

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 936 383**

51 Int. Cl.:

A61K 38/45 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2015 PCT/EP2015/067875**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16020346**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2015 E 15747463 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2022 EP 3177313**

54 Título: **Terapias basadas en transcriptasa inversa de la telomerasa para el tratamiento de afecciones asociadas con el infarto de miocardio**

30 Prioridad:

08.08.2014 EP 14382311

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2023

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN DEL SECTOR PÚBLICO ESTATAL
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
ONCOLÓGICAS CARLOS III (F.S.P. CNIO) (50.0%)
Melchor Fernández Almagro, 3
28029 Madrid, ES y
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BLASCO MARHUENDA, MARIA ANTONIA;
BERNARDES DE JESUS, BRUNO;
BAER, CHRISTIAN;
SERRANO RUIZ, ROSA MARÍA;
BOSCH I TUBERT, FÀTIMA;
AYUSO, EDUARD;
FORMENTINI, IVAN;
BOBADILLA, MARIA y
MIZRAHI, JACQUES**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

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

ES 2 936 383 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

Terapias basadas en transcriptasa inversa de la telomerasa para el tratamiento de afecciones asociadas con el infarto de miocardio

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Esta invención está relacionada con el campo de la biología molecular, la biotecnología y la medicina. Más particularmente, se refiere a vectores de ácidos nucleicos para su uso en el tratamiento del infarto de miocardio.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los telómeros son estructuras especializadas en los extremos de los cromosomas, que tienen un papel en la protección de los extremos de los cromosomas de las actividades de reparación y degradación del ADN (10; 11). Los telómeros de los mamíferos consisten en repeticiones TTAGGG unidas por un complejo multiproteico conocido como shelterina (11). Una longitud mínima de repeticiones TTAGGG y la integridad del complejo de shelterina son necesarios para la protección de los telómeros (10; 11). La telomerasa es una transcriptasa inversa celular (TERT, transcriptasa inversa de la telomerasa; también conocida como TP2; TRT; EST2; TCS1; hEST2) capaz de compensar el desgaste de los telómeros mediante la adición de novo de las repeticiones TTAGGG en los extremos del cromosoma mediante el uso de un componente R A asociado como plantilla (Terc, componente de ARN de la telomerasa) (12). La telomerasa se expresa en la mayoría de los compartimentos de células madre adultas; sin embargo, esto no es suficiente para mantener la longitud de los telómeros, como lo demuestra el hecho de que los telómeros se acortan con la edad en la mayoría de los tejidos humanos y de ratón (15; 61; 14).

[0003] Los ratones que llevan la delección homocigota para el gen TERC (el componente de ARN de la telomerasa) carecen de cualquier actividad detectable de la telomerasa y mostraron un acortamiento progresivo de los telómeros de una generación a otra en una velocidad comparable a la velocidad proporcionada en células humanas (65). Los fenotipos graves típicos de los ratones TERC^{-/-} de última generación (por ejemplo, aplasia de la médula ósea y signos de envejecimiento prematuro) podrían rescatarse mediante la reintroducción de una copia del gen TERC (86). La degeneración tisular múltiple que surge en generaciones posteriores en un modelo de ratón condicional defectuoso para TERT (la subunidad catalítica de la telomerasa) podría revertirse con la reactivación de la telomerasa incluso en ratones de edad avanzada (40).

[0004] En el contexto de ratones de tipo salvaje, la introducción de una copia adicional del gen de la telomerasa, que se expresa en una amplia gama de tejidos epiteliales, condujo a una mayor capacidad de cicatrización de heridas de la piel (66). Cuando se introdujo en un antecedente genético resistente a tumores (Sp53/Sp16/SArf) se observó un notable retraso del envejecimiento junto con un aumento de la esperanza de vida media del 40 % en comparación con los ratones que no expresaban el transgén de la telomerasa (24).

[0005] Se descubrió que una terapia génica con telomerasa basada en virus (AAV) es beneficiosa para prolongar la esperanza de vida, en el contexto del envejecimiento fisiológico normal en ratones de tipo salvaje. En el estudio que examinó este beneficio, se sometió a ratones adultos y de edad avanzada a la terapia génica con AAV9-mTERT para expresar en términos generales la subunidad catalítica de la telomerasa de ratón (mTERT). La esperanza de vida de los ratones tratados con TERT aumentó significativamente, y el envejecimiento se desaceleró, como lo indican varios parámetros fisiológicos (tolerancia a la glucosa e insulina, osteoporosis, coordinación neuromuscular, rotarod, etc). Además, su esperanza de vida media, en comparación con los grupos de control, se incrementó en un 24 % y un 13 % en ratones adultos y viejos, respectivamente. Una única administración intravenosa de AAV9-TERT en ratones adultos dio como resultado un aumento en la longitud de los telómeros en las células sanguíneas periféricas (26).

[0006] En el caso de las enfermedades cardiovasculares (ECV), los telómeros cortos se han relacionado con la disfunción cardíaca tanto en ratones como en humanos (63, 19, 20, 21, 64). En particular, los ratones con telómeros críticamente cortos debido a la deficiencia de telomerasa desarrollan miocardiopatía caracterizada por la alteración de la división celular, mayor muerte de cardiomiocitos e hipertrofia celular, que son concomitantes con dilatación ventricular, estrechamiento de la pared y disfunción cardíaca (19). Curiosamente, de forma análoga a la pérdida de la capacidad de regeneración total del corazón, la expresión de los genes esenciales de la telomerasa Terc y Tert se pierde en la primera semana de vida posnatal (22, 23).

[0007] La insuficiencia cardíaca se encuentra entre las causas más comunes de mortalidad y morbilidad a nivel mundial, y su prevalencia continúa aumentando. A pesar de las nuevas terapias, la remodelación cardíaca y la subsiguiente insuficiencia cardíaca siguen siendo temas críticos después del infarto de miocardio (1), lo que destaca la urgencia de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

RESUMEN

[0008] La presente invención proporciona un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para su uso en el tratamiento de un infarto de miocardio, donde el vector es un vector no integrativo basado en un virus adenoasociado y donde

a) TERT está codificada por

- i) una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, o
- ii) un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de TERT del 50 % o más en comparación con TERT codificada por SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, y que tiene identidad de al menos el 75 % con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, o
- iii) una secuencia de ácido nucleico que es un fragmento de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 que tiene una actividad de TERT y que tiene una identidad al menos del 75 % con la secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 a lo largo de toda la longitud del fragmento;

b) TERT comprende

- i) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, o
- ii) un polipéptido que presenta una actividad de TERT del 50 % o más en comparación con TERT de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 y que tiene una identidad de al menos el 75 % con SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, o
- iii) un polipéptido que es un fragmento de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 que tiene una actividad de TERT y que tiene una identidad de al menos el 75 % con la secuencia de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 a lo largo de toda la longitud del fragmento.

[0009] En una forma de realización, la TERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que es idéntica al menos en un 75 % a la secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3. En una forma de realización, la TERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3. En una forma de realización, la TERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que consiste en la secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3. En una forma de realización, la TERT comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en un 75 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4. En una forma de realización, la TERT comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4. En una forma de realización, la TERT consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4. En una forma de realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica TERT está unida operativamente a una secuencia reguladora que dirige la expresión de la secuencia de codificación. El vector es un vector no integrativo, un vector no integrativo basado en virus adenoasociado. En una forma de realización, el vector es un vector basado en virus adenoasociado derivado de un virus adenoasociado de serotipo 9 (AAV9). En una forma de realización, la cápside del vector basado en virus adenoasociado está hecha de proteínas de la cápside del virus adenoasociado de serotipo 9 (AAV9), y la secuencia de ácido nucleico contenida en la cápside está flanqueada en ambos extremos por repeticiones terminales internas correspondientes a virus adenoasociados de serotipo 2. En una forma de realización, el ácido nucleico contenido en la cápside comprende un fragmento que codifica la secuencia de aminoácidos que codifica TERT. En una forma de realización, el vector comprende una secuencia reguladora que es un promotor constitutivo. En una forma de realización, la secuencia reguladora es el promotor de citomegalovirus (CMV).

[0010] En una forma de realización, el vector se usa para administrarse directamente al tejido cardíaco.

[0011] En determinadas formas de realización, el paciente tratado ha sufrido previamente un infarto de miocardio.

[0012] Además de la invención, la presente solicitud también describe composiciones y enfoques útiles para el tratamiento y la prevención de afecciones asociadas con el infarto de miocardio. En determinados casos, la afección asociada con el infarto de miocardio se selecciona del grupo que consiste en un infarto de miocardio, daño tisular como resultado de un infarto de miocardio, fibrosis del miocardio como resultado de un infarto de miocardio y función cardíaca reducida como resultado de un infarto de miocardio.

[0013] La presente solicitud también describe un enfoque para promover la regeneración del tejido de miocardio en un paciente que lo necesita que comprende un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para su uso con ese propósito.

[0014] La presente solicitud también describe un enfoque para reducir la fibrosis del miocardio en un paciente que lo necesita que comprende un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para su uso con este propósito.

[0015] La presente solicitud también describe un enfoque para mejorar la función cardíaca en un paciente que lo necesita que comprende un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para su uso con este propósito.

[0016] La presente solicitud también describe un enfoque para prevenir el infarto de miocardio en un paciente que lo necesita que comprende un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para su uso con este propósito.

[0017] La presente solicitud también describe un enfoque para promover la proliferación de cardiomiocito en un paciente que lo necesita que comprende un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para su uso con este propósito.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0018]

Figura 1: Proporción de genomas virales (AAV9-Tert y AAV9-eGFP) por genoma diploide de muestra de tejido cardíaco analizada. La desviación se muestra entre paréntesis.

Figura 2: La expresión de la telomerasa reduce la insuficiencia cardíaca letal después de M1 y rescata los parámetros de función cardíaca. A) Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier después de un IM indican una supervivencia mejorada del 17 % después del tratamiento con Tert e IM. El análisis estadístico se calculó con la prueba de rango logarítmico. Ningún animal operado de forma simulada murió. B-F) La ecocardiografía a 1 y 3 semanas en ratones inyectados con AAV9-Tert o sin virus (todos con IM); o ratones simulados (sin virus, sin IM) revela una mejora funcional en el grupo con Tert. B) Se determinó el área telesistólica del VI, C) Área telediastólica del VI, D) fracción de eyección, E) grosor de pared longitudinal, F) grosor de pared transversal en el número indicado de ratones (E y F solo 1 semana después del IM).

Figura 3: La exploración FDG-PET revela una reducción de la gravedad del infarto en ratones tratados con AAV9-Tert y coincide con tamaños de cicatriz fibrótica más pequeños y menos fibrosis intersticial después del IM. A) Porcentaje de ratones con AAV9-vacío o AAV9-Tert que murieron durante o poco después de la exploración PET. B) La gravedad del infarto en las cohortes con AAV9-Tert y AAV9-vacío se evaluó en exploraciones FDG-PET. Se encontró un mayor número de corazones con pérdida de señal en el grupo con AAV9-vacío. C) Imágenes de exploración PET representativas de un corazón completamente funcional (izquierda) y corazones defectuosos después de un IM (derecha). D) Longitud media de la cicatriz en relación con la circunferencia endocárdica del VI de los grupos indicados. E) Área fibrótica intersticial con respecto al área total medida en el miocardio remoto del infarto. Se representan el número de animales y el análisis estadístico (prueba t de Student).

Figura 4: La expresión de la telomerasa rescata los parámetros séricos asociados con la insuficiencia cardíaca. La concentración de urea en suero como medida de la funcionalidad renal y cardíaca se determinó en los grupos indicados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

[0019] La presente solicitud, además de la invención, describe composiciones y enfoques útiles para el tratamiento y la prevención de afecciones asociadas con el infarto de miocardio.

[0020] Una "afección asociada con el infarto de miocardio" incluye eventos de infarto de miocardio, daño tisular como resultado de un infarto de miocardio (incluida la pérdida de cardiomiocitos), fibrosis del miocardio como resultado de un infarto de miocardio, función cardíaca reducida como resultado de un infarto de miocardio.

[0021] Como se muestra en los ejemplos, el tratamiento del corazón de ratón adulto con el vector de terapia génica con telomerasa descrito en la solicitud tiene efectos beneficiosos después de M1 al ayudar a la capacidad de regeneración del corazón, disminuir la fibrosis y aumentar significativamente el tiempo de supervivencia. El tratamiento con el vector de terapia génica con telomerasa aumenta la activación de la telomerasa en el corazón, lo que mejora los parámetros funcionales y morfológicos cardíacos y reduce significativamente la mortalidad por insuficiencia cardíaca después de un IM. El tratamiento rescata los cambios en la expresión génica asociados con la insuficiencia cardíaca, los cambios en el metabolismo y la expresión de genes fetales.

[0022] En consecuencia, la invención proporciona un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para su uso en el tratamiento del infarto de miocardio, donde el vector es un vector no integrativo basado en virus adenoasociado, es decir, un agente que aumenta la longitud de los telómeros del paciente. En una forma de realización, el agente evita la degradación de los extremos cromosómicos. En una forma de realización, el agente aumenta la actividad de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT).

[0023] En determinados enfoques, la secuencia de TERT usada en el vector de terapia génica se deriva de la misma especie que el sujeto. Por ejemplo, la terapia génica en seres humanos se llevaría a cabo usando la secuencia de TERT humana. La terapia génica en ratones se llevaría a cabo usando la secuencia de TERT de

ratón, como se describe en los ejemplos. En una forma de realización, la TERT está codificada por la secuencia de ácido nucleico, como se establece en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 (variantes de TERT humanas 1 y 2), o es un fragmento activo o equivalente funcional de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3. La secuencia polipeptídica codificada por SEQ ID NO:1 se establece en SEQ ID NO:2. El polipéptido codificado por SEQ ID NO:3 se establece en SEQ ID NO:4. Como se utiliza en este caso, "equivalente funcional" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de TERT o un polipéptido que tiene una actividad de TERT. El equivalente funcional puede mostrar una actividad del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 100 % o más en comparación con la TERT codificada por SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3. Los equivalentes funcionales pueden ser artificiales o naturales. Por ejemplo, las variantes naturales de la secuencia de TERT en una población entran dentro del alcance del equivalente funcional. Las secuencias de TERT derivadas de otras especies también entran dentro del alcance del término "equivalente funcional", en particular, la secuencia de TERT murina proporcionada en SEQ ID NO:5. En una forma de realización particular, el equivalente funcional es un ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos que tiene al menos una identidad del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3. En otra forma de realización, el equivalente funcional es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % con SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4. En el caso de equivalentes funcionales, la identidad de secuencia debería calcularse a lo largo de toda la longitud del ácido nucleico. Los equivalentes funcionales pueden contener uno o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30 o más inserciones, deleciones y/o sustituciones de nucleótido cuando se compara con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3. El término "equivalente funcional" también abarca secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido de TERT con al menos una identidad de secuencia del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % con respecto a la secuencia que se establece en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, pero que muestra poca homología con la secuencia de ácido nucleico proporcionada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 debido a la degeneración del código genético.

[0024] Como se utiliza en este caso, el término "fragmento activo" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad o un polipéptido de TERT que tiene una actividad de TERT, pero que es un fragmento del ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4. Un fragmento activo puede ser de cualquier tamaño siempre que se mantenga la actividad de TERT. Un fragmento tendrá al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 100 % de identidad con SEQ ID NO:1-4 a lo largo de la longitud de la alineación entre el fragmento más corto y SEQ ID NO:1-4.

[0025] Las proteínas de fusión que incluyen estos fragmentos pueden estar comprendidas en los vectores de ácido nucleico necesarios para llevar a cabo la invención. Por ejemplo, se pueden incluir 5, 10, 20, 30, 40, 50 o incluso 100 residuos de aminoácidos de la secuencia polipeptídica, o de una secuencia homóloga, en cualquiera o ambos extremos C terminal y/o N terminal sin perjudicar la capacidad del fragmento de polipéptido para plegarse correctamente y mostrar la actividad biológica.

[0026] La identidad de secuencia se puede calcular mediante cualquiera de los diversos métodos en la técnica, incluido, por ejemplo, BLAST (Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). "Basic local alignment search tool". J Mol Biol 215 (3): 403-410) y FASTA (Lipman, DJ; Pearson, WR (1985). "Rapid and sensitive protein similarity searches". Science 227 (4693): 1435-41; http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_list2.shtml) y variaciones en estos programas de alineación.

[0027] En un enfoque, el vector de ácido nucleico para su uso según la invención es un vector de terapia génica. Los métodos y vectores de terapia génica son bien conocidos en la técnica y comprenden generalmente administrar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéuticamente activa a un sujeto. En la técnica, el ácido nucleico puede suministrarse de varias formas, incluida la administración de ADN desnudo, como plásmido o minicirculos, el uso de liposomas o polímeros catiónicos u otras nanopartículas diseñadas que contienen el ácido nucleico, o vectores virales que encapsulan el ácido nucleico.

[0028] En la técnica, la terapia génica se puede lograr mediante la transformación estable de organismos con un sistema de expresión inducible. Los sistemas de expresión inducible adecuados se conocen en la técnica e incluyen el sistema basado en la recombinasa CRE-LOX que es adecuado para usarse en ratones y el regulado por tetraciclina que puede usarse en el tratamiento de sujetos humanos.

[0029] El vector de terapia génica para su uso según la invención es un vector viral: un vector no integrativo basado en virus adenoasociados. Los vectores de terapia genética virales son bien conocidos en la técnica. Los vectores de la técnica incluyen vectores integrativos y no integrativos, como los basados en retrovirus, adenovirus (adV), virus adenoasociados (AAV), lentivirus, poxvirus, alfavirus y herpesvirus.

[0030] El uso de vectores virales no integrativos, como AAV, parece ser particularmente ventajoso. En primer lugar, esto se debe a que los vectores no integrativos no provocan ninguna modificación genética permanente. En segundo lugar, los vectores se dirigen a tejidos adultos, por lo que se evita que los sujetos estén bajo el efecto de la expresión constitutiva de la telomerasa desde etapas tempranas de desarrollo. Además, los vectores

no integrativos incorporan eficazmente un mecanismo de seguridad para evitar la sobreproliferación de células que expresan TERT. Las células perderán el vector (y, en consecuencia, la expresión de la telomerasa) si comienzan a proliferar rápidamente.

[0031] Los ejemplos particulares de vectores no integrativos adecuados de la técnica incluyen aquellos basados en adenovirus (adV), en particular adenovirus *gutless*, virus adenoasociados (AAV), lentivirus deficientes en integrasa, poxvirus, alfavirus y herpesvirus. El vector no integrativo usado en la invención es un vector no integrativo basado en virus adenoasociado, similar a las partículas virales adenoasociadas naturales. AAV se dirige preferentemente a los tejidos posmitóticos, que se consideran más resistentes al cáncer que los altamente proliferativos. Los ejemplos de vectores no integrativos basados en virus adenoasociados incluyen vectores basados en cualquier serotipo de AAV, es decir, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 y AAV pseudotipado. La especificidad del tejido está determinada por el serotipo de la cápside. La pseudotipificación de los vectores de AAV y la ingeniería de la cápside para alterar su rango de tropismo probablemente serán importantes para su uso en la terapia.

[0032] Los vectores derivados de virus adenoasociados (AAVs) han surgido como uno de los vectores de elección para muchas aplicaciones de transferencia de genes debido a sus muchas propiedades deseables, incluida la capacidad de transducir una amplia variedad de tejidos con alta eficiencia, poca inmunogenicidad y un excelente perfil de seguridad (67; 68), ya que la toxicidad está ausente en muchos modelos preclínicos (69; 70; 71; 72; 73). Los vectores de AAV transducen células posmitóticas y pueden mantener la expresión génica a largo plazo (hasta varios años) en modelos de enfermedad en animales tanto pequeños como grandes (69; 70, 71, 72, 73). La seguridad y eficacia de la transferencia del gen de AAV se ha estudiado ampliamente en seres humanos con resultados alentadores en el hígado, el músculo, el SNC y la retina (74, 75, 76; 77; 78).

[0033] AAV2 es el serotipo mejor caracterizado para estudios de transferencia de genes tanto en humanos como en modelos experimentales. AAV2 presenta un tropismo natural hacia los músculos esqueléticos, las neuronas, las células del músculo liso vascular y los hepatocitos. Por lo tanto, AAV2 es una buena elección de vector para dirigirse a estos tejidos, en particular cuando se usan los vectores para su uso según la invención para tratar una afección asociada con uno de estos tejidos. Por ejemplo, el tratamiento de la degeneración neuromuscular se puede dirigir al músculo esquelético y/o las neuronas de esta manera.

[0034] Los serotipos recientemente aislados, tales como AAV7, AAV8 y AAV9 se han adoptado con éxito en estudios preclínicos (28). Aunque se han detectado respuestas inmunológicas limitadas en sujetos humanos tratados con AAV2 o AAV1 contra la cápside de AAV (74; 79; 80; 81), es posible la expresión a largo plazo del gen terapéutico dependiendo del tejido objetivo y la vía de administración (80; 82). Además, el uso de serotipos no humanos, como AAV8 y AAV9, puede ser útil para superar estas respuestas inmunológicas en sujetos, y los ensayos clínicos acaban de comenzar (ClinicalTrials.gov identificador: NCT00979238). Completamente, estos datos alentadores sugieren que los vectores de AAV son herramientas útiles para tratar enfermedades humanas con un alto perfil de seguridad y eficiencia.

[0035] La elección de virus adenoasociados de amplio tropismo, como los derivados del virus adenoasociado de serotipo 9 (AAV9) es particularmente ventajosa cuando se tratan afecciones asociadas con telómeros de longitud corta. Los virus AAV9 han mostrado una transducción eficiente en una amplia gama de tejidos, con un alto tropismo por el hígado, el corazón y el músculo esquelético (83), por lo que los efectos beneficiosos de la terapia génica se pueden lograr en más tejidos. Además, los vectores de AAV9 tienen la capacidad única de cruzar la barrera hematoencefálica y apuntar al cerebro mediante inyección intravenosa en ratones y gatos adultos (84; 85).

[0036] Un aspecto de la invención proporciona un sistema en el que la cápside (que es la parte del virus que determina el tropismo del virus) del vector basado en virus adenoasociado está hecha de proteínas de la cápside del virus adenoasociado de serotipo 9 (AAV9). En una forma de realización de los vectores virales para su uso en la invención, la secuencia polinucleótida envasada en la cápside está flanqueada por repeticiones terminales internas (RTI) de un virus adenoasociado de serotipo 2 que se ha caracterizado ampliamente en la técnica y presenta una secuencia de codificación situada entre las RTI. Como se establece anteriormente, el ácido nucleico codifica preferiblemente un polipéptido de TERT funcional. En una forma de realización, la secuencia reguladora unida operativamente a la secuencia de codificación de TERT es el promotor de citomegalovirus (CMV), aunque los expertos en la técnica conocerán otras secuencias reguladoras adecuadas.

[0037] Al tratar afecciones asociadas con una longitud corta de los telómeros, es ventajoso dirigir el tratamiento a los tejidos afectados. La elección del serotipo de AAV para la proteína de la cápside del vector de terapia génica puede basarse, por lo tanto, en el sitio deseado de la terapia génica. Si el tejido objetivo es músculo esquelético, por ejemplo, en el tratamiento de la pérdida de coordinación neuromuscular, se pueden usar vectores virales basados en AAV1 y AAV6. Ambos de estos serotipos son más eficientes a la hora de la transfección muscular que otros serotipos AAV. AAV3 es útil para transfectar células hematopoyéticas. Se puede encontrar una revisión minuciosa de los vectores basados en AAV para la terapia génica en Shi *et al*, (2008) "AAV-based targeting gene therapy" Am. J. Immunol. 4:51- 65.

[0038] Alternativamente, se pueden usar otros vectores virales para los enfoques descritos aquí. Cualquier vector compatible con el uso en terapia génica se puede usar para los enfoques descritos aquí. Heilbronn y Weger (2010) *Handb Exp Pharmacol*. 197: 143-70 proporcionan una revisión de vectores virales que son útiles en la terapia génica. De acuerdo con toda la explicación precedente, los vectores que comprenden una secuencia de codificación de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) adecuada para su uso en terapia génica son un punto importante para poner en práctica la invención. Los vectores de terapia genética adecuados incluyen cualquier tipo de partícula que comprenda un fragmento de polinucleótido que codifique la proteína de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT), unida operativamente a un elemento regulador, como un promotor, que permite la expresión de una proteína TERT funcional que demuestra una actividad de la transcriptasa inversa de la telomerasa en las células dirigidas. Preferiblemente, TERT está codificada por la secuencia de ácido nucleico como se establece en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, o es un fragmento activo o equivalente funcional de TERT. El término vector de terapia genética, como se usa en la presente solicitud, incluye dentro de su alcance moléculas de ADN desnudo, tales como plásmidos o minicírculos, es decir, moléculas de ADN circular que no contienen secuencias de ADN bacteriano, siempre que la secuencia de codificación de TERT y su elemento regulador unido se inserten en el plásmido, así como en sistemas más complicados, como partículas con la estructura de viriones (partículas virales), que comprenden al menos una cápside y al menos una secuencia de polinucleótidos, con un tamaño que permite envasar la secuencia de polinucleótidos dentro de la cápside de manera similar al del genoma nativo del virus del origen de la cápside. La secuencia de polinucleótidos debe incluir una región en la que se insertan la secuencia de codificación de TERT y su elemento regulador unido de manera que la proteína de transcriptasa inversa de la telomerasa se pueda expresar a partir de esta secuencia de polinucleótidos una vez que la partícula viral haya infectado una célula.

[0039] El vector de terapia génica que se utiliza en la invención es un vector no integrativo: un vector no integrativo basado en virus adenoasociado. Para los fines de la invención, la elección de vectores no integrativos parece ser particularmente ventajosa, ya que no provocan ninguna modificación genética permanente. Además, como se indicó anteriormente, dichos vectores incorporan un mecanismo de seguridad para evitar la sobreproliferación de células que expresan TERT que perderán el vector si las células empiezan a proliferar rápidamente. Se prefieren vectores basados en virus adenoasociados derivados de un virus adenoasociado de serotipo 9 (AAV9) porque los efectos beneficiosos se pueden lograr en más tejidos (véase más arriba). En una forma de realización particularmente preferida, la secuencia reguladora unida operativamente a la secuencia de codificación de TERT es el promotor de citomegalovirus (CMV). La secuencia de ácido nucleico que codifica TERT está unida operativamente a una secuencia reguladora que dirige la expresión de la secuencia de codificación. Como se utiliza en este caso, el término "elemento regulador" significa una secuencia de ácido nucleico que sirve como promotor, es decir, regula la expresión de una secuencia de ácido nucleico unida operativamente al promotor. Dichos "elementos reguladores" o "promotores" pueden controlar la expresión de secuencias de ácido nucleico unidas de forma constitutiva o inducible.

[0040] La secuencia reguladora puede ser un promotor constitutivo. Un ejemplo de una secuencia reguladora que es un promotor constitutivo es el promotor de citomegalovirus (CMV).

[0041] La expresión de TERT después de la terapia genética, como se muestra en los ejemplos de la presente aplicación, persiste durante un tiempo de varios meses a varios años. En ratones la expresión de TERT fue detectable después de 5 meses. En monos la expresión génica después de la terapia genética con un vector basado en AAV se ha detectado hasta 6 años después del tratamiento y hasta 8 años en perros (Rivera *et al* Blood 2005, y 69). Por lo tanto, no es necesaria una repetición frecuente de la administración de los vectores para su uso según la invención. En un enfoque compatible con la invención, el vector está destinado a usarse en el tratamiento de un sujeto una vez. En un enfoque compatible alternativo, el vector está destinado a usarse en el tratamiento de un sujeto inicialmente, y en el tratamiento del sujeto después de nuevo una vez que los niveles de expresión de TERT disminuyen en aproximadamente un 50 % de los alcanzados inmediatamente después del tratamiento. El tratamiento puede repetirse con el mismo vector o un vector alternativo para mantener la reducción de los trastornos relacionados con la edad si es necesario, por ejemplo anualmente, o una vez cada 5 años o una vez por década. Al administrar una segunda dosis o dosis posteriores, puede ser necesario usar un vector de terapia génica diferente, por ejemplo, al usar un vector basado en AAV, la segunda administración y las posteriores pueden ser un vector con una cápside derivada de un serotipo diferente al usado para la primera administración. Es posible que un sujeto pueda desarrollar los anticuerpos de neutralizantes contra el primer vector de terapia genética, por lo que lo hace ineficaz si se administra por segunda vez o posteriormente (Amado *et al* (2010) *Science Translational Medicine* 2(21):21ral6).

[0042] En formas de realización particulares, el vector de terapia génica está destinado a usarse para administrarse a un paciente después de que ese paciente haya sufrido un infarto de miocardio. Es preferible administrar el vector lo antes posible después del infarto de miocardio, por ejemplo, dentro de doce horas, veinticuatro horas, treinta y seis horas, cuarenta y ocho horas, sesenta horas, setenta y dos horas y ochenta y cuatro horas después del evento de infarto de miocardio.

[0043] En el tratamiento de una afección asociada con el infarto de miocardio, es preferible usar el vector de AAV9. Si bien este vector tiene un tropismo amplio, transduce preferentemente tejido cardíaco, lo que permite el uso de una dosis baja del vector que da como resultado una transducción mínima de tejido no cardíaco.

[0044] En una forma de realización de la invención, el vector se usa para administrarse directamente en el tejido cardíaco, lo que reduce aun más el potencial de reactividad cruzada de otros tejidos. La administración directa al tejido cardíaco también es ventajosa, ya que permite que una dosis más baja de vector sea eficaz en el tratamiento. En una forma de realización de la invención, el vector se usa para administrarse directamente al tejido cardíaco en una dosis que es eficaz para transducir tejido cardíaco con una transducción mínima al hígado, cerebro, u otro tejido no cardíaco.

[0045] Como se demuestra en los ejemplos, el tratamiento del corazón de ratón adulto con el vector de terapia génica para su uso según la invención mejora los parámetros funcionales y morfológicos cardíacos y reduce significativamente la mortalidad por insuficiencia cardíaca después de un evento de infarto de miocardio. Los efectos beneficiosos específicos del tratamiento de terapia génica después del IM incluyen la promoción de la capacidad de regeneración del tejido cardíaco, la disminución de la fibrosis y un aumento significativo del tiempo de supervivencia de los ratones.

[0046] Es importante destacar que el tratamiento rescató los cambios en la expresión génica asociados con una insuficiencia cardíaca, incluidos los cambios en el metabolismo y la expresión de genes fetales. Además, se encontró una señalización sostenida de TGF β y una remodelación de la matriz en el corazón tratado, al igual que la inducción de vías cardioprotectoras, como la vía de EGF. Los cambios en la expresión génica inducidos por el tratamiento se enriquecen en la firma de expresión génica regenerativa descrita en ratones recién nacidos, que tiene un potencial regenerativo completo.

[0047] En consecuencia, los enfoques descritos aquí tienen el efecto de tratar y/o prevenir afecciones asociadas con el infarto de miocardio. En este caso se describe el uso de un vector de ácido nucleico, como se ha descrito anteriormente, para su uso en el tratamiento o la prevención en un paciente de una afección asociada con el infarto de miocardio, incluidos, pero no de forma limitada, los eventos de infarto de miocardio, el daño tisular como resultado de un infarto de miocardio (incluida la pérdida de cardiomiocitos), la fibrosis del miocardio como resultado de un infarto de miocardio, la función cardíaca reducida como resultado de un infarto de miocardio.

[0048] Como se describe aquí, la terapia génica da como resultado una mayor esperanza de vida del paciente tratado, en función de la prevención o el retraso de un infarto de miocardio. Como se describe aquí, la terapia génica previene o reduce la fibrosis del tejido cardíaco. Como se describe aquí, la terapia génica mejora la función cardíaca. Como se describe aquí, la terapia génica promueve la regeneración del tejido cardíaco. Como se describe aquí, la terapia génica promueve la proliferación. En formas de realización particulares, al paciente al que se le administró la terapia génica ha sufrido un evento de infarto de miocardio previo.

[0049] La eficacia del tratamiento de las afecciones asociadas con el infarto de miocardio puede medirse mediante varios métodos conocidos en la técnica. Como se describe aquí, la eficacia del tratamiento puede ser medida por un aumento en la esperanza de vida de un paciente tratado que padece una afección asociada con el infarto de miocardio en comparación con la esperanza de vida esperada de un paciente no tratado que padece la misma afección. La esperanza de vida se puede extender en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más con referencia a la esperanza de vida esperada para un paciente que padece la misma afección.

[0050] El tratamiento de terapia génica es útil para prevenir o retrasar la aparición de un evento de miocardio en un paciente que ya ha sufrido un evento de miocardio anterior. Como se describe aquí, la eficacia del tratamiento puede medirse mediante un inicio retrasado de un infarto de miocardio posterior después de un infarto de miocardio anterior. El retraso en el inicio de un infarto de miocardio subsiguiente de un paciente tratado se puede extender en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más con referencia al momento esperado del infarto de miocardio subsiguiente para un paciente no tratado.

[0051] Como se describe aquí, la eficacia del tratamiento puede medirse mediante una reducción de la fibrosis del miocardio como resultado de un infarto de miocardio. La reducción de la fibrosis del miocardio resultante del infarto de miocardio puede reducirse en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más con referencia a la fibrosis en el miocardio antes del tratamiento. La fibrosis se puede medir utilizando varias técnicas conocidas en la técnica. La fibrosis puede ser medida mediante un análisis patológico, como la determinación de áreas fibróticas (cicatrices) usando la tinción tricrómica de Masson.

[0052] Como se describe aquí, la eficacia del tratamiento puede medirse mediante un aumento de la función cardíaca después de un infarto de miocardio. La función cardíaca después del infarto de miocardio puede aumentar en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más con referencia al nivel de función cardíaca antes del tratamiento. La función cardíaca puede medirse utilizando varias técnicas conocidas en la técnica. Como se describe aquí, la función cardíaca se puede medir mediante ecocardiografía. Como se describe aquí, la función cardíaca se puede medir utilizando la formación de imágenes Micro-PET. Como se describe aquí, la

función cardíaca también se puede medir en función de la función renal, donde una reducción de la función renal en un paciente indica una reducción de la función cardíaca en el paciente. Como se describe aquí, la función cardíaca también se puede medir en base al nivel de urea en la orina, donde una reducción del nivel de urea en la orina de un paciente indica una reducción de la función cardíaca en el paciente.

[0053] La eficacia del tratamiento también se puede medir determinando directamente la longitud de los telómeros en una muestra tomada del paciente. La longitud de los telómeros se puede medir, por ejemplo, usando técnicas de hibridación estándar, como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), la hibridación *in situ* fluorescente cuantitativa (Q-FISH) o la hibridación *in situ* fluorescente cuantitativa de alto rendimiento (HT Q-FISH). (66). La longitud de los telómeros también se puede medir como se describe en Canela *et al.* (56).

[0054] En un enfoque particular, se toman muestras del paciente que se somete a tratamiento a lo largo del curso del tratamiento para que se pueda determinar tanto la longitud absoluta de los telómeros como la velocidad de alargamiento o acortamiento de los telómeros a lo largo del curso de tratamiento. Las muestras se pueden tomar todos los días durante el curso del tratamiento, o en intervalos más largos. En un enfoque, las muestras se toman una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada 4 semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas o más.

[0055] La comparación de la longitud de los telómeros se puede medir comparando la proporción de telómeros cortos en una muestra tomada de un paciente. En un enfoque, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros que presentan una intensidad por debajo de la intensidad media de la muestra medida mediante una técnica de hibridación *in situ*, como FISH o Q-FISH. En un enfoque, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros que presentan una intensidad del 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 % o más por debajo de la intensidad media de la muestra. En un enfoque particular, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros que presentan una intensidad del 50 % o más por debajo de la intensidad media de la muestra.

[0056] En otro enfoque, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros por debajo de una longitud determinada, por ejemplo, de 8 kb, 7 kb, 6 kb, 5 kb, o menos. En un enfoque, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros de 8 kb o menos. En otro enfoque, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros de 7 kb o menos. En otro enfoque, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros de 6 kb o menos. En otro enfoque, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros de 5 kb o menos. En otro enfoque, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros de 4 kb o menos. En otro enfoque, la proporción de telómeros cortos es la fracción de telómeros de 3 kb o menos.

[0057] En un enfoque, la eficacia del tratamiento se mide reduciendo la proporción de telómeros cortos en la muestra tomada un paciente tratado que padece una afección asociada con el infarto de miocardio en comparación con una muestra de control. En un enfoque, la proporción de telómeros cortos en una muestra tomada de un paciente tratado se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o más en comparación con una muestra de control. En un enfoque, la muestra de control es una muestra tomada del mismo paciente antes del tratamiento, o tomada en una fase anterior del tratamiento. En otra forma de realización, la muestra de control es una muestra tomada de un paciente que padece la misma afección y al que no se le proporcionó el tratamiento.

[0058] En otro enfoque, la invención se aplica al sujeto mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de cualquiera de los vectores de terapia genética compatibles con la invención descritos anteriormente.

[0059] Se pretende que una "composición farmacéutica" incluya la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, lo que hace que la composición sea adecuada para uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

[0060] Se pretende que "composición" signifique una combinación de agente activo y otro compuesto u otra composición, inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo. Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones.

[0061] Por lo general, incluirán componentes además del componente activo (como el vector de terapia génica), por ejemplo, normalmente incluyen uno o más vehículo(s) farmacéutico(s) y/o excipiente(s). En Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, se encuentra disponible una explicación detallada de dichos componentes. 20ª edición, ISBN: 0683306472.

[0062] Las composiciones generalmente se administrarán a un sujeto en forma acuosa. Sin embargo, antes de la administración, la composición puede haber estado en una forma no acuosa. Por ejemplo, aunque algunos vectores virales se fabrican en forma acuosa, luego se llenan y distribuyen y administran también en forma acuosa, otros vectores virales se liofilizan durante la fabricación y se reconstituyen en una forma acuosa en el

momento de su uso. Por lo tanto, se puede secar una composición compatible con la invención, como una formulación liofilizada. La composición puede incluir conservantes, tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, se prefiere que la composición esté sustancialmente libre de (es decir, menos de 5µg/ml) material mercurial, por ejemplo, libre de tiomersal.

[0063] Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml, por ejemplo, alrededor de 10+2 mg/ml de NaCl. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrógenofosfato de potasio, fosfato disodio deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

[0064] Las composiciones generalmente tendrán una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferiblemente entre 240-360 mOsm/kg, y más preferiblemente estarán dentro del rango de 290-310 mOsm/kg.

[0065] Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón de citrato. Los tampones normalmente se incluirán en el rango de 5-20 mM.

[0066] La composición puede incluir material para una única administración, o puede incluir material para múltiples administraciones (es decir, un "kit multidosis"). Se prefiere la inclusión de un conservante en disposiciones multidosis. Como alternativa (o además) a la inclusión de un conservante en las composiciones multidosis, las composiciones pueden estar contenidas en un recipiente que tenga un adaptador aséptico para la eliminación del material.

[0067] Las composiciones compatibles con la invención para su uso en seres humanos se administran normalmente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque se puede administrar la mitad de la dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml) a los niños.

[0068] La presente solicitud describe una secuencia de ácido nucleico que codifica un TERT para su uso en terapia. La presente solicitud también describe un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para su uso en la terapia y un vector de terapia génica que comprende una secuencia de codificación para la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT), para su uso en una terapia. En particular, la terapia puede tratar o prevenir una afección asociada con el infarto de miocardio. La secuencia de ácido nucleico de TERT puede ser la secuencia que se indica en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o un fragmento o equivalente funcional de la misma. La proteína TERT puede tener una secuencia como se indica en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, o un fragmento o equivalente funcional de la misma.

[0069] El término "paciente" se refiere a un mamífero. En determinados enfoques compatibles con la invención, el paciente es un roedor, primate, ungulado, gato, perro u otro animal doméstico o mamífero domesticado. En determinados enfoques compatibles, el mamífero es un ratón, una rata, un conejo, un cerdo, un caballo, una oveja, una vaca, un gato o un perro doméstico, o un ser humano. Preferiblemente, el paciente es un ser humano.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Modelo de ratón de infarto de miocardio

[0070] Se desarrolló un modelo clínico de ratón de infarto de miocardio (**IM**) después de la ligadura de la arteria coronaria, que se parece a la situación que se encuentra en el corazón humano después de una insuficiencia cardíaca aguda. Los virus adenoasociados de serotipo 9- MV9, que transduce preferentemente el corazón (28, 83, 55) se utilizaron como vector de terapia génica para administrar la expresión de TERT de tipo salvaje específicamente al corazón.

Ratones

[0071] Se produjeron y alojaron ratones macho con antecedentes de FVB/N en el área de barrera libre de patógenos específicos del CNIO, Madrid. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación y de Bienestar Animal (CElyBA) del CNIO-ISCIII y se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de la Federación de Asociaciones Europeas para las Ciencias del Animal de Laboratorio (FELASA).

Medición de la producción viral de la eficiencia de transducción de virus

[0072] Los vectores virales se generaron como lo describe Matsushita (48) y se purificaron tal y como se describió anteriormente (49). Los títulos de partículas de genomas virales se determinaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Para evaluar el tropismo viral, se les inyectó a un grupo de control de ratones de diferentes concentraciones un virus portador de eGFP o Tert bajo el control del promotor de CMV después de la

metodología anteriormente descrita. A las 4 semanas después de la inyección, los ratones se sacrificaron y sometieron a análisis patológicos o evaluaciones de expresión de eGFP y Tert. La cuantificación de las inmunotinciones de eGFP se determinó contando el número de células teñidas con peroxidasa sobre el número total de células con hematoxilina (hígado y cerebro), o el área teñida con peroxidasa con respecto al área total de la sección (corazón). La expresión de la telomerasa en diferentes tejidos se analizó mediante análisis de Western Blot, RT-PCR cuantitativa y ensayo de PART (protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas) siguiendo el protocolo descrito anteriormente (50). El número de copias del genoma viral se evaluó como se detalló anteriormente (51) con cebadores de AAV9 específicos, de muestras de ADN del corazón 4 semanas después de la inyección.

Infarto de miocardio

[0073] Después del destete, se alojaron cinco ratones por jaula y se alimentaron *ad libitum* con una dieta no purificada (n.º 2018, Harlan). Se indujo un IM en ratones macho mediante ligadura permanente de la arteria coronaria descendente (LAD) anterior izquierda bajo anestesia con isoflurano. La buprenorfina analgésica se administró mediante inyecciones intraperitoneales antes del procedimiento. Se realizó una operación simulada en ratones de control y se inyectó. La operación simulada consiste en el mismo procedimiento quirúrgico excepto por la ligadura de la LAD. La fecha de la eutanasia se utilizó para estimar la supervivencia del ratón. Para una evaluación de la supervivencia posterior al IM, se siguieron a los ratones y se inspeccionaron a diario hasta 6 semanas después de la ligadura de LAD.

Ecocardiografía y Micro-PET

[0074] Se realizó una ecocardiografía transtorácica con un Vevo 770 de alta resolución en ratones que fueron sedados con 1 a 2 % de isoflurano y colocados sobre una almohadilla térmica, como se describe (52). La formación de imágenes Micro-PET se realizó tal y como se describió anteriormente (53).

Histología

[0075] Los corazones se fijaron en formaldehído al 4 % tamponado con fosfato y se incluyeron en parafina y se seccionaron (2 mm de grosor) de las regiones basal, medioventricular y apical utilizando un cortador de corazones (Zivic Instruments, HSMS001-1). Las secciones de portaobjetos de corazones (5 mm) se tiñeron con tricómico de Masson. El tamaño del infarto y la longitud fibrótica se calcularon como la proporción promedio entre la longitud de la cicatriz y la circunferencia total del VI de las secciones del ventrículo medio. El área fibrótica intersticial se realizó en secciones transversales del corazón teñidas con tricómico de Masson de forma semicuantitativa utilizando el *software* ImageJ. Se analizaron tres imágenes por corazón del área.

[0076] La inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia se realizaron en tejidos desparafinados y se procesaron con los anticuerpos indicados: Anti-eGFP (Abeam, ab290); anti-Vimentin (D21H3; Cell Signaling, 5741); anticadena pesada de miosina cardíaca (Abeam, ab15); anti-troponina T (Thermo Scientific, Ab-1); anti-KI67 (Abeam, ab16667); caspasa-3 antiactiva (Abeam, ab13847).

PCR cuantitativa en tiempo real y técnicas Western Blot

[0077] El ARN total de los tejidos se extrajo con el mini kit RNeasy de Qiagen según las instrucciones del fabricante. Antes del procesamiento, las muestras de ARN se trataron con DNasa I. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó usando un ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems), usando los siguientes cebadores:

Actina-FW:GGCACCACACCTTCTACAATG; (SEQ ID NO:7)
 Actina-RV:GTGGTGGTGAAGCTGTAG; (SEQ ID NO:8)
 TERT-FW:GGATTGCCACTGGCTCCG; (SEQ ID NO:9)
 TERT-RV:TGCCTGACCTCCTCTTGTGAC; (SEQ ID NO:10)
 PNA-FW:GTGGCTTGTGGGAAATAGTTGA; (SEQ ID NO:11)
 PNA-RV:CTGGCTTGATGATCTGCCTTTAC; (SEQ ID NO:12)
 β -MHC-FW:CCAATGAGTACCGCGTGAA; (SEQ ID NO:13)
 β -MHC-RV:ACAGTCATGCCGGGATGAT; (SEQ ID NO:14)
 BMPRB1-FW: CCCTCGGCCCAAGATCCTA; (SEQ ID NO:15)

BMPRB1-RV:CCACAGGCATTCCAGAGTCATC; (SEQ ID NO:16)

FGFR3- FW:GGAGGACGTGGCTGAAGAC; (SEQ ID NO:17)

FGFR3-RV:GGAGCTTGATGCCCCCAAT; (SEQ ID NO:18)

IRF7-FW:GAGACTGGCTATTGGGGGAG; (SEQ ID NO:19)

IRF7-RV:GACCGAAATGCTTCCAGGG; (SEQ ID NO:20)

ITGB6-FW:CAACTATCGGCCAACTCATTGA; (SEQ ID NO:21)

ITGB6-RV:GCAGTTCTTCATAAGCGGAGAT; (SEQ ID NO:22)

Se realizaron análisis estadísticos (prueba t de Student) en valores delta-delta Ct. Se realizaron las técnicas Western Blot con extractos de células enteras de los tejidos indicados con los siguientes anticuerpos: Anti-h/TERT 1 (Calbiochem), anti-GAPDH (Sigma). La cuantificación se realizó usando el *software* Scion Image.

Análisis de los telómeros

[0078] La determinación de Q-FISH en las secciones de tejido incrustadas en parafina y HT-qFISH (en la sangre periférica) se realizó tal y como se describió anteriormente (54, 55, 56). El análisis de LT de Q-FISH de alto rendimiento (HT-QFISH) en muestras de sangre de HT-QFISH se realizó como se describe (56). Brevemente, se extrajo sangre periférica de la vena facial antes de sacrificar a los animales, se lisaron los glóbulos rojos, se sembraron los leucocitos, se fijaron y se sometieron a Tel-Q-FISH. Las intensidades de fluorescencia se convirtieron en Kb usando células L5178-R y L5178-S como estándares de calibración, que tienen LT estables de 79,7 kb y 10,2 kb, respectivamente (62). Se analizaron muestras por duplicado, o por triplicado en el caso de los estándares de calibración en el sistema de formación de imágenes de OPERA automatizado e imparcial.

Análisis de metabolitos séricos

[0079] Se recogieron muestras de sangre en tubos sin ningún anticoagulante, 6 semanas después del IM. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 20 minutos y el sobrenadante de suero se congeló y mantuvo a 80 °C hasta que se analizaron para minimizar la degradación por congelación y descongelación (57). La concentración de urea en suero en ratones (grupos y números de ratones representados) se determinó en un analizador de suero Pentra 400 (Horiba Medical).

[0080] Además, el análisis de alto rendimiento de los niveles séricos se midió con Rodent Map v3.0 (Myriad RBM).

Análisis de la expresión génica

[0081] El ARN total de las muestras de corazón congeladas se extrajo con el kit RNeasy de Qiagen, se analizó la integridad del ARN en un bioanalizador Agilent (se descartaron las muestras con un índice de integridad del ARN < 7,8) y se analizó en el microarreglo de ADN del genoma del ratón de Agilent siguiendo las instrucciones del fabricante y (58). Brevemente, los genes expresados diferencialmente se obtuvieron mediante la aplicación de modelos lineales utilizando el paquete R limma (59) (Bioconductor project, <http://www.bioconductor.org>).

[0082] Para tener en cuenta la prueba de múltiples hipótesis, el nivel de significancia estimado (valor p) se ajustó usando la corrección de tasa de descubrimiento falso (FDR) de Benjamini y Hochberg. Aquellos genes con FDR < 0,15 se seleccionaron como diferencialmente expresados entre Tert, corazones inyectados con virus vacío y controles operados de forma simulada.

[0083] Se aplicó el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) usando anotaciones de Reactome y KEGG. Los genes se clasificaron en función de la estadística t moderada de limma. Después de la prueba de Kolmogorov-Smirnov, aquellos conjuntos de genes que mostraban FDR < 0,1 (60) se consideraron enriquecidos entre las clases en comparación.

Análisis estadístico

[0084] Se usó una prueba Log-Rank para calcular las diferencias estadísticas en las curvas de supervivencia de las diferentes cohortes de ratones. Se usó una prueba t de Student no pareada para calcular la significación estadística de los niveles de expresión de ARNm y proteína, PART, parámetros funcionales del corazón, tamaño de la cicatriz y fibrosis intersticial. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para los parámetros séricos. La evaluación patológica a través de la observación del corazón después de la tinción tricrómica de Masson o las exploraciones FDG-PET se calcularon con la prueba χ^2 .

Ejemplo 2 - Regulación a la baja de la expresión de Tert de ratón en el corazón durante la primera semana después del nacimiento

[0085] En primer lugar, nos dispusimos a determinar si la expresión de Tert de ratón está regulada a la baja en el corazón durante la primera semana de vida, de manera similar a lo descrito anteriormente para el componente de ARN de telomerasa de ratón en diferentes tejidos de ratón (22), Tert, así como para la expresión de Tert en la rata (23). Para este fin, aislamos corazones neonatales en los días 1, 3, 7 y 10 y determinamos la expresión de Tert de ratón mediante qRT-PCR. Observamos una regulación a la baja significativa de los niveles de ARNm de Tert de ratón a partir del día 7 después del nacimiento.

Ejemplo 3 - Dirigir AAV9-Tert específicamente al corazón

[0086] Se sabe que AAV9 se dirige preferentemente al corazón y al hígado cuando se administra sistémicamente, aunque la eficiencia de dirigirse a los hepatocitos es aproximadamente 10 veces menor que la de dirigirse a los cardiomiocitos (29). Usamos esta eficiencia de transducción diferencial para encontrar una dosis mínima de vectores de AAV9 que se dirijan específicamente al corazón, con una transducción mínima al hígado y otros tejidos. En nuestras condiciones experimentales, una dosis de 5×10^{11} ug/ratón de un vector de AAV9 informador (AAV9-CMV-eGFP) podría transducir más del 60 % de las células cardíacas, como lo muestra la inmunohistoquímica (IHC) de eGFP, pero menos del 1,2 % de células hepáticas y cerebrales 21. Para estimar la eficiencia de transducción del vector de telomerasa 22 (AAV9-CMV-Tert; de aquí en adelante AAV9-Tert), comparamos el número de copias del genoma viral por genoma diploide en corazones transducidos con el vector indicador de eGFP o el vector de AAV9-Tert (figura 1). Encontramos números similares de copias del genoma viral por célula, lo que indica una eficiencia de transducción similar para AAV9-eGFP y AAV9-Tert en el corazón. Al usar inmunotinción conjunta con eGFP y marcadores de cardiomiocitos (cadena pesada de betamiosina, β -MHC) o fibroblastos (vimentina), descubrimos que, dentro del miocardio, AAV9 se dirige preferentemente a los cardiomiocitos (> 60 % de cardiomiocitos positivos para eGFP), mientras que no encontramos evidencia de infección de fibroblastos. El objetivo específico de Tert al corazón también se confirmó mediante qRT-PCR que mostró una inducción de -400 veces de cantidades de ARNm de Tert en el corazón de los ratones tratados en comparación con los ratones no tratados, mientras que la regulación al alza del ARNm de Tert fue 40 veces menor en el hígado de ratones tratados. Los niveles de expresión de ARNm de Tert en el corazón se mantuvieron altos durante al menos 2 meses, como lo indica un aumento de expresión de > 200 veces en los ratones tratados con AAV9-Tert en comparación con los tratados con el vector vacío. Finalmente, el aumento de la expresión del ARNm de Tert fue paralelo al aumento de la expresión de la proteína TERT y al aumento de una actividad de la telomerasa en los corazones tratados con AAV9-Tert en comparación con los ratones no tratados y los controles tratados con AAV9-vacío. Juntos, estos resultados indican que logramos la expresión específica de Tert en el corazón adulto.

Ejemplo 4 - La telomerasa dirigida al corazón no altera la morfología del corazón

[0087] La expresión transgénica de Tert constitutiva en el corazón desde el desarrollo embrionario en adelante da como resultado una hipertrofia cardíaca (25). Por lo tanto, primero nos propusimos determinar si el tratamiento con AAV9-Tert durante la edad adulta tuvo efectos no deseados en la morfología del corazón. El tratamiento con AAV9-Tert en ausencia de infarto de miocardio (IM) no cambió la estructura normal del corazón ni produjo ningún signo de hipertrofia cardíaca según lo evaluado 9-10 semanas después de la administración del virus. Apoyando aun más una estructura normal del corazón, encontramos una expresión normal de la cadena pesada de betamiosina (β -MHC) en corazones tratados con AAV9-Tert. Estos resultados indican que la sobreexpresión de Tert por medio de la terapia génica de AAV9 no tiene ninguno de los efectos adversos mencionados previamente para la expresión transgénica constitutiva de Tert en el corazón.

Ejemplo 5 - La terapia génica con telomerasa reduce la mortalidad después de un IM

[0088] Para evaluar el potencial terapéutico de la activación de la telomerasa durante la edad adulta en la prevención de la insuficiencia cardíaca después de un IM, utilizamos un modelo preclínico de infarto de miocardio en ratones auténticos después de la ligadura de la arteria coronaria, que se demostró previamente que recapitula la insuficiencia cardíaca inducida por IM30. La expresión transgénica mediada por AAV9-10 específica cardíaca alcanza su máximo después de aproximadamente 2 semanas y permanece estable a partir de entonces (31). Aunque la expresión emerge ya muy poco después de la inyección intravenosa, decidimos inducir un IM 2-3 semanas después de la administración del virus para asegurar que los niveles de Tert sean máximos. Además, dado que estábamos interesados en los procesos de regeneración y remodelación después de un infarto agudo, que en seres humanos ocurre predominantemente en la vida adulta, utilizamos ratones adultos (de 1 año). Todos los ratones bajo experimentación eran machos para evitar sesgos de género.

[0089] De manera interesante, un único tratamiento con AAV9-Tert tres semanas antes de la ligadura fue suficiente para rescatar la supervivencia de los ratones después del infarto, con más del 74 % de los ratones tratados con AAV9-Tert sobreviviendo al infarto en comparación con solo el 57 % de los tratados con el vector

vacío (figura 2A). Por lo tanto, la activación de la telomerasa en ratones adultos reduce significativamente la mortalidad por insuficiencia cardíaca después de un IM en un modelo de ratón auténtico para la condición humana.

5

Ejemplo 6 - La terapia génica con telomerasa mejora la función cardíaca después de un IM

[0090] Para investigar cómo la expresión de la telomerasa da como resultado tasas de mortalidad más bajas tras el IM, se evaluó la función cardíaca mediante ecocardiografía bidimensional 1 y 3 semanas después de la ligadura de la LAD. Las dimensiones cardíacas, como el área sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo, aumentaron considerablemente después de un IM en comparación con los ratones operados de forma simulada (sin IM) (figuras 2B, C), que también se acompañó de una fracción de eyección cardíaca disminuida (figura 2D). Es importante destacar que tanto las dimensiones cardíacas como la fracción de eyección se recuperan significativamente en los ratones que recibieron la terapia génica con Tert, pero no en los que recibieron el vector vacío (figuras 2B-D).

[0091] El rescate en los parámetros de la función cardíaca tras el tratamiento con Tert también se evidenció por un grosor de la pared del corazón longitudinal y transversal similar en los ratones tratados con Tert y los operados de forma simulada en comparación con una marcada disminución en estos parámetros en los ratones tratados con el vector de AAV9- vacío (figuras 2E, F).

[0092] A continuación, realizamos un análisis de la exploración FDG-PET, una herramienta de diagnóstico comúnmente usada para evaluar la gravedad del infarto *in vivo*, ya que mide la actividad metabólica en el corazón mediante la determinación de la absorción de glucosa por parte de los cardiomiocitos. En particular, el infarto de corazón da como resultado una disminución de la actividad metabólica en las regiones dañadas (32). En primer lugar, nos dimos cuenta de que los ratones tratados con AAV9-Tert presentan una mejor supervivencia al procedimiento PET *per se*, que implica anestesia y puede provocar la muerte de los ratones sometidos a IM (figura 3A). Cabe destacar que las curvas de supervivencia mostradas en la figura 2A no incluyen ratones utilizados para PET. Como era de esperar, todos los ratones mostraron señales de PET reducidas indicativas de IM; sin embargo, observamos infartos menos graves (caracterizados por una pérdida > 50 % de la señal de PET) en el grupo tratado con AAV9-Tert en comparación con el grupo tratado con AAV9-vacío (figuras 3B-C). Estos resultados indican que los corazones tratados con AAV9-Tert muestran una mejor conservación de las regiones metabólicamente activas en comparación con el grupo con AAV9-vacío.

[0093] Seis semanas después del IM, realizamos un análisis patológico completo que incluye la determinación de la longitud de la cicatriz del corazón mediante la tinción tricrómica de Masson. Descubrimos que los ratones tratados con AAV9-Tert presentaban infartos más pequeños en comparación con los controles con AAV-vacío o sin virus, según lo determinado por la proporción entre la longitud de la cicatriz y la circunferencia (figura 3D). Además, los ratones tratados con AAV9-Tert desarrollaron menos fibrosis intersticial en la región sin infarto del ventrículo izquierdo en comparación con el grupo con AAV9-vacío (figura 3E). Juntos, estos hallazgos indican que un único tratamiento con AAV9-Tert dio como resultado una mayor supervivencia del miocardio y tamaños de infarto más pequeños, lo que previno el deterioro funcional del corazón después de un IM.

Ejemplo 7- El tratamiento con telomerasa rescata telómeros cortos en los cardiomiocitos del corazón

[0094] El acortamiento crítico de los telómeros provoca disfunción cardíaca en los ratones. En particular, los ratones deficientes en telomerasa que tienen telómeros críticamente cortos presentan fenotipos cardíacos que se asemejan a los de la disfunción cardíaca en seres humanos, incluida la hipertrofia cardíaca (19). Como la función principal de la telomerasa es alargar los telómeros críticamente cortos, aquí nos propusimos abordar los efectos del tratamiento con Tert en la longitud de los telómeros (LT) del corazón mediante la realización de Q-FISH de telómeros cuantitativos directamente en las secciones del corazón. Descubrimos que los corazones tratados con AAV9-Tert muestran un aumento neto en LT en el área remota del infarto (formada principalmente por cardiomiocitos) en comparación con el grupo con vector vacío. Por lo tanto, AAV9-Tert es una herramienta potente para disminuir los telómeros cortos en el miocardio y, posteriormente, el riesgo asociado de insuficiencia cardíaca en un corto período de tiempo (LT se midió 9-10 semanas después de la administración del virus). Dado que también se propone que los telómeros cortos en los linfocitos de sangre periférica tengan un valor pronóstico que indique un mayor factor de riesgo de ECV, también medimos la LT de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Detectamos un modesto aumento en la longitud de los telómeros en las células sanguíneas de ratones inyectados con AAV9-Tert en comparación con los controles, lo que confirma nuestras observaciones anteriores (26). No se observaron diferencias en la longitud de los telómeros de CMSP entre los ratones operados de forma simulada y los que se sometieron a IM y recibieron AAV9-vacío o sin virus, lo que sugiere que el IM agudo y los eventos posteriores, como la inflamación y la remodelación, no tienen un impacto negativo en la LT de CMSP. Estos hallazgos sugieren que la terapia génica con telomerasa puede tener efectos beneficiosos adicionales al reducir la abundancia de telómeros cortos en la circulación, lo que, a su vez, es un factor de riesgo conocido de ECV.

Ejemplo 8 - El tratamiento con telomerasa da como resultado un mayor número de cardiomiocitos en proliferación

[0095] Para estudiar el impacto del tratamiento con Tert en la apoptosis y la proliferación en el corazón después de un IM, cuantificamos el porcentaje de células que mostraban una tinción positiva de caspasa-3 y Ki67, respectivamente, 6 semanas después del IM. Encontramos muy pocas células apoptóticas 6 semanas después del IM, independientemente del tratamiento, de acuerdo con el hecho de que la apoptosis es una respuesta temprana después de la isquemia (33). Después del IM, observamos una mayor proliferación (células Ki67 positivas) en el área remota del infarto y en el área del infarto tanto en los grupos con AAV9-Tert como en los grupos con AAV9-vacío en comparación con los ratones con operación simulada. Sin embargo, este aumento se atenuó significativamente en el grupo con AAV9-Tert en comparación con AAV9-vacío, en consonancia con la disminución de la formación de cicatrices fibróticas en estos ratones. Curiosamente, la co-inmunotinción con Ki67 y el marcador de cardiomiocitos troponina T mostraron la presencia de cardiomiocitos positivos para Ki67 en la vecindad del infarto, que aumentaron significativamente en el grupo tratado con Tert en comparación con el grupo con virus vacío, lo que sugiere una mayor curación y regeneración del corazón.

Ejemplo 9 - Impactos de la telomerasa en las redes metabólicas y de señalización relacionadas con la disfunción cardíaca

[0096] Para comprender mejor el papel de Tert en la protección contra la insuficiencia cardíaca aguda después de un IM, en primer lugar, estudiamos los cambios en los metabolitos séricos en las diferentes cohortes de ratones. Debido a una fracción de eyección drásticamente reducida (figura 2D), el IM puede reducir el flujo sanguíneo al riñón y eventualmente inducir la disfunción renal con tasas de filtración glomerular reducidas que conducen a niveles sanguíneos de urea aumentados. Descubrimos que, 6 semanas después del IM, los niveles de urea en suero aumentaron significativamente en ratones tratados sin virus o con el vector vacío, y que esto se recuperó significativamente en la cohorte con AAV9-Tert (figura 4). Una mejor función renal tras el IM en ratones tratados con AAV9-Tert respalda nuestros hallazgos de una mejor función cardíaca en estos ratones (figura 2).

[0097] A continuación, realizamos un perfil completo de múltiples analitos en suero 6 semanas después del IM que abarca varias vías biológicas. Descubrimos que el IM dio como resultado la disminución significativa en los niveles séricos de factores involucrados en la remodelación tisular, como las metaloproteinasas (MMP-9) y sus inhibidores (TIMP-1) (34), en la inflamación, como QDM (quimiocina derivada de macrófagos) o interleucina 18 (IL-18), y en el factor de crecimiento epidérmico (FCE). Es importante destacar que todos ellos fueron rescatados parcialmente en el grupo con AAV9-Tert. Cabe mencionar que el aumento de RFCE se ha descrito previamente como cardioprotector (35).

[0098] A continuación, determinamos la expresión del péptido natriurético auricular (PNA), una proteína cardíaca fetal que se reprime después del nacimiento junto con otros genes cardíacos fetales, pero aumenta en gran medida durante las últimas etapas de la insuficiencia cardíaca (2). Curiosamente, los niveles de PNA se redujeron después del tratamiento con AAV9-Tert en corazones WT viejos (ratones > 2 años sin infarto), lo que sugiere que el tratamiento con Tert reprime la expresión patológica de los genes fetales.

[0099] Para obtener más información sobre los cambios en la expresión génica mediados por Tert en el corazón, realizamos un análisis de ADN de micromatrices 6 semanas después del IM, lo que refleja las etapas posteriores del proceso de reparación de tejidos, incluida la remodelación cardíaca y la formación de cicatrices (33). Usamos ARN de tejido cardíaco ventricular izquierdo de los diferentes grupos (simulado (sin IM); IM + AAV9-Tert; IM + AAV9-vacío). El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) reveló una regulación positiva de las vías asociadas con la inflamación, la proliferación y la replicación del ADN en los ratones con infarto en comparación con el grupo simulado (sin IM), que se rescataron significativamente en los ratones tratados con AAV9-Tert en comparación con los controles con AAV9-vacío. El aumento de la inflamación se atribuye a la eliminación de los cardiomiocitos apoptóticos y necróticos tras el IM, mientras que el aumento de la proliferación se asocia a la repoblación de la zona lesionada con fibroblastos (36). Por lo tanto, el hecho de que Tert atenúe la expresión de genes implicados en la inflamación y proliferación respalda nuestros hallazgos funcionales de que el tratamiento con AAV9-Tert es cardioprotector. Además, descubrimos un enriquecimiento significativo en varias firmas relacionadas con la remodelación de la matriz extracelular y la dinámica de los fibroblastos (por ejemplo, ECM, TGF β y FGFR) en el grupo tratado con Tert en comparación con los controles con vector vacío. Confirmamos algunos de los genes expresados de manera más diferencial dentro de estos conjuntos de genes (Fgfr3 y Bmprlb, respectivamente) mediante qRT-22 PCR. Además, Timp1, Thbs1 y Thbs4 (trombospondina 1 y 4) también se expresaron diferencialmente en ratones tratados con Tert. El aumento de la expresión de Timp1 coincide con los niveles más altos de proteína TIMP1 en el suero de los ratones tratados con Tert. Estos hallazgos son de interés, dado que se ha demostrado que la sobreexpresión de Timp1 mitiga la remodelación miocárdica adversa y mejora la función cardíaca, mientras que Thbs1 y Thbs4 son reguladores importantes de la adaptación cardíaca posterior a un IM al regular la fibrosis y la remodelación del miocardio (37-39).

[0100] Los ratones neonatales tienen un potencial regenerativo completo durante la primera semana de vida, que se caracterizado por una firma de expresión génica bien definida. Por lo tanto, a continuación, nos propusimos

abordar si los cambios en la expresión génica asociados con el tratamiento con Tert en corazones adultos se enriquecieron en la firma de expresión génica regenerativa descrita en ratones recién nacidos. Sorprendentemente, al comparar nuestros datos de expresión con genes sobreexpresados o subrepresentados en el día posnatal 1 (en relación con el día posnatal 10) (7), una etapa en la que el corazón posee potencial regenerativo completo después del IM, descubrimos un enriquecimiento significativo en el grupo con AAV9-Tert en comparación con AAV9-vacío. Confirmamos algunos de los genes expresados de manera más diferencial dentro de estos conjuntos de genes (Irf7 e Itgb6) mediante qRT-PCR. En resumen, el tratamiento con Tert puede modular los programas transcripcionales que favorecen la supervivencia y la regeneración después de un IM y que se asemejan a la firma de expresión génica del corazón neonatal.

Referencias

[0101]

1. Mudd, J. O. y Kass, D. A. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451, 919-928, (2008).
2. Liew, C. C. y Dzau, V. J. Molecular genetics and genomics of heart failure. *Nat Rev Genet* 5, 811-825, (2004).
3. Cohn, J. N., Ferrari, R. y Sharpe, N. Cardiac remodeling concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 35, 569-582, (2000).
4. Dominguez, L. J. *et al.* Ageing, lifestyle modifications, and cardiovascular disease in developing countries. *J Nutr. Health Aging* 10, 143-149 (2006).
5. Bergmann, O. *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324, 98-102, (2009).
6. Porrello, E. R. *et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331, 1078-1080, (2011).
7. Haubner, B. J. *et al.* Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction. *Aging (Albany NY)* 4, 966-977, (2012).
8. Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. y Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-1217, (2013).
9. Boonekamp, J. J., Simons, M. J., Hemerik, L. y Verhulst, S. Telomere length behaves as biomarker of somatic redundancy rather than biological age. *Aging Cell* 12, 330-332, (2013).
10. Blackburn, E. H. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106, 661-673, 24 (2001).
11. de Lange, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19, (2005).
12. Greider, C. W. y Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413, (1985).
13. Vera, E., Bernardes de Jesus, B., Foronda, M., Flores, J. M. y Blasco, M. A. The rate of increase of short telomeres predicts longevity in mammals. *Cell Rep* 2, 732-737, (2012).
14. Flores, I. *et al.* The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev* 22, 654-667, (2008).
15. Harley, C. B., Futcher, A. B. y Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460, (1990).
16. Canela, A., Vera, E., Klatt, P. y Blasco, M. A. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5300-5305, (2007).
17. Flores, I., Cayuela, M. L. y Blasco, M. A. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science* 309, (2005).
18. Heidinger, B. J. *et al.* Telomere length in early life predicts lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1743-1748, (2012).

19. Leri, A. *et al.* Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation. *EMBO J* 22, 131-139, (2003).
- 5 20. De Jesus, B. B. y Blasco, M. A. Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circ Res* 111, 97-109, (2012).
21. De Meyer, T., Rietzschel, E. R., De Buyzere, M. L., Van Criekinge, W. y Bekaert, S. Telomere length and cardiovascular aging: the means to the ends? *Ageing Res Rev* 10, 297-303, (2011).
- 10 22. Blasco, M. A., Funk, W., Villeponteau, B. y Greider, C. W. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA *Science* 269, 1267-1270 (1995).
23. Borges, A. y Liew, C. C. Telomerase activity during cardiac development. *J Mol Cell Cardiol* 29, 2717-2724, (1997).
- 15 24. Tomas-Loba, A. *et al.* Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell* 135, 609-622, (2008).
- 25 25. Oh, H. *et al.* Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, (2001).
26. Bernardes de Jesus, B. *et al.* Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med* 4, 1-14, (2012).
- 25 27. Park, J. I. *et al.* Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 460, 66-72, (2009).
28. Gao, G. P. *et al.* Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, (2002).
- 30 29. Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G. y Rabinowitz, J. E. Analysis of AAV 3 serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 16, (2008).
- 35 30. van den Borne, S. W. *et al.* Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 84, 273-282, (2009).
31. Konkalmatt, P. R. *et al.* Cardiac-selective expression of extracellular superoxide dismutase after systemic injection of adeno-associated virus 9 protects the heart against post-myocardial infarction left ventricular remodeling. *Circ Cardiovasc Imaging* 6, 478-486 (2013).
- 40 32. Stegger, L. *et al.* Accurate noninvasive measurement of infarct size in mice with high-resolution PET. *J Nucl Med* 47, 1837-1844, (2006).
- 45 33. Ertl, G. y Frantz, S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 66, 14 22-32, (2005).
34. Brew, K., Dinakarpanian, D. y Nagase, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 17 1477, 267-283, (2000).
- 50 35. Noma, T. *et al.* Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J Clin Invest* 117, 2445 -2458, (2007).
36. Dobaczewski, M., Gonzalez-Quesada, C. y Frangogiannis, N. G. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 48, 504-511, 24 (2010).
- 55 37. Frolova, E. G. *et al.* Thrombospondin-4 regulates fibrosis and remodeling of the myocardium in response to pressure overload. *FASEB J* 26, 2363-2373, (2012).
38. Frangogiannis, N. G. *et al.* Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation* 111, 2935-2942, (2005).
- 60 39. Frangogiannis, N. G. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev* 92, 635-688, (2012).
- 65 40. Jaskelioff, M. *et al.* Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* 469, 102-106, (2011).

41. Richardson, G. D. *et al.* Telomerase expression in the mammalian heart. *FASEB J* 26, 4832-4840, (2012).
- 5 42. Lowes, B. D. *et al.* Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N Engl J Med* 346, 1357-1365, (2002).
43. Dobaczewski, M., Chen, W. y Frangogiannis, N. G. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 51, 600- 606, (2011).
- 10 44. Jopling, C. *et al.* Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 25, 606-609, (2010).
45. Anversa, P. y Kajstura, J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 83, 1-14 (1998).
- 15 46. Beltrami, A. P. *et al.* Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344, 1750-1757, (2001).
47. Glass, C. y Singla, D. K. Overexpression of TIMP-1 in embryonic stem cells attenuates adverse cardiac remodeling following myocardial infarction. *Cell Transplant* 21, 1931-1944, (2012).
- 20 48. Matsushita, T. *et al.* Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 5, 938-945, (1998).
- 25 49. Ayuso, E. *et al.* High AAV vector purity results in serotype- and tissue- independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther* 17, 503-510, (2010).
50. Blasco, M. A., Rizen, M., Greider, C. W. y Hanahan, D. Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nat Genet* 12, 200-204, (1996).
- 30 51. Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G. y Rabinowitz, J. E. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 16, (2008).
52. Korf-Klingebiel, M. *et al.* Conditional transgenic expression of fibroblast growth factor 9 in the adult mouse heart reduces heart failure mortality after myocardial infarction. *Circulation* 123, 504-514, (2011).
53. Mulero, F., Donate, L. E. y Serrano, M. in *Current Protocols in Mouse Biology* (John Wiley & Sons, Inc., 2011).
- 40 54. Vera, E., Bernardes de Jesus, B., Foronda, M., Flores, J. M. y Blasco, M. A. The rate of increase of short telomeres predicts longevity in mammals. *Cell Rep* 2, 732-737, (2012).
55. Bernardes de Jesus, B. *et al.* Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med* 4, 1-14, (2012).
- 45 56. Canela, A., Klatt, P. y Blasco, M. A. Telomere length analysis. *Methods Mol Biol* 371, 45-72, (2007).
57. Tomas-Loba, A., Bernardes de Jesus, B., Mato, J. M. y Blasco, M. A. A metabolic signature predicts biological age in mice. *Aging Cell* 12, 93-101, (2013).
- 50 58. Martinez, P. *et al.* RAP1 protects from obesity through its extratelomeric role regulating gene expression. *Cell Rep* 3, 2059-2074, (2013).
59. Smyth, G. K., Michaud, J. y Scott, H. S. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21, 2067-2075, (2005).
- 55 60. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545-15550, (2005).
- 60 61. Blasco, M. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol.* 3, 640-649, (2007).
62. McIlrath, J. *et al.* Telomere length abnormalities in mammalian radiosensitive cells. *Cancer Res* 61 : 912-915, (2001).
- 65 63. Brouillette, S. W. *et al.* Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case- control study. *Lancet* 369: 107-114 (2007).

64. Moslehi, J., R. A. Depinho y E. Sahin, Telomeres and mitochondria in the aging heart. *Circ Res* 110: 1226-1237 (2012).
65. Blasco, M. A., H. W. Lee, *et al.* Telomere shortening and tumour formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91(1): 25-34 (1997).
66. Gonzalez-Suarez, E., E. Samper, *et al.* (2001). "Increased epidermal tumours and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes." *EMBO J* 20(11): 2619-30 (2001).
67. Merten, O. W., C. Geny-Fiamma, *et al.* Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Ther* 12 Suppl 1: S51-61 (2005).
68. Buning, H., L. Perabo, *et al.* Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med* 10(7): 717-33 (2008).
69. Niemeyer G.P. *et al.* Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liverdirected AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* 113(4):797-806. (2009).
70. Mas A., *et al.* Reversal of type I diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle. *Diabetes* 55: 1546-1553 (2006).
71. Jiang, H., *et al.* Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. *Blood*. 108(1):107-15. (2006).
72. Ghosh, A., *et al.* Efficient Whole-body Transduction with Trans-splicing Adeno-associated Viral Vectors. *Mol Therapy* 15(4) : 750-755. (2007).
73. Tafuro S., *et al.* Inducible adeno-associated virus vectors promote functional angiogenesis in adult organisms via regulated vascular endothelial growth factor expression. *Cardiovasc Res* 83(4):663-71 (2009).
74. Manno, C.S. *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature Med.* 12(3): 342-347. (2006).
75. Stroes ES, *et al.* Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 12:2303-4. (2008).
76. Kaplitt, M. G. *et al.* Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *The Lancet*, 369 (9579) :2097 - 2105, (2007).
77. Maguire A.M., *et al.* Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med.* 358(21):2240-8. (2008).
78. Bainbridge, J.W B., *et al.* Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber's Congenital Amaurosis. *N Engl J Med.* 358:2231-2239. (2008).
79. Mingozzi, F. *et al.* CD8+ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nature Med.* 13, 419-422 (2007).
80. Brantly, M. L., *et al.* Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:16363-16368. (2009).
81. Mingozzi F, *et al.* AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dosedependent activation of capsid-specific T cells. *Blood.* 114:2077-2086. (2009).
82. Simonelli, F., *et al.* Therapy for Leber's Congenital Amaurosis is Safe and Effective Through 1.5 Years After Vector Administration. *Mol Ther.* 18(3): 643-650. (2010).
83. Inagaki, K., S. Fuess, *et al.* Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther* 14(1): 45-53. (2006).
84. Foust, K.D. *et al.* Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nature Biotechnology*, 27:59-65. (2009).

85. Duque S., *et al.* Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Molecular Therapy* 17(7): 1187-1196. (2009).
- 5 86. Samper E., *et al.* Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *Terc*^{-/-} mice with short telomeres. *EMBO Rep.* 2(9):800-7. (2001).

REIVINDICACIONES

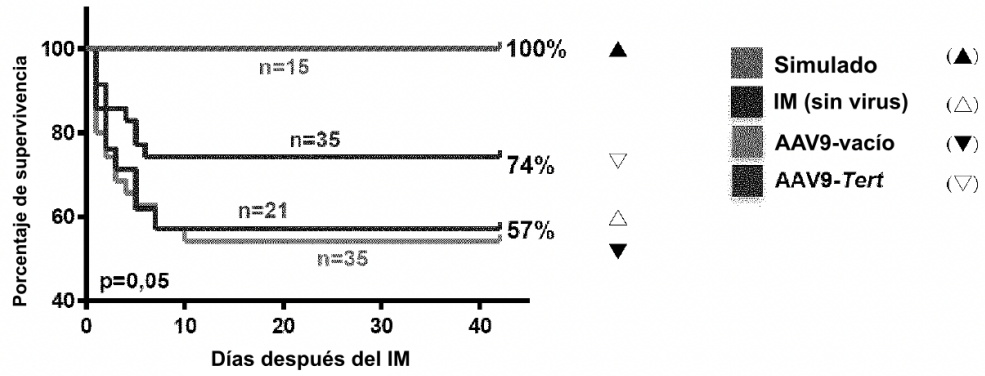
- 5 1. Vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para una transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) para su uso en el tratamiento de un infarto de miocardio, donde el vector es un vector no integrativo basado en un virus adenoasociado y donde
 - a) TERT está codificada por
 - 10 i) una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, o
 - ii) un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de TERT del 50 % o más en comparación con una TERT codificada por SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, y que tiene una identidad de al menos el 75 % con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, o
 - 15 iii) una secuencia de ácido nucleico que es un fragmento de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 que tiene una actividad de TERT y que tiene una identidad de al menos el 75 % con la secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 a lo largo de toda la longitud del fragmento;
 - o
 - b) TERT comprende
 - 20 i) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NQ:2 o SEQ ID NQ:4, o
 - ii) un polipéptido que muestra una actividad de TERT del 50 % o más en comparación con TERT de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 y que tiene al menos una identidad del 75 % con SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, o
 - 25 iii) un polipéptido que es un fragmento de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 que tiene una actividad de TERT y que tiene al menos una identidad del 75 % con la secuencia de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 a lo largo de toda la longitud del fragmento.
- 30 2. Vector de ácido nucleico para su uso según la reivindicación 1, donde el vector es un vector basado en un virus adenoasociado derivado de un serotipo de AAV seleccionado de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 y AAV pseudotipado.
3. Vector de ácido nucleico para su uso según la reivindicación 2, donde el vector es un vector basado en un virus adenoasociado derivado de un virus adenoasociado de serotipo 9 (AAV9).
- 35 4. Vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde TERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3.
5. Vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde TERT comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4.
- 40 6. Vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la secuencia de ácido nucleico que codifica TERT está unida operativamente a una secuencia reguladora que dirige la expresión de la secuencia de codificación.
- 45 7. Vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, donde la cápside del vector basado en virus adenoasociado está hecha de proteínas de la cápside del virus adenoasociado de serotipo 9 (AAV9), y la secuencia de ácido nucleico contenida en la cápside está flanqueada en ambos extremos por repeticiones terminales internas que corresponden a virus adenoasociados de serotipo 2.
- 50 8. Vector de ácido nucleico para su uso según la reivindicación 7, donde el ácido nucleico contenido en la cápside comprende un fragmento que codifica la secuencia de aminoácidos que codifica TERT.
9. Vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el vector comprende una secuencia reguladora que es un promotor constitutivo.
- 55 10. Vector de ácido nucleico para su uso según la reivindicación 9, donde la secuencia reguladora es el promotor de citomegalovirus (CMV).
11. Vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el vector se administra directamente al tejido cardíaco.
- 60 12. Vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el paciente ha sufrido previamente un evento de infarto de miocardio.
- 65 13. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un vector de ácido nucleico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

Figura 1

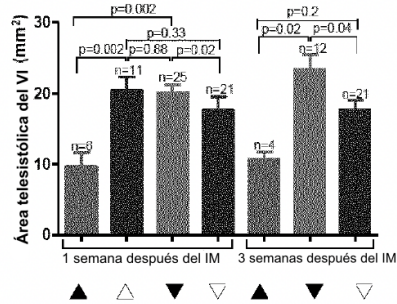
Corazón infectado con:	genomas vectoriales/ genoma diploide
<i>AAV9-Tert</i> (n=4)	0,92 (+/- 0,03)
AAV9-eGFP (n=5)	0,88 (+/- 0,04)

Figura 2

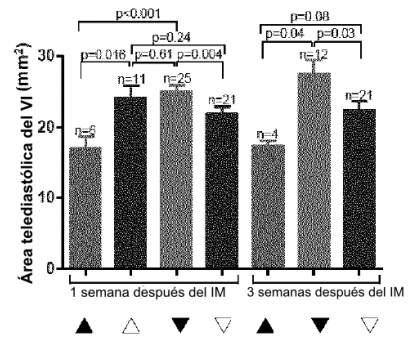
A



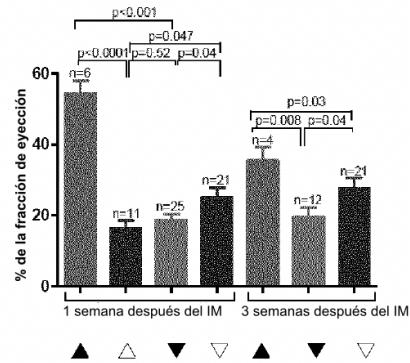
B



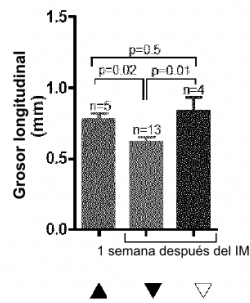
C



D



E



F

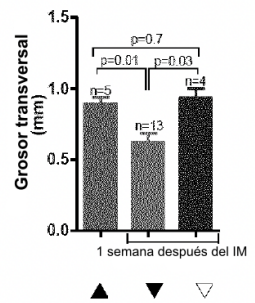


Figura 3

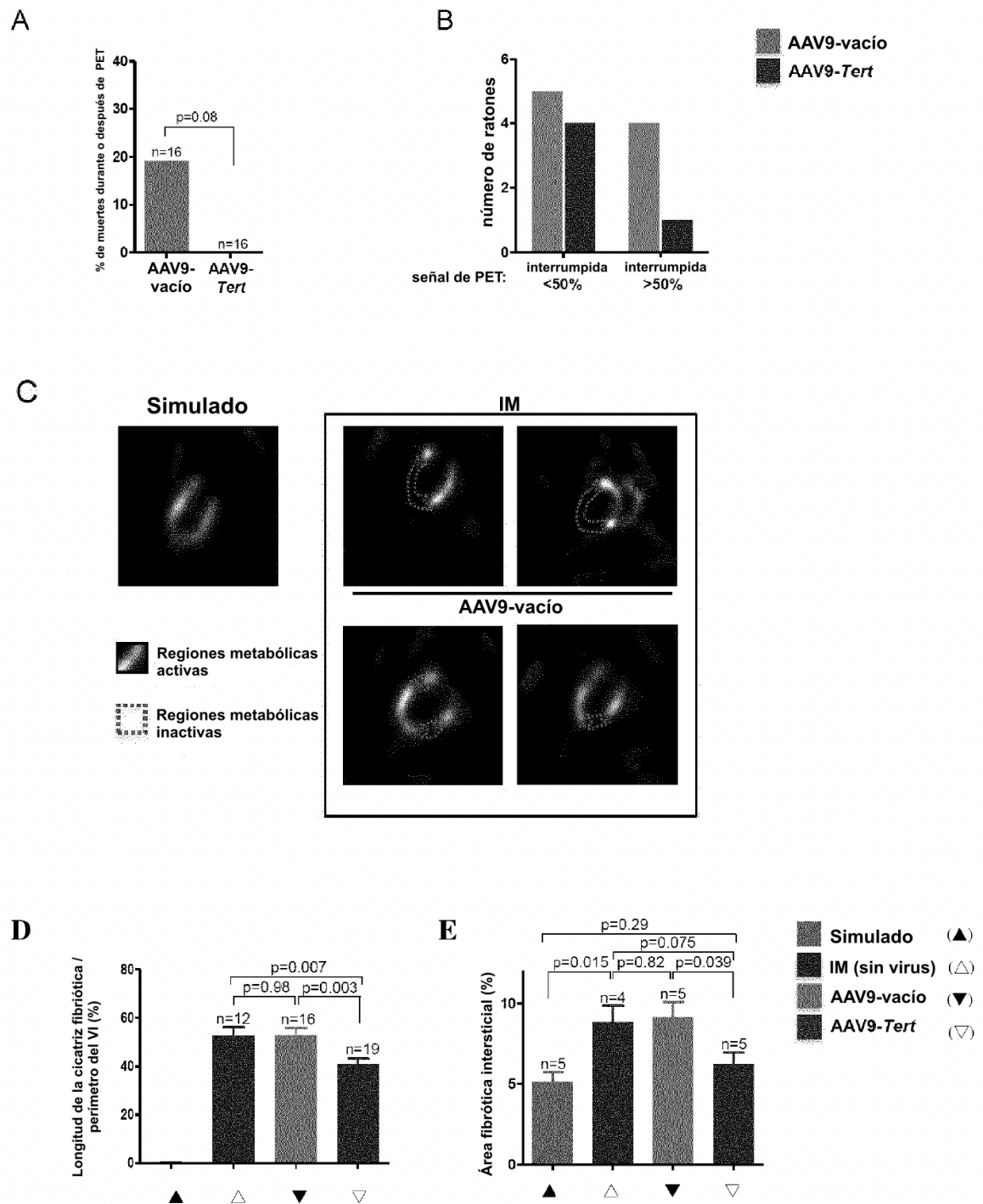


Figura 4

