

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 559**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01)
A61P 9/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2018** **PCT/US2018/052057**
87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2019** **WO19060619**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2018** **E 18858620 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2023** **EP 3684422**

54 Título: **Terapia génica con conexina 43 para restaurar la función eléctrica y cardíaca y la estructura cardíaca, en la miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho**

30 Prioridad:

20.09.2017 US 201762560989 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.08.2024

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 5th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**SHEIKH, FARAH y
ZHANG, JING**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 976 559 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

Terapia génica con conexina 43 para restaurar la función eléctrica y cardíaca y la estructura cardíaca, en la miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho

APOYO GUBERNAMENTAL

La presente materia objeto se realizó con apoyo del gobierno con la subvención número HL095780-01, otorgada por los National Institutes of Health. El Gobierno tiene ciertos derechos en la materia objeto.

Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 62/560.989, presentada el 20 de septiembre de 2017.

Antecedentes

La miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (ARVC) es una enfermedad cardíaca de base genética compleja y devastadora que se observa en individuos jóvenes y atletas, que presenta una amplia variabilidad con respecto a sus características clínicas. Los síntomas clínicos clásicos de la ARVC incluyen palpitaciones, (pre)síncope arritmico y muerte súbita cardíaca debido a arritmias ventriculares y, por tanto, características de afectación eléctrica primaria. Sin embargo, los pacientes con ARVC también presentan síntomas clínicos asociados con enfermedades estructurales, que incluyen remodelación miocárdica consistente en adelgazamiento y dilatación, así como déficits funcionales de los ventrículos (derecho y/o izquierdo) y/o reemplazo fibrograso del miocardio y, por tanto, característicos de afectación estructural primaria. La naturaleza estructural de la enfermedad se refuerza aún más cuando la ARVC se denomina "enfermedad del desmosoma", ya que los estudios de genética humana muestran que el 40 % de los pacientes son portadores de mutaciones en genes que codifican componentes de la unión desmosomal entre células [p. ej., desmoplaquina (DSP), placoglobina (JUP), placofilina 2 (PKP2) y desmogleína 2 (DSG2)], que son cruciales para mantener la integridad mecánica/estructural de las uniones de las células cardíacas.

En la actualidad no existen tratamientos eficaces para la ARVC y tampoco se han realizado ensayos aleatorizados sobre las modalidades de tratamiento, regímenes de detección o medicamentos específicos para la ARVC. Como resultado, las estrategias de tratamiento para pacientes con ARVC están dirigidas principalmente al alivio sintomático de los defectos electrofisiológicos, basado en la experiencia clínica, los resultados de estudios retrospectivos basados en registros y los resultados de estudios en sistemas modelo. Como resultado, las terapias existentes para pacientes con ARVC se basan en el uso de fármacos antiarrítmicos (sotalol, amiodarona y betabloqueantes) que dan paso a acciones más invasivas, que incluyen desfibriladores automáticos implantables y ablación con catéter cardíaco, si el paciente deja de responder o es intolerante a las terapias antiarrítmicas. Sin embargo, las modalidades terapéuticas actuales tienen una eficacia limitada en el tratamiento de la enfermedad, ya que el 40 % de los pacientes con ARVC (enfermedad joven) mueren entre 10 y 11 años después del diagnóstico inicial, lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar terapias más efectivas (y especialmente aquellas que se dirijan a la naturaleza estructural subyacente de la enfermedad) para pacientes con ARVC.

Sumario

En el presente documento se divulgan vectores que codifican una secuencia polipeptídica de conexina 43 unida operativamente a un promotor que es activo en el tejido del músculo cardíaco para usar en métodos de tratamiento de la miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho en un sujeto, que comprende, o como alternativa, que consiste esencialmente en, o aún más consiste en, administrar una cantidad eficaz de una construcción o vector de terapia génica que comprende una secuencia de polinucleótidos de la conexina 43, en donde como resultado de la administración, los niveles de conexina 43 en al menos una parte del corazón aumentan. En algunas realizaciones, la construcción es una construcción de adenovirus. En algunas realizaciones, la construcción es una construcción de virus adenoasociado.

En algunas realizaciones, la secuencia del polipéptido de la conexina 43 es la secuencia de 382 aminoácidos de P17302 (CXA_1HUMAN; UniProtKB) (SEQ ID NO: 1). El polinucleótido codificante puede tener una secuencia de polinucleótido asociada con P17302 o cualquier otra secuencia de ácido nucleico que codifique la misma secuencia de polipéptido. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico codificante es GenBank CR541660.1 (SEQ ID NO: 2).

En algunas realizaciones, como resultado de la administración, se reduce la disfunción eléctrica y estructural cardíaca y se mejora la integridad estructural. En algunas realizaciones, como resultado de la administración, se reduce la disfunción fisiológica cardíaca. En algunas realizaciones, como resultado de la administración, se prolonga la supervivencia.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1G representan que la restauración de los niveles de la proteína conexina 43 más cercanos a los niveles de tipo silvestre puede rescatar anomalías fisiológicas en miocardiocitos derivados de hiPSC mutante ARVC-placofilina-2 (PKP2_{mut}). Las figuras 1A-1B representan trazos de potencial de campo representativos (obsérvese la frecuencia y el patrón de picos en el trazo) para miocardiocitos derivados de hiPSC no ARVC y ARVC-PK P2_{mut} [también conocido como ARVC-Estructural (S)] a nivel basal (figura 1A) y con estimulación con isoproterenol (ISO) (figura 1B), que imita las condiciones asociadas con el estrés/ejercicio, y que han sido infectados durante 48 horas (h) con un adenovirus que alberga proteína verde fluorescente (Ad-GFP) o un adenovirus que alberga conexina 43 (Ad43). Barra de escala, vertical: amplitud del potencial de campo (μ V); horizontal: tiempo (1 s). Las figuras 1C-1D representan un trazo de impedancia (contractilidad) representativo (obsérvese la frecuencia y la forma de los picos en el trazo) para miocardiocitos derivados de hiPSC no ARVC y ARVC-PKP2mut (ARVC-S) a nivel basal (figura 1C) y con estimulación con ISO (figura 1D), con infección por Ad-GFP o Ad43 durante 48 h. Barra de escala, vertical: índice celular; horizontal: tiempo (1 s). La figura 1E representa la cuantificación del índice de irregularidad de activación a nivel basal de miocardiocitos derivados de iPSC no ARVC y ARVC-PKP2_{mut} con infección por Ad-GFP o Ad43. Valores medios con error estándar de la media (e.e.m.), **, $p < 0,01$, $n=6$ (no ARVC), $n=7$ (ARVC-PKP2_{mut}), prueba t de dos muestras. La figura 1F representa la cuantificación del índice de irregularidad de la activación con estímulo con ISO de no ARVC y ARVC-PKP2_{mut} (ARVC-S) con infección por Ad-GFP o Ad43. Valores medios con e.e.m., ***, $p < 0,001$, $n=6$ (no ARVC), $n=7$ (ARVC-PKP2_{mut}), prueba t de dos muestras. La figura 1G representa los niveles de expresión de conexina 43 (Cx43), desmoplaquina (DSP), desmogleína-2 (DSG2), placoglobina (JUP) y placofilina-2 (PKP2) en miocardiocitos derivados de hiPSC no ARVC, ARVC-PKP2_{mut} (ARVC-S) y mutante ARVC-desmogleína-2 [DSG2_{mut} (ARVC-E, también conocido como ARVC-Eléctrica (E)) con infección por Ad-GFP o Ad43 durante 48 h, cadena pesada de α -miosina (α -MHC), control de carga de miocardiocitos, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), control de carga.

Las figuras 2A-2B representan que las anomalías fisiológicas en los miocardiocitos ARVC-S pueden rescatarse mediante la sobreexpresión de Cx43 de una manera dependiente de la dosis. Se muestran trazos de potencial de campo representativos de miocardiocitos derivados de hiPSC no ARVC (figura 2A) y ARVC-PKP2_{mut} (figura 2B) después de una infección con Ad43 dependiente de la dosis. Obsérvese que la frecuencia irregular y el patrón de picos en miocardiocitos derivados de hiPSC ARVC-PKP2_{mut} se vuelven progresivamente más regulares en la frecuencia de picos con dosis crecientes (MOI 5, MOI 10 y MOI 20) de Cx43. Barra de escala, vertical: amplitud del potencial de campo (μ V); horizontal: tiempo (1 s). MOI: multiplicidad de infección.

Las figuras 3A-3F representan que la restauración de los niveles de proteína conexina 43 puede rescatar anomalías fisiológicas en miocardiocitos derivados de hiPSC ARVC-DSG2_{mut} (ARVC-E) con estimulación con catecolaminas (ISO), para imitar condiciones de ejercicio/estrés. Las figuras 3A-3B representan un trazo de potencial de campo representativo de miocardiocitos derivados de hiPSC no ARVC y ARVC-DSG2_{mut} a nivel basal (figura 3A) y con estimulación con ISO (figura 3B) con infección por Ad-GFP o Ad43 durante 48 h. Barra de escala, vertical: amplitud del potencial de campo (μ V); horizontal: tiempo (1 s). Las figuras 3C-3D representan un trazo de impedancia (contractilidad) representativo de miocardiocitos derivados de hiPSC no ARVC y ARVC-DSG2_{mut} a nivel basal (figura 3C) y con estimulación con ISO (figura 3D) con infección por Ad-GFP o Ad43 durante 48 h. Barra de escala, vertical: índice celular; horizontal: tiempo (1 s). La figura 3E representa la cuantificación del índice de irregularidad de activación en el nivel basal en miocardiocitos derivados de hiPSC no ARVC y ARVC-DSG2_{mut} con infección por Ad-GFP o Ad43. Valores medios con e.e.m., $n=6$ (no ARVC), $n=6$ (ARVC-DSG2_{mut}), prueba t de dos muestras. La figura 3F representa la cuantificación del índice de irregularidad de activación con estímulo con ISO de no ARVC y ARVC-DSG2_{mut} (ARVC-E) con infección por Ad-GFP o Ad43. Valores medios con e.e.m., *, $p < 0,05$, $n=6$ (no ARVC), $n=6$ (ARVC-DSG2_{mut}), prueba t de dos muestras. Obsérvese que la frecuencia irregular y el patrón de picos en miocardiocitos derivados de hiPSC ARVC-DSG2_{mut} solo se observan en condiciones ISO y la restauración de Cx43 puede hacer que la frecuencia y el patrón de picos sean más regulares.

Las figuras 4A-4G representan que la restauración de los niveles de proteína conexina 43 puede mejorar el ritmo cardíaco y la función cardíaca en un modelo de ratón ARVC [modelo de desmoplaquina inactivada específica cardíaca (DSP-cKO)]. La figura 4A representa la estrategia experimental para virus adenoasociados etiquetados con proteína verde fluorescente (AAV-GFP)/virus adenoasociados que albergan conexina 43 y etiquetados con inyección de GFP (AAV-Cx43) y análisis electrofisiológico y de la función cardíaca. La figura 4B representa la ecocardiografía de ratones control y DSP-cKO (ratones con DSP flanqueado por sitios loxP; Cre positivo) a las 6 semanas de edad y antes de la inyección del virus adenoasociado (AAV), mostró una disminución significativa en el acortamiento fraccional (% FS) en ratones DSP-cKO en comparación con el control (ratones con DSP flanqueado por sitios loxP; Cre negativo). La figura 4C que representa la ecocardiografía de un ratón control y DSP-cKO a las cuatro (10 semanas de edad) y cinco (11 semanas de edad) semanas después de la inyección de AAV, reveló una mejora en el % FS (6 % a 15 %) en ratones DSP-cKO inyectados con AAV-Cx43. No se pudieron observar cambios significativos en el % FS en los ratones de control inyectados con AAV-Cx43. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia cardíaca entre los grupos de ratones control y DSP-cKO. La figura 4D representa trazos del ECG de superficie representativos del ratón control y DSP-cKO a las cuatro (10 semanas de edad) y cinco (11 semanas de edad) semanas después de la inyección de AAV-Cx43. El ratón DSP-cKO mostró arritmias graves (contracciones ventriculares prematuras (PVC = latidos adicionales que no siguen el patrón regular), serie

de inversiones del complejo QRS (picos que apuntan hacia abajo en lugar de hacia arriba) indicativos de bloqueos de rama) cuatro semanas después de la inyección de AAV-Cx43. Sin embargo, cinco semanas después de la inyección de AAV-Cx43, DSP-cKO muestra una mejora en el ritmo cardíaco [1,5 veces menos PVC, inversiones del complejo QRS limitadas (series de 10 en la semana anterior) (semana 10) y solo dos en la semana siguiente (semana 11)], así como la aparición de un ritmo sinusal normal (frecuencia regular y latidos rítmicos). La figura 4E que representa la cuantificación de PVC en ratón DSP-cKO a las cuatro (10 semanas de edad) y cinco (11 semanas de edad) semanas después de la inyección de AAV-Cx43, reveló una reducción de 1,5 veces en el número de PVC a las cinco semanas después de AAV-Cx43. Las figuras 4F-4H representan la supervivencia (figura 4H), el análisis de transferencia Western (figura 4F) y el análisis de inmunotinción de GFP. La (figura 4G) reveló la restauración de la proteína Cx43 en un ratón DSP-cKO cinco semanas después de la inyección de AAV-Cx43 que sobrevivió (DSP-cKO2-AAV-Cx43, verde). Por el contrario, no se observó restauración de la proteína Cx43 tres semanas después de la inyección de AAV-Cx43 en un ratón DSP-cKO que murió (DSP-cKO1-AAV-Cx43, rojo)

La figura 5 representa un mapa vectorial de Ad43 (SEQ ID NO: 7).

La figura 6 representa un mapa vectorial de AAV-Cx43 (SEQ ID NO: 8).

Descripción detallada

En el presente documento se divulga una estrategia de terapia génica para prolongar la vida y rescatar/tratar la disfunción eléctrica y estructural cardíaca en el trastorno arritmogénico, miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho, mediante la restauración dirigida de la conexina 43 en las células del músculo cardíaco utilizando estrategias con virus adeno(asociados). Aunque se sabe que la conexina 43 afecta a la función eléctrica del corazón, mostramos que la restauración de la conexina 43 también puede prolongar la vida y mejorar la función contráctil (estructural) en un modelo genético de ratón que alberga una forma estructural grave de ARVC en las últimas etapas de la enfermedad (vida). Los estudios en un modelo basado en células madre de ARVC humanas *in vitro* que presentaban déficits estructurales graves (como lo demuestran las uniones desmosomales destruidas mediante ensayos de microscopía electrónica de transmisión) también revelaron que la restauración de la conexina 43 fue suficiente para restaurar los déficits funcionales eléctricos y contráctiles (estructurales) en estas células enfermas. Es más, esta restauración se produjo rápidamente. Dado que la ARVC es una enfermedad rara y mortal que no tiene tratamiento, este enfoque representa la primera oportunidad para probar enfoques de tratamiento en esta población tan vulnerable, y esta estrategia también puede tener aplicaciones para otras enfermedades cardíacas que tienen defectos estructurales subyacentes asociados con la pérdida de conexina 43.

Las células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) han demostrado un tremendo potencial para el modelado *in vitro* de enfermedades cardíacas con base genética. Para este fin, los inventores de la presente divulgación generaron un panel de líneas hiPSC sin integración a partir de pacientes caracterizados genética, bioquímica y fisiológicamente afectados de miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (ARVC), una enfermedad cardíaca de la unión desmosomal entre células, que se sabe que se manifiesta en un espectro de gravedad sintomática y que causa muerte súbita en los jóvenes. A través de ensayos ultraestructurales, moleculares y fisiológicos en tiempo real utilizando el sistema xCelligence® RTCA CardioECR, los inventores muestran que los fenotipos de células cardíacas derivadas de hiPSC de ARVC pueden capturar de forma basal fenotipos de enfermedad cardíaca diferente (eléctrica frente a estructural) observados en tejido cardíaco de pacientes con ARVC de donantes. A través de enfoques de genes candidatos que aprovechan el sistema xCelligence® RTCA CardioECR en las líneas hiPSC ARVC, los inventores también ha descubierto nuevas terapias que comúnmente pueden revertir defectos fisiológicos cardíacos subyacentes a las formas eléctricas y estructurales de ARVC.

La presente invención se basa en el descubrimiento fundamental de que restaurar la conexina 43 sola (a niveles más cercanos a los controles sanos) frente a un corazón estructuralmente comprometido (mediante una terapia génica dirigida al corazón de administración única) es suficiente para un resultado terapéutico positivo. Los estudios descritos en el presente documento sugieren que la conexina 43 es un factor principal de la progresión de la enfermedad cardíaca de base estructural donde la integridad estructural de las células del músculo cardíaco está comprometida. Dado que la conexina 43 se encuentra entre las células del músculo cardíaco y los fibroblastos cardíacos, así como entre las células del músculo cardíaco y los macrófagos cardíacos, las conexiones estructurales con estos otros tipos de células asociadas también pueden verse comprometidas en un corazón estructuralmente enfermo y, por lo tanto, la restauración de la conexina 43 también puede restaurar la integridad estructural de estas interacciones célula-célula. Este es un hallazgo inesperado ya que la conexina 43 nunca se ha considerado como agente terapéutico en el contexto de un corazón estructuralmente comprometido.

En ejemplos específicos, los métodos terapéuticos descritos en el presente documento están dirigidos principalmente a la rara enfermedad cardíaca arritmogénica, miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho, que es una enfermedad cardíaca en la que las uniones mecánicas entre células del desmosoma se desmoronan o se pierden y la conexina 43 es una característica temprana de la enfermedad. Se creía que la restauración de la conexina 43 solo puede aliviar los defectos eléctricos tempranos en los miocardiocitos derivados de hiPSC ARVC que albergaban defectos eléctricos. Los resultados que se muestran en el presente documento fueron sorprendentes en los modelos estructurales de etapa tardía de ARVC mostrados en el presente documento. Utilizando miocardiocitos derivados de

hiPSC ARVC con características estructurales de la enfermedad (modelo humano *in vitro*), así como un modelo genético de ratón que imita una forma estructural grave de ARVC (modelo de ratón DSP cKO *in vivo*), los datos revelaron que a pesar de que un importante gen mecánico (desmosomal) de unión célula-célula está eliminado/mutado y otras proteínas de unión desmosomal célula-célula asociadas se están desmoronando/perdiendo, la terapia génica con conexina 43 era eficaz para mejorar la supervivencia, el ritmo cardíaco y la función cardíaca en etapas estructurales (tardías) de la enfermedad ARVC. Además, se cree que los métodos de la invención ahora pueden aplicarse a otras formas de enfermedades cardíacas estructuralmente comprometidas, tales como la miocardiopatía hipertrófica y la insuficiencia cardíaca congestiva, ya que existe evidencia en la bibliografía de que la conexina 43 también se pierde en las últimas etapas de estas enfermedades, y es en estas últimas etapas cuando las arritmias letales y la integridad estructural del músculo cardíaco (y sus interacciones celulares asociadas) están más comprometidas.

La ARVC es una enfermedad cardíaca predominantemente genética caracterizada por disfunción ventricular derecha, pero recientemente también izquierda, y reemplazo fibrograso del miocardio que produce arritmias ventriculares fatales/graves que conducen a muerte cardíaca súbita en jóvenes y atletas. La ARVC es responsable del 10 % de las muertes cardíacas súbitas en personas ≤ 65 años y del 24 % en personas ≤ 30 años. Se cree que la ARVC es una enfermedad rara, ya que ocurre en 1 de cada 1.000 a 5.000 personas, aunque la prevalencia puede ser mayor ya que algunos pacientes no están diagnosticados o reciben un diagnóstico erróneo debido a marcadores de diagnóstico deficientes. Cada vez hay más pruebas que revelan un inicio más temprano, ya que las poblaciones pediátricas, desde bebés hasta niños adolescentes, también son particularmente vulnerables a la ARVC, lo que pone de manifiesto la necesidad imperiosa de identificar y tratar a los pacientes en una etapa más temprana de la enfermedad.

En la actualidad no existen tratamientos eficaces para la ARVC y no se han realizado ensayos aleatorios sobre las modalidades de tratamiento, regímenes de detección o medicamentos específicos para la ARVC. Como resultado, las estrategias de tratamiento para pacientes con ARVC están dirigidas al alivio sintomático de los defectos electrofisiológicos, basado en la experiencia clínica, los resultados de estudios retrospectivos basados en registros y los resultados de estudios en sistemas modelo. Como resultado, las terapias existentes para pacientes con ARVC se basan en el uso de fármacos antiarrítmicos (sotalol, amiodarona y betabloqueantes) que dan paso a acciones más invasivas, que incluyen desfibriladores automáticos implantables y ablación con catéter cardíaco, si el paciente deja de responder o es intolerante a las terapias antiarrítmicas. Sin embargo, las modalidades terapéuticas actuales tienen una eficacia limitada en el tratamiento de la enfermedad, ya que el 40 % de los pacientes con ARVC mueren entre 10 y 11 años después del diagnóstico inicial, lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar terapias más eficaces para pacientes con ARVC.

En el presente documento se divulga una estrategia de terapia génica para rescatar/tratar la disfunción eléctrica y fisiológica cardíaca en el trastorno arritmogénico, ARVC, mediante sobreexpresión dirigida del polipéptido conexina 43 en células del músculo cardíaco utilizando estrategias de suministro de vectores. En un ejemplo ilustrativo descrito en el presente documento, un suministro único mediado por virus del polinucleótido de conexina 43 que codifica el polipéptido de conexina 43 a las células del músculo cardíaco de dos líneas de pacientes hiPSC ARVC *in vitro* y un nuevo modelo de ratón de ARVC *in vivo* fue suficiente para revertir sustancialmente la disfunción cardíaca eléctrica y fisiológica asociada con la ARVC. Un estudio *in vivo* que utiliza el modelo de ratón DSP-cKO de ARVC sugiere además que la estrategia de tratamiento de terapia génica con conexina 43 puede aprovecharse durante cuadros clínicos en etapa avanzada para prolongar la vida evitando la muerte súbita asociada con la ARVC. Esta estrategia también puede tener aplicaciones de tratamiento para otros trastornos genéticos que dan lugar a muerte súbita arrítmica (p. ej., miocardiopatía hipertrófica), así como a las últimas etapas de la insuficiencia cardíaca, donde existe un mayor riesgo de arritmias y muerte, así como donde se ha descrito pérdida del polipéptido conexina 43. Los estudios sugieren además que los polipéptidos de conexina 43 pueden tener un papel más allá de la función eléctrica y también actuar como un andamio para unir las conexiones estructurales entre las células (independientemente de las proteínas estructurales clásicas, como las proteínas desmosomales), ya que la función cardíaca también se pudo mejorar en los modelos de los inventores con enfermedad estructural grave (p. ej., línea hiPSC ARVC estructural (PKP2_{mut}) y el modelo de ratón de ARVC), lo cual difiere de las ideas anteriores sobre el papel de esta proteína en el campo como clásicamente asociada únicamente con la función eléctrica.

Como se utiliza en el presente documento, "sobreexpresión" se refiere a un nivel aumentado de expresión en comparación con el cuadro clínico, y en realizaciones particulares en comparación con el nivel ausente o mínimo de expresión del polipéptido conexina 43 observado en un cuadro clínico, y no en comparación con un cuadro clínico normal, sano o de tipo silvestre. La restauración de los niveles de expresión del polipéptido conexina 43 hasta al menos aproximadamente el 5 % de lo normal es beneficiosa, incluso sin que sea necesariamente una restauración completa de la función cardíaca. Restauración de los niveles de expresión de conexina 43 a ≥ 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o tanto como ≥ 50 % de los niveles normales son eficaces para restaurar la función cardíaca normal.

Como se utiliza en el presente documento, el término "vector" tiene su significado habitual en el campo e incluye el entendimiento de que es capaz de transferir secuencias de ácidos nucleicos a células diana. Por ejemplo, un vector puede comprender una secuencia codificante capaz de expresarse en una célula diana. Para los fines de la presente divulgación, "construcción de vector", "vector de expresión" y "vector de transferencia génica", generalmente se refieren a cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que es útil para

transferir el gen de interés a las células diana. Así, el término incluye vectores de clonación y expresión, así como vectores de integración.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "virus adenoasociado" (AAV) tiene su significado ordinario en el campo e incluye, sin limitación, AAV tipo 1, AAV tipo 2, AAV tipo 3 (incluidos los tipos 3A y 3B), AAV tipo 4, AAV tipo 5, AAV tipo 6, AAV tipo 7, AAV tipo 8, AAV tipo 9, AAV tipo 10, AAV tipo 11, AAV2i8, Asokan *et al.*, Nat Biotechnol. (1):79-82, 2010, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad), AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino y AAV ovino y cualquier otro AAV ahora conocido o descubierto posteriormente. Se han identificado varios serotipos y clados adicionales de AAV, que también están abarcados por el término "AAV".

Las secuencias genómicas de varios AAV y parvovirus autónomos, así como las secuencias de las repeticiones terminales invertidas (ITR), las proteínas rep y la subunidades de cápside se conocen en la materia. Estas secuencias se pueden encontrar en la bibliografía o en bases de datos públicas como la base de datos GenBank®.

Como se utiliza en el presente documento, el término "miocardiocito" o la expresión "miocito cardíaco" tienen su significado habitual en el campo e incluyen una célula muscular especializada que forma principalmente el miocardio del corazón. Los miocardiocitos pueden tener cinco componentes principales: (1) membrana celular (sarcolema) y túbulos T, para la conducción de impulsos, (2) retículo sarcoplásmico, un depósito de calcio necesario para la contracción, (3) elementos contráctiles, (4) mitocondrias y (5) un núcleo. Los miocardiocitos se pueden subdividir en subtipos que incluyen, pero sin limitación, miocardiocito auricular, miocardiocito ventricular, miocardiocito del nódulo sinoauricular (SA), miocardiocito del nódulo SA periférico o miocardiocito del nódulo SA central. Las células madre se pueden propagar para imitar las funciones fisiológicas de los miocardiocitos o, como alternativa, diferenciarse en miocardiocitos. Esta diferenciación puede detectarse mediante el uso de marcadores seleccionados de, pero sin limitación, cadena pesada de miosina, cadena ligera de miosina, actinina, troponina, tropomiosina, GATA4, factor potenciador de miocitos (Mef)2c y Nkx-2.5.

Como se utiliza en el presente documento, el término "control" tiene su significado habitual en el campo e incluye un sujeto o muestra alternativa utilizada en un experimento con fines de comparación. Un control puede ser "positivo" o "negativo". Por ejemplo, cuando el propósito del experimento es determinar una correlación de un nivel de expresión alterado de un gen con un fenotipo particular, generalmente es preferible utilizar un control positivo (una muestra de un sujeto que presenta dicha alteración y muestra el fenotipo deseado) y un control negativo (un sujeto o una muestra de un sujeto que carece de la expresión o fenotipo alterado).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "célula madre" tiene su significado habitual en el campo e incluye una célula que se encuentra en un estado indiferenciado o parcialmente diferenciado y tiene la capacidad de autorrenovarse y/o generar progenie diferenciada. La autorrenovación se define como la capacidad de una célula madre de proliferar y dar lugar a más células madre de este tipo, manteniendo su potencial de desarrollo (es decir, propiedades totipotentes, pluripotentes, multipotentes, etc.). Como se utiliza en el presente documento, la expresión "célula madre somática" tiene su significado habitual en el campo e incluye cualquier célula madre derivada de tejido no embrionario, incluyendo tejido fetal, juvenil y adulto. Se han aislado células madre somáticas naturales de una amplia variedad de tejidos adultos, incluidos sangre, médula ósea, cerebro, epitelio olfativo, piel, páncreas, músculo esquelético y músculo cardíaco. Las células madre somáticas de origen natural de ejemplo incluyen, pero sin limitación, células madre mesenquimales (MSC) y células madre neurales (NSC). En algunas realizaciones, las células madre o progenitoras pueden ser células madre embrionarias. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "células madre embrionarias" tiene su significado habitual en el campo e incluye células madre derivadas de tejido formado después de la fertilización pero antes del final de la gestación, incluido el tejido preembrionario (tal como, por ejemplo, un blastocisto), tejido embrionario o tejido fetal tomado en cualquier momento durante la gestación, normalmente, pero no necesariamente, antes de alrededor de 10-12 semanas de gestación. Lo más frecuentemente, las células madre embrionarias son células pluripotentes derivadas del embrión temprano o blastocisto. Las células madre embrionarias se pueden obtener directamente de tejido adecuado, incluyendo, pero sin limitaciones, tejido humano, o de líneas celulares embrionarias establecidas. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "células madre de tipo embrionario" tiene su significado habitual en el campo e incluye células que comparten uno o más, pero no todas las características, de una célula madre embrionaria.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "célula pluripotente" tiene su significado habitual en el campo e incluye una célula menos diferenciada que puede dar lugar a al menos dos células de progenie distintas (genotípica y/o fenotípicamente) más diferenciadas. En algunas realizaciones, una "célula pluripotente" incluye una célula madre pluripotente inducida (iPSC) que es una célula madre derivada artificialmente de una célula no pluripotente, normalmente una célula somática adulta, que se ha producido induciendo la expresión de uno o más genes específicos de células madre. Dichos genes específicos de células madre incluyen, pero sin limitación, la familia de factores de transcripción octámeros, es decir, unión del factor de transcripción de unión al octámero (Oct)-3/4; la familia de genes SRY Box (Sox), es decir, Sox1, Sox2, Sox3, Sox 15 y Sox 18; la familia de genes del factor tipo Kruppel (Klf), es decir, Klf1, Klf2, Klf4 y Klf5; la familia de genes Myc, es decir, c-myc y L-myc; la familia de genes Nanog, es decir, OCT4, NANOG, y REX1; o LIN28.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "célula pluripotente inducida" tiene su significado habitual en

el campo e incluye células de tipo embrionario reprogramadas al fenotipo inmaduro a partir de células adultas. Las iPSC humanas también expresan marcadores de células madre y son capaces de generar células características de las tres capas germinales.

5 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" tiene su significado habitual en el campo e incluye una concentración o cantidad de un reactivo o composición, tal como una composición como se describe en el presente documento, un vector vírico u otro, que sea eficaz para producir el resultado deseado, incluyendo el crecimiento y/o diferenciación celular *in vitro* o *in vivo*, o para el tratamiento de una afección como se describe en el presente documento. Se apreciará que la cantidad de vector vírico u otro vector a administrar variará dependiendo de las características específicas del trastorno a tratar, incluyendo, aunque no de forma limitativa, el tamaño o el volumen total/área de superficie a tratar, así como la proximidad del lugar de administración a la ubicación de la región a tratar, entre otros factores familiares para el biólogo médico.

15 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho" (ARVC) tiene su significado habitual en el campo e incluye un trastorno progresivo hereditario que generalmente afecta al lado derecho del corazón pero puede afectar a ambos lados. Las paredes del ventrículo se vuelven delgadas y estiradas. La ARVC también puede causar ritmos cardíacos anormales.

20 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "miocardiopatía hipertrófica" tiene su significado habitual en el campo e incluye una situación en la que las células del músculo cardíaco se agrandan y hacen que los ventrículos se engrosen.

25 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "conexina 43" tiene su significado habitual en el campo e incluye una proteína de unión gap. Las uniones gap pueden ser esenciales para muchos procesos fisiológicos, como la despolarización coordinada de las células cardíacas, el desarrollo embrionario adecuado y la respuesta conducida en la microvasculatura. Por esta razón, las mutaciones en los genes que codifican la conexina pueden provocar anomalías funcionales y del desarrollo. La secuencia de aminoácidos de la proteína humana se encuentra con el número de registro de Genbank AAA52131. La secuencia de aminoácidos de la proteína murina se encuentra con el número de registro AAA37444. La secuencia de aminoácidos de la proteína canina se encuentra con el número de registro AAR25626. La secuencia de aminoácidos de la proteína equina se encuentra con el número de registro NP_001296155.

35 Los métodos actualmente divulgados comprenden una estrategia de tratamiento viable que tiene implicaciones en la prolongación de la vida al rescatar la disfunción eléctrica y fisiológica cardíaca asociada con trastornos arritmogénicos, tal como la ARVC. Hasta la fecha, no existen tratamientos que aprovechen los tratamientos basados en la conexina 43 o los tratamientos de terapia génica para pacientes con ARVC. Las estrategias basadas en la conexina 43 actualmente divulgadas se centran en el uso de miméticos peptídicos y fármacos de molécula pequeña, que actúan principalmente para relocalizar la conexina 43 existente desde la célula hasta la "ubicación correcta"; estas estrategias se basan en tener la proteína conexina 43 existente en el corazón. Sin embargo, los pacientes con ARVC y los pacientes con insuficiencia cardíaca terminal tienen muy poca o ninguna proteína conexina 43 en las células del músculo cardíaco, por lo tanto, estos enfoques no funcionan en estos contextos.

45 Se ha demostrado que la terapia génica es un enfoque seguro y eficaz para evitar la enfermedad cardíaca, y los experimentos presentados en el presente documento proporcionan evidencia de que este método puede restaurar la expresión de la conexina 43 en el corazón, así como evitar los defectos eléctricos y estructurales asociados con la ARVC que provocan la muerte súbita. Dado que la ARVC es una enfermedad rara y mortal que no tiene tratamiento, este enfoque brindará la primera oportunidad para probar enfoques de tratamiento en esta población tan vulnerable, y esta estrategia también puede tener aplicaciones para otras enfermedades cardíacas que tienen defectos estructurales y arritmogénicos subyacentes asociados con la pérdida del polipéptido conexina 43.

50 Así, en algunas realizaciones, el polipéptido conexina 43 está dirigido a terapias clínicas para pacientes con ARVC generando un vector vírico adenoasociado controlado por el promotor de troponina T cardíaca (serotipo 9) que contiene el ADNc de la conexina 43 humana y amplificando y administrando virus de calidad clínica a pacientes con ARVC como un medio para restaurar los niveles de proteína conexina 43, así como para rescatar la disfunción eléctrica y contráctil. Sin embargo, en algunas realizaciones se utilizan otros vectores. En algunas realizaciones, el vector usa un promotor diferente. Si bien el promotor debe estar activo en el tejido cardíaco, el promotor puede ser, pero no necesariamente, activo solo o principalmente en el tejido cardíaco. En algunas realizaciones, el vector es un vector vírico adenoasociado. En algunas realizaciones, el vector se basa en un virus diferente. En algunas realizaciones, el vector no es vírico.

60 En algunos casos, el vector es un vector vírico. En algunos casos, el vector vírico se basa o se deriva de, un virus deficiente en replicación. Los ejemplos no limitativos de vectores víricos adecuados para administrar una molécula de ácido nucleico de la divulgación a un sujeto incluyen aquellos derivados de adenovirus, retrovirus (p. ej., lentivirus), virus adenoasociado (AAV) y herpes simple-1 (HSV-1). En un caso particular, el vector vírico se deriva de AAV.

65 En algunas realizaciones, el vector tiene un tropismo por el tejido cardíaco, tal como el virus adenoasociado serotipo

9 (AAV9), pero en otras realizaciones el vector no es específico del tejido cardíaco. En algunas realizaciones, la expresión de la conexina 43 está restringida al tejido cardíaco como resultado de un promotor específico de tejido, o un vector cardiotrópico, o ambos. En algunas realizaciones, el vector confiere una expresión duradera del polipéptido de conexina 43. En algunas realizaciones el vector no es integrativo.

En algunas realizaciones, el tratamiento eficaz se logra con una única administración de un vector de terapia génica. En dichas realizaciones, la inmunogenicidad débil o no inmunogénica tiene una importancia reducida en comparación con los vectores que podrían ser, o se espera que sean, administrados más de una vez. En algunas realizaciones, el vector es uno para el cual el receptor no tiene una respuesta inmunitaria preexistente, por ejemplo, una respuesta de anticuerpos anti-vector.

Esta estrategia también puede tener aplicaciones de tratamiento para otros trastornos genéticos que dan lugar a muerte súbita arrítmica (p. ej., miocardiopatía hipertrófica), así como a insuficiencia cardíaca en etapa tardía, donde existe un mayor riesgo de arritmias y muerte, así como donde se ha descrito pérdida de conexina 43.

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto que lo necesite, en donde el sujeto padece miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho. El método comprende, o como alternativa consiste esencialmente en, o aún además consiste en, administrar al sujeto un vector que codifica una secuencia polipeptídica de la conexina 43, en donde como resultado de la administración de una cantidad eficaz del vector, los niveles de conexina 43 en al menos una parte del corazón del sujeto aumentan. El aumento del polipéptido conexina 43 generalmente se infiere por mejoras en la sintomatología. En algunas realizaciones, se pueden observar mejoras en la sintomatología a los pocos días de aumentar la expresión de la conexina 43 o a los pocos días de administrar un vector de terapia génica con conexina 43, por ejemplo, al cabo de 1, 2, 3 o 4 días.

En algunas realizaciones, el polipéptido de conexina 43 comprende al menos una secuencia de 382 aminoácidos de P17302 (CXA_1HUMAN; UniProtKB) (SEQ ID NO. 1), o un equivalente biológico del mismo. Existen al menos cuatro isoformas truncadas más pequeñas de la conexina 43 en el corazón humano, que incluyen los 32kDa (100-382AA; SEQ ID NO: 3), 29kDa (125-382AA; SEQ ID NO: 4), 26kDa (147-382AA; SEQ ID NO: 5) y 20 kDa (213-382AA; SEQ ID NO: 6), que pueden actuar como fragmentos funcionales de la misma (*Autoregulation of connexin43 gap junction formation by internally translated isoforms*, Smith y Shaw, Cell Rep. 5(3):611-8, 2013, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad. En algunas realizaciones, los fragmentos están codificados por las SEQ ID NOS: 9 a 12, respectivamente.

El polipéptido puede suministrarse en un vehículo o construcción de suministro de genes, que comprende el polinucleótido que codifica la conexina 43 operativamente unido a secuencias para la expresión del polinucleótido *in vivo*. Los ejemplos no limitativos de estos incluyen, por ejemplo, un promotor de troponina T cardíaca, promotor de cadena ligera de la miosina cardíaca, promotor de la cadena pesada de la miosina cardíaca y un potenciador de la α -actina cardíaca unido a un promotor del factor de elongación 1 α . Los promotores restringidos espacialmente específicos de miocardiocitos incluyen, pero sin limitación, secuencias de control derivadas de los siguientes genes: cadena ligera 2 de miosina, cadena pesada de alfa-miosina, AE3, troponina C cardíaca, actina cardíaca y similares.

Las construcciones pueden estar contenidas además dentro de un vector vírico; ejemplos no limitativos de estos incluyen un vector adenoviral, un vector adenoasociado (AAV), o un vector lentiviral. El vector vírico puede seleccionarse por tropismo tisular hacia el corazón, p. ej., un vector AAV del grupo de un serotipo AAV1, AAV2, AAV2i8, o AAV9, (véase Emerging Adeno-Associated Viral Vector Pipeline for Cardiac Gene Therapy, Asokan y Samulski, Hum Gene Ther. 24(11): 906-913, 2013, y Systemic Gene Transfer to Skeletal Muscle Using Reengineered AAV Vectors, Phillips *et al.*, Methods Mol Biol. 709:141-51, 2011, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad para todo lo que se enseña sobre transferencia de genes cardíacos *in vivo*). Adicionalmente, el vector AAV puede ser quimérico, aumentando aún más el tropismo tisular del vector. Los ejemplos no limitativos de estos incluyen, por ejemplo, los vectores AAV1/2 descritos en AAV Vectors for Cardiac Gene Transfer: Experimental Tools and Clinical Opportunities (Mol. Ther. 19(9):1582-1590, 2011), que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad para todo lo que se enseña sobre la transferencia de genes cardíacos *in vivo*.

Los vectores que contienen el polinucleótido de conexina 43 se administran local o sistémicamente.

Los métodos son útiles para el tratamiento de mamíferos, tal como un paciente humano. Como es entendido por un experto en la materia, la proteína y/o polinucleótido será de la misma especie del sujeto que se está tratando.

Se debe administrar una cantidad eficaz del polinucleótido y/o vector, p. ej., de aproximadamente 2×10^{11} a aproximadamente 2×10^{14} genomas víricos por kg de peso corporal del sujeto. Los vectores pueden administrarse en vehículos farmacéuticamente aceptables.

También se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que lo necesite, en donde el sujeto sufre una o más de: miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho; disfunción ventricular derecha y/o izquierda; reemplazo fibrograso del miocardio; miocardiopatía hipertrófica; o disfunción cardíaca eléctrica y fisiológica en enfermedades

arritmogénicas. Los métodos comprenden, o como alternativa consisten esencialmente en, o aún además consisten en, administrar al sujeto una cantidad eficaz de un vector que confiere expresión del polipéptido de conexina 43 como se describe en el presente documento. Un experto en la materia puede determinar si los niveles de conexina 43 aumentan en sistemas modelo mediante inmunohistoquímica, transferencia Western, cromatografía de afinidad, o indirectamente basándose en la detección de ARNm mediante transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), y similares. En pacientes reales, la detección de un aumento del polipéptido conexina 43 generalmente se infiere de las mejoras en la sintomatología.

En algunas realizaciones, el polipéptido de conexina 43 comprende al menos una secuencia de 382 aminoácidos de P17302 (CXA_1HUMAN; UniProtKB) (SEQ ID NO. 1), o un equivalente biológico del mismo.

Algunas realizaciones son composiciones farmacéuticas que comprenden un vector capaz de conferir expresión del polipéptido conexina 43 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para dicho producto son normalmente soluciones acuosas estériles. En diversos aspectos de estas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede comprender medios de cultivo, solución salina tamponada con fosfato o solución salina tamponada con HEPES. En algunas realizaciones, el vector se suministra en una formulación líquida, que puede almacenarse congelada, para uso directo. En otras realizaciones, el vector se suministra en forma liofilizada y se reconstituye poco antes de la administración con agua para inyección o una solución acuosa estéril.

Varias de las realizaciones divulgadas comprenden la administración a un mamífero, por ejemplo, un ser humano, y constituyen un método de tratamiento. Como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" incluye ampliamente, tanto colectivamente y como realizaciones individuales, cualquier tipo de actividad de tratamiento, incluyendo el diagnóstico, la mitigación o prevención de enfermedades en el hombre u otros animales, o cualquier actividad que de otro modo afecte la estructura o cualquier función del cuerpo del hombre u otros animales. El tratamiento puede incluir la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente un trastorno o signo o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una curación parcial o completa para un trastorno y/o un efecto adverso atribuible al trastorno. Los ejemplos de "tratamiento" incluyen, pero sin limitación: impedir que se produzca un trastorno en un sujeto que puede estar predispuesto a un trastorno, pero al que todavía no se ha diagnosticado que lo tenga; inhibir un trastorno, es decir, detener su desarrollo; y/o aliviar o mejorar los síntomas del trastorno, p. ej., arritmia cardíaca. Como entienden los expertos en la materia, "tratamiento" puede incluir una mejora sistémica de los síntomas asociados con la patología y/o un retraso en la aparición de síntomas tales como dolor en el pecho. La evidencia clínica y subclínica del "tratamiento" variará según la patología, el individuo y el tratamiento. La actividad de tratamiento incluye la administración de los medicamentos, formas farmacéuticas y composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento para un paciente, especialmente de acuerdo con los diversos métodos de tratamiento divulgados en el presente documento, ya sea por un profesional de la salud, el propio paciente o cualquier otra persona. Las actividades de tratamiento incluyen las prescripciones, instrucciones y consejos de los profesionales de la salud como médicos, médicos asistentes, personal de enfermería y similares que actúan bajo las órdenes de cualquier otra persona, incluidos otros profesionales de la salud o el propio paciente. En algunas realizaciones, la actividad de tratamiento también puede incluir alentar, inducir o exigir que un medicamento en particular, o una combinación de ellos, sea elegido para el tratamiento de una afección, y que el medicamento realmente se utilice, aprobando la cobertura del seguro para el medicamento, negando la cobertura de un medicamento alternativo, incluyendo el medicamento o excluyendo un medicamento alternativo, de un formulario de medicamentos u ofreciendo un incentivo económico para usar el medicamento, como podría hacerlo una compañía de seguros o una empresa de gestión de beneficios farmacéuticos, y similares. En algunas realizaciones, la actividad de tratamiento también puede incluir alentar, inducir o prescribir que se elija un medicamento en particular para el tratamiento de una afección (y que el medicamento se utilice realmente) mediante una política o estándar de práctica que podría establecer un hospital, clínica, organización para el cuidado de la salud, práctica médica o grupo de médicos, y similares.

En varias de las realizaciones divulgadas en el presente documento, los vectores que expresan el polipéptido de conexina 43 se preparan para su administración a un mamífero o se administran a un mamífero. En algunas realizaciones el mamífero es un ser humano. En otras realizaciones el mamífero es una mascota doméstica, por ejemplo, un gato o un perro. En algunas realizaciones el mamífero es un animal agrícola, por ejemplo, un caballo, una vaca, una oveja o un cerdo. En otras realizaciones, el mamífero es un animal de laboratorio, por ejemplo, un ratón, una rata, un hámster o un conejo.

En un aspecto relacionado, las composiciones terapéuticas de la presente divulgación se administran a un sujeto como una modalidad profiláctica o de mejora. Como se utiliza en el presente documento, "meliorativo", significa mejorar o aliviar a un sujeto de los síntomas asociados con un trastorno, e incluye curar dicho trastorno.

Se entenderá que, si se desea, una composición como se divulga en el presente documento también se puede administrar en combinación con otros agentes, tales como, p. ej., otras proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos. De hecho, prácticamente no hay límite para otros componentes que también pueden incluirse, dado que los agentes adicionales no causan un efecto adverso significativo al contacto con las células diana o los tejidos del hospedador. Por lo tanto, las composiciones pueden administrarse junto con diversos otros agentes según se requiera en el caso particular. Dichas composiciones pueden purificarse a partir de células hospedadoras u

otras fuentes biológicas, o como alternativa, pueden sintetizarse químicamente como se describe en el presente documento.

La administración de vectores de terapia génica suele realizarse mediante inyección o infusión. En algunas realizaciones se utiliza la administración intravenosa. En otras realizaciones, los vectores se administran en un tejido, órgano o cavidad corporal que está o está en comunicación con, el lugar donde el tratamiento tendrá efecto; tal como el propio corazón o el espacio pericárdico.

Se pueden administrar dosis adecuadas del vector a un sujeto que lo necesite. Los ejemplos no limitativos de métodos de administración incluyen administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intradérmica, administración intraperitoneal, administración oral, infusión, administración intracraneal, administración intratecal, administración intranasal e intraarterial. En algunos casos, la administración puede implicar la inyección de una formulación de la composición del vector.

Los esquemas de administración continua y discontinua por cualquier método incluyen también esquemas posológicos en los que la dosis de vector se modula durante todo el período efectivo, de manera que, por ejemplo, al inicio del período de administración de conexina 43, la dosis es baja y aumenta hasta el final del período de administración de conexina; la dosis es inicialmente alta y disminuye durante el período de administración; la dosis es inicialmente baja, aumentado hasta un nivel máximo, reduciéndose después hacia el final del período de administración; y cualquier combinación de los mismos. Asimismo, los programas de posología se pueden realizar usando cualquier método estándar en la técnica, tal como por ejemplo un sistema de catéter.

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

Un modo de administración de viriones de AAV recombinantes utiliza un sistema de suministro mejorado por convección (CED). De esta manera, los viriones recombinantes se pueden suministrar a muchas células en grandes áreas de músculo. Es más, los vectores suministrados expresan eficientemente transgenes en células musculares. Cualquier dispositivo de suministro mejorado por convección puede ser apropiado para el suministro de vectores víricos. En una realización preferida, el dispositivo es una bomba osmótica o una bomba de infusión. Tanto las bombas osmóticas como las de infusión se comercializan a través de una variedad de proveedores, por ejemplo Alzet Corporation, Hamilton Corporation, Alza, Inc. (Palo Alto, CA).

Normalmente, se suministra un vector vírico a través de dispositivos CED de la siguiente manera. Un catéter, cánula u otro dispositivo de inyección se inserta en el tejido muscular apropiado del sujeto elegido, tal como el músculo esquelético. Para obtener una descripción detallada sobre el suministro de CED, véase la patente de Estados Unidos n.º 6.309.634, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad.

Existen varios métodos de perfusión disponibles y estándar en la técnica, y sin estar sujeto a ningún método en particular, se contempla cualquier método de perfusión que dé el resultado deseado, tales como métodos que utilizan un catéter. El objetivo de los métodos de perfusión es aumentar el tiempo de contacto entre el vector (p. ej., adenovirus, AAV, vectores de lentivirus) y las células diana (p. ej., células de músculo liso). Por consiguiente, el método abarca métodos de perfusión tales como métodos de perfusión de circuito cerrado realizados a temperatura corporal y en condiciones definidas a, por ejemplo, 37 grados C, durante aproximadamente 2, 5, 10, 12, 15, 30, 60 o más minutos, o en animales más grandes o humanos durante aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12 o más horas, permitiendo la entrada del virus a las células diana y creando condiciones óptimas para la expresión genética y la síntesis de proteínas. Por esta razón, diversos excipientes, p. ej., aminoácidos naturales y no naturales, factores de crecimiento y similares se pueden añadir para proporcionar suficiente material para la síntesis de proteínas.

Cada método de tratamiento puede expresarse como una composición para usar en dicho método médico. Por ejemplo, realizaciones que comprenden un vector que expresa el polipéptido de conexina 43 para usar en el tratamiento de una enfermedad arritmogénica.

La presente invención se describe más particularmente en los siguientes ejemplos que pretenden ser ilustrativos únicamente ya que numerosas modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. El aumento de la expresión de conexina 43 promovió una vida prolongada y la restauración del ritmo cardíaco y la función cardíaca en un modelo genético de miocardiopatía

La conexina 43 no estaba presente en miocardiocitos derivados de hiPSC en la miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho que mostraban anomalías eléctricas, estructurales y contráctiles, además la conexina cardíaca 43 no está presente desde el principio en un modelo de ratón de ARVC que presenta disfunción cardíaca y muerte súbita.

5 Los intentos de relocalizar la conexina 43 existente que quedaba en la célula utilizando un péptido alfa-carboxi terminal 1 (CT1) mimético del extremo carboxi de la conexina 43 y rotigaptida fracasaron, lo que sugería que no hay suficiente conexina 43 y, por lo tanto, se requeriría una restauración genética de la conexina 43 para restaurar sus niveles y función.

10 Usando el adenovirus Cx43 YFP, los presentes inventores demostraron que la sobreexpresión de la conexina 43 es suficiente para restaurar el ritmo normal de los miocardiocitos (medido mediante el potencial de campo) y la función contráctil (medida mediante la impedancia) en una línea celular iPSC de un paciente humano con ARVC con graves anomalías estructurales que porta el PKP2 c.1171-2A>G (PKP2_{mut}) (figura 1A-F). El análisis de transferencia Western reveló que la sobreexpresión de la conexina 43 era suficiente por sí sola para rescatar alteraciones funcionales en la

15 ARVC (PKP2_{mut}) sin afectar a las proteínas desmosomales (unión mecánica entre células) que se demostró que se perdieron en esta línea hiPSC ARVC (figura 1G). No obstante, en algunas realizaciones, la terapia génica con conexina 43 se puede usar junto con terapias complementarias dirigidas a la restauración de la proteína desmosomal para reforzar aún más la unión célula-célula en la ARVC.

20 Usando el adenovirus Cx43 YFP, los presentes inventores también demostraron que los efectos rescatados de la sobreexpresión de la conexina 43 en la línea hiPSC ARVC estructural (PKP2_{mut}) eran dependientes de la dosis (figura 2).

25 Usando el adenovirus Cx43 YFP, los presentes inventores demostraron que la sobreexpresión de la conexina 43 también podría rescatar las arritmias y la disfunción inducidas por catecolaminas en una línea hiPSC ARVC eléctrica que porta el DSG2 c.1498 C>A (DSG_{mut}) después de la estimulación con isoproterenol (figura 3A-F).

30 Utilizando la construcción del virus adenoasociado (AAV) Cx43 GFP, el suministro único de Cx43 GFP AAV puede prolongar la vida (2 veces) y mejorar la función cardíaca (2,5 veces) y el ritmo (1,5 veces) en un modelo de ratón adulto de ARVC (DSP-cKO), que sufre muerte súbita prematura (figura 4A-H). El modelo de ratón DSP-cKO se describió anteriormente. Un ratón adulto DSP-cKO inyectado con Cx43 GFP AAV fue encontrado muerto 3 semanas después de la inyección de AAV; sin embargo, los análisis de transferencia Western revelaron que este ratón no expresó con éxito Cx43 en el corazón (probablemente no tuvo suficiente tiempo para expresarse), lo que refuerza aún más que fue la sobreexpresión de Cx43 la clave para la prolongación de la vida y la restauración del ritmo cardíaco y la función

35 cardíaca en ratones DSP-cKO supervivientes (figura 4H).

Los presentes inventores han probado el prototipo de prueba de concepto *in vitro* utilizando un adenovirus etiquetado con proteína fluorescente amarilla de conexina 43 humana controlado por el potenciador/promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV) en miocardiocitos humanos derivados de iPSC de dos líneas de pacientes con

40 ARVC que presentan defectos principalmente eléctricos (inducidos por catecolaminas), así como características estructurales/eléctricas combinadas. La restauración de la conexina 43 a los niveles de control fue suficiente para rescatar tanto los déficits eléctricos y contráctiles inducidos por catecolaminas en la línea hiPSC ARVC eléctrica de los inventores como los déficits eléctricos y contráctiles basales e inducidos por catecolaminas en la línea hiPSC ARVC estructural y eléctrica combinada de los inventores (figuras 1-3). Los presentes inventores también han generado un

45 virus adenoasociado controlado por troponina T cardíaca (serotipo cardiopático 9) que alberga la conexina 43 humana y está marcado con proteína verde fluorescente para mostrar que el virus puede suministrarse y expresarse exitosamente en un corazón de ratón enfermo en etapa avanzada que presenta ARVC (ratones DSP-cKO) utilizando un método de suministro único (suministro retroorbital). Los presentes inventores también demostraron que el AAV Cx43 probablemente tarda entre 3 y 6 semanas con una dosis de $2,4 \times 10^{11}$ genomas víricos/ratón en expresarse de

50 manera óptima basándose en el ratón DSP cKO que recibió el virus y murió (3 semanas después de la inyección de AAV, sin mostrar expresión de la proteína conexina 43) frente al ratón DSP cKO que recibió el virus y sobrevivió (6 semanas después de la inyección de AAV, que muestra una fuerte expresión de la proteína conexina 43) (figura 4). Los presentes inventores muestran además que el ratón DSP cKO que recibió el virus y mostró una fuerte expresión de la proteína conexina 43 vivió más (2 veces) y mostró una función cardíaca (2,5 veces) y un ritmo cardíaco (1,5

55 veces) mejorados (figura 4). Los presentes inventores también demuestran que este virus AAV no afecta a la función contráctil ni eléctrica cardíaca en ratones de control, durante toda la duración del estudio (el sacrificio se produjo 5 semanas después de la inyección de AAV) (figura 4).

Ejemplo 2. El aumento de la expresión de Cx43 promueve la prolongación de la vida y la restauración del ritmo cardíaco y la función cardíaca en un modelo de lesión de hipertrofia cardíaca.

60 Se someten ratones de seis a ocho semanas de edad a constricción aórtica transversal durante 4 semanas para inducir hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca inducidas por sobrecarga de presión. A los ratones se les administra terapia génica Cx43 después de este período de 4 semanas mediante una inyección única en la vena retroorbital en dosis similares al modelo ARVC utilizado en el Ejemplo 1 (anterior). Los ratones se controlan continuamente durante 1, 2 y 4 semanas mediante ecocardiografía y telemetría para controlar la función ventricular

izquierda y el ritmo cardíaco, respectivamente. En comparación con los controles, los ratones tratados con AAV Cx43 muestran una mejora de la función cardíaca, tal como acortamiento fraccional, reducción de las anomalías del ritmo, tales como menos PVC, así como una mayor supervivencia. Se realiza un análisis histológico para evaluar el tamaño del corazón y la infiltración fibrótica en el músculo cardíaco después de la infección. Los ratones tratados con AAV Cx43 muestran un tamaño cardíaco reducido (así como dimensiones cardíacas) y menos fibrosis después de una sobrecarga de presión en comparación con los controles.

Salvo que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etc., usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones se han de entender como que están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Tal como se utilizan en el presente documento, el término "alrededor de" y "aproximadamente" significan entre el 10 y el 15 %, preferentemente entre el 5 y el 10 %. En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que han de obtenerse mediante las realizaciones de la presente divulgación. Como mínimo y no en un intento de limitar la aplicación de la teoría de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos indicados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo habituales. A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que establecen el amplio alcance de las realizaciones de la presente divulgación sean aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se indican de la manera más precisa posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene de forma inherente algunos errores que son necesariamente el resultado de la desviación típica que se encuentra en sus respectivas mediciones de ensayo.

Los términos "un/uno", "una", "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la materia objeto en el presente documento (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse que incluyen tanto el singular como el plural, a menos que se indique otra cosa en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. La mención de intervalos de valores en el presente documento solo pretende servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos que se describen en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado, a menos que se indique otra cosa en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o de lenguaje ilustrativo (p. ej., "tal como") proporcionado en el presente documento tiene como objetivo simplemente ilustrar mejor las realizaciones descritas en el presente documento y no representa una limitación del alcance de la materia objeto de otra manera reivindicada. Ninguna de las expresiones de la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativas de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para poner en práctica cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento.

Los agrupamientos de elementos o realizaciones alternativos divulgados en el presente documento no deben interpretarse como limitaciones. Cada elemento del grupo puede citarse y reivindicarse individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos hallados en el presente documento. Se prevé que uno o más miembros de un grupo se incluyan en, o eliminen de, un grupo por motivos de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se produzca dicha inclusión o supresión, se considera que la memoria descriptiva contiene el grupo modificado, cumpliendo así con la descripción escrita de todos los grupos Markush utilizados en las reivindicaciones adjuntas.

Ciertas realizaciones se describen en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores de esta divulgación para llevar a cabo la materia objeto divulgada en el presente documento. Por supuesto, resultarán evidentes para los expertos en la materia variaciones de estas realizaciones descritas tras leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos en la materia empleen dichas variaciones según sea adecuado y los presentes inventores pretenden que la presente materia objeto se ponga en práctica de un modo distinto al específicamente descrito en el presente documento. En consecuencia, este alcance de la materia objeto divulgada incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto mencionada en las reivindicaciones adjuntas al presente según lo permita la ley aplicable. Es más, cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las posibles variaciones de los mismos está abarcado por la presente divulgación a menos que se indique lo contrario o el contexto lo contradiga claramente.

Realizaciones específicas divulgadas en el presente documento pueden estar limitadas además en las reivindicaciones usando que consiste en o que consiste esencialmente en. Cuando se usa en las reivindicaciones, ya sea presentados o añadidos por enmienda, la expresión de transición "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en las reivindicaciones. La expresión de transición "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados y a aquellos que no afectan materialmente a las una o más características básicas y novedosas. Las realizaciones descritas en el presente documento y reivindicadas de este modo se describen intrínseca o expresamente y se posibilitan en el presente documento.

En conclusión, debe entenderse que las realizaciones descritas en el presente documento son ilustrativas de los

principios de la materia objeto. Otras modificaciones que se pueden usar están dentro del alcance de esta divulgación. Así, a modo de ejemplo, aunque no de forma limitativa, se pueden utilizar configuraciones alternativas de acuerdo con las enseñanzas del presente documento. En consecuencia, la materia objeto divulgada y las invenciones reivindicadas no se limitan a lo que se muestra y describe exactamente.

REIVINDICACIONES

1. Un vector que codifica una secuencia polipeptídica de conexina 43 unida operativamente a un promotor que está activo en el tejido del músculo cardíaco, para usar en un método para tratar una enfermedad o afección cardiovascular de base estructural en un sujeto que lo necesita,
5 que comprende administrar al sujeto dicho vector, en donde, como resultado de la administración de una cantidad eficaz del vector, los niveles de conexina 43 en al menos una parte del corazón del sujeto aumentan, en donde la enfermedad o afección cardiovascular es miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho.
10
2. El vector para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia polipeptídica de conexina 43 comprende una secuencia de 382 aminoácidos de P17302 (CXA_1HUMAN; UniProtKB) (SEQ ID NO. 1), o un fragmento funcional de la misma.
- 15 3. El vector para usar de la reivindicación 2, en donde la secuencia que codifica el polipéptido de conexina 43 es la SEQ ID NO: 2.
4. El vector para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el vector es un vector vírico, opcionalmente, en donde el vector vírico es un vector adenoviral o un vector vírico adenoasociado (AAV); además opcionalmente en donde el vector AAV es del grupo de un serotipo AAV1, AAV2 o AAV9.
20
5. El vector para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el promotor es un potenciador/promotor temprano inmediato de CMV; o en donde el promotor es un promotor cardíaco específico, opcionalmente en donde el promotor es un promotor de troponina-T; o, en donde el promotor es un promotor de la cadena ligera de la miosina cardíaca, promotor de la cadena pesada de la miosina cardíaca, o un potenciador de la α -actina cardíaca unido a un promotor del factor de elongación 1 α .
25
6. El vector para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el vector se administra local o sistémicamente.
30
7. El vector para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el sujeto es un mamífero, opcionalmente, en donde el sujeto es un ser humano.
8. El vector para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la cantidad eficaz es de aproximadamente 2×10^{11} a aproximadamente 2×10^{14} genomas víricos por kg de peso corporal del sujeto.
35
9. El vector para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde como resultado de la administración, se reduce la disfunción eléctrica y/o fisiológica cardíaca.
- 40 10. El vector para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde como resultado de la administración, se mejora la integridad estructural cardíaca.

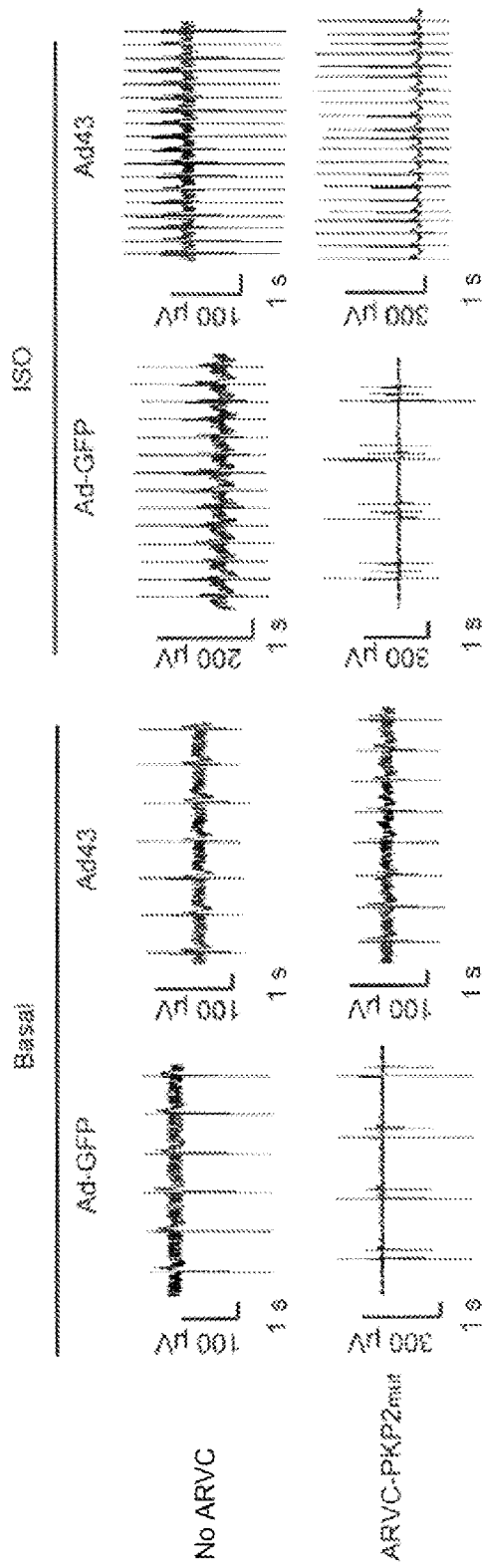


FIG. 1A

FIG. 1B

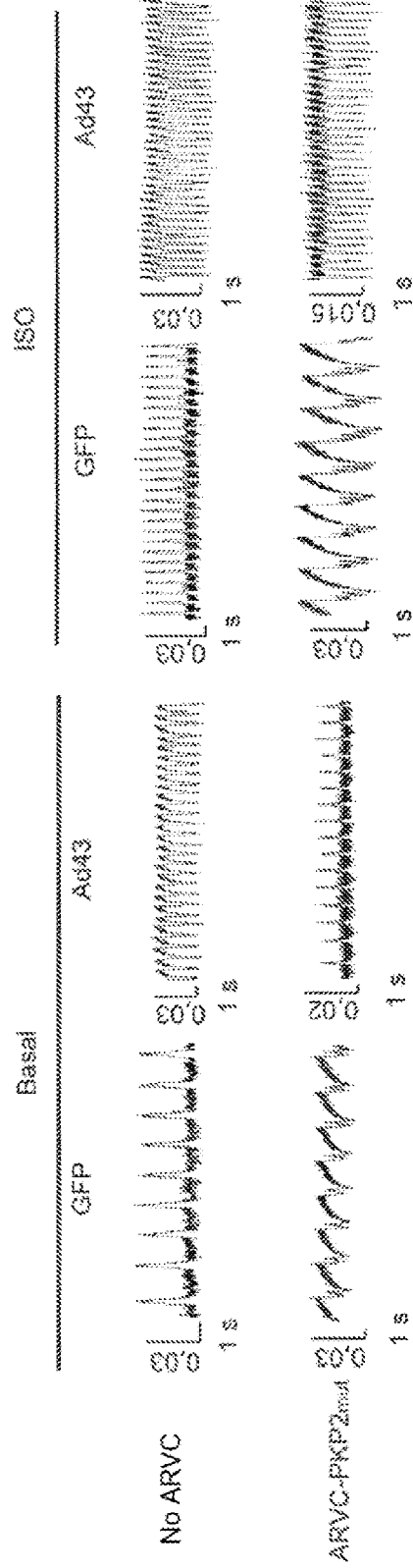


FIG. 1C

FIG. 1D

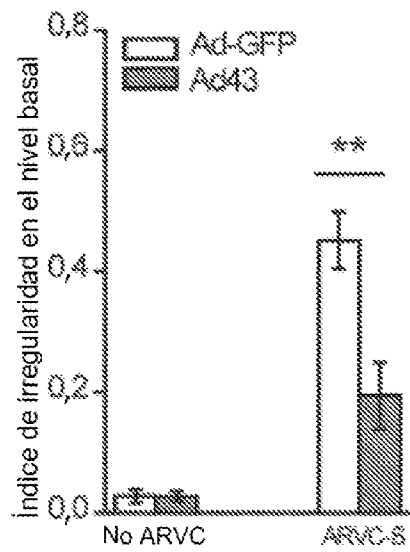


FIG. 1E

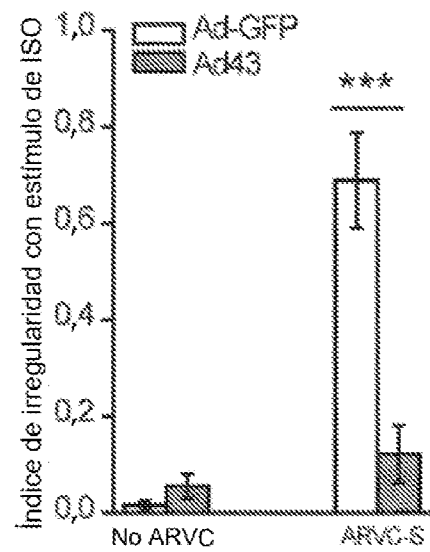


FIG. 1F

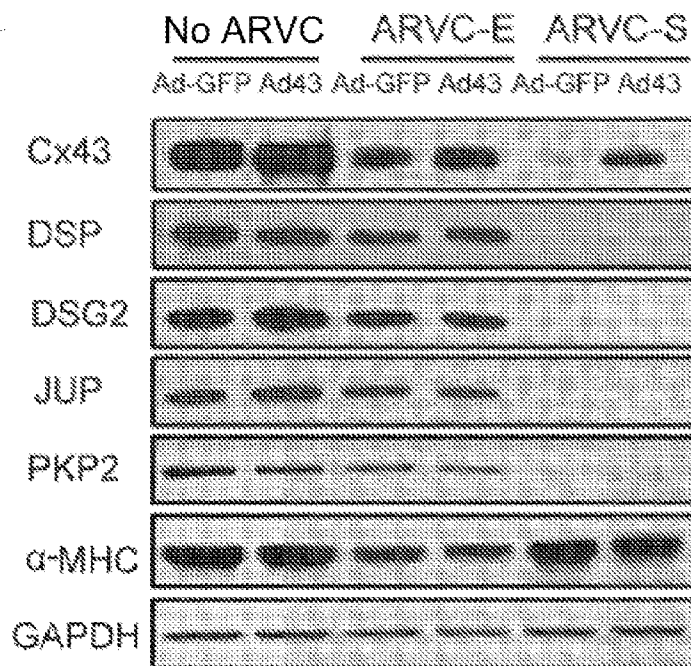


FIG. 1G

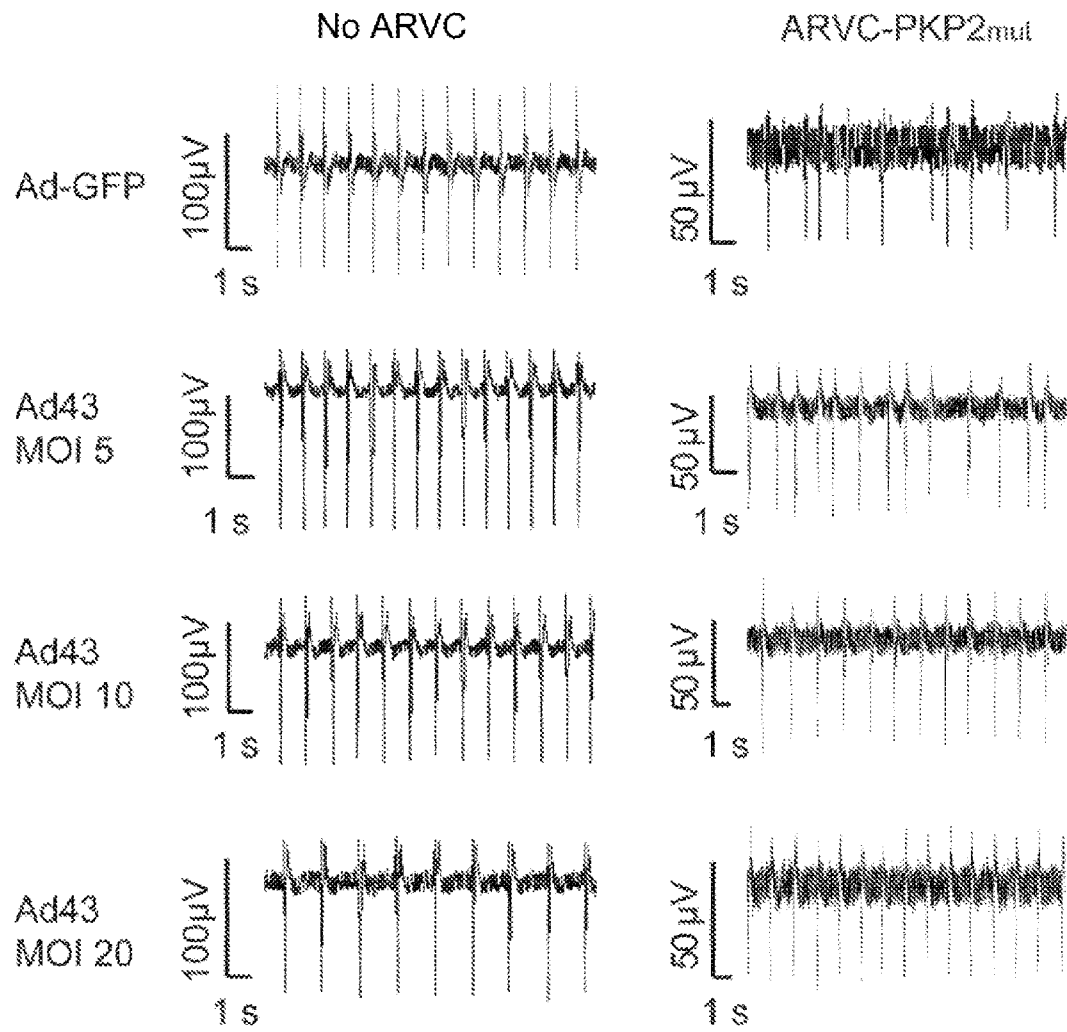


FIG. 2A

FIG. 2B

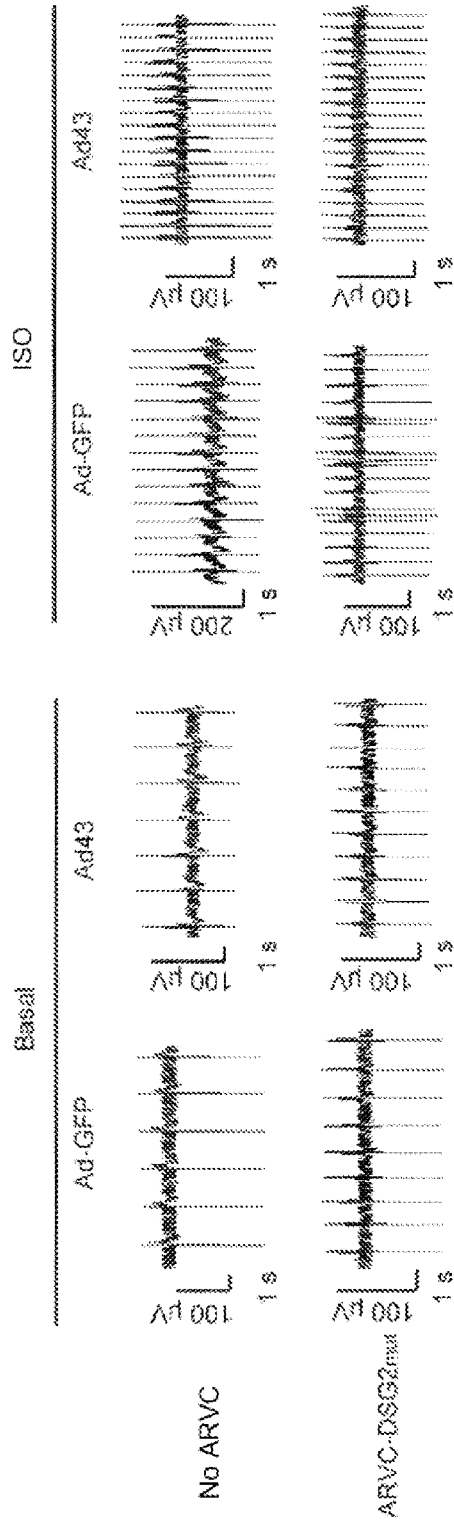


FIG. 3A

FIG. 3B

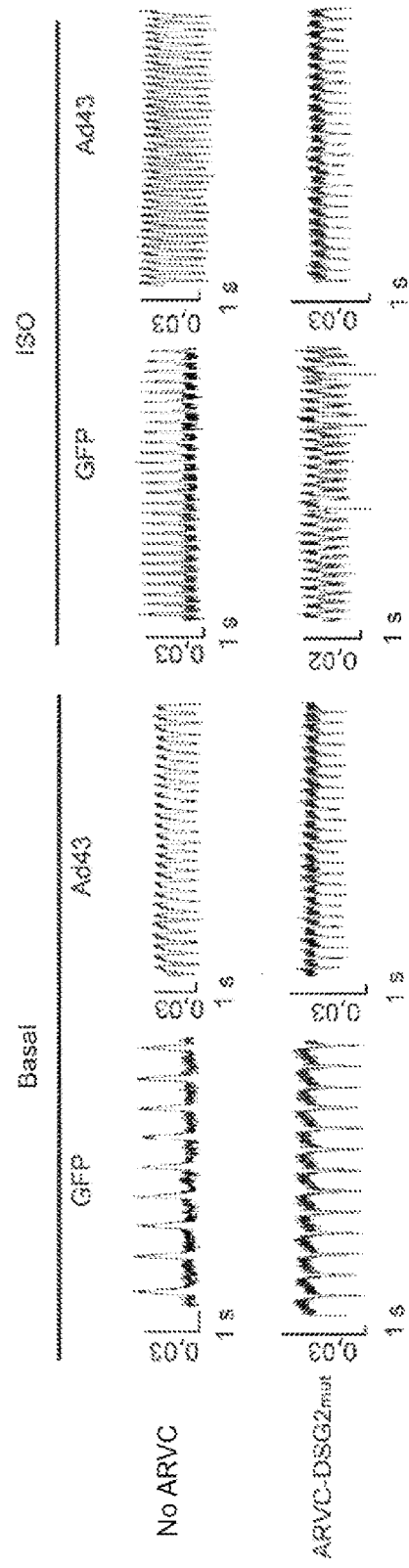


FIG. 3C

FIG. 3D

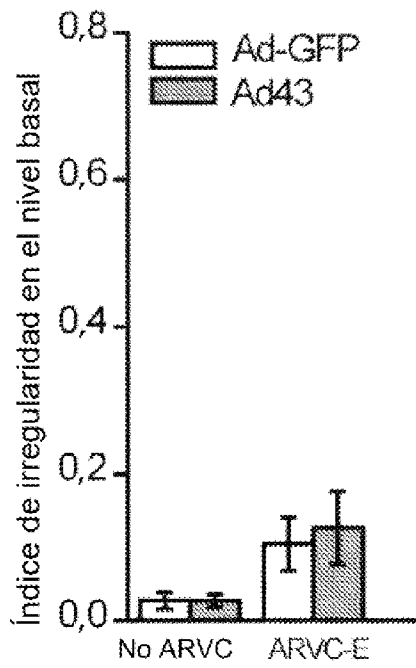


FIG. 3E

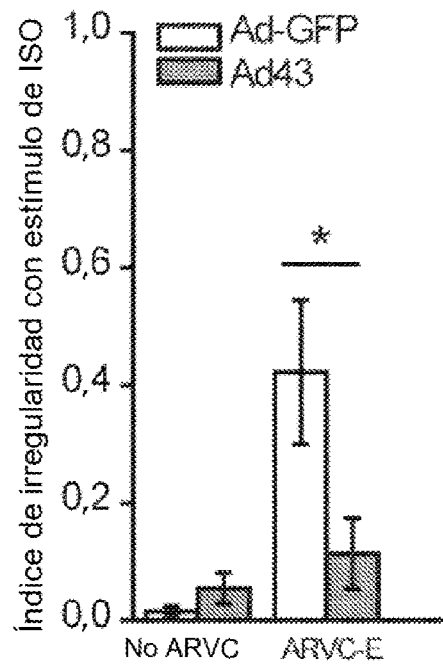


FIG. 3F

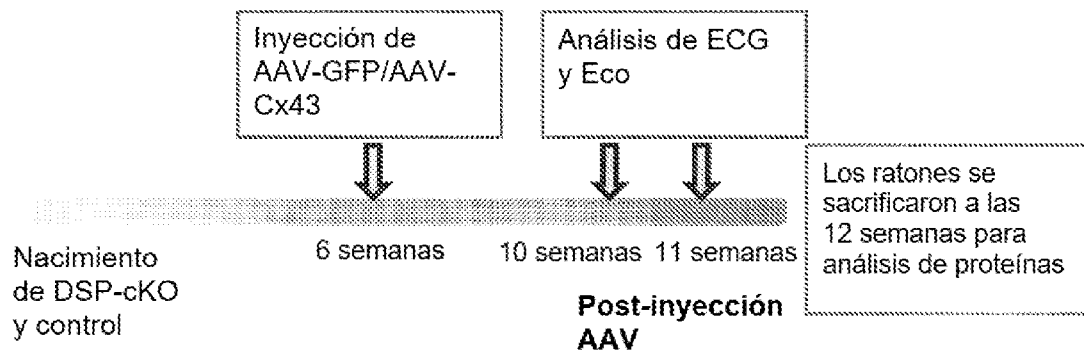


FIG. 4A

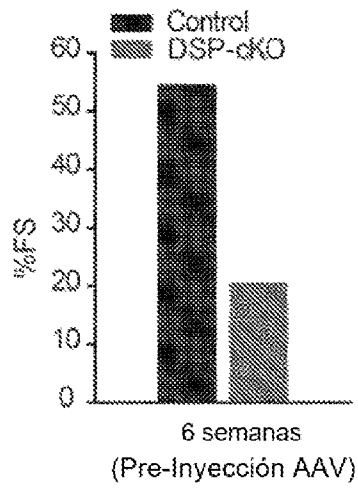


FIG. 4B

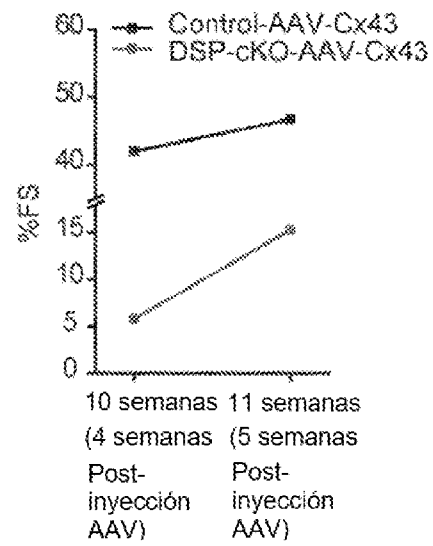


FIG. 4C

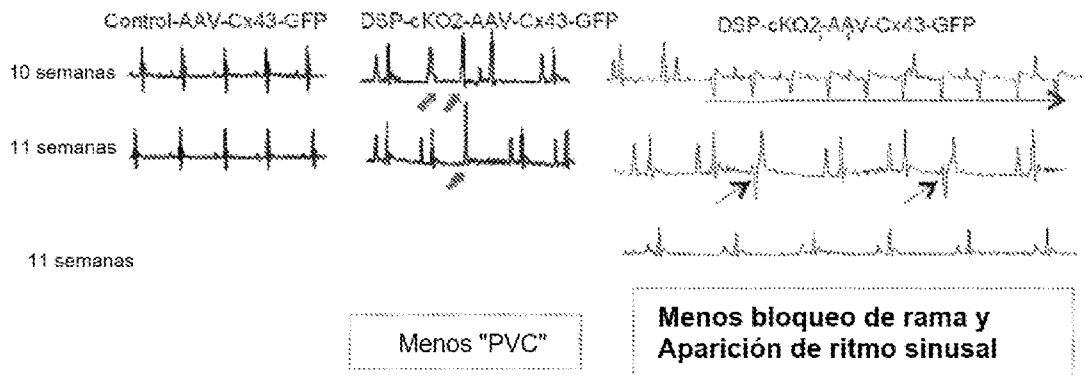


FIG. 4D

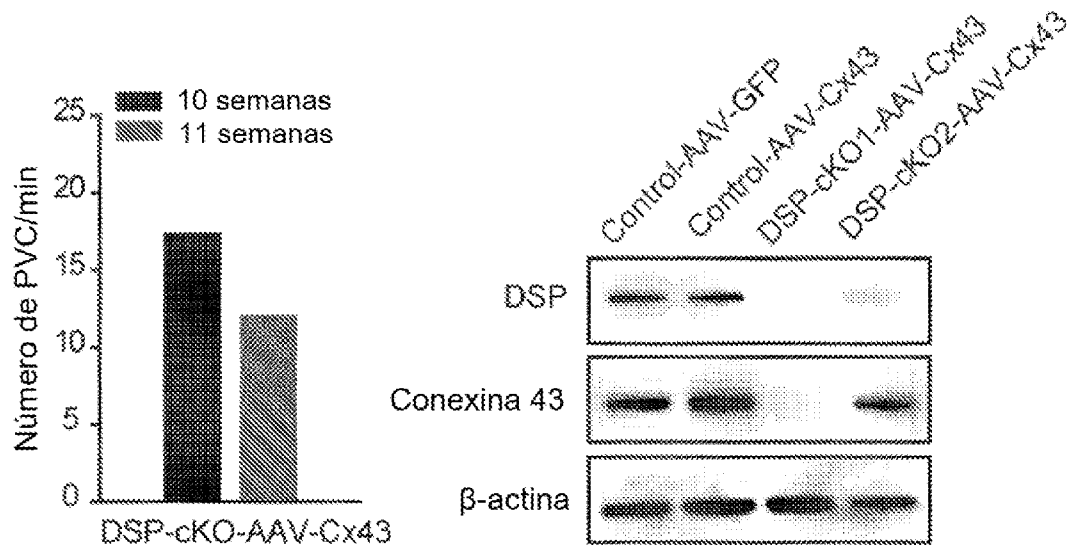


FIG. 4E

FIG. 4F

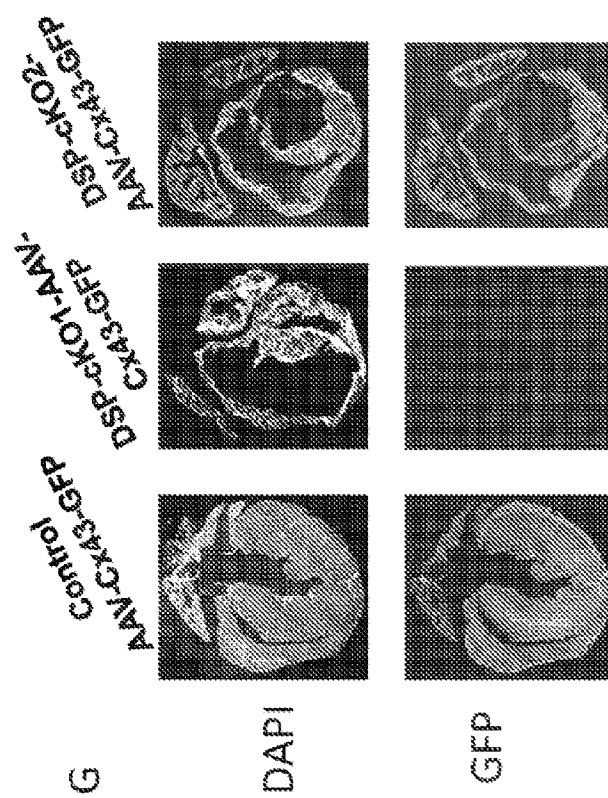


FIG. 4G

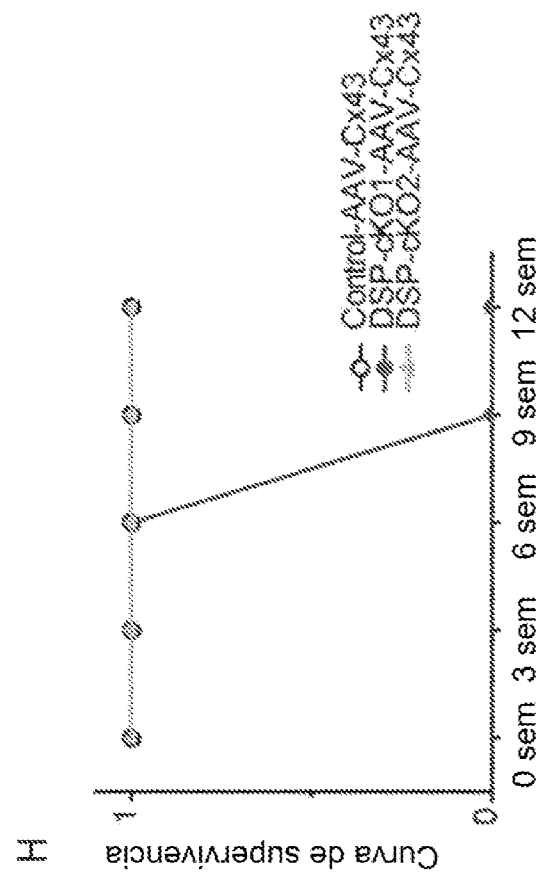


FIG. 4H

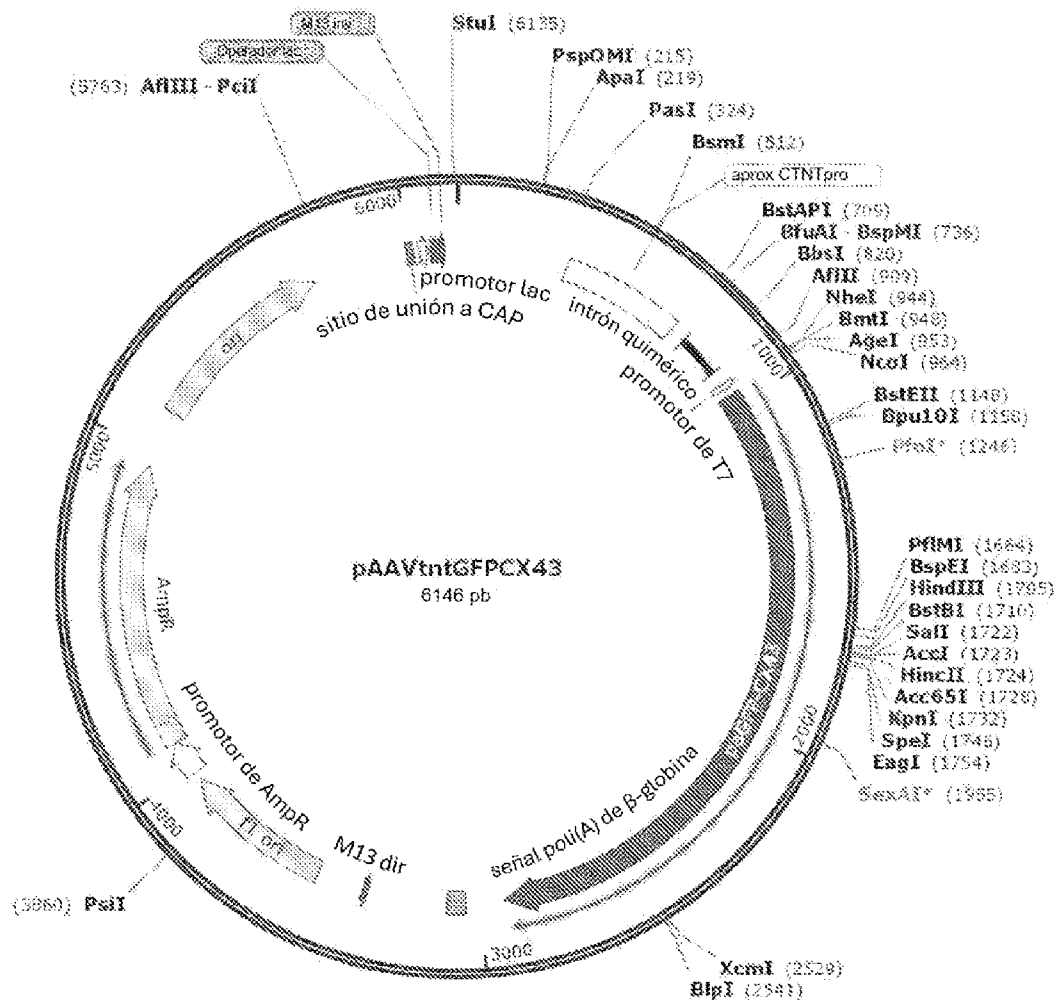


FIG. 6