hCLN2 o equivalentes del mismo, en el que el AAV derivado de rhesus puede no ser inhibido por una inmunidad preexistente en un ser humano; véase, por ejemplo, Sondhi, et al., Hum Gene Ther. Methods. Octubre de 2012; 23 (5): 324-35, Publicación electrónica del 6 de noviembre de 2012; Sondhi, et al., Hum Gene Ther. Methods. 17 de octubre de 2012; enseñan que la administración

directa del AAVrh.10hCLN2 en el SNC de ratas y de primates no humanos a unas dosis escalables a seres humanos tiene un perfil de seguridad aceptable y media en una expresión de la carga significativa en el SNC.

5 También pueden usarse, por ejemplo, vectores AAV diseñados específicamente para la transferencia génica cardíaca (un AAV cardioprotector), por ejemplo, el mutante AAVM41 que tiene una eficacia de transducción mejorada y una especificidad para el miocardio, véase, por ejemplo, Yang, et al. *Virology* 11 de febrero de 2013; 10 (1): 50.

10 Debido a que los virus adenoasociados (AAV) son unos agentes infecciosos habituales en los primates, y como tales, los primates sanos portan un gran conjunto de anticuerpos neutralizantes específicos para los AAV (NAb) que inhiben las estrategias terapéuticas de transferencia génica mediada por el AAV, los métodos de la invención comprenden el cribado de los pacientes candidatos para evaluar los NAb específicos del AAV antes del tratamiento, especialmente con el componente de la cápsida del AAV8 usado frecuentemente, para facilitar el diseño individualizado del tratamiento y mejorar la eficacia terapéutica; véase, por ejemplo, Sun, et al., *J. Immunol. Methods*. 31 de enero de 2013; 387 (1-2): 114-20, Publicación electrónica del 11 de octubre de 2012.

15 Kits e instrucciones

Se divulgan kits que comprenden composiciones y métodos que incluyen instrucciones para el uso de los mismos. Como tales, también pueden proporcionarse kits, células, vehículos de expresión (por ejemplo, virus recombinantes, vectores) y similares.

20 Por ejemplo, los kits que comprenden las composiciones según se divulgan, por ejemplo, comprenden un péptido o un polipéptido de la urocortina-2 (UCN-2); o un ácido nucleico de codificación paracrina, (b) una formulación líquida o acuosa de la invención, o (c) una vesícula, un liposoma, una nanopartícula o una partícula nanolipídica. En un aspecto, el kit comprende adicionalmente instrucciones para llevar a la práctica los métodos, por ejemplo, los métodos *in vitro* o *ex vivo*, para aumentar el nivel paracrino deseado en el torrente sanguíneo, o para proteger una célula, por ejemplo, una célula cardíaca o pulmonar; o para el tratamiento, la prevención o la mejora de la diabetes o de la prediabetes.

30 Formulaciones

En algunas realizaciones alternativas, la invención proporciona composiciones y métodos para su uso en el aumento de los niveles de la Urocortina-2 *in vivo*. En algunas realizaciones alternativas, estas composiciones comprenden ácidos nucleicos que codifican la Urocortina-2 formulados para estos fines, por ejemplo, vehículos de expresión o ácidos nucleicos que codifican la Urocortina-2 formulados en un tampón, en una solución salina, en un polvo, en una emulsión, en una vesícula, en un liposoma, en una nanopartícula, en una nanolipopartícula y similares.

40 En algunas realizaciones alternativas, la invención proporciona vectores que comprenden péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCN-2), o ácidos nucleicos que codifican la UCN-2, para su uso para tratar, mejorar o prevenir la insuficiencia cardíaca congestiva, o para su uso para aumentar la función cardíaca en un sujeto en necesidad de los mismos.

45 En algunas realizaciones alternativas, las composiciones (incluyendo las formulaciones de péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCN-2), o los ácidos nucleicos de codificación paracrina (por ejemplo, que codifican la UCN-2), pueden ser formulados de cualquier forma y pueden ser aplicados en una diversidad de concentraciones y formas dependiendo de las condiciones deseadas *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*, incluyendo un método de administración deseado *in vivo* o *ex vivo* y similares. Los detalles sobre las técnicas para las formulaciones y las administraciones *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* están bien descritos en la bibliografía científica de patentes.

50 Las formulaciones y/o los portadores de los ácidos nucleicos de codificación paracrina, o los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCN-2), usados para llevar a la práctica esta invención son bien conocidos en la materia. Las formulaciones y/o los portadores usados para llevar a la práctica esta invención pueden estar en formas tales como comprimidos, píldoras, polvos, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, etc., adecuados para aplicaciones *in vivo* o *ex vivo*.

55 En algunas realizaciones alternativas, los ácidos nucleicos de codificación paracrina, o los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCN-2), usados para llevar a la práctica esta invención, pueden estar en una mezcla con soluciones acuosas y/o tampón, o en forma de una suspensión acuosa y/o tamponada que incluye, por ejemplo, un agente suspensor, tal como carboximetil celulosa de sodio, metil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma de acacia, y agentes dispersantes o humectantes tales como un fosfátido natural (por ejemplo, lecitina), un producto de la condensación de un óxido de alquileno con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de la condensación de un óxido de alquileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetileno oxietanol), un producto de la condensación de un óxido de alquileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitol) o un producto de la condensación de un óxido de alquileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitano). La suspensión acuosa también puede

contener uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o de n-propilo. Puede ajustarse la osmolaridad de las formulaciones, por ejemplo, mediante el uso de un tampón apropiado.

5 En la práctica de esta invención, los compuestos (por ejemplo, las formulaciones) de la invención pueden comprender una solución de ácidos nucleicos o de genes de codificación paracrina, o de los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCn-2), disueltos en un portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, algunos vehículos y disolventes aceptables que pueden ser empleados incluyen agua y solución de Ringer, un cloruro de sodio isotónico. Además, pueden emplearse aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Con este fin puede emplearse cualquier aceite fijo estéril, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos, o ácidos grasos tales como el ácido oleico. En una realización, las soluciones y las formulaciones usadas para llevar a la práctica la invención son estériles y pueden ser elaboradas para que estén generalmente exentas de sustancias indeseables. En una realización, estas soluciones y formulaciones son esterilizadas mediante las técnicas de esterilización convencionales bien conocidas.

15 Las soluciones y las formulaciones usadas para llevar a la práctica la invención pueden comprender sustancias auxiliares según se necesite para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y agentes tamponantes, agentes de ajuste de la toxicidad, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración del agente activo (por ejemplo, de los ácidos nucleicos o de los genes de codificación paracrina) en estas formulaciones puede variar ampliamente, y puede ser seleccionada basándose fundamentalmente en los volúmenes de fluido, las viscosidades y similares, según el modo de administración en particular *in vivo* o *ex vivo* seleccionado y los resultados deseados, por ejemplo, para aumentar la expresión paracrina *in vivo*.

25 Las soluciones y las formulaciones usadas para llevar a la práctica la invención pueden ser liofilizadas; por ejemplo, la invención proporciona una formulación liofilizada estable que comprende ácidos nucleicos o genes de codificación paracrina, o los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCn-2). En un aspecto, esta formulación se elabora mediante la liofilización de una solución que comprende un ácido nucleico o un gen de codificación paracrina, o los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCn-2), y un agente de volumen, por ejemplo, manitol, trehalosa, rafinosa y sacarosa o mezclas de los mismos. Un proceso para la preparación de una formulación liofilizada estable puede incluir la liofilización de una solución de aproximadamente 2,5 mg/ml de proteína, aproximadamente 15 mg/ml de sacarosa, aproximadamente 19 mg/ml de NaCl, y un tampón de citrato de sodio que tiene un pH mayor de 5,5 pero menor de 6,5. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE.UU. nº 20040028670.

35 Las composiciones y las formulaciones de la invención pueden ser suministradas mediante el uso de liposomas (véase también el siguiente análisis). Mediante el uso de liposomas, particularmente cuando la superficie del liposoma porta ligandos específicos para las células objetivo, o están de otro modo dirigidos preferentemente a un tipo de órgano o tejido específico, se puede enfocar el suministro del agente activo en las células objetivo en una aplicación *in vivo* o *ex vivo*.

#### 40 Nanopartículas, nanolipopartículas y liposomas

La invención también proporciona nanopartículas, nanolipopartículas, vesículas y membranas liposomales que comprenden los compuestos (por ejemplo, los ácidos nucleicos o los genes de codificación paracrina, o los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCn-2)) usados para llevar a la práctica los métodos de esta invención, por ejemplo, para suministrar los ácidos nucleicos o los genes de codificación paracrina, o los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCn-2), a un individuo, a un paciente o a células de mamífero *in vivo* o *ex vivo*. En algunas realizaciones alternativas, estas composiciones están diseñadas para dirigirse a moléculas específicas, incluyendo moléculas biológicas tales como polipéptidos, incluyendo los polipéptidos de la superficie celular, por ejemplo, para un direccionamiento a un tipo celular deseado, por ejemplo, una célula cardíaca, una célula renal, una célula pulmonar, una célula nerviosa de mamífero y similares.

La invención proporciona liposomas multicapa que comprenden los compuestos usados para llevar a la práctica esta invención, por ejemplo, según se describe en Park, et al., Publicación de Patente de EE.UU. nº 20070082042. Los liposomas multicapa pueden ser preparados usando una mezcla de componentes en fase oleosa que comprende escualano, esteroides, ceramidas, lípidos o aceites neutros, ácidos grasos y lecitinas, de entre aproximadamente 200 y 5000 nm de tamaño de partícula, por ejemplo, para atrapar un ácido nucleico o un gen de codificación paracrina.

Los liposomas pueden elaborarse usando cualquier método, por ejemplo, según se describe en Park, et al., Publicación de Patente de EE.UU. nº 20070042031, incluyendo un método de producción de un liposoma mediante la encapsulación de un agente activo (por ejemplo, los ácidos nucleicos o los genes de codificación paracrina, o los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCn-2)), comprendiendo el método proporcionar una solución acuosa en un primer reservorio; proporcionar una solución lipídica orgánica en un segundo reservorio, y después mezclar la solución acuosa con la solución lipídica orgánica en una primera región de mezcla para producir una solución de liposomas, en la que la solución líquida orgánica se mezcla con la solución acuosa para producir sustancialmente instantáneamente un liposoma que encapsula el agente activo; y mezclar inmediatamente después la solución de liposomas con una solución tampón para producir una solución diluida de liposomas.

En una realización, las composiciones de liposomas usadas para llevar a la práctica esta invención comprende un amonio sustituido y/o polianiones, por ejemplo, para el suministro dirigido de un compuesto (por ejemplo, de los ácidos nucleicos o los genes de codificación paracrina) usados para llevar a la práctica esta invención a un tipo celular deseado, según se describe, por ejemplo, en la Publicación de Patente de EE.UU. nº 20070110798.

La invención también proporciona nanopartículas que comprenden los compuestos (por ejemplo, los ácidos nucleicos o los genes de codificación paracrina, o los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCn-2)) usados para llevar a la práctica esta invención en forma de nanopartículas que contienen un agente activo (por ejemplo, una nanopartícula secundaria), según se describe, por ejemplo, en la Publicación de Patente de EE.UU. nº 20070077286. En una realización, la invención proporciona nanopartículas que comprenden un agente activo liposoluble de esta invención o un agente activo hidrosoluble liposolubilizado para que actúe con una sal metálica bivalente o trivalente.

En una realización, pueden usarse suspensiones lipídicas sólidas para formular y suministrar los ácidos nucleicos o los genes de codificación paracrina, o los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCn-2), usados para llevar a la práctica la invención a un paciente, a un individuo o a una célula de mamífero *in vivo* o *ex vivo*, según se describe, por ejemplo, en la Publicación de Patente de EE.UU. nº 20050136121.

#### Vehículos de suministro

En algunas realizaciones alternativas, puede usarse cualquier vehículo de suministro para llevar a la práctica los métodos o las composiciones de esta invención, por ejemplo, para suministrar los ácidos nucleicos o los genes de codificación paracrina, o los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCn-2), para llevar a la práctica los métodos de la invención *in vivo* o *ex vivo*. Por ejemplo, pueden usarse vehículos de suministro que comprenden policationes, polímeros catiónicos y/o péptidos catiónicos, tales como derivados de polietilenoimina, por ejemplo, según se describe, por ejemplo, en la Publicación de Patente de EE.UU. nº 20060083737.

En una realización, se usa un complejo seco de polipéptido-tensioactivo para formular una composición de la invención, en el que un tensioactivo está asociado con un ácido nucleico a través de un enlace no covalente, por ejemplo, según se describe, por ejemplo, en la Publicación de Patente de EE.UU. nº 20040151766.

En una realización, puede aplicarse un ácido nucleico o un polipéptido usado para llevar a la práctica esta invención a células en forma de hidrogeles poliméricos o de copolímeros solubles en agua, por ejemplo, según se describe en la Patente de EE.UU. nº 7.413.739; por ejemplo, puede polimerizarse un ácido nucleico o una proteína a través de una reacción entre un nucleófilo fuerte y un enlace insaturado conjugado o un grupo insaturado conjugado, mediante una adición nucleofílica, en la que cada componente precursor comprende al menos dos nucleófilos fuertes o al menos dos enlaces insaturados conjugados o grupos insaturados conjugados.

En una realización, se aplica un ácido nucleico o una proteína a las células usando vehículos con conjugados peptídicos que atraviesan la membrana celular, por ejemplo, según se describe en las Patentes de EE.UU. nº 7.306.783; 6.589.503. En un aspecto, el propio ácido nucleico está conjugado con un péptido que atraviesa la membrana celular. En una realización, un ácido nucleico, una proteína y/o el vehículo de suministro se conjugan con un péptido mediador del transporte, por ejemplo, según se describe en la Patente de EE.UU. nº 5.846.743, que describe péptidos mediadores del transporte que son muy básicos y se unen a los polifosfoinosítidos.

En una realización, se usa una electropermeabilización como medio primario o adjunto para suministrar ácidos nucleicos o genes de codificación paracrina a una célula, por ejemplo, usando cualquier sistema de electroporación según se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. nº 7.109.034; 6.261.815; 5.874.268.

#### Productos de fabricación, implantes y órganos artificiales

La invención también proporciona productos de fabricación que comprenden las células de la invención (por ejemplo, células modificadas para que expresen proteínas paracrinas, o los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCn-2), para su uso en los métodos de la invención), y el uso de las células elaboradas mediante los métodos de esta invención, incluyendo, por ejemplo, implantes y órganos artificiales, sistemas de biorreactores, sistemas de cultivo celulares, placas, platos, tubos, frascos y matraces que comprenden las células modificadas para que expresen proteínas paracrinas para llevar a la práctica los métodos de la invención. Puede usarse cualquier implante, órgano artificial, sistema de biorreactor, sistema de cultivo celular, placa de cultivo celular, plato (por ejemplo, una placa de Petri), tubo de cultivo celular y/o matraz de cultivo celular (por ejemplo, un frasco rotatorio) para llevar a la práctica esta invención.

En algunas realizaciones alternativas, la invención proporciona un biorreactor, un implante, una endoprótesis vascular, un órgano artificial o un dispositivo similar que comprende las células modificadas para que expresen proteínas paracrinas para llevar a la práctica los métodos de la invención; por ejemplo, incluyendo los implantes según se describen en las USPN 7.388.042; 7.381.418; 7.379.765; 7.361.332; 7.351.423; 6.886.568; 5.270.192; y en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. nº 20040127987; 20080119909 (que describe implantes

auriculares); 20080118549 (que describe implantes oculares); 20080020015 (que describe un apósito para heridas bioactivo); 20070254005 (que describe bioprótesis de válvulas cardíacas, injertos vasculares, implantes de menisco); 20070059335; 20060128015 (que describe implantes de hígado).

5 Implante de células *in vivo*

En algunas realizaciones alternativas, la invención también comprende el implante o el injerto de las células, por ejemplo, de células cardíacas, que comprenden o que expresan los ácidos nucleicos o los genes de codificación paracrina, o los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCn-2), para su uso en la invención; y en un aspecto, la invención comprende el implante o el injerto de los ácidos nucleicos o los genes de codificación paracrina (o de las células que los expresan), o de los péptidos o polipéptidos de la urocortina-2 (UCn-2), en un vaso, un tejido o un órgano *ex vivo* o *in vivo*, o el implante o el injerto de la célula diferenciada reprogramada en un individuo en necesidad de la misma.

15 Las células pueden ser extraídas de un individuo, tratarse usando las composiciones y/o los métodos de esta invención, y reinsertarse (por ejemplo, inyectarse o injertarse) en un tejido, un órgano o en el individuo, usando cualquier técnica o protocolo conocido. Por ejemplo, pueden reimplantarse células reprogramadas desdiferenciadas, o células reprogramadas diferenciadas, (por ejemplo, inyectarse o injertarse) usando microesferas, por ejemplo, según se describe en la Patente de EE.UU. nº 7.442.389; por ejemplo, en un aspecto, la célula portadora comprende un agente de volumen que comprende micropartículas de polimetilmetacrilato redondas y lisas precargadas en un sistema de mezcla y suministro, y un portador autólogo que comprende estas células. En otra realización, las células son readministradas a un tejido, un órgano y/o un individuo en necesidad de las mismas en una matriz reticulada biocompatible, según se describe, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. nº 20050027070.

25 En otra realización, las células para su uso en la invención (por ejemplo, las células elaboradas llevando a la práctica los métodos de esta invención) son readministradas (por ejemplo, inyectadas o injertadas) en un tejido, un órgano o un individuo en necesidad de las mismas con, o protegidas por, un recubrimiento no inmunogénico biocompatible, por ejemplo, como en la superficie de un implante sintético, por ejemplo, según se describe en la Patente de EE.UU. nº 6.969.400, que describe, por ejemplo, un protocolo en el que puede conjugarse un AC incompetente para el AMPc con un polietilenglicol que ha sido modificado para contener múltiples grupos nucleofílicos, tales como un grupo amino primario o un tiol.

35 En una realización, las células para su uso en la invención (por ejemplo, las células elaboradas llevando a la práctica los métodos de esta invención) son readministradas (por ejemplo, inyectadas o injertadas) en un tejido, un órgano y/o un individuo en necesidad de las mismas usando los métodos de injerto según se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. nº 7.442.390; 5.733.542.

40 Puede usarse cualquier método para el suministro de polipéptidos, de ácidos nucleicos y/o de células a un tejido o un órgano (por ejemplo, un pulmón, un riñón, un corazón), y estos protocolos son bien conocidos en la materia, por ejemplo, según se describe en la Patente de EE.UU. nº (USPN) 7.514.401, que describe por ejemplo, el uso de polipéptidos, ácidos nucleicos y/o células intracoronarios (IC), intravenosos (IV) y/o de suministro local (inyección en el miocardio) en un corazón *in situ*. Por ejemplo, en algunas realizaciones alternativas, pueden usarse partículas farmacológicas en aerosol en los pulmones y en el torrente sanguíneo, una terapia génica, infusiones continuas, inyecciones repetidas y/o polímeros de liberación sostenida para el suministro de los polipéptidos, los ácidos nucleicos y/o las células a un tejido o un órgano (por ejemplo, un pulmón, un riñón, un corazón). En algunas realizaciones alternativas, los ácidos nucleicos y/o las células pueden proporcionarse a través de un catéter en las arterias coronarias, o mediante una inyección directa en la aurícula izquierda o en el miocardio ventricular a través de una toracotomía limitada; o suministrarse en el miocardio a través de un catéter colocado durante una cateterización cardíaca; o suministrados en el espacio pericárdico.

50 En algunas realizaciones alternativas, los ácidos nucleicos o las proteínas para su uso en esta invención, o un vector que comprende un ácido nucleico para su uso en la invención (por ejemplo, un AAV, o un vector adenovírico para terapia génica), o una vesícula, un liposoma, una nanopartícula o una partícula nanolipídica (NLP) de la invención, y similares, pueden ser administrados a un tejido o a un órgano (por ejemplo, un pulmón, un riñón, un corazón); por ejemplo, según se describe en el documento USPN 7.501.486, por ejemplo, los polipéptidos de la invención que comprenden una secuencia de aminoácidos CRPPR (SEQ ID NO: 1), la secuencia de aminoácidos CARPAR (SEQ ID NO: 2) o un peptidomimético de las mismas, o la secuencia de aminoácidos CPKRPR (SEQ ID NO: 3) o un peptidomimético de la misma.

60 Las composiciones usadas para llevar a la práctica esta invención pueden usarse junto con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, agentes angiogénicos, agentes antitrombóticos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunosupresores, agentes antiarrítmicos, agentes inhibidores del factor de necrosis tumoral, agentes inhibidores de la endotelina, agentes inhibidores de la enzima convertora de la angiotensina, agentes antagonistas del calcio, agentes antibióticos, agentes antivíricos y vectores víricos.

Las composiciones usadas para llevar a la práctica esta invención pueden usarse para mejorar o tratar cualquiera de una diversidad de cardiopatías y enfermedades cardiovasculares, por ejemplo, cardiopatías y enfermedades cardiovasculares, por ejemplo, enfermedad arterial coronaria (CAD); aterosclerosis; trombosis; reestenosis; vasculitis, incluyendo la autoinmune y la vasculitis vírica, tal como la poliarteritis nodosa, el síndrome de Churg-Strass, la arteritis de Takayasu, la enfermedad de Kawasaki y la vasculitis por Rickettsias; aneurismas ateroscleróticos; hipertrofia miocárdica; enfermedades cardíacas congénitas (CHD); insuficiencia cardíaca isquémica y anginas; enfermedades valvulares/endocárdicas adquiridas; enfermedades miocárdicas primarias, incluyendo miocarditis; arritmias; y rechazos de trasplantes; enfermedades miocárdicas metabólicas y miocardiomiopatías tales como miocardiomiopatías congestivas, hipertróficas y restrictivas, y/o trasplantes de corazón.

La invención se describirá más adicionalmente con referencia los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

#### EJEMPLO 1: el suministro intravenoso de un AAV9 que codifica la urocortina-2 aumenta la función cardíaca en ratones normales

Este ejemplo demuestra la eficacia de un ejemplo de una realización de la invención: la administración intravenosa de AAV9/urocortina-2 (o AAV9/UCn2) proporciona un aumento sostenido de la UCn2 en el suero y la función contráctil del VI, lo que indica la eficacia de este ejemplo de realización de la invención para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

En este estudio hemos desarrollado y ensayado la eficacia relativa de los dos serotipos de virus adenoasociados (AAV) (AAV5 y AAV9) que codifican la urocortina-2 (UCn-2), que es un péptido vasoactivo de la familia del factor de liberación de la corticotropina, que tienen unos efectos beneficiosos proteicos en animales y en los pacientes con una insuficiencia cardíaca. El AAV5.Ucn-2 y el AAV9.Ucn-2 ( $5 \times 10^{11}$  copias del genoma, cg) fueron suministrados mediante una inyección intravenosa (IV). Cuatro semanas después de la transferencia génica, el ADN del AAV (PCRq) estaba elevado en el hígado (AAV5.UCn2: 2.601.839 copias/ $\mu$ g; AAV9.UCn2: 30.121.663 copias/ $\mu$ g) y en el corazón (AAV5: 87.635 cg/ $\mu$ g; AAV9: 300.529 copias/ $\mu$ g; y el ARNm estaba elevado de forma similar en comparación con la UCn2 endógena (AAV5.Ucn- 2:  $68 \pm xx$  veces; AAV9.Ucn-2: 8.575).

Las muestras del ventrículo izquierdo mostraron una elevación del ARNm de la Ucn2 únicamente con el AAV9.UCn2, que estaba aumentado 28 veces con respecto al ARNm endógeno. La Ucn-2 plasmática había aumentado (AAV5.UCn2: desde 2,7 ng/ml pre hasta 3,6 ng/ml,  $p < 0,0001$ ; AAV9.UCn2. Finalmente, asociado con el aumento de los niveles de la UCn2 en el suero, había un aumento en la función contráctil del VI.

#### EJEMPLO 2: transferencia génica para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares

Este ejemplo demuestra la eficacia de un ejemplo de una realización de la invención en la obtención de un elevado rendimiento en la expresión del transgen en el corazón de una forma que puede ser aplicada fácilmente y con seguridad.

En algunas realizaciones alternativas, la invención proporciona métodos que usan vehículos de expresión, por ejemplo, vectores, que codifican un transgen de tipo paracrino. En esta realización, el transgen actúa como una hormona, con efectos cardiacos después de ser liberado en la circulación desde un punto distante. En algunas realizaciones alternativas, esta metodología puede sortear el problema de alcanzar un elevado rendimiento en la transferencia génica cardíaca, y permite que los pacientes sean tratados mediante una inyección sistémica durante una visita a la consulta.

Analizamos múltiples vectores del serotipo AAV y métodos de suministro, y completamos con éxito los estudios de viabilidad de la transferencia génica paracrino. A ratas con una ICC grave dilatada se les suministró en el músculo esquelético un vector de un virus adenoasociado 5 (AAV5) que codifica el Factor de Crecimiento Insulinoide I (IGFI) bajo la regulación de tetraciclina. Esto permitió la activación de la expresión del IGFI tras la adición de doxiciclina en el agua de bebida de la rata. Este sistema proporcionó una elevación sostenida de los niveles del IGFI en el suero y mejorar la función del corazón con insuficiencia.

En algunas realizaciones alternativas, a) se usa una transferencia génica del IGFI para aumentar la función; b) se usan vectores AAV y promotores para la administración intravenosa para proporcionar una expresión máxima del transgen con unos efectos mínimos fuera del objetivo; c) se usa la expresión regulada del transgen para permitir un ajuste fino de los niveles del transgen en el suero, y permitir la activación y la desactivación de la expresión según sea necesario; d) se usa una transferencia génica de los genes de expresión paracrino, por ejemplo, en un modelo de rata de ICC; y e) se usan unas dosis eficaces del AAV, y se usan activadores de la expresión del transgen después de la administración intravenosa del vector, por ejemplo, en cerdos normales, usando el paracrino en el suero (por ejemplo, el IGFI) como criterio de valoración.

En algunas realizaciones alternativas, una inyección por vía IV de un vector AAV con una expresión regulada de péptidos selectivos tendrá, a través de acciones con mediación paracrina, unos efectos favorables sobre el corazón con insuficiencia.

5 Selección del vector. En algunas realizaciones alternativas se usan vectores víricos adenoasociados (AAV) que permiten la expresión a largo plazo del transgen superior en el adenovirus, evitando el potencial de una mutagénesis por inserción asociada con los vectores lentivíricos. Se ha documentado una elevación persistente en el suero del Factor IX, de la eritropoyetina y de la  $\alpha$ 1-antitripsina, en perros y en primates no humanos, años después de una única inyección de dos vectores AAV<sup>1-4</sup>, y hemos confirmado una elevación persistente en el suero (> 1 año) del IGFI después de una inyección intramuscular de AAV5.IGFI-tet en ratas en nuestro laboratorio<sup>5</sup>. Aunque los ensayos clínicos recientes han averiguado que algunos serotipos de AAV desencadenan respuestas inmunitarias<sup>6,7</sup>, no parece que la generación más nueva de vectores AAV tengan unos problemas similares en estudios preclínicos en primates.

15 Serotipos del AAV: en algunas realizaciones alternativas se usa un serotipo AAV2 del AAV, pero en algunas, se prefieren vectores AAV "pseudotipados". Estos serotipos de AAV, que incluyen el AAV5, el AAV6, el AAV8 y el AAV9, son construcciones híbridas que incluyen la cápside del AAV2 y unos componentes de replicación únicos que confieren su nomenclatura específica. En algunas realizaciones alternativas, se usa el suministro intravenoso del AAV6, el AAV8 y el AAV9; éstos muestran una distribución y expresión sustancial del transgen en el corazón, el hígado, el músculo esquelético, y en cualquier otra parte.

Averiguamos que el AAV5 era mejor por vía intravenosa que intramuscular para aumentar los niveles del IGFI en el suero, según se ilustra en la Figura 7, que muestra gráficamente los datos de los niveles del IGFI en el suero libre 3 meses después de la transferencia génica del AAV5.IGFI.tet por vía IV frente a la IM: el suministro intravenoso en ratones (n = 3, cada grupo) proporcionó un aumento de 2 veces en el IGFI en el suero después de la activación de la expresión del IGFI con doxiciclina (On); el suministro intramuscular en ratas (n = 9 cada grupo) proporcionó un aumento > 1,3 veces en el IGFI en el suero 5 semanas después de la activación de la expresión del IGFI. Valores de P por encima de las barras: en el grupo de comparación (prueba de la t, bilateral). El cambio en el IGFI en el suero era mayor después de la administración intravenosa del AAV5.IGFI.tet (p < 0,001).

30 Cuando se administraba por vía intravenosa, el AAV9 era superior al AAV5 en términos de la expresión del transgen en el hígado y el corazón, según se ilustra en la Figura 8 gráficamente, y mediante la imagen, ilustra los datos que muestran la eficacia relativa de la administración intravenosa de los ejemplos de construcciones AAV5 y AAV9 de la invención usando el número de copias y la expresión del transgen en el hígado y el corazón como criterios de valoración, según se ilustra en la Figura 8.

En algunas realizaciones alternativas, el AAV8, como el AAV9, proporciona una expresión generalizada, pero proporciona una mayor proporción en el hígado que en otros órganos, una propiedad que, junto con un promotor específico hepático, nos hemos propuesto aprovechar.

40 En algunas realizaciones alternativas, se usan vectores autocomplementarios AAV (vectores scAAV); pueden proporcionar una mayor expresión del transgen que sus análogos monocatenarios (ssAAV)<sup>8</sup>. La expresión del transgen usando los vectores AAV (capacidad del inserto, 4,7 kb) se retrasa 4-6 semanas hasta que se sintetiza la hebra de ADN complementaria. Al codificar la hebra de ADN complementaria en el vector, el scAAV (capacidad del inserto, 3,3 kb), permite la expresión del transgen en 2 semanas y da como resultado una mayor expresión del transgen frente a su análogo ssAAV<sup>8</sup>.

Únicamente un vector de expresión regulado (el AAV8.TBG.IGFI.tet) puede estar sujeto a la construcción del scAAV, los otros son demasiado grandes, según se ilustra en la Figura 10. Sin embargo, si se selecciona este vector para los estudios con cerdos, puede usarse el ssAAV para proporcionar un mejor rendimiento en la elaboración de las grandes cantidades necesarias. Puede usarse el análogo del scAAV para uso humano, aprovechando la superior expresión, permitiendo una reducción en las necesidades de la dosis y mejorando la seguridad en los ensayos clínicos.

55 **Tabla 2. Regulación de la tetraciclina frente a la rapamicina**

Característica	Tetraciclina	Rapamicina
Activador	Doxiciclina	AP22594
Expresión basal ("fuga")	Muy baja/ninguna	Ninguna
Dosis-respuesta lineal	Si	Si
Efectos secundarios del activador	Bajos (evítese durante el embarazo)	Inmunosupresor
Proteínas bacterianas/víricas	Si	No
Usada en ensayos clínicos	Todavía no	Todavía no

*TG, transgen; AP22594, análogo de rapamicina oral, 100 veces menor supresión inmunitaria frente a la rapamicina<sup>14</sup>*

El promotor con respecto al tejido objetivo. En algunas realizaciones alternativas, el promotor seleccionado para la expresión del transgen en vectores AAV tiene una cierta dependencia tisular. En algunas realizaciones alternativas, los promotores usados para llevar a la práctica la invención incluyen: la  $\beta$ -actina de pollo (CBA); la globulina de unión a la hormona tiroidea (TBG, específica del hígado); y los promotores del virus de Sarcoma de Rous (RSV). A este respecto, se ha demostrado coherentemente que el CMV es un promotor superior en el músculo esquelético y cardiaco. Algunos estudios recientes indican que el promotor del CMV es susceptible de una metilación en el hígado, lo que finalmente desactiva la expresión del transgen. La pérdida de la expresión hepática reduciría los niveles del transgen en el suero, y por lo tanto, hemos elegido no usar el promotor de CMV, seleccionando en su lugar unos promotores similarmente robustos menos susceptibles a la metilación: la  $\beta$ -acción de pollo (CBA); la globulina de unión a la hormona tiroidea (TBG, específica del hígado); y los promotores del virus de Sarcoma de Rous (RSV), según se ilustra en la Figura 10.

Expresión regulada. En algunas realizaciones alternativas, en el uso de la expresión a largo plazo conferido por la transferencia génica mediada por el AAV, la expresión del transgen está regulada para inactivar la expresión si se observan unos efectos adversos inesperados. La expresión regulada permitiría también un suministro intermitente en lugar de constante. En algunas realizaciones alternativas, el sistema puede ser configurado de forma que el activador inactivo o active la expresión del transgen. En los casos en los que se necesita una expresión prácticamente constante del transgen, es deseable un sistema "inactivo" (por ejemplo, sólo se toma el activador oral cuando no se desea la expresión del transgen, por ejemplo, en el caso de efectos secundarios). En algunas realizaciones alternativas, en los casos en los que se necesita una expresión intermitente del transgen, es deseable un sistema "activo" (por ejemplo, sólo se toma el activador oral en los momentos en los que se desea la expresión del transgen).

Estas realizaciones alternativas permiten un control estrecho, y, cuando están ajustadas para la enfermedad específica tratada, proporcionan un medio para tomar la menor cantidad del activador. En algunas realizaciones alternativas, se usan sistemas de expresión regulados, por ejemplo, ecdisona, tamoxifeno, tetraciclina, rapamicina<sup>9-12</sup>; el gran tamaño del sistema de ecdisona puede necesitar una estrategia con dos vectores que sería difícil de desarrollar para una transferencia génica clínica debido a restricciones normativas. El sistema del tamoxifeno, aunque no es engorroso, requiere un activador menos tolerado que el sistema de tetraciclina (tamoxifeno frente a doxiciclina). En algunas realizaciones alternativas, pueden ser adecuadas sólo dos de las opciones disponibles (regulación con tetraciclina y con rapamicina), y estos son los únicos sistemas que se han ensayado en modelos de animales grandes<sup>3,4</sup>. Estos dos sistemas poseen unas características análogas (Tabla 2, más arriba): el gen de interés está controlado por un factor de transcripción diseñado inducible por un fármaco de activación (tetraciclina o un análogo de la rapamicina).

Expresión regulada por la tetraciclina. En algunas realizaciones alternativas, la invención usa una expresión regulada por la tetraciclina para establecer la transferencia génica:

- a) Expresión basal del transgen ("fuga"). Las variantes más nuevas de rTA, tales como la que proponemos y hemos usado en estudios recientes (rtTA2<sup>S</sup>-M2), proporcionan una robusta expresión dependiente de la tetraciclina sin ninguna actividad basal<sup>13</sup>, al contrario que las construcciones previas de rTA.
- b) Uso crónico de la tetraciclina con respecto a la tolerabilidad en el paciente y los efectos fuera del objetivo.

- el sistema de regulación tet ha sido ampliamente estudiado<sup>11</sup>; los estudios *in vitro* muestran que la expresión estimulada por doxiciclina del transgen comienza a 0,001 ng/ml y alcanza un máximo a 0,1  $\mu$ g/ml, una reducción de 10 veces en la CE<sub>50</sub> con respecto al sistema de la primera generación<sup>13</sup>. En los seres humanos, una única dosis oral de 200 mg de doxiciclina proporciona unas concentraciones medias plasmáticas y tisulares de 1,5  $\mu$ g/ml a las 24 h<sup>14</sup>, 15 veces mayor que la necesaria para una expresión máxima. Una única dosis diaria de doxiciclina de 10-20 mg puede ser suficiente para completar la activación de la expresión del transgen en sujetos humanos<sup>15</sup>. Las dosis de 200 mg/d son bien toleradas por los pacientes que usan doxiciclina oral de forma crónica para el acné y las infecciones crónicas<sup>14,16</sup>.
- ORACEA® (doxiciclina 40 mg por vía oral una vez al día) está aprobada por la FDA para su uso continuo en el tratamiento de la rosácea<sup>16</sup>. Esta dosis, un 80 % menor que la dosis de 200 mg necesaria para el tratamiento de la infección, proporciona unos efectos antiinflamatorios para el tratamiento de la rosácea, pero no tiene efectos antimicrobianos y no da lugar al desarrollo de organismos resistentes a los antibióticos (11 años de datos clínicos). Cada cápsula contiene 40 mg de doxiciclina anhidra en forma de microesferas de 30 mg de liberación inmediata y 10 mg de liberación retardada. Los sujetos con alergia a la tetraciclina, con un aumento en la fotosensibilidad, las mujeres embarazadas o en periodo de lactancia, o los niños menores de 9 años de edad (decoloración de los dientes, posible reducción del crecimiento de los huesos largos) no deberían usar doxiciclina. En 5 años de uso clínico, el efecto secundario más habitual era un leve malestar gastrointestinal<sup>16</sup>.
- las tetraciclinas pueden atenuar la expresión y la actividad de la metaloproteínasa de la matriz, y tienen un impacto sobre la remodelación ventricular izquierda (VI) cuando son administradas en los primeros pocos días después de un infarto de miocardio (IM)<sup>17</sup>. Sin embargo, en los estudios preclínicos propuestos, la doxiciclina es administrada 5 semanas después del IM, cuando la dilatación de la cámara del VI y la formación de cicatrices son estables e iguales entre los grupos. Previamente hemos documentado que la

doxiciclina no afecta al remodelado del VI, la expresión de los TIMP o de la MMP en el modelo murino propuesto de ICC inducida por un IM<sup>18</sup>. En el entorno clínico, la tetraciclina no se usará en la fase aguda del IM.

5 c) Respuestas inmunitarias hacia los componentes del sistema de rTA. No se identificaron respuestas inmunitarias frente al regulador tet en un estudio a largo plazo que usó una transferencia génica (intrarretinal) del AAV4.tet y del AAV5.tet en primates no humanos<sup>3,15</sup>, en el que se observó una sostenida expresión dependiente de la tetraciclina del transgen durante los 2,5 años de duración del estudio. No observamos inflamación en los corazones de los ratones que expresaban unos elevados niveles de rTA<sup>18,19</sup>, ni en ratones y ratas después de una expresión regulada del IGFI mediada por el AAV5 usando el elemento de regulación rTA2<sup>S</sup>-M2<sup>S</sup>. Parece que la administración intramuscular del AAV.tet en primates no humanos, al contrario que el suministro intrarretinal o vascular, conduce a una atenuación en la expresión regulada debido a las respuestas inmunitarias frente al componente bacteriano y vírico de la proteína de fusión del transactivador<sup>20</sup>. La respuesta inmunitaria frente al regulador tet puede ser, y simultáneamente puede determinarse, el sistema de regulación de rapamicina, que no posee proteínas bacterianas o víricas y no está asociado con la provocación de una respuesta inmunitaria<sup>7</sup>. Véase la Tabla 2 que recoge las ventajas y las limitaciones de la regulación por tet y rapamicina.

Expresión regulada con rapamicina. En algunas realizaciones alternativas se usa el macrólido sirolimus (rapamicina), un producto de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*: inicialmente fue desarrollado como un agente antifúngico, pero se averiguó que tenía efectos antiproliferativos e inmunosupresores. Actualmente se usa en clínica: a) para prevenir el rechazo en un trasplante de órganos (2 mg P.O. (*per os*, por vía oral), una vez al día, que proporciona unos niveles medios en el suero de  $12 \pm 6$  ng/ml); y b) en endoprótesis vasculares que eluyen fármacos para reducir la reestenosis después de una angioplastia, debido a sus efectos antiproliferativos. La rapamicina aumenta la esperanza de vida en ratones, parece impedir los efectos perjudiciales del envejecimiento<sup>21</sup> y se usa como adyuvante en el tratamiento del glioblastoma multiforme<sup>22</sup>. La rapamicina se une a la proteína de unión de FK 12 citosólica (FKBP12) e inhibe el objetivo de mamífero de la ruta de señalización de la rapamicina (mTOR). Una cinasa de serina/treonina, la mTOR, influye en el crecimiento y la proliferación de la célula, y favorece la supervivencia de la célula. La utilidad de la rapamicina con respecto a una terapia génica se basa en sus propiedades de dimerización, una característica que es explotada en el sistema de expresión regulado por la rapamicina. En este sistema, los dominios de unión y de activación del ADN de un factor de transcripción diseñado son expresados por separado como proteínas de fusión, que son reticuladas y por lo tanto activadas, mediante la adición de un fármaco de "dimerización" bivalente, en este caso, la rapamicina o un análogo de la rapamicina<sup>12</sup>. La expresión es dependiente de la dosis, reversible, está desencadenada por concentraciones nanomolares del activador<sup>12</sup>. El sistema de rapamicina no contiene proteínas víricas ni bacterianas, y por lo tanto es improbable que desencadene una respuesta inmunitaria. En macacos, una inyección intramuscular de un AAV1 que codifica la eritropoyetina proporcionó una expresión regulada por la Rap de hasta 6 años (26 ciclos de inducción individuales) sin ningún descenso en los niveles de la eritropoyetina y sin ninguna respuesta inmunitaria frente a los elementos de regulación<sup>4</sup>. La inmunosupresión es un potencial inconveniente de la rapamicina. Sin embargo, este problema puede ser sorteado mediante el uso de un análogo de la rapamicina por vía oral (AP22594), que activa la expresión del transgen tan eficazmente como la rapamicina, mostrando una mínima supresión inmunitaria, y no inhibe la mTOR<sup>4</sup>. Adicionalmente, como activador, son más eficaces las dosis semanales en lugar de las diarias, reduciendo adicionalmente los efectos fuera del objetivo. La relación entre la dosis y la respuesta del AP22594 administrado por vía oral, y sus intervalos de dosis máxima, partiendo de unas dosis orales usadas eficazmente en macacos (0,45 mg, una vez por semana), puede ser determinada en cerdos<sup>4</sup>.

#### 45 Factor de Crecimiento Insulinoide I (IGFI)

Selección del IGFI. La hormona de crecimiento (GH) ejerce muchos de sus efectos a través de la activación del IGFI. El IGFI ejerce muchos de sus efectos a través de la Akt. Debido a la convergencia de la señalización de la GH a través del IGFI hacia la Akt, debe defenderse la selección del IGFI sobre la GH o la Akt. Se predecía que el aumento en la expresión de la GH aumentaría la glucosa en el suero y los efectos perjudiciales sobre la presión arterial, que se evitan si se selecciona el IGFI. Se esperaba que el aumento en la expresión de la Akt reduciría la apoptosis, pero tendría otros potenciales efectos favorables no proporcionados por la Akt, tales como un aumento en la angiogénesis. Por lo tanto, seleccionamos la transferencia génica a través del IGFI para nuestros estudios iniciales preclínicos de la ICC, y recientemente demostramos que la transferencia génica a través del IGFI mejora la función del corazón de rata con insuficiencia<sup>5</sup> (véanse las Figuras 1-8 y las Tablas 4 y 5).

Señalización del IGFI. Los IGF, conocidos inicialmente como somatomedinas, son una familia de péptidos que median en muchas de las actividades anabólicas y mitógenas de la GH. Se aislaron dos somatomedinas con similitudes estructurales y metabólicas a la insulina a partir de plasma humano en 1978 y se denominaron IGFI e IGFI. Posteriormente se demostró que el IGFI (la somatomedina C) era el IGF regulado por la GH en circulación. El IGFI tiene 70 aminoácidos en una única cadena con 3 puentes de disulfuro y un peso molecular de 7,6 kD. Inicialmente se pensó que se generaba únicamente en el hígado, se demostró que era producido por muchos tejidos, incluyendo el intestino, el cerebro, el riñón, al pulmón y el corazón. La delección específica hepática del gen del IGFI en ratas no altera el crecimiento y el desarrollo normales<sup>23</sup>, lo que indica que el IGFI, ampliamente expresado en otros tejidos incluyendo el corazón, regula el crecimiento y el desarrollo a través de una liberación en

el tejido local de una forma paracrina.

El IGFI pertenece a una familia de proteínas que incluye ligandos (IGFI, IGFII, insulina), seis proteínas de unión conocidas (las IGFBP 1-6) y receptores de la superficie celular que incluyen los receptores del IGFI y de la insulina<sup>24</sup>.

El IGFI es traducido en forma de un pre-pro péptido que incluye un péptido de señalización amino terminal, unos dominios A, B, C y D y un péptido E variable carboxilo terminal. Existen tres isoformas conocidas del pro-IGFI en los seres humanos (pro-IGFIa, pro-IGFIb y pro-IGFIc) que difieren únicamente en la composición de aminoácidos del péptido variable E. Las proteínas de unión al IGF (IGFBP) actúan como proteínas portadoras y prolongan la semivida del IGF al inhibir la degradación<sup>24</sup>. Prácticamente todo (98 %) el IGFI circula predominantemente unido (80 %) a la IGFBP-3<sup>24</sup>.

El IGFI y el IGFII muestran una elevada afinidad de unión al receptor del IGFI en todos los tejidos excepto en el hígado. El receptor del IGF comparte una homología del 60 % con el receptor de la insulina y contiene un dominio de cinasa de tirosina. La unión al receptor del IGFI da como resultado una autofosforilación de los residuos de tirosina. Esto activa el receptor, produciendo la fosforilación de los sustratos, incluyendo el sustrato del receptor de la insulina, que activa múltiples cascadas de señalización que incluyen las rutas de la cinasa de PI3/Akt y la cinasa de proteína activada por mitógenos (MAPK), y otras, muchas de las cuales tienen unos efectos cardiovasculares beneficiosos (véanse las siguientes Secciones y la Tabla 3).

Efectos del aumento en el IGFI. Un aumento en el IGFI en el suero reduce los niveles de insulina en el suero, aumenta la sensibilidad a la insulina y mejora los perfiles lipídicos<sup>24</sup>. Sin embargo, la infusión de la proteína IGFI puede causar hipotensión e hipoglucemia<sup>25</sup>. La GH, que se opone a la actividad de la insulina, aumenta los niveles de glucosa en el suero. La capacidad del IGFI de aumentar la captación de glucosa en el corazón puede jugar un papel en la recuperación post-isquémica de la función del VI después de la administración del IGFI. El IGFI aumenta el flujo sanguíneo muscular y tiene una actividad vasodilatadora, a través de efectos dependientes e independientes del receptor, y de la producción de óxido nítrico<sup>26</sup>. Los efectos combinados metabólicos y vasodilatadores de una elevada dosis en infusión intravenosa de IGFI en seres humanos pueden causar aturdimiento y eritema - unas dosis menores aumentan el rendimiento cardíaco, no afectan a la presión arterial ni a la glucosa en el suero, y no están asociadas con síntomas<sup>25,27</sup>.

La activación del receptor del IGFI es responsable de numerosas respuestas celulares que incluyen la regulación de la expresión génica, la estimulación de la miogénesis, la progresión del ciclo celular, la modulación inmunitaria y la esteroidogénesis. En el corazón, el IGFI y la ruta de señalización del receptor del IGFI/PI3K/Akt tienen unos efectos beneficiosos sobre la función, el crecimiento y la supervivencia del miocito cardíaco. Además, el IGF muestra unos efectos angiogénicos<sup>28</sup>, aumenta la función contráctil cardíaca en corazones normales<sup>25,29,30</sup> y con insuficiencia<sup>27,29,30,33</sup> e inhibe la apoptosis<sup>34,35,38</sup>. Estas características hacen que el IGFI sea atractivo para una terapia en la ICC (Tabla 3).

**Tabla 3. IGFI: efectos cardiovasculares beneficiosos**

Característica	Mecanismo	Especie	Ref
↓ SVR	Vasodilatación a través del NO	R, P, H	25, 26, 32, 39 *
	Inotropo; vasodilatación	R, D, H	25, 29, 30, 36
↑ dP/dt del VI, la FE o el GC		R, D, P	27, 29-33, 39 *
↑ Función del VI en la ICC	Inotropo, ↑ Manipulación del Ca <sup>2+</sup>	M, R	34, 35, 38
↑ Protección cardíaca	↓ Apoptosis a través de la Akt	M, R	31, 36, 45, 46
↑ Masa del VI	Prolif. de los MC; ↓ Apoptosis a través de la Akt		
↑ Flujo sanguíneo	Angiogénesis	R	28

*SVR, resistencia vascular sistémica; GC, gasto cardíaco; FE, fracción de eyección, VI, ventrículo izquierdo; prolif, proliferación; M, ratón; R, rata; D, perro; P, cerdo; H, humano; 39\* se usó la GH, que elevó el IGFI 2 veces*

La proteína IGFI en el tratamiento de la enfermedad cardíaca (Tabla 3)

Estudios preclínicos. Se han estudiado los efectos de la administración de la proteína recombinante humana IGFI o GH en modelos de animal de enfermedades cardíacas. El IGFI es un inotropo positivo en corazones de rata aislados y en el músculo papilar de hurón; la GH no tiene ningún efecto inotrópico en los mismos tejidos<sup>29</sup>. Se encontraron unos efectos inotrópicos similares del IGFI en músculos papilares aislados de perros con una insuficiencia cardíaca inducida por electroestimulación<sup>30</sup>. El IGFI administrado a ratas normales durante cuatro semanas aumentó la función cardíaca y dio como resultado una hipertrofia concéntrica del VI<sup>31</sup>. El IGFI y la GH administrados conjuntamente durante dos semanas se asociaron con un aumento en la dP/dt del VI y una hipertrofia del VI en ratas normales<sup>36</sup>. La administración del IGFI antes de una isquemia y una reperfusión miocárdica en ratas disminuyó la

liberación de la cinasa de creatina y redujo la apoptosis<sup>34</sup>. La combinación de IGFI y GH<sup>32</sup> o el IGFI solo<sup>33</sup> administrado cuatro semanas después de un IM, aumentó la función del VI en ratas. La GH administrada a ratas durante cuatro semanas después de un IM aumentó la función sistólica del VI<sup>37</sup>, redujo la fibrosis cardíaca, la apoptosis de los miocitos cardíacos y aumentó la supervivencia<sup>38</sup>. En el modelo de ICC por electroestimulación en cerdos, la GH aumentó el IGFI en el suero, aumentó la función del VI y redujo el estrés de la pared del VI<sup>39</sup>.

Estudios clínicos. El uso clínico de la proteína GH o IGFI ha recibido una considerable atención, aunque existe una escasez de grandes estudios controlados por placebo. Se estudiaron los efectos hemodinámicos agudos de la infusión de IGFI en un estudio cruzado controlado por placebo con enmascaramiento de pacientes con una ICC (n = 8). Las infusiones de cuatro horas de IGFI aumentaron el gasto cardíaco, disminuyeron la resistencia vascular y redujeron las presiones de la aurícula derecha y de enclavamiento<sup>27</sup>. La administración crónica de la proteína IGFI no ha sido evaluada en pacientes con una ICC. El uso de la proteína GH en pacientes con una ICC ha producido unos resultados ambiguos. Dos pequeños estudios no controlados y no enmascarados con un total de 14 pacientes con una ICC notificaron que tres meses de terapia con la proteína GH aumentaron el IGFI en el suero, la función del VI y el estado clínico<sup>40,41</sup>. Unos ensayos aleatorizados controlados por placebo de la GH (proteína) administrada durante hasta 3 meses en pacientes con una ICC no alteraron la función del VI ni el estado clínico<sup>42,43</sup>. La revisión más reciente de la bibliografía de la terapia con la proteína GH concluye que se carece de evidencias de eficacia en la ICC clínica isquémica e idiopática, debido quizás a la cinética de la administración del péptido<sup>44</sup>. Por lo tanto, en algunas realizaciones alternativas, los métodos de transferencia génica de esta invención, al proporcionar una expresión sostenida del IGFI, pueden ser superiores a la terapia con la proteína IGFI.

Aumento en la expresión del IGFI o la GH cardíacos. La expresión cardíaca dirigida del IGFI humano en ratas, con su concomitante aumento en la producción del IGFI en los miocitos cardíacos, prácticamente duplica los niveles del IGFI en el suero. Estas ratas han aumentado el peso del corazón con una hiperplasia de los miocitos cardíacos, pero no hay ningún aumento en el volumen de los miocitos cardíacos<sup>35,45</sup>. Después de un IM se encontró una reducción en la apoptosis de los miocitos y un aumento en la fosforilación de la Akt<sup>35</sup>. La expresión cardíaca dirigida del IGFI atenúa la senescencia de la célula relacionada con la edad con reducciones en la actividad de la telomerasa, un acortamiento de los telómeros y de los daños en el ADN. Estas ratas muestran un aumento en la activación de la Akt y un aumento en la función del VI a los 22 meses de edad con respecto a sus compañeros de camada emparejados por edades negativos para el transgen<sup>46</sup>. La expresión conjunta del IGFI cardíaco en un trasfondo de cardiomiopatía (paradigma de mestizaje) parece impedir la apoptosis cardíaca, el remodelado del VI y la disfunción del VI<sup>47</sup>. Sin embargo, dado que nunca estuvo presente una ICC, esta estrategia no es equivalente al tratamiento de una ICC ya existente, una metodología que es el tema central en la propuesta actual.

Para determinar si la transferencia génica de la GH influiría en el remodelado del VI después de un IM, se inyectó directamente en el músculo cardíaco de rata un adenovirus que codifica la GH (Ad.GH) en el momento de una oclusión coronaria<sup>48</sup>. Se realizaron inyecciones en la zona limítrofe entre el miocardio en peligro y el viable. Seis semanas después del IM y de la transferencia génica, se observaron unos efectos favorables sobre la dimensión diastólica final del VI, la dP/dt del VI y el espesor de la pared en la región infartada. Los mismos científicos demostraron posteriormente que la Ad.GH inyectada en la zona limítrofe del infarto en ratas tres semanas después de una oclusión arterial coronaria aumentaba la dP/dt del VI y atenuaba la dilatación del VI y el adelgazamiento de la pared tres semanas después de la inyección<sup>49</sup>. La transferencia génica de la GH durante o 3 semanas después del IM parecía tener unos efectos beneficiosos sobre el remodelado del VI.

Cuando se inyectó el adenovirus que codifica el IGFI (Ad.IGFI) en el lecho de perfusión en peligro justo antes de la oclusión coronaria en ratas, la magnitud del infarto se redujo en un 50 %, un efecto que se cree debido principalmente al resultado de una reducción en la apoptosis<sup>50</sup>. Este estudio no abordó los efectos de la transferencia génica del IGFI sobre el remodelado del VI después de un IM. Se ha demostrado que la transferencia génica del IGFI mediada por un adenovirus reduce la apoptosis de los miocitos inducida por la hipoxia *in vitro*, y, en un modelo de rata de perfusión isquémica, antes de la inyección del adenovirus que codifica el IGFI el tamaño del infarto se redujo en aproximadamente un 50 % (p < 0,003), a pesar de que el transgen era expresado únicamente en aproximadamente el 15 % de la región isquémica, lo que es coherente con un efecto paracrino regional. El efecto de la expresión del IGFI en la totalidad del corazón con insuficiencia no ha sido explorado.

#### Potenciales efectos adversos del IGFI

Supervivencia. La alteración del sistema GH/IGFI parece aumentar, no disminuir, la longevidad en ratas con una función cardíaca normal<sup>51</sup>. Sin embargo, proponemos aumentar la expresión del IGFI en el entorno de una ICC grave, lo que augura un notable aumento en la mortalidad a corto plazo. Ningún dato sugiere que la inhibición del IGF aumente la longevidad en una ICC. Por el contrario, un aumento en el IGFI en el suero en seres humanos reduce la incidencia de la ICC y la mortalidad<sup>52,53</sup>. Los estudios epidemiológicos han demostrado que las personas con un bajo IGFI en el suero presentan un riesgo elevado de desarrollar una insuficiencia cardíaca isquémica. En el estudio Framingham, los individuos por encima del valor mediano del IGFI en el suero tenían una reducción del 50 % en la incidencia de la ICC en comparación con aquellos por debajo del mediano<sup>52,53</sup>. Un informe reciente muestra que los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), que prolongan la vida en la ICC, aumentan la señalización del IGFI<sup>54</sup>. Nuestros datos demuestran que la transferencia génica del IGFI aumenta la función del

corazón con insuficiencia en la rata, y proponemos determinar si también hay un beneficio en la supervivencia.

Cáncer. Los estudios epidemiológicos clínicos notifican una correlación entre los aumentos en los niveles del IGFI en el suero (elevaciones > 2 veces) y el cáncer de próstata y de mama premenopáusicas<sup>55</sup>, pero no hay ninguna indicación de que esta relación sea causal. Es relevante que la incidencia del cáncer de próstata aumenta con la edad, mientras que la concentración del IGFI en el suero disminuye<sup>55</sup>. En los pacientes con cáncer, un aumento en el IGFI en el suero puede tener su origen en el tumor. De hecho, el aumento en la expresión del IGFI en el epitelio de la próstata de ratas eleva las concentraciones del IGFI en el suero y puede dar lugar a una neoplasia prostática<sup>56</sup>. Un aumento en las concentraciones del IGFI en el suero también puede ser el resultado de cambios en el estado nutricional de los pacientes con cáncer. Se podría especular que el IGFI puede aumentar el crecimiento tumoral a través de una angiogénesis y de una reducción en la apoptosis. La expresión cardíaca dirigida del IGFIb, con la concomitante elevación sostenida del IGFI en el suero, no está asociada con el cáncer de próstata o de mama, y el aumento combinado del IGFI y de la GH en el suero no aumenta la incidencia de cáncer de próstata, de mama o de pulmón en pacientes con acromegalia<sup>54</sup>. El papel del IGFI en la génesis o la progresión del cáncer es teórico. Parece prudente que las terapias que aumentan la expresión del IGFI deberían limitar las concentraciones del IGFI en el suero y proporcionar también un medio para detener la expresión si se desea. Proponemos conseguir estos objetivos mediante el uso de la transferencia génica de un vector de expresión regulado, que aumenta las concentraciones del IGFI en el suero, y por lo tanto tienen unos efectos cardiovasculares beneficiosos.

Novedad de los estudios. Estos estudios se centran en el desarrollo de una transferencia génica del IGFI para una ICC clínica. La transferencia génica del IGFI (o de la GH) no se ha usado en una ICC clínica. Ningún ensayo clínico controlado por placebo con enmascaramiento doble de la proteína GH/IGFI en la ICC ha tenido éxito, quizás debido a la relativamente corta semivida biológica de la proteína GH/IGFI, un problema que sería superado mediante una transferencia génica. Aunque la transferencia génica cardíaca de la GH y del IGFI se han usado antes de una oclusión coronaria para reducir el tamaño del infarto en estudios con animales, ningún estudio previo ha analizado la transferencia génica del IGFI para la ICC *per se*. Además, la metodología paracrina propuesta que usa el suministro sistémico de un vector de expresión a largo plazo y regulado, es nueva, y puede ser aplicada a otros péptidos de expresión paracrina para el tratamiento de una diversidad de enfermedades cardiovasculares.

Sumario. Debido a las limitaciones de los estudios preclínicos y clínicos en lo que respecta a los beneficios predecibles de la administración del péptido del IGFI en el tratamiento de una ICC grave, y a la promesa teórica de una transferencia génica del IGFI de expresión paracrina, nos embarcamos en unos estudios en nuestro laboratorio (véanse los datos preliminares), diseñados para sortear los impedimentos y los inconvenientes de una infusión intravenosa continua o intermitente crónica del péptido.

Otros péptidos beneficiosos. Aunque el uso del IGFI es convincente, debería enfatizarse que los métodos de terapia génica paracrina de la invención también son adecuados para cualquier péptido en circulación con unos efectos cardiovasculares beneficiosos. Por ejemplo, la urocortina-2 es un péptido vasoactivo recién descubierto de la familia del factor de liberación de la corticotropina que actúa a través de los receptores del factor de liberación de la corticotropina de tipo 2, que son fuertemente expresados en el corazón y en la vasculatura. Las infusiones del péptido de urocortina-2 tienen unos efectos proteicos beneficiosos en los animales y en los pacientes con una insuficiencia cardíaca<sup>57</sup>. El BNP es otro péptido biológicamente eficaz para el tratamiento de la ICC clínica que podría ser suministrado de una manera similar. Además, en la hipertensión pulmonar, los análogos de la prostaciclina pueden ser eficaces en el tratamiento de la hipertensión pulmonar, pero los agentes actuales (epoprostenol y trepostinilo) requieren una inyección sistémica constante, y el propio tratamiento está asociado con una elevada morbilidad<sup>58</sup>. En algunas realizaciones alternativas, los métodos de la invención proporcionan un vector de expresión regulado que codifica la sintasa de prostaciclina en forma de una terapia génica de tipo paracrino para la hipertensión pulmonar. De hecho, cualquier péptido terapéutico actual que requiera una infusión intravenosa prolongada o crónica intermitente se prestaría por sí mismo a esta metodología de transferencia génica de tipo hormonal.

El AAV y la respuesta inmunitaria en estudios clínicos. La expresión a largo plazo del transgen después del suministro intramuscular o intravascular de los vectores AAV ha sido más bien la norma que la excepción en roedores. Sin embargo, los estudios en pacientes han sido importunados por la expresión limitada debido a las respuestas inmunitarias frente al transgen y, a veces, frente al vector AAV *per se*<sup>6</sup>. A partir de estos y de otros estudios surgen dos conclusiones. 1) El suministro intramuscular (en comparación con el intravascular) del AAV generalmente provoca un aumento en la respuesta inmunitaria frente al transgen y a la cápside del AAV; y 2) el éxito en roedores, debido a su relativa tolerancia inmunitaria, no siempre predice un éxito en seres humanos. Los estudios con roedores y cerdos pueden ser diseñados en seres humanos teniendo en mente que:

los serotipos del AAV (AAV8 y AAV9) pueden ser seleccionados de forma que sea menos probable que estén asociados con anticuerpos neutralizantes preexistentes en sujetos humanos<sup>59</sup>. Por ejemplo, el AAV8 está asociado con la prevalencia más baja de anticuerpos neutralizantes anti-AAV (un 19 % frente a un 59 % para el AAV1, y un 50 % para el AAV2). Además, entre la minoría de sujetos humanos con anticuerpos frente a los AAV8/9, el 75-90 % de esos sujetos posee un título bajo, haciendo que el AAV8 y el AAV9 sean las actuales elecciones óptimas con respecto a una respuesta inmunitaria anticipada<sup>59</sup>. El suero humano no posee

prácticamente ninguna seropositividad frente a los vectores AAV derivados de rhesus, tales como el AAVrh.32.33<sup>60</sup>, lo que proporciona un vector alternativo si el AAV8 y el AAV9 resultan inadecuados, aunque la experiencia preclínica y clínica con el AAVrh.32.33 es limitada.

- 5 La inyección intramuscular de los vectores AAV puede ser evitada debido a que pueden desencadenar respuestas inmunitarias en animales más grandes<sup>6</sup>.

10 Pueden usarse proteínas del IGFI específicas para dos especies: rata y cerdo. Puede usarse tanto el IGFI de rata como el de cerdo. El uso de un IGFI específico de una especie reducirá las respuestas inmunitarias frente al transgen. Los ensayos clínicos pueden llevarse a cabo con el vector óptimo que codifique el IGFI humano.

15 El suministro intravenoso del AAV8 y del AAV9 es atractivo debido a su simplicidad, y debido a que es probable que consigan los mayores niveles del transgen terapéutico en el suero con la dosis más baja posible del AAV. Aunque la seroprevalencia frente a estos vectores AAV es importante en cerdos y en primates, incluyendo los seres humanos, no ha sido un factor importante en roedores. Las muestras preliminares de cerdos de nuestro proveedor no muestran ningún signo de anticuerpos contra el AAV8 o el AAV9 en 7 de los 9 cerdos ensayados.

20 En algunas realizaciones alternativas, la expresión de un transgen de la invención está limitada a un único órgano, por ejemplo, si dicha estrategia proporciona unos niveles terapéuticos en el suero de ese transgen. Por ejemplo, un ejemplo de un vector de la invención es el AAV8 con un promotor específico de hepatocitos (T<sub>β</sub>G, la globulina de unión a la hormona tiroidea humana).

#### Transferencia génica de expresión paracrina mediante el uso del IGFI

25 Aunque hemos seleccionado el IGFI para estos estudios de viabilidad, en algunas realizaciones alternativas la invención comprende el uso de cualquiera de los genes candidatos descritos en el presente documento, y cualquiera de estos genes sería eficaz para el efecto previsto. Por ejemplo, la invención proporciona métodos y composiciones que suministran de forma eficaz cualquier polipéptido paracrino, por ejemplo, un péptido cardiotónico de mamífero, una Serelaxina, una Relaxina-2, una Urocortina-2, una Urocortina-1, una Urocortina-3, un Péptido Natriurético Cerebral, una Sintasa de Prostaciclina, una Hormona del Crecimiento, un Factor de Crecimiento Insulinoide-1 o cualquier combinación de los mismos; o, una Urocortina-2, una Urocortina-1, una Urocortina-3, un Péptido Natriurético Cerebral, una Sintasa de Prostaciclina, una Hormona del Crecimiento, un Factor de Crecimiento Insulinoide-1 humanos, o cualquier combinación de los mismos.

35 Diseñamos un ejemplo de vector AAV5 que codifica el IGFI de rata (de tipo A) que está bajo el control de un elemento de respuesta a la tetraciclina (TRE): la Figura 1 ilustra un ejemplo de construcción de la invención que comprende un AAV5 que codifica el IGFI; este ejemplo de vector del AAV5 proporciona una expresión regulada del IGFI: ITR, repetición terminal invertida; TRE, elemento de respuesta a la tetraciclina; IGFAU1, Factor de Crecimiento Insulinoide-1; SVpA, poliA del genoma vírico del SV40 (bidireccional); rTA2<sup>S</sup>M2, transactivador inverso controlado por tetraciclina; CMV, promotor génico temprano del citomegalovirus humano. Tamaño total del inserto, 2823 pb, se ajusta a un vector scAAV5 (capacidad de 3,3 kb).

45 La secuencia codificante incluye un péptido de señalización para asegurar la secreción extracelular del IGFI. Hemos usado este vector (AAV5.IGFI.tet) en experimentos de transferencia génica en miocitos cardiacos cultivados: la Figura 2A ilustra los datos de los estudios, en los que se infectaron miocitos cardiacos de rata neonatal cultivados con el AAV5.IGFI.tet (10.000 cg/célula, 2 d); los geles ilustraban cómo se indujo la expresión del IGFI mediante doxiciclina (+Dox) (2 µg/ml, 3 días), pero no se produjo en ausencia de doxiciclina (-Dox). El IGFI fue detectado en el medio mediante un anticuerpo anti-AU1 mediante una inmunoelectrotransferencia. La Figura 2B ilustra los datos en los que en los mismos experimentos se lisaron los miocitos cardiacos con tampón de lisis de Akt (10 min, 4 °C) y se centrifugaron (12.000 x g, 10 min); la Akt total y la fosfo-Akt fueron detectadas mediante anticuerpos anti-Akt y anti-fosfo-T308-Akt. La expresión del IGFI estaba asociada con la activación de la Akt. Después de la infección, la expresión del transgen era indetectable (no había "fuga") hasta su activación con doxiciclina (Figura 2A).

55 Nuestro vector (Figura 1) contiene una variante más reciente del rTA (rTA2<sup>S</sup>-M2), que proporciona una robusta expresión dependiente de la dox y una actividad basal baja o ausente, al contrario que las construcciones previas de rTA<sup>13</sup>.

#### Expresión regulada del IGFI en miocitos cardiacos cultivados

60 Los miocitos cardiacos de rata neonatal cultivados experimentaron una transferencia génica con el AAV5.IGFI-tet (10<sup>4</sup> cg/célula, 2 días). Como se ilustra gráficamente en la Figura 3, posteriormente se añadió doxiciclina (2 µg/ml) al medio, y la expresión del ARNm del IGFI se cuantificó usando una RT-PCR en tiempo real. La expresión del ARNm del IGFI aumentó (frente a no estimulados) 1,5 veces en 30 min, y alcanzó un pico de una elevación de 14 veces a las 24 h. A las 48 h, el ARNm del IGFI era algo menor (10 veces), lo que refleja la degradación de la doxiciclina. Para inactivar la expresión del IGFI, se eliminó la doxiciclina usando cuatro lavados sucesivos con PBS ("lavado de eliminación", véase la Figura 3). El ARNm del IGFI disminuyó rápidamente tras la desaparición de la doxiciclina.

La administración en el músculo esquelético del AAV5.IGFI.tet mejora la función del corazón con insuficiencia

5 Transferencia génica en el músculo esquelético. Inicialmente llevamos a cabo unos estudios de la insuficiencia  
 10 cardiaca murina después de un suministro intracoronario indirecto del AAV5.IGFI.tet (Figura 1), encontrando unas  
 mejoras sustanciales en función del corazón con insuficiencia después del suministro dirigido al corazón. Sin  
 embargo, los estudios de viabilidad que demostrarían la eficacia de una transferencia de acción paracrina,  
 requerirían el suministro del vector en el músculo esquelético. Para estos estudios fundamentales usamos una  
 administración intramuscular del AAV5.IGFI.tet en el músculo tibial anterior de ratas<sup>5</sup>. Se seleccionó el AAV5 debido  
 a sus bien conocidos elevados niveles de expresión después de una inyección IM en el músculo esquelético. En  
 todos los casos encontramos una expresión del IGFI en el medio (experimentos con cultivos celulares), y una  
 expresión a largo plazo del IGFI en el corazón (modelo murino de la ICC) y en el suero (modelo de rata después de  
 una inyección IM, de ratón después de una inyección por vía IV), y la correspondiente mejora en la función del  
 corazón con insuficiencia<sup>5</sup>.

15 En el estudio con ratas, analizamos en primer lugar la viabilidad de la inyección en el músculo esquelético del  
 AAV5.EGFP para proporcionar una expresión a largo plazo del transgen, según se ilustra en la Figura 4A: ilustra  
 microfotografías que muestran la expresión de la EGFP en el músculo tibial anterior unilateral 3 semanas después  
 de la transferencia génica del AAV5.EGFP en ratas. El músculo tibial anterior contralateral no inyectado del mismo  
 animal no muestra ninguna expresión de la EGFP. La Figura 4B es la Tabla 4, que resume los datos de la  
 20 ecocardiografía que mide los efectos de la expresión del IGFI en el músculo esquelético en la ICC.

Modelo de IM de la ICC y protocolo experimental

25 Se indujo un IM en ratas mediante una oclusión coronaria izquierda proximal, dando como resultado un gran infarto  
 transmural y un grave deterioro en la función del VI. Una semana después del IM, las ratas con una función  
 deteriorada del VI recibieron  $2 \times 10^{12}$  copias de genoma (cg) del AAV5.IGFI.tet en el músculo tibial anterior. Cuatro  
 semanas después (5 semanas después del IM), las ratas con una fracción de eyección (FE) del VI < 35 % fueron  
 asignadas aleatoriamente a dos grupos: un grupo recibió doxiciclina en el agua de bebida para activar la expresión  
 del IGFI (IGF activado; n = 10) y el otro no recibió la doxiciclina (IGF desactivado; n = 9). Diez semanas después del  
 30 IM (5 semanas después de la activación de la expresión del IGFI), se evaluó el tamaño y la función del VI mediante  
 una ecocardiografía y estudios hemodinámicos; la Figura 5 ilustra el protocolo experimental de la transferencia  
 génica del AAV5.IGFI.tet en el músculo esquelético en una ICC.

35 Resultado. El IGF activado en las ratas mostró un aumento en la fracción de eyección del VI (p = 0,02) y redujo la  
 dimensión sistólica final del VI (p = 0,03) (Tabla 4, véase la Figura 4B). Adicionalmente, la función contráctil del VI,  
 evaluada mediante el índice de desarrollo de presión (+dP/dt del VI) durante una infusión de dobutamina, aumentó  
 después de iniciarse la expresión del IGFI (p = 0,001) (Tabla 5, página siguiente). Además, se observaron cambios  
 favorables en el gasto cardiaco (p = 0,007) y en el trabajo de apoplejía (p = 0,003) (Tabla 5). El IGFI en el suero está  
 40 aumentado 5 semanas después de la activación del transgen (IGF desactivado:  $164 \pm 24$  ng/ml; IGF activado:  $218 \pm$   
 $11$  ng/ml; p = 0,008; n = 9 cada grupo). Estos datos indican que la inyección en el músculo esquelético del  
 AAV5.IGFI.tet permite la expresión activada por tetraciclina, aumenta los niveles del IGFI en el suero y mejora la  
 función del corazón con insuficiencia<sup>5</sup>. En algunas realizaciones alternativas pueden usarse vectores de AAV menos  
 inmunógenos, y pueden usarse por vía intravenosa en lugar de en una inyección intramuscular para sortear el  
 45 desencadenamiento de respuestas inmunitarias, y ensayar dos sistemas de expresión regulados.

45

Tabla 5. Efectos de la activación de la expresión del IGFI en el músculo esquelético en una ICC				
		IGF desactivado (n = 10)	IGF activado (n = 10)	p
FC (latidos/min)	Basal	377 ± 42	364 ± 83	0,79
	Dobutamina	373 ± 29	395 ± 10	
GC (ml/min)	Basal	10,3 ± 2,2	16,3 ± 1,8	0,007
	Dobutamina	15,8 ± 2,4	23,2 ± 2,8	
SW (ml · mm de Hg)	Basal	1,6 ± 0,4	4,1 ± 0,6	0,003
	Dobutamina		6,4 ± 1,2	
+dP/dt del VI (mm de Hg/s)	Basal	4.237 ± 630	6.337 ± 687	< 0,0001
	Dobutamina	6.842 ± 913	12.974 ± 1.061	
-dP/dt del VI (mm de Hg/s)	Basal	-3.453 ± 494	-4.564 ± 409	0,030
	Dobutamina	-6.036 ± 1.197	-8.518 ± 1.056	
Presión sistólica (mm de Hg)	Basal	104 ± 12	143 ± 11	0,011
	Dobutamina	113 ± 9	163 ± 8	
Presión media (mm de Hg)	Basal	82 ± 13	110 ± 8	0,07
SVR (unidades de Wood)	Basal	7,5 ± 1,3	6,8 ± 0,5	0,23

FC, frecuencia cardiaca; GC, gasto cardiaco; SW, trabajo de apoplejía.  
 Los datos indican la media ± EE.  
 Valores de probabilidad de un ANOVA bifactorial, que muestra el efecto del IGFI. Referencia 5

Apoptosis y fibrosis cardíacas (Figura 6)

La figura 6 ilustra los efectos de la transferencia génica del AAV5.IGFI-tet sobre la apoptosis y la fibrosis cardíacas. La Figura 6A ilustra gráficamente los datos de una tinción TUNEL que indican que la activación de la expresión del IGFI (IGF activado) estaba asociada con una reducción en la apoptosis de los miocitos cardíacos ( $p < 0,0001$ ; ANOVA bifactorial), que se redujo más en los límites que en la región remota. La Figura 6B ilustra las secciones teñidas con rojo de picosirius del septo intraventricular no infartado de ratas con el IGF desactivado y el IGF activado que mostraban una reducción en la fibrosis cardíaca, y el área fraccional del colágeno se redujo ( $p = 0,048$ ); la Figura 6C ilustra gráficamente estos datos procedentes de las ratas con el IGF desactivado y el IGF activado.

Suministro intravenoso con respecto al intramuscular del AAV5.IGFI.tet. En estudios preliminares determinamos si la transferencia génica intravenosa podría aumentar los niveles en circulación del IGFI. Una semana después de la administración intravenosa del AAV5. IGFI.tet ( $5 \times 10^{10}$  cg por ratón, vena de la cola), los ratones fueron asignados aleatoriamente a uno de dos grupos: un grupo recibió doxiciclina en el agua de bebida para activar la expresión del IGFI (IGF activado) y el otro no recibió la doxiciclina (IGF desactivado). Dado que la mayor parte del IGFI en circulación está unido a las proteínas de unión al IGFI (las IGFBP) con elevada afinidad y es biológicamente inactivo, medimos que la forma libre en el suero del IGFI, la forma bioactiva del IGFI, era 2 veces mayor en los ratones con el IGF activado que con el IGF desactivado 3 meses después de la activación de la expresión del IGFI (Figura 7, página siguiente). Usando la estrategia de transferencia génica intramuscular del AAV5.IGFI.tet ( $2 \times 10^{12}$  cg por rata) descrita en la Sección 2.2.1.2., encontramos un aumento de 1,3 veces en el IGFI en el suero libre en el grupo con el IGF activado con respecto al grupo con el IGF desactivado 5 semanas después de la activación de la expresión del IGFI (Figura 7). Estos datos sugieren que la administración intravenosa del AAV5.IGFI.tet es más eficaz que la administración intramuscular con respecto a las concentraciones del IGFI en el suero.

Además, es probable que una estrategia intravenosa sortee la provocación de una respuesta inmunitaria, que se ha observado después de la administración intramuscular del AAV<sup>6</sup>. Estos experimentos proporcionan unos datos de viabilidad fundamentales para nuestros estudios.

Suministro intravenoso: el AAV5 con respecto al AAV9.

A continuación, determinamos la eficacia relativa de la administración intravenosa del AAV5 frente al AAV9, usando el número de copias y la expresión del transgen en el hígado y en el corazón como criterios de valoración, según se ilustra en la Figura 8. Usamos los vectores AAV autocomplementarios (sc), que permiten una expresión temprana con respecto a los vectores AAV de hebra única (ss). Los ratones recibieron por vía intravenosa el scAAV5.CMV.EGFP o el scAAV9.CMV.EGFP ( $5 \times 10^{11}$  cg) y fueron sacrificados 21 días después. Se usaron cebadores de la PCR dirigidos a las secuencias habituales de ambos vectores para comparar el número de copias del ADN del AAV en el hígado y en el corazón. En el hígado, el AAV9 (con respecto al AAV5) proporcionó unos aumentos de 3 veces tanto en las copias del ADN del AAV como en la expresión de la EGFP; en el corazón, se observó un aumento de 5 veces en las copias del ADN del AAV y un aumento de 8 veces en la expresión de la EGFP. Estos datos demuestran que, en comparación con el AAV5 intravenoso, el AAV9 puede proporcionar unos mayores niveles del transgen en el suero.

Métodos

La Figura 10 ilustra ejemplos de los vectores y los diseños de vector de la invención: usando una administración intravenosa de tres vectores seleccionados a partir de los estudios preliminares y las características biológicas, pueden determinarse los méritos relativos de los ampliamente distribuidos y expresados AAV8 y AAV9 (Figura 10 A), y del AAV8 con un promotor específico hepático (Figura 10B). El criterio de eficacia pueden ser los niveles del IGFI en el suero 6 semanas después de su suministro. Se usa un vector AAV óptimo para generar dos vectores de expresión regulados (Tet y Rap), que pueden ser comparados después de su administración intravenosa en ratas, según se ilustra en la Figura 10C-F. El criterio de eficacia pueden ser los niveles del IGFI en el suero, esta vez analizado 16 semanas después de la activación de la expresión del transgen (20 semanas después del suministro).

Figuras **10A y B**. Vectores de AAV para los estudios iniciales en ratas para la determinación del mejor serotipo del AAV para los estudios posteriores. Estos vectores codifican el IGFI de rata (no regulado), dirigido por el CBA (AAV8 y AAV9) o por la TBG (AAV8). Puede usarse el mejor de éstos, basándose en los niveles en el suero y en la duración de la expresión del IGFI, para llevar a cabo estudios posteriores para la determinación del sistema de regulación óptimo.

Figura **10C-F**. Vectores candidatos para estudios en ratas para la determinación del sistema de expresión regulado óptimo. Usando el mejor vector AAV a partir de los estudios iniciales (más arriba), se generaron y se ensayaron 2 vectores de expresión regulados: uno con una regulación por tetraciclina, el otro con una regulación por rapamicina. Estos vectores codifican la expresión regulada del IGFI de rata, dirigida por el RSV (AAV8 y AAV9) o por la TBG (AAV8). El promotor CBA es demasiado grande para el vector de regulación por rapamicina, por lo que en su lugar se usa el RSV. Se selecciona al mejor de estos dos sistemas de regulación para la generación del vector óptimo para los posteriores estudios en cerdos normales, que codifica para la expresión regulada del IGFI porcino. ITR,

repetición terminal invertida; TRE, elemento de respuesta a la tetraciclina; IGFI, factor de crecimiento insulinoide-I; SVpA, poliA del genoma del virus SV40 (bidireccional); rTA2<sup>S</sup>M2, transactivador inverso controlado por tetraciclina; SV40en, potenciador del virus de simio 40; TBG Prom, promotor de la globulina de unión al hormona tiroidea; RSV Prom, promotor del virus del sarcoma de Rous; FRB-p6, parte de la FRAP, una proteína de interacción con la rapamicina, combinada con una subunidad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (p65); IRE, sitio de reentrada de la transcripción interna; ZF, dominio de unión al ADN en dedo de cinc HD1; FKBP, proteína de unión a FK506; pA, segmento de poliadenilación mínimo; ZBD, dominio de unión al ADN en dedo de cinc HD (8 copias).

No anticipamos que las respuestas inmunitarias frente al AAV jugarán un papel importante en ratas, aunque dichas respuestas son importantes en perros, en cerdos, en seres humanos y en otros primates. Las respuestas inmunitarias deberían ser cuidadosamente valoradas. La biodistribución del AAV (por ejemplo, usando una PCRq que usa cebadores que amplifican las secuencias habituales de todos los vectores) y la toxicidad (por ejemplo, usando un análisis histológico) pueden ser cuantificadas.

Tamaño del grupo. El criterio de éxito primario puede ser el nivel del IGFI en el suero, que tiene un coeficiente de variación del 20 %. Para detectar una diferencia del 30 % en el IGFI en el suero entre los grupos, asumiendo un error  $\alpha$  del 0,05 y un error  $\beta$  del 0,10, se requerirá un tamaño del grupo de  $n = 10$ .

### EJEMPLO 3: la administración del AAV8 que codifica la urocortina-2 aumenta la función cardíaca

Este ejemplo muestra que, en algunas realizaciones alternativas de los métodos de esta invención, un transgen paracrino actúa como una hormona y tiene efectos cardíacos después de ser liberado en la circulación desde un sitio distante. Este ejemplo de metodología puede sortear el problema de alcanzar un elevado rendimiento en la transferencia génica cardíaca, y permite que los pacientes sean tratados mediante una inyección sistémica durante una visita a la consulta. Adicionalmente, este ejemplo de metodología puede eliminar la necesidad de un suministro intravenoso (IV) de péptidos terapéuticos, y sortear así las repetidas y prolongadas estancias en el hospital, la elevada morbilidad y los enormes costes económicos. En algunas realizaciones alternativas, el vector más adecuado para conseguir estos objetivos es un virus adenoasociado de tipo 8 (AAV8), que proporciona una expresión amplia y a largo plazo después de su administración intravenosa en roedores, en cerdos y en primates.

En algunas realizaciones alternativas de los métodos se usa la urocortina-2, un recientemente descubierto péptido vasoactivo de la familia del factor de liberación de la corticotropina, como un transgen terapéutico. La urocortina-2 puede actuar a través de los receptores del factor de liberación de la corticotropina de tipo 2, que son fuertemente expresados en el corazón y en la vasculatura. Los estudios con animales y pacientes con una insuficiencia cardíaca congestiva han mostrado unos efectos hemodinámicos favorables de las infusiones del péptido de urocortina-2, incluyendo un aumento en la función cardíaca independiente de la carga, lo que indica un efecto cardíaco directo. Hemos establecido que la administración intravenosa del AAV8 usando el promotor de la  $\beta$ -actina de pollo proporciona unos elevados niveles sostenidos en el suero de la UCn2 y aumenta la función del corazón con insuficiencia en el ratón.

Para seleccionar las mejores realizaciones específicas para llevar a la práctica este aspecto de la invención, pueden llevarse a cabo estudios con ratones y cerdos, por ejemplo: a) determinar la expresión regulada del transgen para permitir un ajuste fino de los niveles plasmáticos del transgen, y activar e inactivar la expresión según sea necesario; y b) determinar la seguridad, la eficacia y el mecanismo de acción de la transferencia génica de la urocortina-2, usando este ejemplo de metodología de acción paracrina en un modelo de animal aceptado en la técnica, un modelo de ratón de la ICC. También, el uso de cerdos normales puede determinar: a) la dosis de vector mínimamente eficaz necesaria para aumentar la UCn2 en el suero; b) la biodistribución del vector y del transgen; y c) la toxicidad.

Las potenciales ventajas de los métodos de transferencia génica paracrina de la invención con respecto a la infusión por vía IV del péptido se muestran en la Tabla 1 (más arriba). En algunas realizaciones alternativas, la práctica de los métodos de la invención permite sortear la infección y reducir las repetidas y prolongadas visitas en el hospital, reduciendo así los costes. En algunas realizaciones alternativas, el suministro sistémico del vector es una ventaja en la transferencia génica paracrina, al proporcionar el mayor nivel de expresión para cualquier dosis dada del AAV. La potencial seguridad y eficacia de esta metodología se demostró recientemente en un ensayo clínico de terapia génica en fase temprana en pacientes con hemofilia B<sup>2</sup>, un estudio que ha restaurado la esperanza en la terapia génica. En algunas realizaciones alternativas, los métodos de transferencia génica paracrina de la invención pueden ser adecuados para cualquier péptido en circulación que tenga unos efectos cardiovasculares beneficiosos.

En algunas realizaciones alternativas, el AAV se usa para permitir una expresión más larga del transgen que del adenovirus, y evitar la mutagénesis por inserción asociada con el retrovirus. Se ha demostrado una expresión persistente del transgen en animales grandes, años después de una única inyección de los vectores AAV<sup>6-10</sup>. Nosotros hemos confirmado esto en ratones<sup>11</sup> y en ratas. Aunque en los ensayos clínicos recientes se ha encontrado que algunos serotipos del AAV desencadenan respuestas inmunitarias después de una inyección IM<sup>12,13</sup>, la nueva generación de vectores AAV (los AAV5, 6, 8 y 9) no tienen problemas similares<sup>14</sup>. El suministro por vía IV del AAV es superior al IM con respecto a los niveles del transgen en el suero, y el AAV9 y el AAV8 son superiores al AAV5<sup>15</sup> (y datos no publicados). Además, los anticuerpos anti-AAV8 preexistentes no son tan

prevalentes en los seres humanos (19 %) como en otros serotipos del AAV, incluyendo el AAV1 y el AAV2 (50-59 %) <sup>16</sup>. Nuestros datos, ilustrados gráficamente en la Figura 11, indican que el AAV8 por vía IV es el vector y la vía de suministro óptimos para alcanzar unos niveles elevados y sostenidos en el suero de la UCn2 en el suero para una metodología paracrina. La Figura 11 ilustra los datos del: suministro por vía IV del AAV9.CMV.UCn2 (9.CMV), del AAV9.CBA.UCn2 (9.CBA) con respecto al AAV8.CBA.UCn2 (8.CBA); en la que los datos indicaban que todos los vectores estaban asociados con unos aumentos sustanciales en la UCn2 en el suero 6 semanas después. Las cifras de las barras indican el tamaño de la muestra para cada grupo; valor de p del ANOVA. ITR, repetición terminal invertida; SVpA, poliA del genoma vírico del SV40; UCn2, urocortina-2; CBA, promotor de la  $\beta$ -actina de pollo; potenciador del CMV, potenciador del citomegalovirus humano.

A pesar de su robustez en el músculo estriado, el promotor del CMV es susceptible a la metilación y la inactivación en el hígado <sup>17</sup>, y nuestros datos indican que los promotores menos susceptibles a la metilación son superiores. De hecho, aunque el CMV proporcionó un aumento sostenido de 2 veces en la UCn2 después del suministro por vía IV del vector, el uso del promotor de la  $\beta$ -actina de pollo (CBA) dio como resultado un aumento de 15,7 veces en la UCn2 en el suero, según se ilustra en la Figura 11. También puede usarse el promotor de la globulina de unión a la hormona tiroidea específico de los hepatocitos (TBG).

En algunas realizaciones alternativas, las construcciones y los métodos de la invención proporcionan una expresión regulada, por ejemplo, la inactivación de la expresión. Debido al potencial de la expresión a largo plazo conferido por la transferencia génica con el AAV, es deseable la capacidad de inactivar la expresión en el caso de que se produzcan unos efectos adversos. La expresión regulada también permite la flexibilidad de un suministro intermitente del transgen en lugar de constante. En algunas realizaciones alternativas, las construcciones y los métodos de la invención usan sistemas de expresión regulados tales como, por ejemplo: ecdisona, tamoxifeno, tetraciclina, rapamicina <sup>18-21</sup>. El tamaño del sistema de ecdisona requiere una estrategia con dos vectores, y el tamoxifeno presenta problemas de toxicidad. Los sistemas de regulación con tetraciclina y rapamicina (Tabla 2) se han ensayado en modelos con animales grandes <sup>9,10,22-26</sup>.

**Tabla 2. Regulación con tetraciclina frente a la de rapamicina**

Característica	Tetraciclina	Rapamicina
Activador	Doxiciclina	AP22594
Expresión basal ("fuga")	Muy baja/ninguna	Ninguna
Dosis-respuesta lineal	Si	Si
Efectos secundarios del activador	Bajos (evitar durante el embarazo)	Inmunosupresor
Proteínas bacterianas/víricas	Si	No
Usada en ensayos clínicos	Todavía no	Todavía no

*TG, transgen; AP22594, análogo oral de rapamicina, 100 veces menos supresión inmunitaria con respecto a la rapamicina <sup>11</sup>*

En algunas realizaciones alternativas, las construcciones y los métodos de la invención usan un sistema de regulación tet, que ha sido ampliamente estudiado <sup>27</sup>. Al contrario que las construcciones previas de rTA, las variantes de rTA de esta invención (por ejemplo, el rTA2<sup>S</sup>-M2), proporcionan una robusta expresión dependiente de tet sin ninguna actividad basal (es decir, ninguna "fuga") <sup>11,26,28,29,30</sup> y una sensibilidad 10 veces mayor a la tetraciclina (máxima expresión de la activación del transgen a 0,1  $\mu$ g/ml) <sup>30</sup>. Una única dosis diaria de doxiciclina de 10-20 mg puede ser suficiente para completar la activación de la expresión del transgen en sujetos humanos <sup>26,31</sup>. Las dosis de 200 mg/día son bien toleradas por los pacientes que usan doxiciclina oral de forma crónica para el acné y las infecciones crónicas <sup>31,32</sup>. Las tetraciclinas pueden atenuar la actividad de la metaloproteinasas de la matriz (MMP) y afectar al remodelado del VI cuando son administradas en los primeros pocos días después de un IM <sup>24</sup>. Hemos demostrado previamente que la doxiciclina no influye en el remodelado del VI, en la expresión del TIMP o de la MMP en el modelo murino propuesto de una ICC inducida por un IM en el que la doxiciclina se administra 5 semanas después del IM <sup>25</sup>. En el entorno clínico, la tetraciclina no se usará en la fase aguda del IM.

Las respuestas inmunitarias frente a los componentes del sistema rTA, un potencial problema, no fueron identificadas en un estudio de transferencia génica del AAV4.tet y del AAV5.tet (intrarretinal) en primates no humanos <sup>9</sup>, en el que la expresión dependiente de tetraciclina del transgen persistió durante los 2,5 años de duración del estudio. No observamos inflamación en los corazones de ratón que expresan unos elevados niveles de rTA <sup>25,28,29</sup>, ni en ratones después de la expresión regulada del IGFI mediada por el AAV5 usando el elemento de regulación rTA2<sup>S</sup>-M2 <sup>11</sup>. Parece que el suministro IM del AAV.tet en primates no humanos, al contrario que el suministro intrarretinal o vascular, sí que da lugar a una atenuación de la expresión regulada, debido a las respuestas inmunitarias frente a los componentes bacterianos y víricos de la proteína de fusión transactivadora <sup>33</sup>. Las respuestas inmunitarias frente al regulador tet y al sistema de regulación de rapamicina, que no posee proteínas bacterianas ni víricas y no está asociada con la provocación de la respuesta inmunitaria, pueden ser ensayadas de forma simultánea <sup>10</sup>. Véase la Tabla 2 para ver las ventajas y las limitaciones de la regulación por tet y rapamicina.

En el sistema de regulación por rapamicina, la expresión del transgen es desencadenada por concentraciones nanomolares de rapamicina o de un análogo de rapamicina, que es dependiente de la dosis y reversible <sup>21</sup>. La rapamicina se usa clínicamente para suprimir la respuesta inmunitaria, previene los efectos perjudiciales del

envejecimiento en ratones<sup>23</sup> e inhibe el glioblastoma multiforme<sup>34</sup> al bloquear el objetivo de mamífero de la ruta de señalización de la rapamicina (mTOR)<sup>35</sup>. El análogo oral de la rapamicina AP22594, que activa la expresión del transgen tan eficazmente como la rapamicina, muestra una mínima supresión inmunitaria, y no inhibe la mTOR<sup>10,35-37</sup>. Pueden usarse cerdos para determinar la relación entre la dosis y la respuesta del AP22594 administrado por vía oral, y sus intervalos de dosificación requeridos, partiendo de unas dosis orales similares a las usadas eficazmente en macacos (0,45 mg/kg, una vez por semana)<sup>10</sup>.

En algunas realizaciones alternativas, las construcciones y los métodos de la invención expresan *in vivo* la urocortina-2, que incluye aminoácidos de la UCn1, de la UCn2 y de la UCn3 (38-40 (aa)), que pertenece a la familia del factor de liberación de la corticotropina (CRF). Estos péptidos pueden estimular los receptores del factor de liberación de la corticotropina 1 y 2 (CRF1, CRF2). La UCn1 se une al CRFR1 y al CRFR2, pero la UCn2 y la UCn3 se unan exclusivamente al CRFR2<sup>38-41</sup>, que son expresados en los miocitos cardiacos, en la vasculatura, en el intestino, en el cerebro y en el músculo esquelético<sup>42,43,44</sup>. Aunque la UCn1 se encontró en una inflamación inducida por LPS y estaba implicada en la permeabilidad tisular<sup>45,46</sup>, los efectos de la UCn2, que son diversos, se han asociado con unos efectos biológicos favorables, debido en parte a su afinidad por el CRFR2. Los efectos de la UCn2 no son totalmente dependientes del AMPc. Por ejemplo, la desensibilización del CRFR2 después de la unión de la UCn2 induce la señalización PI3K/Akt a través de la translocación de la  $\beta$ -arrestina. Además, se produce un aumento en la señalización ERK1/2 a través de la disociación de las subunidades de la proteína G  $\beta$  y  $\gamma$ <sup>47,48</sup>. Estos acontecimientos independientes del AMPc contribuyen a reducir la apoptosis en los miocitos cardiacos. Las infusiones peptídicas de la UCn2 en la ICC preclínica y clínica han demostrado de forma coherente unos efectos favorables sobre la función del VI, y una reducida activación del eje adrenosimpático<sup>49-51</sup>.

Según se recoge en la siguiente Tabla 3, entre los muchos efectos beneficiosos, la infusión de UCn2 usando los métodos y las composiciones de la invención, puede aumentar la función contráctil independientemente de las condiciones de carga, lo que indica unos efectos cardiacos directos<sup>52</sup>. Los mecanismos de los efectos inotrópicos no han sido definidos. Algunos estudios recientes sugieren unos efectos beneficiosos sobre la manipulación del  $Ca^{2+}$ <sup>53</sup>, la duración del potencial de acción<sup>54</sup>, la lesión por isquemia y reperusión<sup>55-57</sup> y el sistema renina-aldosterona<sup>49</sup>. La seguridad y la eficacia de la infusión de la UCn2 ha sido confirmada en modelos de ICC de animales grandes<sup>58,59</sup>, y en sujetos humanos normales y en pacientes con una ICC<sup>50,51</sup>. Una editorial reciente promueve su uso en la ICC de la Clase 3 y 4<sup>60</sup>.

**Tabla 3. Urocortina-2: efectos cardiovasculares beneficiosos**

Característica	Mecanismo	Especie	Ref
↓ SVR	Vasodilatación a través del CRFR2	M, S, H	44, 57-59
↑ GC y FE	Inotropo; vasodilatación	M, S, H	44, 57-59
↓ Trabajo cardíaco	↓ SVR y LAP	M, S, H	44, 57-59
↑ Función diastólica del VI	Lusotropo	M, R, S, H	44, 52, 56
↑ Diuresis	↑ RBF y la excreción de Na; ↓ RAS	S, H	49, 57-59
↓ Función del VI en la ICC	Se notifican todos los anteriores	M, R, S, H	44, 49, 56, 57, 59
↓ Lesión por IR en el VI y apoptosis	Desconocido	M, R	53-55

*SVR resistencia sistémica vascular; CRFR2, receptor del factor de liberación de la corticotropina 2; GC, gasto cardíaco; FE, fracción de eyección ventricular izquierda; VI, ventrículo izquierdo; LAP, presión auricular derecha; RBF, flujo sanguíneo renal, RAS, sistema renina-angiotensina; CM, miocito cardíaco; IR, isquemia y reperusión, M, ratón; R. rata; S, oveja; H, ser humano*

Dado que la semivida plasmática de la UCn2 es de 15 min<sup>51</sup>, se requiere una infusión crónica. Por el contrario, en algunas realizaciones alternativas, la transferencia génica de acción paracrina de la UCn2 de la invención puede sortear los impedimentos asociados con las infusiones peptídicas crónicas, según se recoge en la Tabla 1, más arriba. Al expresar únicamente la UCn2 específica de especie en las dos especies propuestas, se anularán las respuestas inmunitarias frente al transgen.

*Viabilidad de la transferencia génica de acción paracrina.* Hemos probado que la transferencia génica paracrina a través de una inyección IM del AAV5 que codifica el Factor de Crecimiento Insulinoide-I (AAV5.IGFI) mejora la función de la rata con insuficiencia<sup>11</sup>. Ahora también hemos demostrado que el suministro por vía IV del AAV8 que codifica la UCn2 no sólo proporciona unos elevados niveles sostenidos en el suero de la UCn2 (> 15 veces de aumento), sino que también aumenta la función de los corazones normales y con insuficiencia.

*Selección del vector AAV y del promotor.* A partir de estudios previamente publicados, era evidente que el AAV8 o el AAV9 por vía IV proporcionarían unos mayores niveles de expresión del transgen que otros serotipos del AAV, y los promotores del CMV o de la CBA, que generalmente son los más robustos, serían óptimos. Por lo tanto, diseñamos un vector AAV8 y dos AAV9 que codifican la UCn2 murina guiados por el CMV o la CBA para determinar qué vector aumentaría de forma más eficaz la UCn2 en el suero, según se ilustra en la Figura 11. Se usó un ELISA específico

para la UCn2 disponible comercialmente. El AAV9.CMV elevó la UCn2 en el suero 2,3 veces, lo que, aunque menor que los otros 2 vectores, puede ser suficiente para una respuesta terapéutica. Sin embargo, el AAV8.CBA se asoció con un aumento de 15,7 veces en la UCn2 en el suero (AAVB.CBA.UCn2:  $109 \pm 7$  ng/ml,  $n = 9$ ; Control:  $7 \pm 1$  ng/ml). Dicho elevado nivel de la UCn2 en el suero permitiría reducir la dosis del AAV8. La superioridad del AAV8.CBA y del AAV9.CBA con respecto al AAV9.CMV puede reflejar bien la robustez relativa del CBA o bien la susceptibilidad del CMV a la metilación y la inactivación en el hígado<sup>17</sup>. Por lo tanto, seleccionamos el AAV8.CBA para estudios adicionales.

Distribución y expresión del AAV8.CBA.UCn2 después de un suministro intravenoso. En algunas realizaciones alternativas, las construcciones y los métodos de la invención expresan *in vivo*, mediante una estrategia de transferencia génica de acción paracrina, la UCn2, y pueden usarse para aumentar los niveles de la UCn2 en el suero. Algunas realizaciones alternativas no requieren que esté presente la expresión de la UCn2 en el corazón *per se*, debido a que son los efectos de la UCn2 en circulación y sus efectos sobre el corazón y la vasculatura lo que proporcionará los efectos terapéuticos del transgen, efectos que no requieren la expresión de la UCn2 en los propios miocitos cardiacos.

Expresión hepática de la UCn2. El aumento de 15,7 veces en la UCn2 en el suero documentado 6 semanas después del suministro por vía IV del AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$  cg; véase la Figura 11) estaba asociado con un aumento dependiente del tiempo en la expresión del ARNm de la UCn2 en el hígado, según se ilustra en la Figura 12, que tuvo una meseta a las 4-6 semanas después del suministro, lo que se correlacionaba bien con el aumento estacionario en la UCn2 en el suero. La Fig 12A ilustra gráficamente el curso temporal de la expresión del ARNm de la UCn2 en el hígado después del AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$  cg, por vía IV). La expresión de la UCn2 en el hígado (cada barra es el valor medio de 2 ratones) alcanzó una meseta a las 4-6 semanas después del suministro, lo que se correlacionaba con la meseta observada en la UCn2 en el suero (datos no mostrados). La Fig 12B ilustra gráficamente los datos que muestran la expresión del ARNm de la UCn2 en el VI 6 semanas después del AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$  cg, por vía IV). Se observaron unos similares niveles elevados del ARNm de la UCn2 en muestras de músculo esquelético (datos no mostrados).

Expresión cardíaca de la UCn2. Aunque la expresión cardíaca de la UCn2 no es necesaria para los efectos beneficiosos de las terapias génicas de acción paracrina de la invención, hemos documentado unos sustanciales aumentos en la expresión del ARNm de la UCn2 en muestras del VI 6 semanas después del suministro por vía IV del AAV8.CBA.UCn2, véase la Figura 12B. En algunas realizaciones alternativas, una construcción de la invención, incluyendo, por ejemplo, el AAV8, que incluye la presencia de ADN del AAV8 y del ARNm de la UCn2, puede ser suministrada y/o expresada en cualquier órgano u otros órganos, incluyendo el músculo esquelético, el pulmón, el cerebro, el riñón, el bazo, el intestino delgado, la médula ósea.

Transferencia génica de la UCn2 en ratones normales. Para determinar si la transferencia génica de la UCn2 aumentaba la función del VI, suministramos el AAV8.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$  cg) o una solución salina (control) mediante un suministro intravenoso (IV) a ratones normales. Cinco semanas después de la transferencia génica de la UCn2, los ratones experimentaron un procedimiento invasivo en el que se colocaron catéteres Millar (1,4 F) en la cámara del VI para medir el desarrollo de la presión. La adquisición de los datos y los análisis estaban enmascarados para la identidad del grupo. La transferencia génica de la UCn2 aumentó la función contráctil del VI (+dP/dt del VI) (Fig 13A, izquierda); también se redujo la -dP/dt, lo que indica un aumento en la relajación del VI (Fig 13B, panel derecho). No se detectaron efectos adversos sobre la masa del VI, la histología o la estructura o la función del VI. La Fig. 3 ilustra gráficamente: la función del VI en ratones normales 6 semanas después del suministro por vía IV del AAV8.CBA.UCn2 (con respecto a los ratones de control, a los que se les inyectó una solución salina. Fig. 3A: +dp/dt del VI; Fig. 3B. -dP/dt del VI. Los valores representan la media  $\pm$  EE. El número de las barras representa el tamaño del grupo. La transferencia génica de la UCn2 aumentó tanto la función contráctil como la relajación cardíaca.

Transferencia génica de la UCn2 en ratones con una ICC. Usamos una oclusión coronaria izquierda proximal para inducir una ICC grave en ratones, un modelo que hemos usado ampliamente y que simula los aspectos de la ICC basada en una isquemia clínica<sup>25</sup>. Como se muestra en el protocolo (Fig 12A), 3 semanas después de la oclusión coronaria llevamos a cabo una ecocardiografía para confirmar la grave disfunción del VI y la dilatación de la cámara. Después asignamos aleatoriamente candidatos para recibir un suministro por vía IV del AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$  cg por ratón) o un volumen equivalente de solución salina. Cinco semanas después de la aleatorización, a los ratones se les realizaron repetidas ecografías y mediciones del desarrollo de la presión del VI y el deterioro y su primera derivada, +dP/dt del VI. La adquisición de los datos y los análisis estaban enmascarados para la identidad del grupo. A pesar de la notable disfunción del VI que había presente en el momento de la transferencia génica de la UCn2, el cambio en el área fraccional del VI (% del FAC), un sustituto de la fracción de eyección, aumentó (Fig 14B). La transferencia génica de la UCn2 también aumentó la función sistólica (+dP/dt del VI) y diastólica (-dP/dt del VI) del VI (Fig 14C). El pico de la +dP/dt del VI aumentó hasta un valor que se aproximaba a la normalidad, confirmando que la estrategia propuesta merece un desarrollo como una nueva terapia para la ICC. Las Figuras 14B y 14C ilustran los datos que muestran los efectos de la transferencia de la UCn2 sobre el corazón con insuficiencia: la Fig.14A: 3 semanas después del IM y del desarrollo de la ICC, los ratones recibieron el AAV8.UCn2 por vía IV o una solución salina; 5 semanas después de la transferencia génica (8 semanas después del IM), se evaluó la función del VI (estudios enmascarados); Fig.14B la transferencia génica de la UCn2 aumentó el cambio en el área fraccional del

VI (% del FAC); Fig.14C. la transferencia génica de la UCn2 aumentó el pico de la +dP/dt y el pico de la -dP/dt del VI, lo que indica unos notables beneficios en la función sistólica y diastólica del VI del corazón con insuficiencia.

Transferencia génica de la UCn2: efectos sobre la manipulación del  $Ca^{2+}$  cardiaco

La transferencia génica del C2.5.1.UCn2 altera la expresión de la SERCA2a. La transferencia génica del AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$  cg, por vía IV) estaba asociada con un aumento en la expresión del ARNm de la SERCA2a y de la proteína en muestras del VI obtenidas a partir de ratones 4 semanas después de la transferencia génica (Fig 15). Se anticiparía que estos cambios promoverían la disponibilidad del  $Ca^{2+}$  al miofilamento, y por lo tanto aumentarían tanto la función sistólica como la diastólica, como hemos observado en los corazones normales y con insuficiencia después de la transferencia génica de la UCn2 (Fig 13 y 14), proporcionando un mecanismo verosímil mediante el cual la transferencia génica de la UCn2 aumenta la función del VI. Se han descrito unos efectos similares del péptido de la UCn2 en miocitos cardiacos aislados<sup>53</sup>.

La Fig. 15 ilustra los datos (Fig. 15A, mediante una gráfica, Fig. 15B, mediante una inmunoelectrotransferencia) en los que ratones normales recibieron un suministro por vía IV del AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$  cg) o solución salina (CON); y cuatro semanas después, las muestras del VI del grupo con la transferencia génica de la UCn2 mostró un aumento de 2 veces en la expresión de la proteína SERCA2a. La señal de la inmunoelectrotransferencia se normalizó al contenido en TnI. Los números de las barras indican el tamaño del grupo. Se anticiparía que estos cambios en la expresión de la SERCA2a promoverían la disponibilidad del  $Ca^{2+}$  al miofilamento, y por lo tanto aumentarían la función sistólica y la diastólica.

Transferencia génica de la UCn2 y aumentos transitorios del  $Ca^{2+}$ . Se aislaron miocitos cardiacos (CM) a partir de ratones 4 semanas después del AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$  cg, por vía IV). Los ratones que habían recibido una solución salina por vía IV se usaron como controles. Durante la medición, los miocitos cardiacos de los ratones con la UCn2 se incubaron con el péptido de la UCn2 a 24 nM para simular los niveles de la UCn2 en el suero *in vivo*. Los miocitos cardiacos de los ratones que recibieron la transferencia génica de la UCn2 mostraron una alteración en los aumentos transitorios del  $Ca^{2+}$  con una t1/2 reducida, según se ilustra en la Figura 16: los aumentos transitorios del  $Ca^{2+}$  después de la transferencia génica de la UCn2: la Fig. 16A ilustra gráficamente que la transferencia génica de la UCn2 aumentó la velocidad de disminución del  $Ca^{2+}$ ; la Fig. 16B ilustra gráficamente que la disminución transitoria con el tiempo del  $Ca^{2+}$  estaba acortada en los miocitos cardiacos de los ratones que habían recibido la transferencia génica de la UCn2 4 semanas antes. Los experimentos se repitieron tres veces. Las barras indican la media + EE; las cifras de las barras indican el número de miocitos cardiacos; las cifras por encima de las barras indican el valor de p.

La UCn2 es cardioprotectora. Para ensayar los efectos de la UCn2 sobre la lesión hipóxica, tratamos los miocitos cardiacos de rata neonatal cultivados con azida de sodio ( $NaN_3$ ), que se une irreversiblemente al cofactor hemo en la oxidasa de citocromo e inhibe la respiración mitocondrial, simulando una citotoxicidad inducida por hipoxia. El tratamiento con la UCn2 protegió a los miocitos cardiacos frente a la lesión, según se refleja morfológicamente y por la reducida liberación de LDH, según se ilustra en la Figura 17. La UCn2 también protege a los miocitos cardiacos aislados de la lesión por hipoxia y reoxigenación ( $p < 0,001$ ; datos no mostrados). La Figura 17 muestra los datos de que la UCn2 protege a los miocitos cardiacos de rata neonatal cultivados frente a la lesión hipóxica: la Fig. 17A ilustra que la UCn2 (60 nM) preserva la normalidad morfológica 24 h después del tratamiento con  $NaN_3$  (10 mM); la Fig. 17B ilustra gráficamente que la UCn2 redujo la liberación de LDH después del tratamiento con  $NaN_3$  ( $p < 0,001$ ).

Efecto sobre el CREB y la  $\beta$ -catenina. Se obtuvieron muestras del VI a partir de ratones 4 semanas después del AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$  cg, por vía IV). Los ratones que habían recibido una solución salina por vía IV se usaron como controles. Las muestras del VI de los ratones que habían recibido la transferencia génica de la UCn2 mostraron un aumento de la fosforilación del CREB (un aumento de 3 veces,  $p < 0,01$ , Fig 18A). El CREB es un factor de transcripción que permite la expresión génica mediada por el CRE en el corazón. Además, la transferencia génica de la UCn2 se asoció con un aumento de 2 veces en la fosforilación de la  $\beta$ -catenina del VI ( $p < 0,0001$ , Fig 18B). El aumento de la fosforilación de la  $\beta$ -catenina reduce la acumulación de la  $\beta$ -catenina en los discos intercalados de los miocitos cardiacos, y por lo tanto reduce la rigidez cardíaca y la disfunción diastólica. Esto puede contribuir a nuestra observación de que la transferencia génica de la UCn2 aumenta la relajación del VI en los corazones normales y con insuficiencia. La Figura 18 ilustra gráficamente que se detectó la fosforilación tanto del CREB (Fig. 18A) como de la  $\beta$ -catenina (Fig. 18B) en muestras del VI 4 semanas después del suministro por vía IV del UCn2.CBA.UCn2. Los ratones de control recibieron solución salina por vía IV.

Efectos no cardiacos de la transferencia génica de la UCn2. El suministro por vía IV del AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$  cg) tiene un efecto favorable sobre el metabolismo de la glucosa - un efecto antidiabético. Por ejemplo, los ratones que recibieron la transferencia génica de la UCn2 son resistentes a la hiperglicemia inducida por una dieta rica en grasas (HFD), un modelo de diabetes de tipo 2 usado en estudios preclínicos (Fig 19A). Los reducidos niveles de glucosa son debidos al aumento en la utilización de la glucosa, según se observa en la prueba de tolerancia a la glucosa de los ratones alimentados con la HFD (Fig 19B). La Figura 19 ilustra los datos que muestran que la UCn2 afecta a la regulación de la glucosa. Los ratones recibieron un suministro por vía IV del AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$

cg, n = 8) o solución salina (n = 8), y comida normal durante 3 semanas. Se observó una pequeña reducción en la glucosa sanguínea en ayunas en el grupo con la UCn2. Después, los ratones recibieron una dieta rica en grasas (HFD) durante 8 semanas. Se observó una hiperglicemia en los controles, como se esperaba, pero los ratones con la UCn2 mantuvieron unos niveles de glucosa sanguínea normales. Fig. 19B. Los ratones recibieron un suministro por vía IV del AAV8.CBA.UCn2 ( $5 \times 10^{11}$  cg, n = 8) o solución salina (n = 8) y HFD durante 2 meses, y se llevaron a cabo las pruebas de tolerancia a la glucosa. Los ratones en ayunas recibieron glucosa (2 mg/g de peso corporal, por vía IP) y se midieron los niveles de glucosa. Los resultados indican que la transferencia génica de la UCn2 promueve la utilización de la glucosa y protege frente a una hiperglicemia inducida por la dieta.

La Figura 20 ilustra ejemplos de construcciones de la invención: abreviaturas: ITR, repetición terminal invertida; TRE, elemento de respuesta a la tetraciclina; SVpA, poliA del genoma vírico del SV40 (bidireccional); rtTA2SM2, transactivador inverso controlado por tetraciclina; SV40en, potenciador del virus de simio 40; TBG Prom, promotor de la globulina de unión a la hormona tiroidea; RSV Prom, promotor del virus del sarcoma de Rous; FRB-p6, parte de la FRAP, una proteína de interacción con la rapamicina, combinada con una subunidad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (p65); IRE, sitio de reentrada de la transcripción interna; ZF, dominio de unión al ADN en dedo de cinc HD1; FKBP, proteína de unión a la FK506; pA, segmento mínimo de poliadenilación; ZBD, dominio de unión al ADN en dedo de cinc HD (8 copias).

Referencias:

- 1 Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB et al. Heart disease and stroke statistics-2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012; 125: e2-e220. PMID: 22179539
- 2 Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 2011; 365: 2357-2365. PMID: PMC3265081
- 3 Buchlis G, Podsakoff GM, Radu A, Hawk SM, Flake AW, Mingozi F et al. Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood* 2012; en la prensa. PMID: 22271447
- 4 Flotte TR, Trapnell BC, Humphries M, Carey B, Calcedo R, Rouhani F et al. Phase 2 clinical trial of a recombinant adeno-associated viral vector expressing alpha1-antitrypsin: interim results. *Hum Gene Ther* 2011; 22: 1239-1247. PMID: PMC3205788
- 5 Brantly ML, Spencer LT, Humphries M, Conlon TJ, Spencer CT, Poirier A et al. Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 alpha1-antitrypsin (AAT) vector in AAT-deficient adults. *Hum Gene Ther* 2006; 17: 1177-1186. PMID: 17115945
- 6 De BP, Heguy A, Hackett NR, Ferris B, Leopold PL, Lee J et al. High levels of persistent expression of alpha1-antitrypsin mediated by the nonhuman primate serotype rh.10 adeno-associated virus despite preexisting immunity to common human adeno-associated viruses. *Mol Ther* 2006; 13: 67-76. PMID: 16260185
- 7 Gao GP, Lu Y, Sun X, Johnston J, Calcedo R, Grant R et al. High-level transgene expression in nonhuman primate liver with novel adeno-associated virus serotypes containing self-complementary genomes. *J Virol* 2006; 80: 6192-6194. PMID: PMC1472562
- 8 Nathwani AC, Rosales C, McIntosh J, Rastegarlarri G, Nathwani D, Raj D et al. Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol Ther* 2011; 19: 876-885. PMID: PMC3098629
- 9 Stieger K, Le Meur G, Lasne F, Weber M, Deschamps JY, Nivard D et al. Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol Ther* 2006; 13: 967-975. PMID: 16442848
- 10 Rivera VM, Gao GP, Grant RL, Schnell MA, Zoltick PW, Rozamus LW et al. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 2005; 105: 1424-1430. PMID: 15507527
- 11 Lai NC, Tang T, Gao MH, Saito M, Miyanochara A, Hammond HK. Improved function of the failing rat heart by regulated expression of insulin-like growth factor I via intramuscular gene transfer. *Hum Gene Ther* 2012; 23: 255-261. PMID: 22017392
- 12 Mingozi F, Meulenber JJ, Hui DJ, Basner-Tschakarjan E, Hasbrouck NC, Edmonson SA et al. AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* 2009; 114: 2077-2086. PMID: PMC2744569
- 13 Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006; 12: 342-347. PMID: 16474400
- 14 Hildinger M, Auricchio A, Gao G, Wang L, Chirmule N, Wilson JM. Hybrid vectors based on adeno-associated virus serotypes 2 and 5 for muscle-directed gene transfer. *J Virol* 2001; 75: 6199-6203. PMID: PMC114336
- 15 Fang H, Lai NC, Gao MH, Miyanochara A, Roth DM, Tang T, Hammond HK. Comparison of adeno-associated virus serotypes and delivery methods for cardiac gene transfer. *Hum Gene Ther Methods* 2012; Octubre de 17 [publicación electrónica previa a la impresión] PMID: 23075106
- 16 Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF, Masurier C. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther* 21: 704-712, 2010

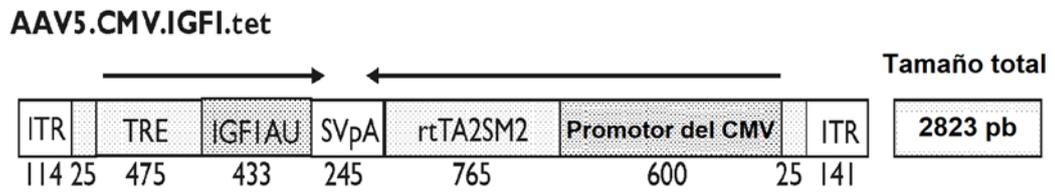
- 17 Everett RS, Evans HK, Hodges BL, Ding EY, Serra DM, Amalfitano A. Strain-specific rate of shutdown of CMV enhancer activity in murine liver confirmed by use of persistent [E1(-), E2b(-)] adenoviral vectors. *Virology* 2004; 325: 96-105. PMID: 15231389
- 5 18 Hoppe UC, Marban E, Johns DC. Adenovirus-mediated inducible gene expression in vivo by a hybrid ecdysone receptor. *Mol Ther* 2000; 1: 159-164. PMID: 10933926
- 19 Sipo I, Wang X, Hurtado Pico A, Suckau L, Weger S, Poller W et al. Tamoxifen-regulated adenoviral E1A chimeras for the control of tumor selective oncolytic adenovirus replication in vitro and in vivo. *Gene Ther* 2006; 13: 173-186. PMID: 16136163
- 10 20 Goverdhan S, Puntel M, Xiong W, Zirger JM, Barcia C, Curtin JF et al. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther* 2005; 12: 189-211. PMID: PMC2676204
- 21 Rivera VM, Clackson T, Natesan S, Pollock R, Amara JF, Keenan T et al. A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med* 1996; 2: 1028-1032. PMID: 8782462
- 15 22 Stieger K, Belbellaa B, Le Guiner C, Moullier P, Rolling F. In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 527-541. PMID: 19394373
- 23 Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 2009; 460: 392-395. PMID: PMC2786175
- 24 Villarreal FJ, Griffin M, Omens J, Dillmann W, Nguyen J, Covell J. Early short-term treatment with doxycycline modulates postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation* 2003; 108: 1487-1492.
- 20 25 Lai NC, Tang T, Gao MH, Saito M, Takahashi T, Roth DM et al. Activation of cardiac adenylyl cyclase expression increases function of the failing ischemic heart in mice. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 1490-1497. PMID: 18402905
- 26 Stieger K, Mendes-Madeira A, Meur GL, Weber M, Deschamps JY, Nivard D et al. Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression: a key step towards gene therapy of retinal diseases. *Gene Ther* 2007; 14: 1668-1673. PMID: 17914405
- 25 27 Goverdhan S, Puntel M, Xiong W, Zirger JM, Barcia C, Curtin JF, Soffer EB, Mondkar S, King GD, Hu J, Sciascia SA, Candolfi M, Greengold DS, Lowenstein PR, Castro MG. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther* 12: 189-211,2005
- 28 Gao MH, Bayat H, Roth DM, Yao Zhou J, Drumm J, Burhan J et al. Controlled expression of cardiac-directed adenylyl cyclase type VI provides increased contractile function. *Cardiovasc Res* 2002; 56: 197-204. PMID: 12393090
- 30 29 Tang T, Hammond HK, Firth A, Yang Y, Gao MH, Yuan JXJ, Lai NC. Adenylyl cyclase 6 improves calcium uptake and LV function in aged heart. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57: 1846-1855. PMID: 21527140
- 35 30 Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W. Exploring the sequence space for tetracycline- dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7963-7968, 2000
- 31 Rolain JM, Mallet MN, Raoult D. Correlation between serum doxycycline concentrations and serologic evolution in patients with *Coxiella burnetii* endocarditis. *J Infect Dis* 2003; 188: 1322-1325. PMID: 14593588
- 40 32 Berman B, Perez OA, Zell D. Update on rosacea and anti-inflammatory-dose doxycycline. *Drugs Today (Barc)* 2007; 43: 27-34. PMID: 17315050
- 33 Herzog RW, Hagstrom JN, Kung SH, Tai SJ, Wilson JM, Fisher KJ et al. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5804-5809. PMID: PMC20861
- 45 34 Minniti G, Muni R, Lanzetta G, Marchetti P, Enrici RM. Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. *Anticancer Res* 2009; 29: 5171-5184. PMID: 20044633
- 35 Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 21-35. PMID: 21157483
- 36 Yang W, Digits CA, Hatada M, Narula S, Rozamus LW, Huestis CM et al. Selective epimerization of rapamycin via a retroaldol/aldol mechanism mediated by titanium tetrakisopropoxide. *Org Lett* 1999; 1: 2033-2035. PMID: 10905864
- 50 37 Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 483-510. PMID: 8717522
- 38 Davidson SM, Rybka AE, Townsend PA. The powerful cardioprotective effects of urocortin and the corticotropin releasing hormone (CRH) family. *Biochem Pharmacol.* 2009; 77:141-150. PMID: 18817752
- 55 39 Perrin MH, Vale WW. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 885: 312-328. PMID: 10816663
- 40 Eckart K, Radulovic J, Radulovic M, Jahn O, Blank T, Stiedl O, Spiess J. Actions of CRF and its analogs. *Curr Med Chem.* 1999; 6:1035-1053. PMID: 10519912
- 41 Wiley KE, Davenport AP. CRF2 receptors are highly expressed in the human cardiovascular system and their cognate ligands urocortins 2 and 3 are potent vasodilators. *Br JPharmacol* 2004; 143: 508-514. PMID: PMC1575420
- 60 42 Imperatore A, Florio P, Torres PB, Torricelli M, Galleri L, Toti P, Occhini R, Picciolini E, Vale W, Petraglia F. Urocortin 2 and urocortin 3 are expressed by the human placenta, deciduas, and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195: 288-295. PMID: 16626608
- 65 43 Boorse GC, Denver RJ. Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Gen Comp Endocrinol.* 2006; 146:9-18. PMID: 16413023

- 44 Wiley KE, Davenport AP. CRF2 receptors are highly expressed in the human cardiovascular system and their cognate ligands urocortins 2 and 3 are potent vasodilators. *Br J Pharmacol* 143: 508-514, 2004
- 45 Singh LK, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Seretakis D, Green M, Theoharides TC. Potent mast cell degranulation and vascular permeability triggered by urocortin through activation of corticotropin-releasing hormone receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 288: 1349-1356. PMID: 10027877
- 5 46 Emeto TI, Moxon JV, Rush C, Woodward L, Golledge J. Relevance of urocortins to cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 51: 299-307. PMID: 21689660
- 47 Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM., International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol. Rev.* 2003; 55: 21-26. PMID: 12615952
- 10 48 Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, Vale WW. Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology*. 1993; 133:3 058-3061. PMID: 8243338
- 49 Hinkle RT, Donnelly E, Cody DB, Bauer MB, Isfort RJ. Urocortin II treatment reduces skeletal muscle mass and function loss during atrophy and increases nonatrophying skeletal muscle mass and function. *Endocrinology* 144: 4939-4946, 2003
- 15 50 Davis ME, Pemberton CJ, Yandle TG, Fisher SF, Lainchbury JG, Frampton CM, Rademaker MT, Richards AM. Urocortin 2 infusion in healthy humans: hemodynamic, neurohormonal, and renal responses. *J Am Coll Cardiol*. 30: 461-741, 2007
- 51 Davis ME, Pemberton CJ, Yandle TG, Fisher SF, Lainchbury JG, Frampton CM, Rademaker MT, Richards M. Urocortin 2 infusion in human heart failure. *Eur Heart J* 28: 2589-2597, 2007
- 20 52 Bale TL, Hoshijima M, Gu Y, Dalton N, Anderson KR, Lee KF, Rivier J, Chien KR, Vale WW, Peterson KL. The cardiovascular physiologic actions of urocortin II: acute effects in murine heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3697-3702, 2004
- 53 Yang LZ, Kockskamper J, Khan S, Suarez J, Walther S, Doleschal B, Unterer G, Khafaga M, Machler H, Heinzl FR, Dillmann WH, Pieske B, Spiess J. cAMP- and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases mediate inotropic, lusitropic and arrhythmogenic effects of urocortin 2 in mouse ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 162: 544-56, 2011
- 25 54 Meili-Butz S, Bühler K, John D, Buser P, Vale WW, Peterson KL, Brink M, Dieterle T. Acute effects of urocortin 2 on cardiac function and propensity for arrhythmias in an animal model of hypertension-induced left ventricular hypertrophy and heart failure. *Eur J Heart Fail*. 12: 797-804, 2010
- 30 55 Brar BK, Jonassen AK, Stephanou A, Santilli G, Railson J, Knight RA, Yellon DM, Latchman DS. Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem* 275: 8508-8514, 2000
- 56 Brar BK, Jonassen AK, Egorina EM, Chen A, Negro A, Perrin MH, Mjos OD, Latchman DS, Lee KF, Vale W. Urocortin-II and urocortin-III are cardioprotective against ischemia reperfusion injury: an essential endogenous cardioprotective role for corticotropin releasing factor receptor type 2 in the murine heart. *Endocrinology* 145: 24-35, 2004
- 35 57 Barry SP, Lawrence KM, McCormick J, Soond SM, Hubank M, Eaton S, Sivarajah A, Scarabelli TM, Knight RA, Thiemermann C, Latchman DS, Townsend PA, Stephanou A. New targets of urocortin-mediated cardioprotection. *J Mol Endocrinol* 45: 69-85, 2010
- 40 58 Rademaker MT, Charles CJ, Espiner EA, Fisher S, Frampton CM, Kirkpatrick CM, Lainchbury JG, Nicholls MG, Richards AM, Vale WW. Beneficial hemodynamic, endocrine, and renal effects of urocortin in experimental heart failure: comparison with normal sheep. *J Am Coll Cardiol* 40: 1495-1505, 2002
- 59 Miriam T, Rademaker MT, Charles CJ, Nicholls MG, Richards AM. Urocortin 2 inhibits furosemide-induced activation of renin and enhances renal function and diuretic responsiveness in experimental heart failure. *Circ Heart Fail* 2: 532-540, 2009
- 45 60 Tang WHW, Francis GS. Exploring new drugs for heart failure: the case of urocortin. *Eur Heart J* 28: 2561-2562, 2007
- 61 Haurigot V, Mingozzi F, Buchlis G, Hui DJ, Chen Y, Basner-Tschakarjan E, Arruda VR, Radu A, Franck HG, Wright JF, Zhou S, Stedman HH, Bellinger DA, Nichols TC, High KA. Safety of AAV factor IX peripheral transvenular gene delivery to muscle in hemophilia B dogs. *Mol Ther* 18: 1318-1329, 2010
- 50 62 Roth DA, McKirnan MD, Canestrelli I, Gao MH, Dalton N, Lai NC, Roth DM, Hammond HK. Intracoronary delivery of an adenovirus encoding fibroblast growth factor-4 in myocardial ischemia: effect of serum antibodies and previous exposure to adenovirus. *Human Gene Ther* 17: 230-238, 2006
- 63 Kaspar BK, Roth DM, Lai NC, Drumm JD, Erickson DA, McKirnan MD, Hammond HK. Myocardial gene transfer and long-term expression following intracoronary delivery of AAV. *J Gene Med* 7: 316-324, 2005.

## REIVINDICACIONES

1. Un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína o un péptido paracrino para su uso en un método para tratar, mejorar o proteger a un sujeto que padece una insuficiencia cardiaca congestiva que comprende proporcionar y administrar o suministrar el vector a una célula del sujeto, o a un sujeto en necesidad del mismo  
5 en el que la proteína o el péptido paracrino comprende una proteína o un péptido de la Urocortina-2 (UCn-2), y el vector es un virus adenoasociado (AAV).
2. El vector para su uso según la reivindicación 1, en el que la proteína o el péptido paracrino comprende adicionalmente: una Serelaxina de mamífero, una Relaxina-2, una Urocortina-1 (UCn-1), una Urocortina-3 (UCn-3), un Péptido Natriurético Cerebral, una Sintasa de Prostaciclina, una Hormona del Crecimiento, un Factor de Crecimiento Insulinoide-1 o cualquier combinación de los mismos; o, una Serelaxina humana, una Relaxina-2, una Urocortina-1, una Urocortina-3, un Péptido Natriurético Cerebral, una Sintasa de Prostaciclina, una Hormona del Crecimiento, un Factor de Crecimiento Insulinoide- 11, o cualquier combinación de los mismos.  
10  
15
3. El vector para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector es administrado o suministrado al individuo o al sujeto en necesidad del mismo por vía oral, mediante una inyección intramuscular (IM), mediante una inyección intravenosa (IV), mediante una inyección subcutánea (SC) o intradérmica, mediante una inyección intratecal, mediante una inyección intraarterial (IA), mediante una inyección intracoronaria, mediante una inhalación, mediante un aerosol o mediante un sistema de suministro de partículas biolístico, o mediante el uso de un "cañón de genes", de una pistola de aire o de un cañón de genes HELIOS™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).  
20
4. El vector para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que a una célula del sujeto se le administra un estímulo o una señal que induce la expresión del ácido nucleico, o que induce o activa un promotor que induce la expresión del ácido nucleico.  
25
5. El vector para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector está formulado en una formulación farmacéutica.  
30
6. El vector para su uso según la reivindicación 5, en el que el vector está formulado en una vesícula, un liposoma, una nanopartícula o una partícula nanolipídica (NLP).
7. El vector para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector está en una célula aislada o cultivada, y opcionalmente la célula es una célula de mamífero, una célula cardiaca o una célula humana, una célula de un primate no humano, una célula de mono, una célula de ratón, una célula de rata, una célula de cobaya, una célula de conejo, una célula de hámster, una célula de cabra, una célula bovina, una célula equina, una célula ovina, una célula canina o una célula felina.  
35  
40
8. El vector para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el vector está formulado o es suministrado con, en o junto con, una endoprótesis vascular, un órgano artificial o un implante.
9. El vector para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector expresa la proteína o el péptido paracrino *in vitro* o *ex vivo*.  
45
10. El vector para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector AAV se selecciona entre el AAV8, el AAV6, el AAV8, el AAV9 o el AAV.rh.10.
11. El vector para su uso según la reivindicación 10, en el que el vector AAV es el AAV8 o el AAV9.  
50
12. Un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína o un péptido de la urocortina 2 (UCn2) humana para su uso en el aumento de la función cardiaca en un sujeto en necesidad del mismo que comprende proporcionar y administrar o suministrar el vector a una célula del sujeto, o a un sujeto en necesidad del mismo, en el que el vector es un virus adenoasociado (AAV) AAV8 o AAV9.  
55
13. El vector para su uso según la reivindicación 12, en el que el vector está formulado en o en forma de una vesícula, de un liposoma, de una nanopartícula o de una partícula nanolipídica (NLP).
14. El vector para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector está formulado para su administración por vía oral, mediante una inyección intramuscular (IM), una inyección intravenosa (IV), una inyección subcutánea (SC) o intradérmica, una inyección intratecal, una inyección intraarterial (IA), una inyección intracoronaria, inhalación o una administración mediante aerosol, opcionalmente en el que la administración es mediante una inyección intravenosa (IV).  
60  
65

Figura 1



**Figura 2**

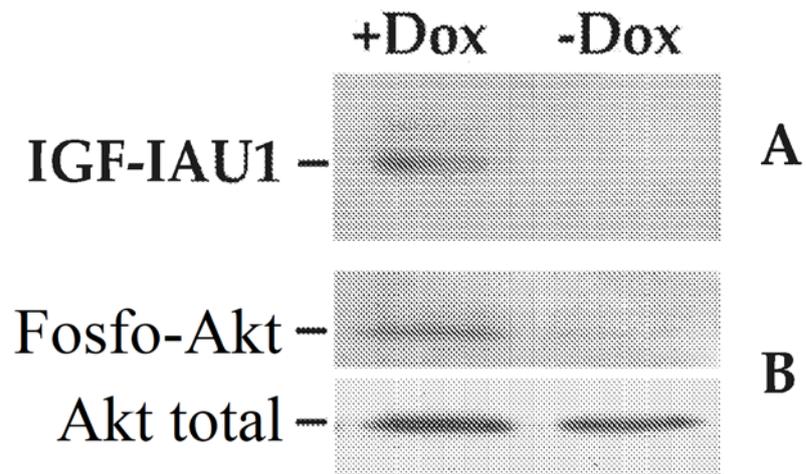


Figura 3  
*Expresión del IGF1 activada por la tetraciclina*

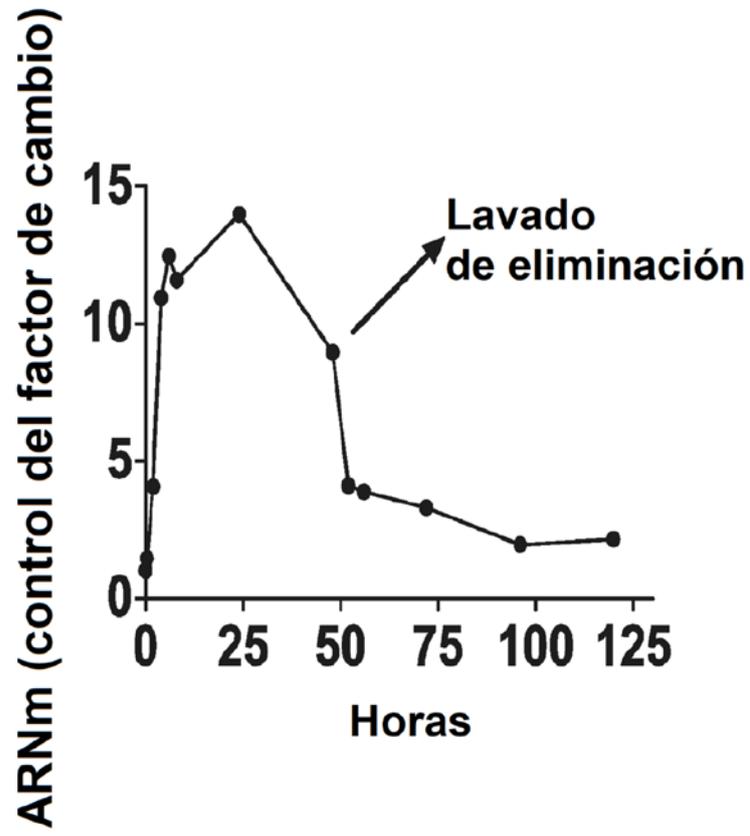


Figura 4A

Lado no inyectado

Lado inyectado

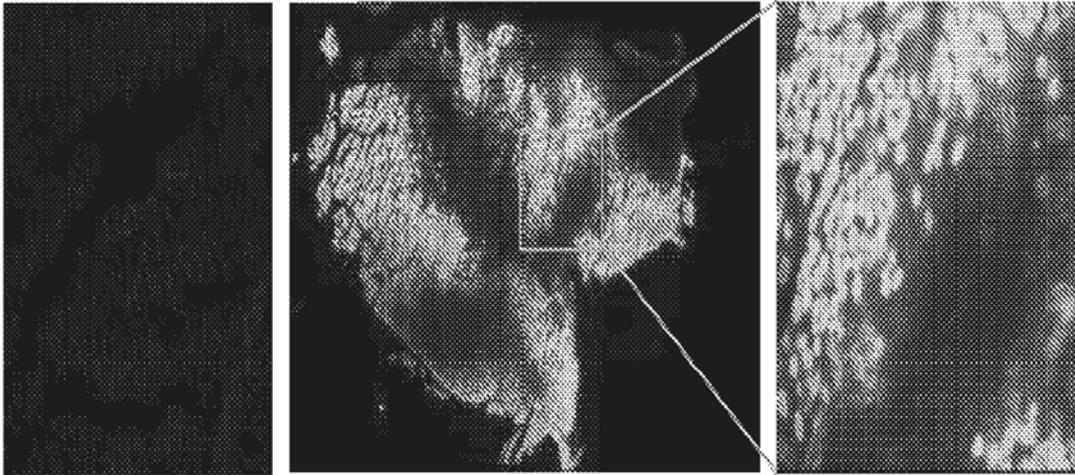


Figure 4B

Tabla 4. Ecocardiografía: efectos de la expresión del IGFI en el músculo esquelético en la ICC							
	IGF desactivado (9)			IGF activado (10)			P
	5 semanas después del IM	10 semanas después del IM	Cambio (%)	5 semanas después del IM	10 semanas después del IM	Cambio (%)	
FC -lpm-	341 ± 16	340 ± 9	-0,7 ± 14,1	355 ± 10	351 ± 10	-3,9 ± 10,2	0,85
DDF -mm-	10,0 ± 0,2	9,9 ± 0,4	-0,1 ± 0,3	9,8 ± 0,3	9,2 ± 0,3	-0,1 ± 0,4	0,56
DSF -mm-	7,9 ± 0,4	8,2 ± 0,5	0,3 ± 0,3	7,9 ± 0,5	7,1 ± 0,4	-0,9 ± 0,4	0,03
FE (%)	41 ± 3	39 ± 3	-1,4 ± 2,4	37 ± 4	45 ± 2	+8,6 ± 3,1	0,02

FC, frecuencia cardíaca; DDF, diámetro diastólico final; DSF, diámetro sistólico final; FE, fracción de eyección del VI. Los datos indican la media ± EE. Valores de probabilidad de un ANOVA bifactorial, que muestra el efecto del IGFI. Referencia 5

Figura 5

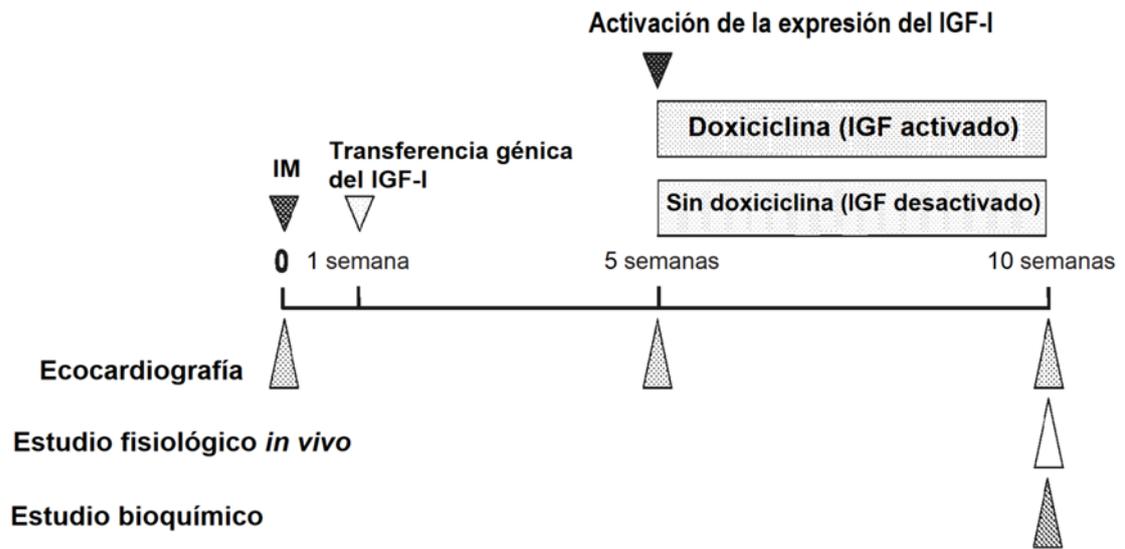


Figura 6

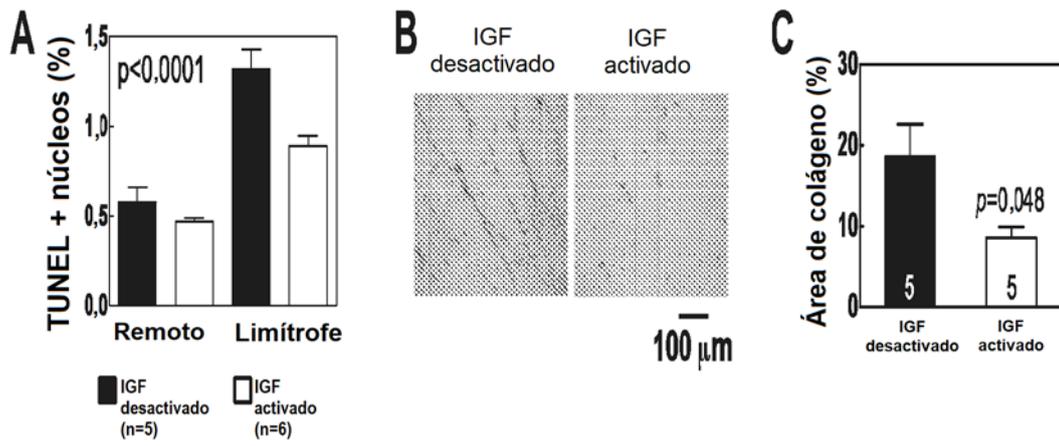


Figura 7

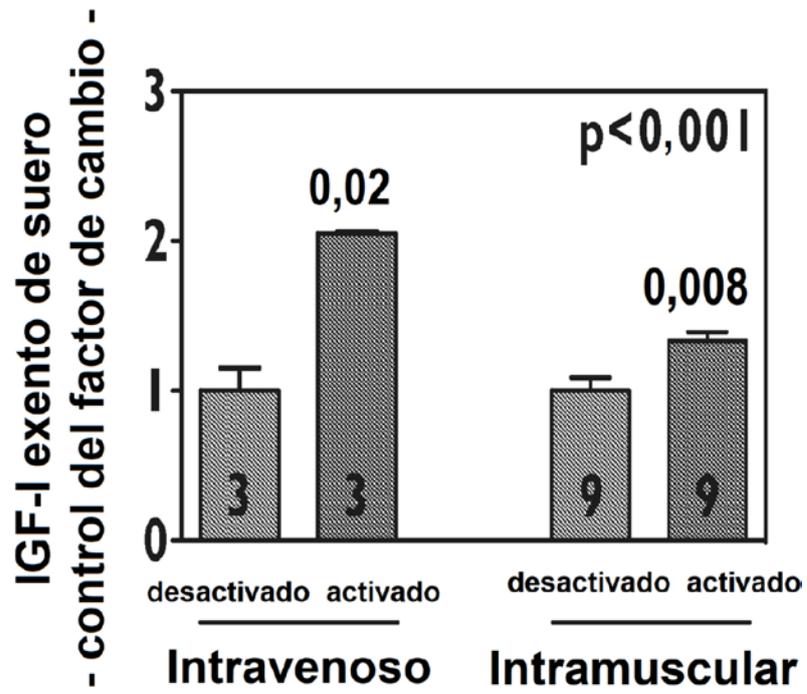
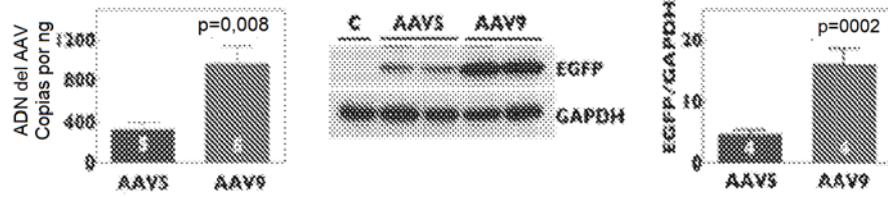


Figura 8

**AAVS frente al AAV9 (5 x 10<sup>11</sup> cg, IV)**

**Hígado**



**Corazón**

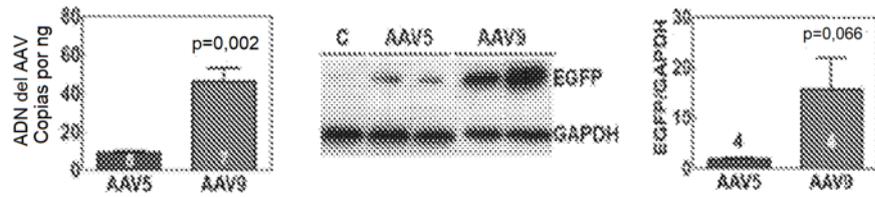


Figura 9

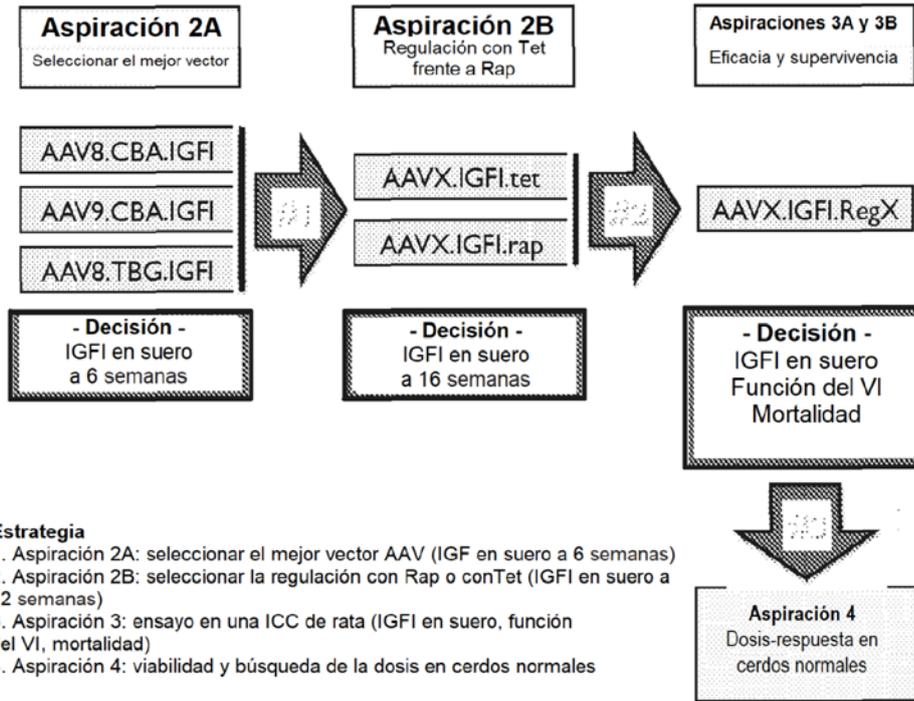


Figura 10

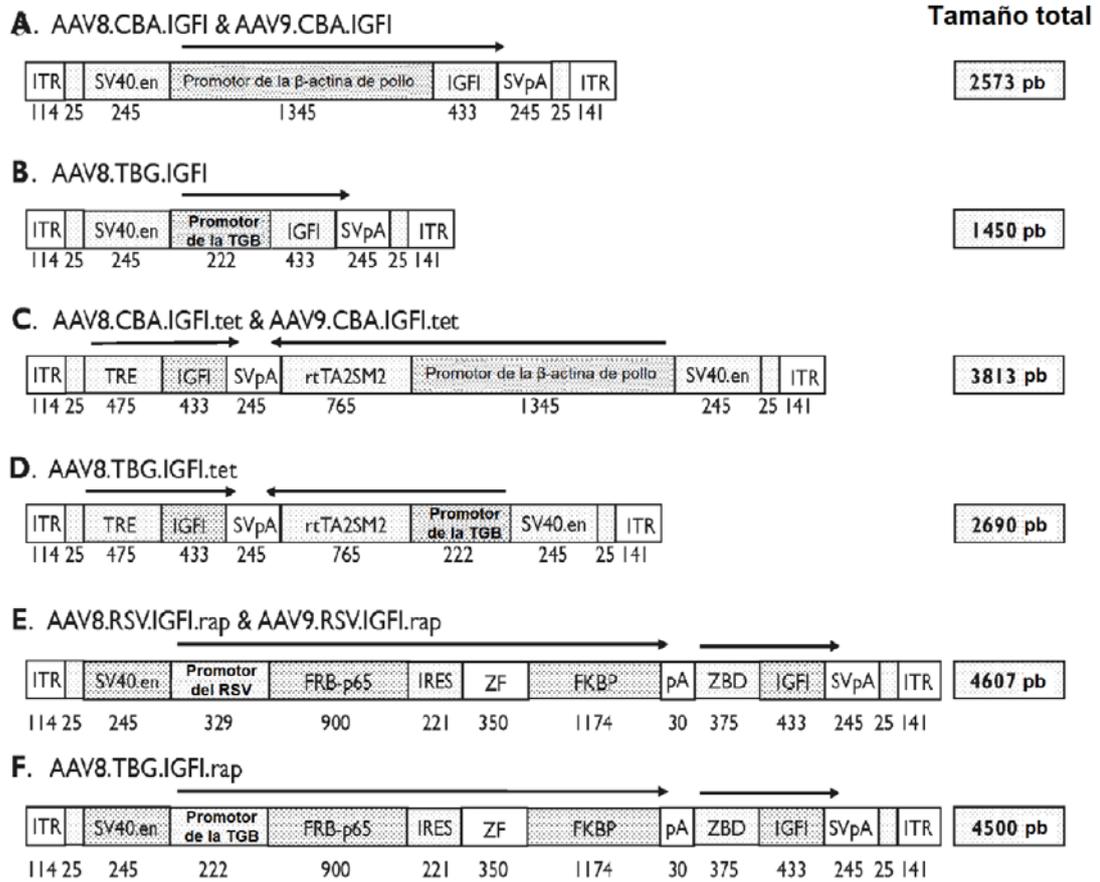


Figura 11

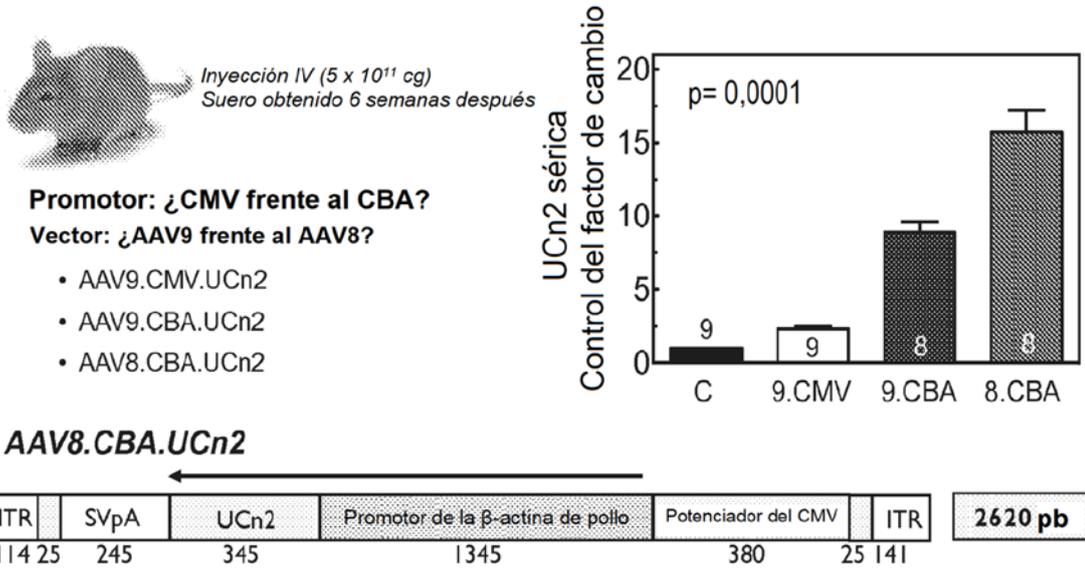


Figura 12A

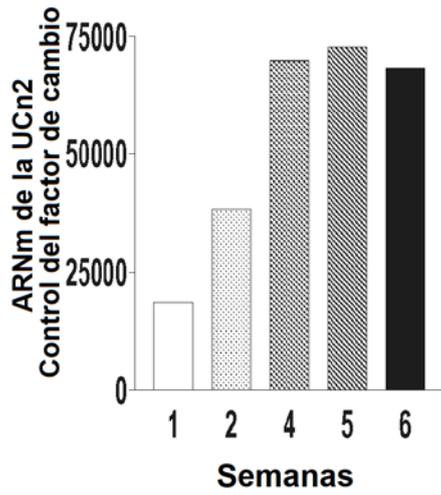
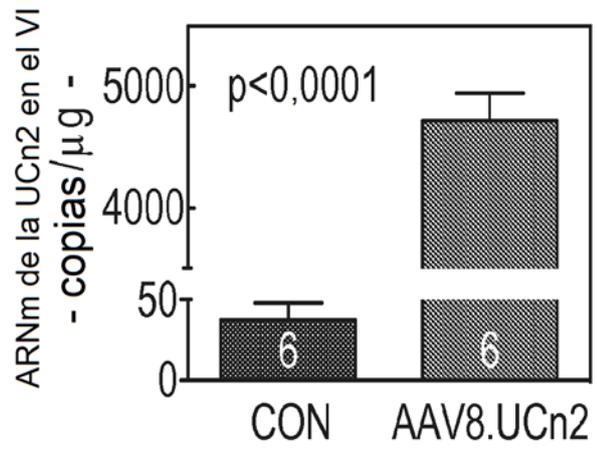
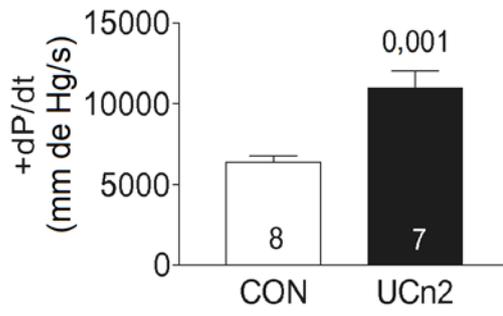


Figura 12B



Figuras 13A



Figuras 13B

s

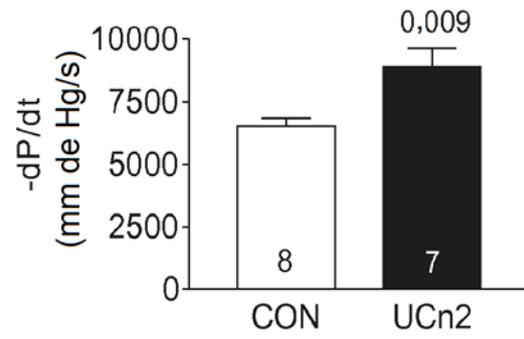


Figura 14

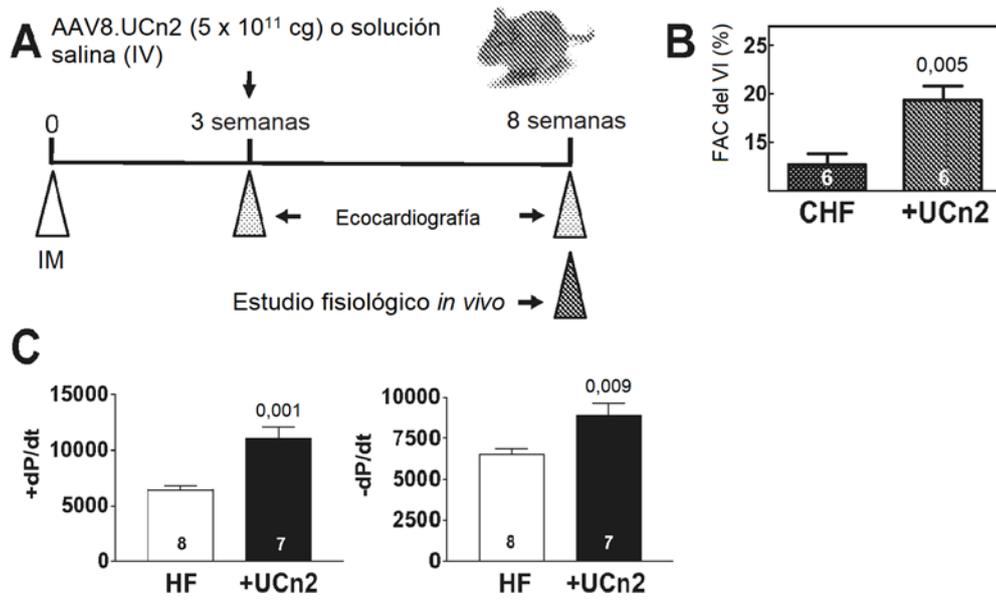


Figura 15A

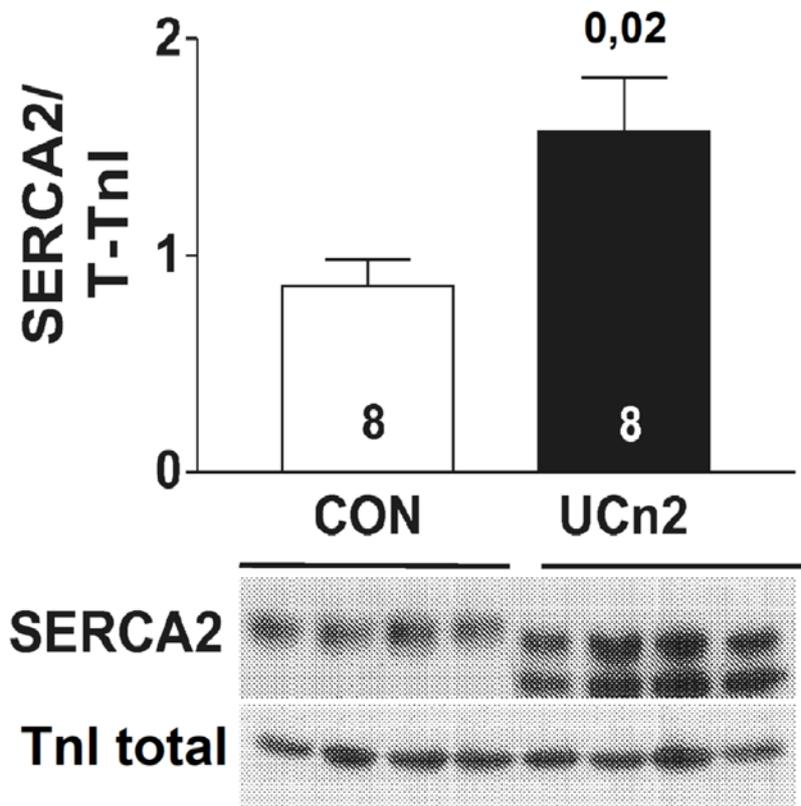


Figura 15B

Figura 16A

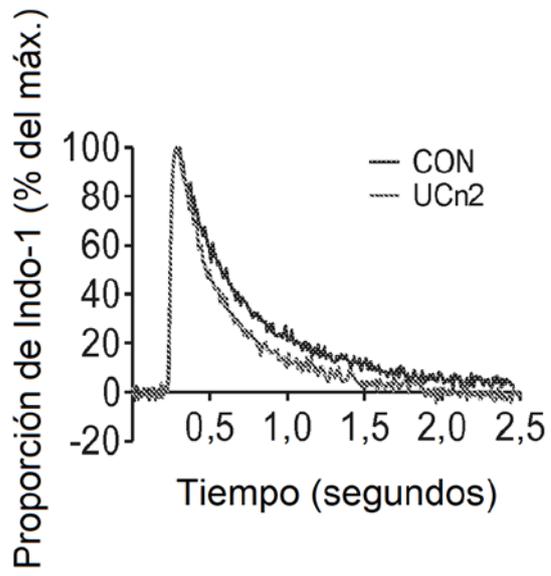


Figura 16B

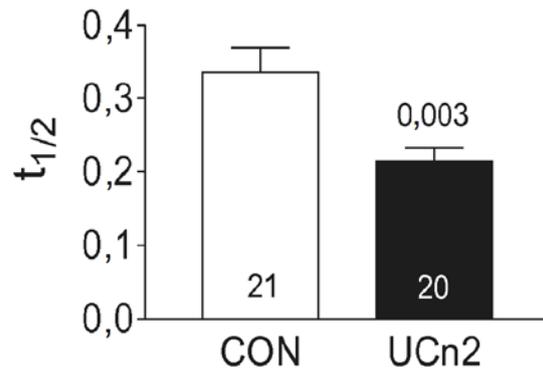


Figura 17A

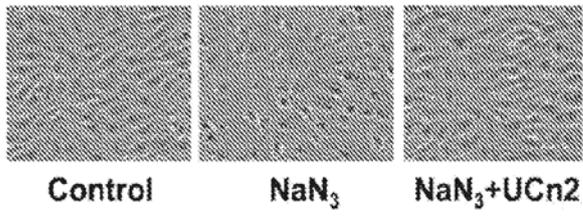


Figura 17B

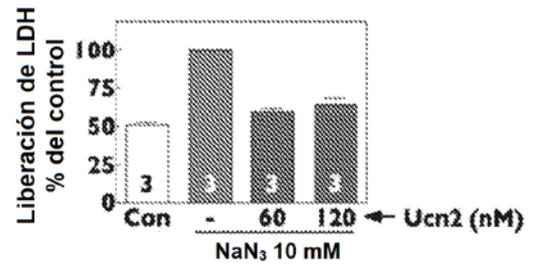


Figura 18A

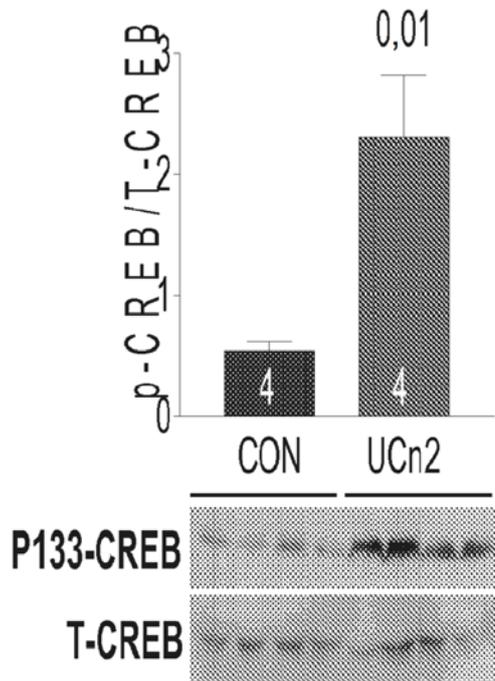


Figura 18B

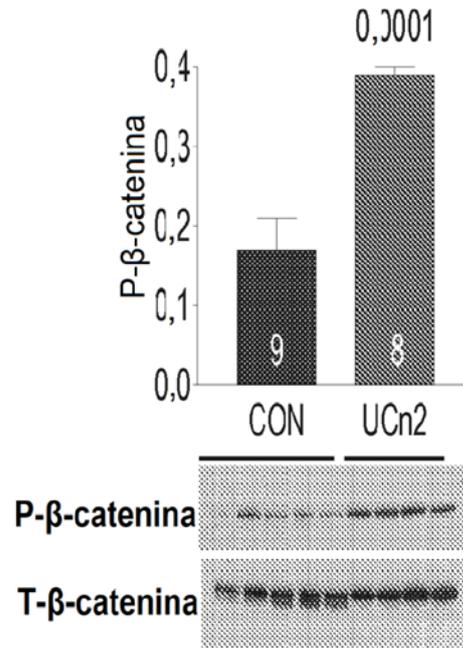


Figura 19A

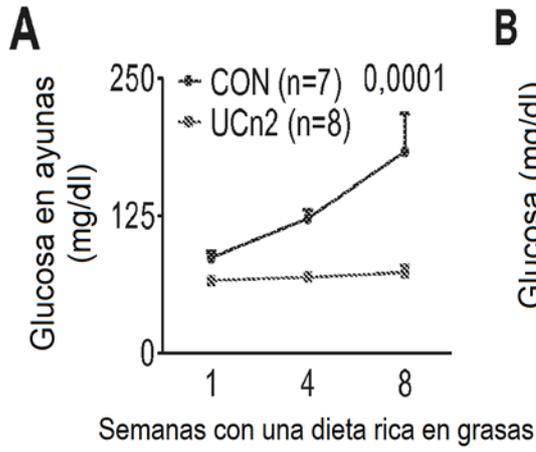


Figura 19B

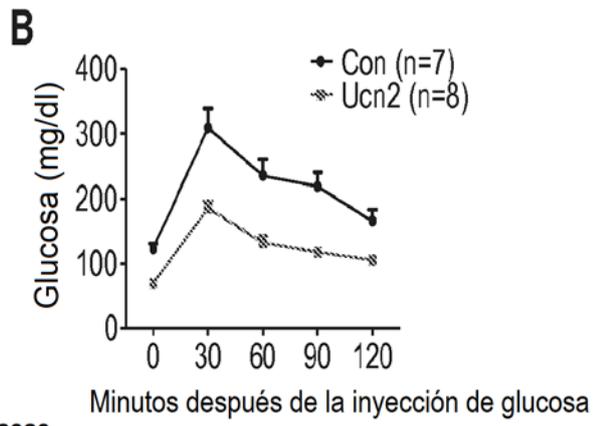


Figura 20

