



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 975**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01971139 .9**
96 Fecha de presentación : **11.09.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1317289**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2003**

54 Título: **Mutante PLB dominante negativo para su utilización en el tratamiento de enfermedades cardíacas.**

30 Prioridad: **11.09.2000 US 231821 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2009

73 Titular/es:
**The Regents of the University of California
5th Floor, 1111 Franklin Street
Oakland, California 94607-5200, US**

72 Inventor/es: **Chien, Kenneth, R.;**
Hoshijima, Masahiko;
Ross, John, Jr. y
Ikeda, Yasuhiro

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 320 975 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

Mutante PLB dominante negativo para su utilización en el tratamiento de enfermedades cardíacas.

5 **Antecedentes de la invención**

La transferencia genética somática ofrece miles de posibilidades para la utilización terapéutica en diversas enfermedades que incluyen defectos congénitos, así como en formas adquiridas de anomalías patológicas. Han existido diversas limitaciones críticas que han dificultado la aplicación práctica de la transferencia genética *in vivo*. Estas incluyen la duración de la expresión de los genes transferidos, el balance entre la especificidad tisular y la eficacia de la expresión genética, y los efectos secundarios adversos de la inflamación local provocados por los vectores.

En el campo de la medicina cardiovascular, la terapia genética se ha focalizado en la transferencia genética vascular, dirigida principalmente a la enfermedad coronaria isquémica. Muchos grupos de investigadores han obtenido la transferencia genética cardíaca utilizando vectores adenovíricos (Ad) con cassettes de expresión genética intensa, no específicas tisulares, gobernadas por promotores del citomegalovirus (CMV) o del virus del sarcoma de Rous (RSV). Se han llevado a cabo ensayos clínicos de varios factores angiogénicos que incluyen el factor de crecimiento de las células endoteliales (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento hepatocítico (HGF). Lo que se espera es que la transducción de las células cardíacas con vectores virales dé lugar a la secreción de estos factores de crecimiento a partir de las células cardíacas, que inducen el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y que mejoran el suministro sanguíneo al corazón para disminuir la isquemia.

Algunas publicaciones han informado de algunos éxitos en la modificación de la función cardíaca mediante la experimentación de la transferencia genética en ratas y conejos, utilizando la inyección intra-aórtica o intra-coronaria de los virus. Sin embargo, en estos informes, no se describió apropiadamente el grado de especificidad de la transferencia genética, o la expresión genética fue poco uniforme en la distribución. En ratas, se creó la constricción aórtica ascendente, para estimular la hipertrofia compensadora que a menudo da lugar a la insuficiencia cardíaca (Miyamoto *et al.*, 2000). La actividad de la Ca^{2+} APTasa (SERCA 2a) del retículo sarcoplásmico está reducida en los corazones insuficientes, lo que conduce a una movilización anormal del Ca^{2+} y que lleva eventualmente a un fallo en la contracción. La inyección intracardíaca de un vector viral Ad-SERCA2a en ratas fue suficiente para inducir alguna mejoría fisiológica; sin embargo, existieron ciertas limitaciones. Los vectores Ad indujeron una respuesta inmunológica robusta, dando lugar a la necrosis miocárdica. Dicha respuesta inmune robusta prevendría la re-administración del Ad y puede dar lugar a la depuración de las células transducidas por el sistema inmune. Aunque se reivindicó que la mayoría de los miocitos expresaron el gen transferido, en el informe relativo a la transducción no se consideraron otros tipos celulares en el corazón, o la especificidad tisular de la expresión genética. En un estudio similar por los mismos investigadores utilizando ratas normales, se informó de la expresión poco uniforme de un constructo informador en el corazón. Adicionalmente, se observó la expresión del gen transferido en órganos alejados, incluyendo los pulmones y el hígado (Hajjar *et al.*, 1998).

Otros intentos para mejorar la función cardíaca se han dirigido al receptor adrenérgico β_2 (β -AR). La función de β -AR disminuye en la insuficiencia cardíaca, y la sobreexpresión de β -AR en ratones transgénicos por lo demás normales da lugar al aumento de la función cardíaca. Para determinar si β -AR podría aumentar la función cardíaca en conejos normales, se inyectó durante 40 segundos, mediante un catéter, en el ventrículo izquierdo, estando la aorta sujeta con una abrazadera, un adenovirus que expresaba β -AR (Ad- β -AR) (Maurice *et al.*, 1999). El procedimiento de suministro produjo una expresión miocárdica multicavitaria difusa, mejorando la función cardíaca; sin embargo, en el informe, no se tuvo en consideración ni la eficacia ni la especificidad de la transferencia genética. A continuación, a los corazones de los conejos que habían sufrido un infarto miocárdico, se suministró, mediante un vector adenovírico, un inhibidor quinásico β -adrenérgico, para atenuar la desensibilización β -AR, con objeto de obtener sólo una mejoría regional de la contractibilidad cardíaca (Shah *et al.*, 2001). Así, la demostración del efecto terapéutico de la transferencia genética somática cardíaca se ha dificultado por la falta de estrategias de suministro genético *in vivo*, para llevar a cabo, en el corazón intacto, una expresión cardioprotéica de alta eficacia a largo plazo.

La disfunción de una proteína puede corregirse mediante modulación de un factor regulador de la proteína. En un estudio por Minamisawa *et al.* (1999), se demostró que la eliminación o interrupción de la fosfolanban (PLB), una proteína que inhibe la función de SERCA2, pudo rescatar los defectos cardíacos en un ratón en el que la proteína LIM músculo específica (MLP) se suprimió (Arber *et al.*, 1997). Se generaron ratones con genes doblemente inactivados (DKO), cruzando un ratón PLB con genes inactivados con un ratón MLP con genes inactivados. Los ratones resultantes mostraron alguno de los defectos de la cepa de ratones MLP con genes inactivados. A este respecto, estudios de complementación genética en un modelo de ratón con genes diana de cardiomiopatía dilatada, han identificado un papel esencial para los defectos en el ciclo del calcio del retículo endoplásmico, en la progresión de la insuficiencia cardíaca (Chien, 1999).

Los mutantes dominantes negativos de una proteína pueden utilizarse para inhibir la función de la proteína, dando lugar esencialmente a una mutación con genes inactivados. Algunos de los mutantes dominantes negativos de PLB se han identificado y caracterizado mediante diversos procedimientos (WO 00/25804, que se incorporan como referencia a la presente memoria). Estas mutaciones incluyen las mutaciones puntuales E2A, K3E, R14E, S16N, S16E, L37A, I40A y V49A, así como la mutación doble K3E/R14E, algunas de las cuales se han ensayado solamente *in vitro* (Toyofuku *et al.*, 1994). La inyección neonatal en la cavidad ventricular de un vector viral AD expresando una

forma dominante negativa de PLB (V49A), inhibió la función de la PLB nativa, rescatando la función cardíaca. La transferencia génica cardioprotéica *in vivo* a largo plazo con alta eficacia en varias formas del modelo de insuficiencia cardíaca crónica, se ha considerado un ensayo crítico para evaluar el valor terapéutico de la modificación funcional de la fosfolamban.

5

A partir de estudios sobre la fibrosis quística, es conocido que no es necesaria la transducción de todas las células para una mejora en la función. La expresión del canal de sodio de tipo salvaje en un porcentaje tan bajo como el 6-10% de las células en el interior de una capa epitelial, a las que les falte un canal de sodio, es suficiente para el transporte normal del ión sodio (Johnson *et al.*, 1992). Esto se conoce como “el efecto bystander”. Es probable que la expresión esporádica de un canal de calcio o receptor puede ser suficiente para aumentar la función de un tejido enfermo; sin embargo, el reemplazo de una proteína estructural necesitará de una transferencia génica más eficiente. Hasta la fecha, no existen informes de una transferencia génica estable de alta eficacia al tejido cardíaco.

10

La cardiomiopatía autosómica recesiva (CM) del hamster Sirio que se presenta de modo natural en las cepas BIO14.6, UMX7.1 y TO-2 del hamster, se han identificado recientemente como debidas a una mutación en el gen δ -sarcoglicano (Nigro *et al.*, 1997; Sakamoto, *et al.*, 1997). Esta mutación da lugar a una disminución en la expresión estable de todos los genes sarcoglicanos (α , β y γ), dando lugar a una disminución de la integridad estructural de todas las células musculares. La progresiva dilatación ventricular izquierda, la disfunción sistólica y diastólica, y la pérdida de células en el hamster CM se parece a muchas características fenotípicas de la cardiomiopatía dilatada primaria humana (DCM) (Ryoke *et al.*, 1999; Ikeda *et al.*, 2000). En el hamster, estos cambios fenotípicos se asocian con un aumento en la permeabilidad de la célula miocárdica, y rotura. En los ratones transgénicos, la interrupción del gen δ -sarcoglicano provocó daño cardíaco, que se informó que estaba asociado al menos, parcialmente, con anomalías de los músculos lisos vasculares (Coral-Vázquez *et al.*, 1999). En los ratones transgénicos, se informó de que la interrupción del gen δ -sarcoglicano estaba asociada con anomalías de los músculos lisos vasculares y daño miocárdico secundario (Coral-Vázquez *et al.*, 1999). Se cree que la fragilidad de las células es debida al ensamblaje incorrecto del complejo distrofina asociado a glicoproteína (DAGC) (Sakamoto, *et al.*, 1997). Normalmente, los componentes del DAGC se encuentran perpendiculares al plano del sarcolema y se unen a la proteína laminina de la matriz extracelular y a la proteína distrofina intracelular, estabilizando la célula. En ausencia de δ -sarcoglicano, el complejo se colapsa y ya no puede estabilizar las células, haciéndolas más susceptibles al estrés mecánico.

20

El rescate de la distrofia del músculo esquelético del hamster CM tuvo lugar mediante la inyección intramuscular de Ad (Holt, *et al.*, 1998) o del virus asociado al adenovirus (AAV) (Greulich, *et al.*, 1999) que contiene el gen δ -sarcoglicano. El rescate mediante el Ad- δ -sarcoglicano se llevó a cabo mediante la inyección directa del Ad- δ -sarcoglicano en el cuádriceps femoris. La expresión fue inicialmente alta ($\geq 80\%$), y alguna de las expresiones se apreciaron hasta 198 días después de la administración viral; sin embargo, la expresión disminuyó significativamente a lo largo del tiempo. No se trató la expresión del producto génico, o de su ausencia, en sitios alejados.

25

La inyección directa del AAV- δ -sarcoglicano en un músculo pequeño (es decir, el tibial anterior), fue suficiente para el suministro génico a través del músculo; sin embargo, el suministro génico eficiente en los músculos más grandes (por ejemplo, de los miembros posteriores) requirió el suministro a través de la circulación con la interrupción simultánea del endotelio, utilizando histamina. El miembro posterior se aisló de la circulación sistémica mediante torniquetes, seguido por la inyección de papaverina en histamina, y finalmente, de virus, en el vaso femoral. Después de 4 a 6 semanas, se ensayó en un sistema *ex vivo* la integridad estructural de las células. En ambos sistemas, el tratamiento con el virus que expresaba el δ -sarcoglicano dio lugar a un aumento de la estabilidad estructural de las células musculares. No se trató el suministro génico al corazón. Además, el aislamiento del corazón de la circulación mediante el torniquete para aumentar la exposición del virus al tejido de interés, será probablemente problemática; por tanto, un procedimiento idéntico no podría utilizarse para el tejido cardíaco.

30

En algunos casos de las distrofias hereditarias, como en la distrofia muscular de Duchenne, la muerte es causada habitualmente por insuficiencia cardíaca debida a cardiomiopatía, más que a miopatía del músculo esquelético, como sucede con CM en los hamsters. Como los productos del gen del sarcoglicano son elementos estructurales de la célula, para el tratamiento eficaz de la enfermedad, será necesaria la transferencia eficaz para casi todas las células. Por tanto, los procedimientos para una transferencia génica eficiente al músculo cardíaco serán útiles en el tratamiento de diversas distrofias musculares.

35

El suministro génico eficaz para el corazón presenta un problema mayor que el suministro al tejido del músculo estriado, debido a las diferencias estructurales de los tejidos. Las células del músculo estriado son grandes, multinucleadas, que se derivan a partir de la fusión de mioblastos múltiples. Por tanto, el suministro de una partícula vírica a una única célula dará lugar a una expresión sobre un área mucho más grande, pues el ARN transcrito en un único núcleo será transportado a través de la célula. Las células cardíacas contienen sólo uno o dos núcleos por célula y son mucho más pequeñas (10 veces). La expresión en la misma área porcentual necesitará la transducción eficiente de un número de células significativamente más alto.

40

Los promotores histo-específicos se han utilizado para aumentar la especificidad de la expresión génica miocárdica, pero los niveles de expresión del gen transferido fueron bajos (Rothmann *et al.*, 1996). Otra estrategia para restringir la expresión de los genes transferidos al corazón ha implicado la inyección directa del virus en el miocardio (Gutzman *et al.*, 1993; French *et al.*, 1994). Otro intento implicó la inyección intrapericárdica del vector vírico combinada con el tratamiento con proteinasa (Fromes *et al.*, 1999). Estas manipulaciones consiguieron el suministro génico local debido

45

a la falta de una intensa difusión del vector viral; sin embargo, el resultado de estos procedimientos es la expresión génica altamente restringida con el daño tisular local.

La eficacia del suministro génico cardiomiocítico mediante un vector AAV se documentó *in vitro* utilizando células neonatales cultivadas de rata, así como en un sistema *ex vivo* utilizando la inmersión del músculo papilar de rata (Maeda *et al.*, 1998). Se informó de que la transferencia *ex vivo* del vector AAV, seguida por el trasplante cardíaco singéneo alcanzó una expresión del gen marcador de alta eficacia (Svensson *et al.*, 1999). El suministro intracoronario de AAV se intentó en el miocardio porcino; sin embargo, se observó una eficacia extremadamente baja de la transferencia génica (0,2%) (Kaplitt *et al.*, 1996). Hasta la fecha, no existe un informe del sistema del suministro génico cardiopéptico *in vivo* de alta eficacia con una expresión sostenible a largo plazo.

Se requiere el desarrollo de otros medios para el tratamiento de problemas cardíacos.

Sumario de la invención

La invención consiste en la utilización de un vector vírico que contiene un polinucleótido que codifica el mutante S16E PLB dominante negativo de fosfolanban (PLB), que presenta una mutación de serina a ácido glutámico en el aminoácido 16, al compararla con la molécula de tipo salvaje, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades cardíacas.

La invención supera las limitaciones en los medios anteriores, para alcanzar un alto nivel de transferencia génica cardiopéptica *in vivo* con una alta coherencia (promedio del 60-70% de los miocitos cardíacos) en modelos animales y normales cardiomiopáticos. La invención implica el aumento del tiempo de permanencia del vector viral, Ad o AAV, que contiene el gen de interés, en el corazón, mediante la inducción de la hipotermia, mediante el aislamiento del corazón de la circulación, y mediante la parada cardíaca completa o parcial. Los agentes permeabilizantes constituyen un componente esencial de la invención, y se utilizan durante la administración del virus, para aumentar la absorción de éste por las células cardíacas. La expresión del gen mediante los vectores AAV está muy restringida al músculo cardíaco y se mantiene durante largo tiempo, sin síntomas de inflamación miocárdica.

Se utilizaron hamsters normales, así como hamsters CM, para demostrar la utilidad de la invención. Los animales se anestesiaron y se enfriaron a una temperatura central de 18-25°C aproximadamente en bolsas rellenas con agua helada. La aorta y la arteria pulmonar se ocluyeron utilizando lazos corredizos metálicos para aislar el corazón de la circulación. Las soluciones se inyectaron en la aorta en la siguiente secuencia: solución cardiopéptica del Hospital Sto. Thomas, agentes permeabilizantes en solución cardiopéptica, y finalmente virus, Ad o AAV, con agentes permeabilizantes en solución cardiopéptica. El tiempo para el aislamiento del corazón varió de 4 a 10 minutos antes de la liberación de los lazos corredizos metálicos. El animal se resucitó y se devolvió a la temperatura corporal normal.

Los animales se analizaron con respecto a la especificidad de la transferencia génica, entre 4 y 6 días después de ésta utilizando Ad, o de 5 semanas a 3 meses después de utilizar AAV, empleando constructos informativos (β -galactosidasa), o para la mejora en la función cardíaca utilizando δ -sarcoglicano, formas dominantes negativas de PLB u otros genes estructurales o funcionales. La expresión de la β -galactosidasa se detectó a través de los corazones de los hámsters normales ($78,1 \pm 30,1\%$ con Ad y $79 \pm 8\%$ con AAV de los miocitos del ventrículo izquierdo por unidad de área que expresen β -galactosidasa). La expresión de δ -sarcoglicano en los hámsters BIO14.6 CM deficientes en δ -sarcoglicano, se restauró al $57,2 \pm 8,2\%$ de aquélla en los hamsters "golden" normales, utilizando el vector Ad, conjuntamente con una marcada mejoría de la expresión de otros componentes del complejo DAGG. La transferencia de un gen para una forma dominante negativa de la fosfolanban potenció la contractibilidad en el corazón de los hamsters CM, suprimiendo la insuficiencia cardíaca mediante la potenciación de la función de SERCA2. El análisis histológico de las células cardíacas demostró que fueron menos dañadas que las células de los hamster CM emparejados por edades.

Estos datos demuestran que la invención resulta útil para la transferencia de una secuencia codificante para ambos tipos de proteínas, estructurales y reguladoras, a las células cardíacas. Ambos vectores, Ad y AAV, pudieron mediar una transferencia génica eficiente, y pueden utilizarse igualmente bien en el procedimiento de la invención. La selección de un vector viral dependerá del tamaño del gen que vaya a ser transferido y de otras consideraciones bien conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, es conocido que diversos promotores funcionan en el corazón, incluyendo los promotores del citomegalovirus (CMV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores pueden utilizarse con o sin los elementos potenciadores del virus. Además, otros elementos, tal como un intrón 40 del virus simiano (SV), u otra estructura intrónica artificial, puede insertarse para aumentar la expresión génica. Experimentos utilizando hamsters normales sin una función cardíaca comprometida incluyeron la administración de una segunda dosis del virus, mientras que sólo una dosis del virus se administró a hámsters BIO 14.6 para reducir la cantidad de tiempo de hipotermia y de aislamiento del corazón de la circulación. El número de partículas virales y el de dosis administradas variarán dependiendo del estado del paciente, que será evaluado por el experto en la materia.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se comprenderá mejor a partir de la siguiente descripción detallada, conjuntamente con las figuras adjuntas, en las cuales los números de referencia similares se refieren a partes similares y en las que:

Figura 1 A-C: Caracterización del mutante de pseudofosforilación de la fosfolanban (S16EPLB). (A): Alineación (comparativa entre) las especies del péptido de PLB de 52 aminoácidos, que está muy conservado. El sitio de fosforilación en Ser 16 catalizado por la quinasa cAMP dependiente mutó como Glu16. (B): Aumento regulado de la hemodinámica cardíaca independiente de las catecolaminas en los ratones transgénicos 616EPLB. S16EPLB se situó detrás del promotor α -MHC del ratón de 5,5 kilobases (donación del Dr. Jeffery Robbins, Universidad de Cincinnati), generándose los ratones transgénicos en los antepasados CB6F1 mediante inyección intranuclear. (En cuadros): el ritmo cardíaco (izquierdo), la derivada máxima (central) y mínima (derecho) del cambio de la presión LV con dosis crecientes de dobutamina, el agonista β -adrenérgico, se midieron en animales de control (círculos abiertos, n=8), y animales α -MHC-S16EPLB (círculos cerrados, n=8) tal como se ha descrito anteriormente (Palakodeti *et al*, 1997). Media \pm SE, *P<0,05 (medida repetida de ANOVA, seguida por el ensayo post hoc Student-Newman-Keuls). (C): Rescate de la disfunción cardiomopática de las células ventriculares MLPKO mediante transferencia del gen AdenoS16EPLB. AdenoS16EPLB se inyectó juntamente con AdenoEGFP en los neonatos ratones MLPKO de 0 a 3 días. Entre 4 y 6 semanas más tarde, se midieron las contracciones únicas celulares de las células transgénicas positivas (S16E) y de las células negativas (de control) de los ratones MLPKO, y de las células transgénicas positivas de los ratones de tipo salvaje inyectados con solo AdenoEGFP (normales). (Christensen *et al.*, 2000).

Figura 2 A-D: Efecto terapéutico de rAAV/S16EPLB sobre la progresión de la disfunción de LV en los hamsters BIO14.6 CM. (A,B): Medición ecocardiográfica de %FS (A) y LVDD (B) antes, y 5 semanas y 3-6 meses después de transferencia génica intra-coronaria (GT) sin tratamiento viral (barras abiertas, n=10 durante 5 semanas y n=16 durante 3-6 meses), rAAV/LacZ (barras punteadas n=11 durante 5 semanas y n=11 durante 3-6 meses) y rAAV/S16EPLB (barras rellenas, n=11 durante 5 semanas y n=13 durante 3-6 meses). Media \pm SE, *P<0,05 vs. LacZ, #P<0,05 vs. sin virus. (medida repetida de ANOVA, seguida por el ensayo post hoc Student-Newman-Keuls). (C,D): Contractibilidad del ventrículo izquierdo (max LV dP/dt) se evaluó en el valor basal y en respuesta al aumento de las dosis de la dobutamina a las 5 semanas (C) y 3 meses (D) después de la transfección de rAAV/S16EPLB (círculos cerrados, n=6 durante 5 semanas y n=9 durante 3 meses), suministro de rAAV/LacZ (círculos abiertos, n=7 durante 5 semanas y n=5 durante 3 meses) y hamster F1B normal de control (triángulos cerrados, n=7 durante 5 semanas y n=6 durante 3 meses). Media \pm SE, *P<0,05 S16EPLB vs. LacZ (medida repetida de ANOVA, seguida por el ensayo post hoc Student-Newman-Keuls). De los procedimientos para el análisis funcional cardíaco de los hamsters CM mediante ecocardiografía y la cateterización cardíaca se informó anteriormente (Ryoke *et al*, 1999).

Figura 3: Rescate de la lesión progresiva de células miocárdicas con fibrosis intersticial e interrupción de la membrana en hamsters CM, mediante suministro intra-coronario de rAAV/S16EPLB. El área lesionada se cuantificó en los cortes sometidos a una tinción doble para la aglutinina de germen de trigo y la distrofina, seguida por la utilización del programa NIH de imagen. Los cortes (6 cortes transparietales de cada animal, 3 animales por cada grupo) fueron de LVs aisladas de animales después de 5 semanas y 3 meses con suministro génico rAAV/LacZ y rAAV/S16EPLB. Al mismo análisis lesional se sometieron hamsters normales (cepa F1B) de 5 semanas de edad. Media \pm SE, *P<0,05 S16EPLB vs. LacZ (medición repetida de ANOVA, seguida por el ensayo post hoc Student-Newman-Keuls).

40 Descripción detallada y formas de realización preferidas

Es conocido que la eficacia de la transferencia génica cardíaca en el corazón aislado se ve afectada por múltiples parámetros, que incluyen el flujo coronario, el tiempo de permanencia, la concentración vírica, la temperatura, la presencia de hematíes en el perfundido coronario, y la permeabilidad vascular. Para optimizar varios de estos factores, particularmente la perfusión, el tiempo de permanencia y la permeabilidad vascular, se indujo una hipotermia total del cuerpo conjuntamente con una parada cardíaca, incluyéndose durante la inyección de las partículas virales agentes permeabilizantes tales como histamina, substancia P y serotonina. Este procedimiento dio lugar sistemáticamente a una alta expresión del transgén en el corazón del hamster normal y enfermo, restaurando el complejo de sarcoglicano en los corazones de los hamster BIO14.6 CM.

La técnica hipotérmica se basa en la que se utilizó para la cirugía cardiovascular neonatal humana que se llevó a cabo en los años 1960, que permitió la parada cardíaca de hasta 1 hora (Mohri *et al.*, 1969). Asimismo, se llevó a cabo con éxito una hipotermia total del cuerpo en perros con parada cardíaca durante por lo menos 45 minutos (Mohri *et al.*, 1968). Esto permite un gran aumento en el tiempo de permanencia del virus en el corazón, aumentando la eficacia de la transducción. Los agentes permeabilizantes aumentaron asimismo la eficacia de la transducción. Las inyecciones de Ad sin agentes permeabilizantes vasculares dieron lugar a una expresión transgénica limitada. La histamina contribuyó a alcanzar una parada cardíaca completa, presumiblemente mejorando la perfusión miocárdica. Sin embargo, el efecto principal fue, sin duda, aumentar la permeabilidad vascular. Se ha mostrado que el aumento a corto plazo en la permeabilidad vascular producida por la histamina proviene de la comunicación lagunar endotelial, un efecto que permite que las partículas virales penetren en el espacio extravascular.

Aunque no forme parte de la presente invención, se advirtió que la transferencia del gen del δ -sarcoglicano aumentó sorprendentemente la expresión proteica de las otras proteínas sarcoglicano que se encuentran en el DAGC, sugiriendo que el gen δ -sarcoglicano expresa una proteína que está apropiadamente plegada y dirigida hacia su propia localización en la célula. Esto demuestra que una transferencia de un gen que codifica una proteína en las células cardíacas es factible y que puede dar lugar a una corrección substancial de la deficiencia de una proteína mutante sarcolémica, puede acarrear implicaciones para el tratamiento futuro de algunas formas de la DCM genética humana.

El procedimiento de transferencia génica de alta eficacia se aplicó para rescatar la alteración del acoplamiento excitación-contracción (E-C) y defectos asociados en la realización de la contracción cardíaca que se observa en los hámsters CM. La ablación de PLB rescató un espectro de fenotipos que se encontraron en un modelo murino de cardiomiopatía dilatada, en el que el ratón aloja una deficiencia en la proteína citoesquelética MLP (Minamisawa *et al.*, 1999). Se diseñó e insertó en un vector AAV un mutante dominante negativo que interfería PLB, para determinar si la interrupción de la actividad de PLB podría también rescatar una deficiencia en el gen δ -sarcoglicano en el hamster CM. El PLB dominante negativo contenía un ácido glutámico en lugar de una serina en el aminoácido 16 (S16EPLB), por lo que el PLB ya no podría ser fosforilado por una proteína dependiente del AMP cíclico. Como control, se utilizó un vector rAAV-LacZ. Los dos AAVs se transfirieron al miocardio de hamsters BIO14.6 de 5-6 semanas de edad mediante el procedimiento anterior, en el cual se había confirmado mediante ecocardiografía un estadio medio de insuficiencia cardíaca. Cinco semanas y 3-6 meses después del suministro génico, se llevaron a cabo ecocardiografía y la medición de alta fidelidad de la presión ventricular izquierda (LV), para evaluar la función cardíaca *in vivo*. El tratamiento con la transferencia del gen AAV-S16EPLB suprimió el fallo progresivo de la contractibilidad cardíaca en estos animales, demostrando la eficacia del procedimiento de transferencia génica para modificar funcionalmente el estado de la bomba cardíaca.

Ejemplo 1

(Antecedentes de la invención)

Construcción de los vectores virales. Se construyó un vector Ad de replicación deficiente (E1A y E1B suprimidos), que contiene el gen β -galactosidasa con una secuencia señal de localización nuclear (Ad.CMV LacZ), o el gen δ -sarcoglicano (Ad.CMV δ -sarcoglicano) del hamster gobernado por el promotor CMV. Los constructos virales se generaron utilizando el vector lanzadera PACCMV.PLPA mediante el procedimiento de Graham *et al.*, 1995 (que se incorpora a la presente memoria como referencia). Los vectores Ad generados mediante la recombinación *in vitro* se amplificaron en 293 células. Las células se recuperaron y se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación para liberar las partículas virales. Se purificaron los virus a través de dos gradientes consecutivos de CsCl. Los títulos promedio de los virus fueron de $1,27 \times 10^{11}$ pfu/ml para Ad.CMV LacZ y de $5,5 \times 10^9$ pfu/ml para Ad.CMV δ -sarcoglicano.

Los vectores AAV se basan en el tipo 2 de parvovirus incompleto y no patogénico, y se construyeron esencialmente tal como se ha descrito por Xiao *et al.* 1998 (que se incorpora a la presente memoria como referencia). Brevemente, los tres constructos plasmídicos, un vector lanzadera, un vector de empaquetamiento y un vector auxiliador mini-adenovirus no infeccioso, se cotransfectaron a 293 células para generar partículas virales de replicación deficiente. Las partículas virales AAV se recuperaron a partir de dos gradientes secuenciales de CsCl o mediante un procedimiento de columna de heparina en una sola etapa. El título promedio de los virus fue de $1-3 \times 10^{12}$ partículas virales (VP)/ml para ambos AAV-LacZ y AAV-S16EPLB.

Ejemplo 2

(Antecedentes de la invención)

Transducción in vivo. Se anestesiaron unos hamsters con pentobarbital sódico (85 mg/kg, vía intraperitoneal), se intubaron y se ventilaron, se situaron electrodos para ECG en las extremidades y se insertó un catéter termistor 6F en el recto. El pecho se afeitó y en el segundo espacio intercostal se llevó a cabo una pequeña toracotomía anterior izquierda (4-5 mm); alrededor de la aorta ascendente y la arteria pulmonar principal se dispusieron ligaduras de seda, trenzadas, y se enhebraron a través de tubos plásticos de oclusión. A través de una incisión media en el cuello, se expuso la carótida derecha, se canuló con un tubo PE-60 moldeado a la llama, avanzando el extremo por la aorta ascendente, justamente por encima de la válvula aórtica (por debajo del lazo corredizo metálico) para la medición de la presión arterial y las inyecciones posteriores de las partículas virales.

Las bolsas rellenas con el agua helada se situaron alrededor del animal decúbiteo supino, incluyendo la cabeza, controlando cada 3 minutos la frecuencia cardíaca y la temperatura, hasta que la temperatura central alcanzó 18°C (tiempo promedio 40 minutos) en el hamster normal. Se ocluyeron a continuación la aorta y la arteria pulmonar, inyectándose las soluciones en la aorta de la siguiente forma: solución cardioplégica modificada del Hospital St. Tomás (20 mM KCl, 2 μ l/g peso corporal(BW)), 10 segundos más tarde, 20 mM histamina (2,5 μ l/g BW), disueltos en solución cardioplégica; 5 minutos más tarde, solución de virus (100 μ l) con histamina y solución cardioplégica; 2 minutos más tarde, una segunda inyección de virus con histamina, en hamsters normales. Debido a la disminución de la función basal en los hamsters CM, se llevó a cabo sólo una inyección. Ambos lazos corredizos metálicos se liberaron (después de, aproximadamente, un período de tiempo de oclusión de 10 minutos para los hamsters normales y de 6 minutos para los hamsters CM), iniciándose entonces una infusión intra-aórtica de dobutamina (10 μ g/kg/min) con compresión periódica del pecho. La recuperación del ritmo sinusal y de la presión tuvo lugar aproximadamente en 1-2 minutos después del comienzo de la dobutamina. Cuando la presión arterial sistólica alcanzó alrededor de 50 mmHg, el animal se situó en un cojín de calentamiento (42°C), calentándose gradualmente hasta 36°C. El pecho se cerró a continuación y se succionó, evacuándose, el aire intratorácico, dejando que los animales se recuperaran.

En los experimentos posteriores, se mostró que la hipotermia moderada (24-26°C) y el tiempo más corto de oclusión aórtica (4-5 minutos) dio lugar a sólo una pérdida moderada de la eficacia transfaccional (67,5%, no significativa a partir de las eficacias del 77,3% utilizando el protocolo inicial).

Ejemplo 3

(Antecedentes de la invención)

5 *El procedimiento de transducción que utiliza un gen informador no altera la función cardíaca.* Mediante ecocardiografía (ECG) se estudiaron hamsters normales (n=10) a los 4 días después de la administración de Ad.CMV LacZ. El porcentaje de acortamiento fraccional (%FS) del ventrículo izquierdo fue del $43,88 \pm 5,45\%$, indicador de una función normal y la dimensión diastólica final del ventrículo izquierdo (LVDd) fue de $4,38 \pm 0,22$ mm, indicador de un tamaño normal del corazón. En un grupo de hamsters normales no tratados emparejados por la edad, el % FS fue de $46,83 \pm 2,43$ y la LVDd fue de $4,12 \pm 0,3$ mm (no significativamente diferentes). En los hamsters CM, se examinaron algunos animales mediante ecocardiografía, tanto antes como 6 días después de la administración de Ad.CMV LacZ. La función ventricular izquierda se deprimió en los hamsters CM de control con respecto a los hamsters de tipo salvaje, tal como se espera (% FS $27,77 \pm 3,17\%$, LVDd $5,44 \pm 0,25$ mm) y algo más deprimida 6 días después (%FS $23,59 \pm 4,93\%$, LVDd $5,60 \pm 0,37$ mm, ambos $p < 0,05$).

15

Ejemplo 4

(Antecedentes de la invención)

20 *Expresión de β -galactosidasa y δ -sarcoglicano en hamsters BIO14.6 utilizando un vector Ad.* En los corazones de hamsters CM transducidos con Ad.CMV LacZ, se dio una eficacia de transferencia génica similar a la obtenida en los hamsters normales. Se observó que existía una tendencia a la tinción positiva del ventrículo izquierdo superior a la del ventrículo derecho, siendo la transducción algo menos homogénea que en los corazones normales. En los corazones transducidos con Ad.CMV δ -sarcoglicano, la expresión de la proteína δ -sarcoglicano promedió $57,2 \pm 8,2\%$ de la (obtenida) en el corazón normal, tal como se determinó mediante transferencia Western. Los aumentos en el α - y β -sarcoglicano fueron incluso más intensos que el aumento que se apreció en el δ -sarcoglicano. En los corazones CM, tanto transducidos con LacZ como no transducidos, no se detectó la expresión del δ -sarcoglicano y la expresión de las proteínas α - y β -sarcoglicano fue muy baja. De este modo, existió una restauración exitosa del complejo del sarcoglicano en los corazones de los hamsters BIO14.6.

30

En otros experimentos, en las semanas 1 y 3 después de la transferencia génica Ad.CMV δ -sarcoglicano, se demostró, mediante inmunotinción, una restauración clara y difusa del δ -sarcoglicano (y de otros sarcoglicanos) al sarcolema y a los túbulos-t.

35 Ejemplo 5

(Antecedentes de la invención)

40 *Expresión de β -galactosidasa en hamsters utilizando un vector AAV.* Se administraron 1×10^{12} partículas víricas/kgBW AAV-LacZ a hamsters normales y hamsters BIO14.6 CM, mediante el procedimiento de la invención. Se analizó la expresión de LacZ 4-6 semanas y 3-6 meses después de la administración del virus. Se apreció la expresión homogénea de LacZ a través del ventrículo izquierdo, con una transducción de más del 60% de los miocitos. Contrariamente a esto, no se observó una tinción significativa de LacZ en otros órganos importantes, que incluían pulmones, hígado, bazo, riñones, aorta, esófago, glándulas sexuales y músculo esquelético.

45

Ejemplo 6

50 *La expresión de la fosfolanban dominante negativa interrumpe la función de la proteína de tipo salvaje.* El fosfolanban es un péptido de 52 aminoácidos altamente conservado con dos sitios diferentes de fosforilación: Ser16 (quinasa dependiente del AMP cíclico: proteínquinasa A) y Thr17 (quinasa dependiente de la Ca^{2+} -calmodulina). Los efectos lusitrópicos e inotrópicos *in vivo* de los agonistas β -adrenérgicos están regulados principalmente por la fosforilación de Ser16 de PLB mediante la proteína quinasa A y la defosforilación, mediada primariamente por la fosfatasa tipo 1 unida al retículo sarcoplásmico (SR). Ya que se ha mostrado que la fosforilación mediante la proteína quinasa A alivia la inhibición de SERCA2 mediante la disociación de la acción inhibitoria de PLB, generamos un mutante PLB pseudofosforilado reemplazando Ser16 con el aminoácido básico glutamina, introduciendo por lo tanto una carga negativa en posición 16 (S16EPLB) (Figura 1A). Para ensayar directamente la capacidad de S16EPLB para activar un efecto inotrópico en células cardíacas individuales, se utiliza un protocolo *in vivo* de suministro del vector adenovírico. La expresión del S16EPLB condujo a la activación constitutiva de la contractibilidad y de la relajación en las células ventriculares del ratón de tipo salvaje en ausencia de catecolaminas. Para examinar si S16E podría tener un efecto similar en el corazón intacto *in vivo*, se generan ratones transgénicos que albergaran un gen S16EPLB gobernado por un promotor α -MHC. El análisis de transferencia de ARN reveló una sobreexpresión de 5 veces aproximadamente del transgen S16E con respecto a los niveles de PLB. Estos ratones transgénicos no mostraban evidencias de defectos morfológicos, hipertrofia, o cardiomiopatía, pero desplegaron un aumento basal en la contractibilidad cardíaca en ausencia de la estimulación catecolamínica, que era similar cualitativamente al fenotipo cardíaco de los ratones nulos en cuanto al fosfolanban (Figura 1 B). A continuación, se transfieren AdenoS16EPLB a células cardíacas neonatales deficientes en MLP. La contractibilidad marcadamente deprimida y las propiedades relajantes que se encontraron en células MLPKO aisladas, se rescató parcialmente mediante S16EPLB a las 4-6 semanas después de la transferencia génica neonatal (Figura 1C).

65

Ejemplo 7

Potenciación de la contractibilidad cardíaca mediante la administración de un fosfolanban dominante negativo.

Para comparar directamente los efectos terapéuticos potenciales del vector adenovírico recombinante con respecto a la expresión mediada por AAV de S16E, se generan los vectores AAV-S16EPLB y AAV-LacZ (Xiao *et al.*, 1998), y examinamos sus efectos respectivos sobre la progresión de la insuficiencia cardíaca en los hamsters BIO14.6 CM (de 5-34 semanas de edad). A las 5-6 semanas de edad, los hamsters CM muestran una clara evidencia de disfunción cardíaca, con una disminución significativa en el acortamiento fraccional (% FS), evaluado mediante ecocardiografía (hamster normal $47,0 \pm 6,7$, n=15 vs. hamster CM $39,6 \pm 7,2$, n=14, P= 0,006). En las siguientes 28 semanas, los hamsters CM desarrollaron rápidamente una insuficiencia cardíaca que es comparable al tipo III de NYHA (New York Heart Association), caracterizada por una ecocardiografía con una marcada disminución en % FS (a las 18 semanas de edad, el hamster normal $44,0 \pm 4,9$, n=14, vs. hamster CM $24,1 \pm 4,3$, n=10, P<0,001) y dilatación de la cavidad, indicada por un aumento dimensional al final de la diástole de la cavidad del ventrículo izquierdo (LVdD) (a las 18 semanas de edad, el hamster normal $4,46 \pm 0,37$, n= 14, vs. hamster CM $5,28 \pm 0,41$, n=10, P <0,001). La administración intracoronaria del AdenoS16EPLB potenció significativamente la contractibilidad cardíaca, indicado por un aumento del 33% aproximadamente en la velocidad media del acortamiento de las fibras circunferenciales (mVcf) 6 días después de la transfección, mientras que Ad-LacZ no dio lugar a un efecto significativo. La reducción de LVdD se produjo también en los animales transfectados con AdenoS16EPLB (6% de disminución, p<0,05 vs. medición preoperativa), mientras que los animales a los que se inyectó con Ad-LacZ mostraron un ligero agrandamiento posterior en la cavidad LV, documentando de esta forma la eficacia a corto plazo de la inhibición de PLB.

Asimismo, se evaluó la eficacia terapéutica a largo plazo del suministro intracoronario de rAAV-S16EPLB en los hamsters CM. La ecocardiografía demostró que la transferencia génica rAAV/S16EPLB suprimió intensamente la afectación progresiva de la contracción cardíaca y la dilatación de la cavidad que se encontró en los hamsters CM cinco semanas después de la transferencia génica (Figura 2A,B). Las derivadas primeras máximas de la presión (LV) del ventrículo izquierdo, LV max dP/dt, revirtieron ampliamente hacia los niveles de los hamsters normales, mediante el tratamiento con rAAV/S16EPLB a nivel básico, así como en respuesta al incremento de las dosis del agonista β -adrenérgico dobutamina (Figura 2C). Este efecto de AAV-S16EPLB para mitigar el desarrollo de la insuficiencia cardíaca fue evidente más adelante, a los 3-6 meses de la transferencia génica, con una mejoría substancial en %FS (animales AAV-S16EPLB, $25,9 \pm 5,7$, n=13 vs. animales AAV-LacZ $20,2 \pm 6,2$, n=11, P<0,05) (Figura 3A), y mVcf (animales AAV-S16EPLB $3,4 \pm 0,7$, n=13 vs. animales AAV-lacZ $2,7 \pm 0,7$, n=11, P<0,05). La medición de alta fidelidad de la presión del ventrículo izquierdo documentó directamente que el suministro mediado por AAV del mutante PLB de pseudofosforilación, mantuvo el efecto rescate sobre la contractibilidad cardíaca durante 3 meses después del suministro génico (Figura 2D), exhibiendo un aumento superior al 50% de LV max dP/dt en los animales a los que se transfirió S16EPLB, comparados con los controles LacZ. La expresión persistente del péptido S16E se evidenció mediante análisis de inmunotransferencia con anticuerpos anti-PLB y anti-fosfo 16-PLB (péptido S16EPLB vs. PLB endógeno=1,5-5:1, n=6), y la transferencia southern sugirió que el gen de fusión CMV-S16EPLB está, por lo menos, parcialmente integrado en el genoma del huésped, lo que sugiere que la expresión puede verdaderamente ser a largo plazo. Considerados en conjunto, estos datos proporcionan una evidencia directa de que la inhibición de PLB puede llevar a la reversión crónica de la insuficiencia cardíaca, utilizando una nueva estrategia terapéutica génica mediada por AAV, incluso en los estadios de la enfermedad que corresponden a insuficiencia cardíaca humana grave (que se encuentra) próxima a los estadios finales (último NYHA tipo III).

Ejemplo 8

La expresión de un fosfolanban dominante negativo disminuye el daño en las células cardíacas insuficientes. Estudios experimentales y clínicos previos documentaron que los aumentos crónicos en la contractibilidad mediada por los agonistas β -adrenérgicos o los inhibidores de la fosfodiesterasa pueden conducir a la rápida progresión de la disfunción cardíaca en la insuficiencia cardíaca crónica. Además, la administración de β -bloqueantes puede mejorar la supervivencia y la progresión de la insuficiencia cardíaca clínica. Los mecanismos que subyacen a este efecto perjudicial a largo plazo se han atribuido a la toxicidad catecolamínica, y han aumentado la duda respecto a si la estimulación crónica del funcionamiento cardíaco mediante las catecolaminas gobierna inherentemente la progresión de la insuficiencia cardíaca. Utilizando un nuevo sistema AAV intracoronario para suministrar un mutante PLB pseudofosforilado que activa constitutivamente la contractibilidad cardíaca en ausencia de la estimulación de cAMP, se ha mostrado que los aumentos crónicos en la contractibilidad cardíaca pueden conducir a una reversión a largo plazo de la disfunción cardíaca y a un marcado efecto sobre la progresión de la insuficiencia cardíaca. En este estudio, se proporcionan pruebas que sugieren que uno de los mecanismos para los efectos terapéuticos sostenidos del suministro génico de AAV-S16EPLB en el sistema de modelo del hamster CM, se refiere a un efecto sobre el enlentecimiento de la tasa de muerte de las células miocíticas, que subyace a la progresión de la insuficiencia cardíaca en este modelo. El análisis histológico a las 5 semanas después de la transferencia génica reveló que la fibrosis intersticial cardíaca, que es progresiva en la cardiomiopatía humana, fue regulada por disminución para un extenso período de tiempo mediante el suministro génico AAV-S16EPLB, y que el grado de lesión celular, evaluado por la estabilidad del complejo de la distrofina, disminuyó significativamente en los animales tratados con el rAAV/S16EPLB (Figura 3).

65 **Referencias**

Arber, S., *et al* (1997) MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*. 88:393-403.

ES 2 320 975 T3

- Christensen, G. et al. (2000)** High-efficiency, long-term cardiac expression of foreign genes in living mouse embryos and neonates. *Circulation*. 101:178-84.
- Coral-Vazquez, R. et al. (1999)** Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: A novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell*. 98:465-74.
- French, B.A. et al. (1994)** Direct *in vivo* transfer into porcine myocardium using replication-deficient adenoviral-vectors. *Circulation*. 90:2414-24.
- Frommes, Y. et al. (1999)** Gene delivery in the myocardium by intrapericardial injection. *Gene Ther*. 6:683-8.
- Graham, F.L. and Prevec, L. (1995)** Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol. Biotechnol*. 3:207-20.
- Greelish, J.P. et al. (1999)** Stable restoration of the sarcoglycan complex in dystrophic muscle perfused with histamine and recombinant adeno-associated viral vector. *Nat. Med*. 5:439-43.
- Gutzman, R.J. et al. (1993)** Efficient gene transfer into myocardium by direct injection of adenovirus vectors. *Circ. Res*. 73: 1202-7.
- Hajjar, R.J. et al. (1998)** Modulation of ventricular function through gene transfer *in vivo*. *Proc. Natl.Acad. Sci., USA*. 95:5251-5256.
- Holt, K.M. et al. (1998)** Functional rescue of the sarcoglycan complex in BIO 14.6 hamster using delta-sarcoglycan gene transfer. *Mol. Cell*. 1:841-8.
- Ikeda, Y., et al. (2000)** Altered membrane proteins and permeability correlate with cardiac dysfunction in cardiomyopathic hamsters. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 278: H1362-70.
- Johnson, L.G. (1992)** Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat. Genet*. 2:21-5.
- Kaplitt, M.G. et al. (1996)** Long-term gene transfer in porcine myocardium after coronary infusion of an adeno-associated virus vector. *Ann. Thorac. Surg*.62:1669-76.
- Maeda, Y., et al. (1998)** Efficient gene transfer into cardiac myocytes using adeno-associated virus (AAV) vectors. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 30:1341-8.
- Maurice, J., et al. (1999)** Enhancement of cardiac function after adenoviral-mediated *in vivo* intracoronary beta-2 adrenergic receptor gene delivery. *J. Clin. Invest*. 104:21-9.
- Miyamoto, M.I., et al. (2000)** Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:793-98.
- Mohri, H. et al. (1968)** Challenge of prolonged suspended animation. A method of surface-induced deep hypothermia. *Ann. Surg*. 168:779-87.
- Mohri, H. et al. (1969)** Method of surface-induced deep hypothermia for open-heart surgery in infants. *J. Cardio-vasc. Surg*. 58:262-70.
- Nigro, V., et al. (1997)** Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene. *Hum. Mol. Genet*. 6:601-7.
- Rothman, T, et al. (1996)** Heart muscle-specific gene expression using replication defective recombinant adenovirus. *Gene Ther*. 3:919-26.
- Ryoke, T., et al. (1999)** Progressive cardiac dysfunction and fibrosis in the cardiomyopathic hamster and effects of growth hormone and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation*. 100:1734-43.
- Sakamoto, A., et al. (1997)** Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation in the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: An animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.94:13873-8.
- Shah, A.S. et al. (2001)** *In vivo* ventricular gene delivery of a β -adrenergic receptor kinase inhibitor to the failing heart reverses cardiac dysfunction. *Circulation* 103:1311.
- Svensson, E.C., et al. (1999)** Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial infection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors. *Circulation*.99:201-5.

ES 2 320 975 T3

Toyofuku, E., et al. (1994) Amino acids Glu2 to Ile18 in the cytoplasmic domain of phospholamban are essential for functional association with the Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. 269:3088-94.

Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. (1998) Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper virus. *J. Virol.* 72:2224-32.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de un vector vírico que contiene un polinucleótido que codifica el mutante S16E PLB dominante negativo de fosfolanban (PLB), que presenta una mutación de serina a ácido glutámico en el aminoácido 16, cuando se compara con la molécula de tipo salvaje, en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de las enfermedades cardíacas.

10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el vector vírico comprende asimismo un promotor apto para su utilización en el músculo cardíaco.

3. Utilización según la reivindicación 1, en la que el vector vírico es un vector vírico adeno-asociado (AAV).

15 4. Utilización según la reivindicación 1, que comprende asimismo la utilización de un gen que codifica un gen CA2+ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA-2), para la preparación de un medicamento que combine dicho vector codificante de SERCA-2 con el vector vírico que codifica el mutante S16E PLB.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

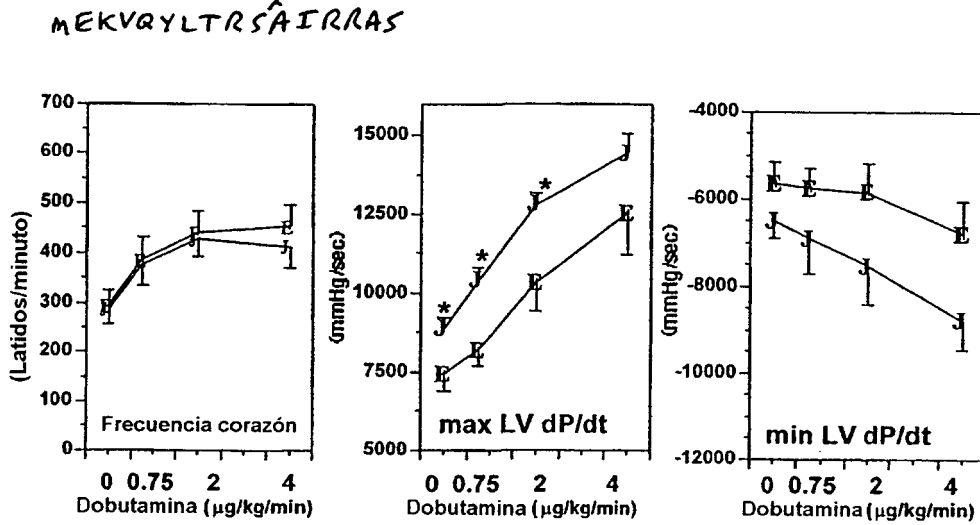
Figura 1

A

*

MEKVQYLTRSAIRRAETIEMPQARQKLQNLFINFCLILICLLLICIVMLL S16EPLB
 MEKVQYLTRSAIRRASTIEMPQARQKLQNLFINFCLILICLLLICIVMLL (humano)
 MDKVQYLTRSAIRRASTIEMPQARQNLQNLFINFCLILICLLLICIVMLL (perro)
 MEKVQYLTRSAIRRASTIEMPQARQNLQNLFINFCLILICLLLICIVMLL (ratón)
~~MEKVQYLTRSAIRRASTIEMPQARQNLQNLFINFCLILICLLLICIVMLL (conejo)~~

B



C

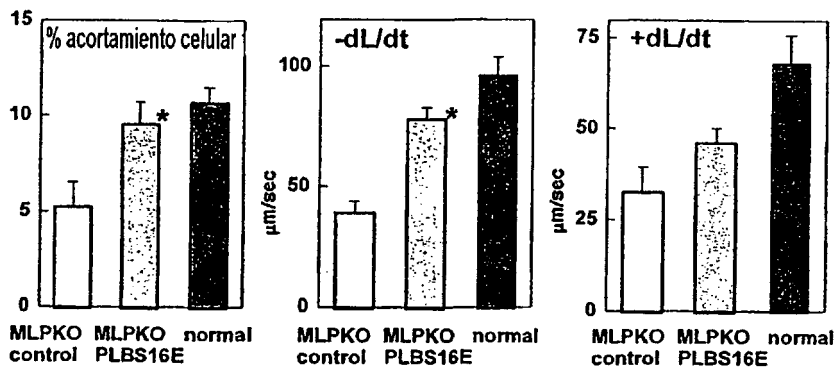


Figura 2

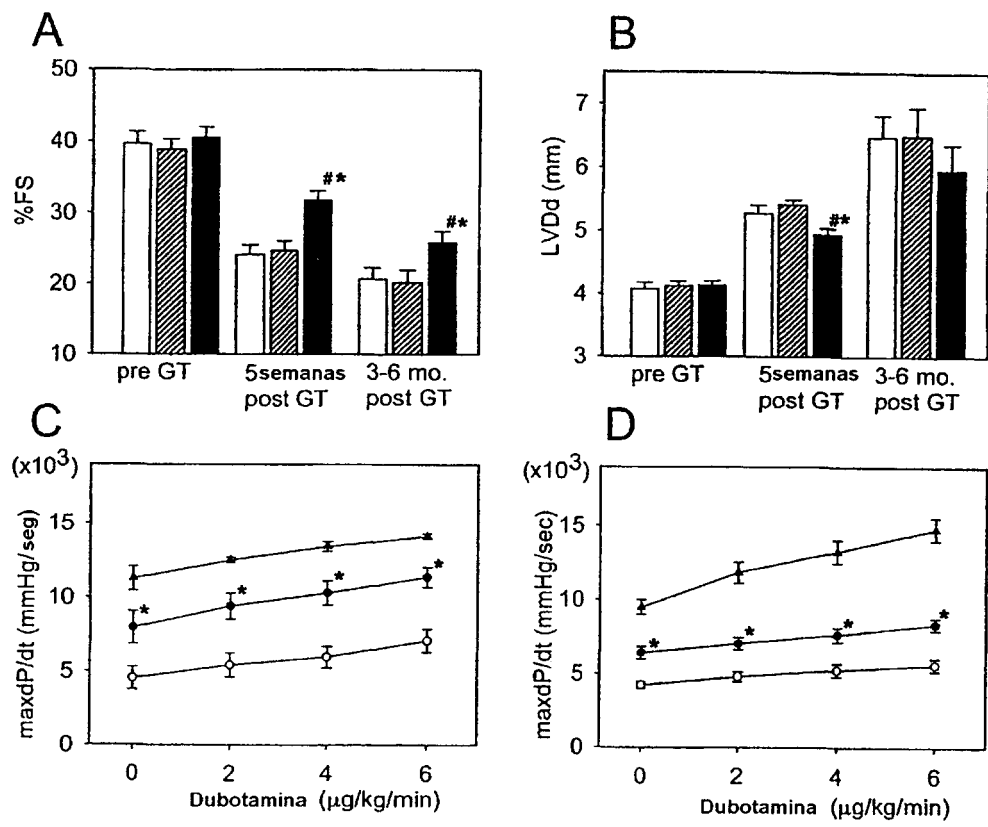


Figura 3

