

Trattamento dello scompenso cardiaco con terapia genica: i risultati inattesi del trial CUPID 2

Marta Gigli^{1,2}, Gianfranco Sinagra¹, Luisa Mestroni²

¹Dipartimento Cardiovascolare e Scuola di Specializzazione in Malattie dell'Apparato Cardiovascolare, Azienda Ospedaliera "Ospedali Riuniti" e Università degli Studi, Trieste

²Cardiovascular Institute and Adult Medical Genetics Program, University of Colorado Anschutz Medical Campus, Aurora, Colorado, USA

Heart failure is still a major cause of morbidity and mortality in Europe and North America. In the last three decades, gene therapy emerged as a target in the molecular mechanisms implicated in heart failure encouraging preclinical gene therapy studies in small and large animal models. Prior studies documented a decreased expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase protein (SERCA2a), a major cardiac calcium cycling protein, in heart failure. These results paved the way to preliminary studies based on gene transfer strategies of SERCA2a. The encouraging results in terms of safety and surrogate clinical endpoints led to a large randomized clinical study, the CUPID trial, including patients with heart failure and reduced ejection fraction. This phase IIb trial enrolling 250 patients randomized to intracoronary delivery of adeno-associated virus 1 (AAV1)/SERCA2a or placebo concluded with a non-superiority of the studied therapy, thus not confirming the results of the previous experiences with the same approach. In the present manuscript, we provide an overview of the scientific experiences that preceded the design of this major trial, then critically revising its structure and results. Finally we tried to understand the reasons of this unexpected failure and which are the future perspectives of gene therapy for heart failure.

Key words. Adeno-associated virus; Gene therapy; Heart failure.

LA TERAPIA GENICA ALLO STATO ATTUALE

Lo scompenso cardiaco è ancora oggi una delle maggiori cause di morbilità, mortalità ed ospedalizzazioni in tutto il mondo¹. La terapia dello scompenso cardiaco cronico a frazione di eiezione ridotta storicamente si è basata su poche classi farmacologiche² e solo recentemente lo studio PARADIGM-HF³, a quasi 30 anni di distanza dall'avvento degli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina, ha per la prima volta dimostrato la superiorità di un nuovo farmaco, LCZ696 (un'associazione di inibitore della neprililina e sartano), su quelli che per lungo tempo sono stati la pietra miliare della terapia. Se da un lato le strategie farmacologiche "standard" hanno dimostrato un altro passo avanti nella riduzione dei sintomi e degli outcome sfavorevoli, rallentando di fatto la progressione di malattia, le attuali conoscenze sulla genetica e i meccanismi molecolari che stanno alla base delle patologie cardiache aprono il campo a nuovi approcci terapeutici per il trattamento e possibilmente la cura dello scompenso cardiaco.

La terapia genica rappresenta una strategia innovativa e di grande potenziale per la cura delle malattie cardiovascolari e in particolare dello scompenso cardiaco, sulla spinta dei successi in altri campi della medicina^{4,5}. Questa strategia terapeutica utilizza vettori veicolanti materiale genico all'interno di cellule target. In linea generale i vettori virali si sono dimostrati più efficienti dei vettori non virali, innanzitutto in termini di durata di espressione genica, e per questo anche in ambito cardiovascolare hanno rappresentato la strategia prevalente negli studi condotti fino ad ora⁶. I vettori virali consistono di materiale genico (genoma virale e il gene da trasferire) avvolto da un capsido proteico o da un involucro lipidico che interagisce con specifici recettori di membrana permettendo il legame, l'internalizzazione e il rilascio del "gene terapeuta" all'interno della cellula bersaglio⁷. Multiple tecniche di somministrazione sono possibili, ad esempio in ambito cardiovascolare l'infusione intracoronarica o quella in vena periferica prevalgono sull'iniezione intramiocardica diretta.

L'utilizzo clinico di vettori virali presenta le maggiori difficoltà tecniche e di regolamentazione. La risposta immunitaria al vettore o alla cellula modificata può ostacolare il trasferimento del gene, limitarne la durata di espressione o determinare la clearance della cellula⁸. Tra i vettori virali, gli adeno-associati (*adeno-associated viral vectors*, AAV), formati da DNA a singola elica, hanno un basso profilo di rischio e sono in grado di ottenere un'espressione persistente e duratura del gene in diversi tessuti tra cui il cuore. Proprio per queste caratteristiche hanno raccolto grande attenzione nel campo della terapia genica cardiologica^{9,10}.

Accettato 25.07.2016. Gli autori dichiarano nessun conflitto di interessi.

Questo lavoro è stato supportato in parte da un grant del programma Transatlantic Network of Excellence della Leducq Foundation (14-CVD 03).

Per la corrispondenza:

Prof.ssa Luisa Mestroni Cardiovascular Institute, University of Colorado Denver Anschutz Medical Campus, 12700 E 19th Ave # F442, Aurora, CO 80045-2507, USA
e-mail: Luisa.Mestroni@ucdenver.edu

SERCA2a COME TARGET TERAPEUTICO

Il reticolo sarcoplasmatico/endoplasmatico Ca^{2+} -ATPasi2a (SERCA2a) regola la contrazione e il rilascio dei cardiomiociti trasportando il calcio dall'interno del citoplasma al reticolo endoplasmatico durante la diastole (Figura 1). È stato dimostrato in passato come una ridotta attività di SERCA2a possa contribuire allo sviluppo e alla progressione dello scompenso cardiaco indipendentemente dalla sua eziologia, essendo infatti il ruolo regolatorio del calcio nell'eccitazione/contrazione dei cardiomiociti di particolare importanza nella genesi dello scompenso cardiaco¹¹⁻¹⁵. Studi successivi hanno dimostrato un'associazione tra ridotti livelli di SERCA2a mRNA e bassi livelli di concentrazione sierica di SERCA2a e attività della Ca^{2+} -ATPasi, in particolare nella fase di transizione dall'ipertrofia compensata allo scompenso cardiaco, collegandoli ad una rapida e più severa progressione della malattia¹⁶.

Per il ruolo diretto nella genesi e progressione dello scompenso cardiaco, SERCA2a rappresenta quindi un potenziale target terapeutico. L'incremento dell'espressione di SERCA2a nei cardiomiociti umani di pazienti con cardiomiopatia dilatativa ad eziologia ischemica e non, ha determinato un incremento della contrazione e della velocità di rilascio delle miocellule¹⁷. Il trasferimento genico di SERCA2a in mo-

delli animali si è dimostrato efficace nel migliorare la funzione contrattile, senza conseguenze in termini di incremento di mortalità o di aritmie ventricolari maggiori¹⁸.

Inoltre in studi su animali l'iperespressione di SERCA2a attraverso trasferimento genico ha confermato le attese, dimostrando un effetto protettivo sulla funzione contrattile ventricolare sinistra e un miglioramento del rimodellamento ventricolare¹⁹. La via di somministrazione più facilmente attuabile e più sicura, seppur forse non la più efficiente, successivamente poi impiegata negli studi su pazienti, è quella intracoronarica senza interruzioni di flusso¹³.

Questi risultati hanno quindi portato alla realizzazione di un primo trial di fase 1 con l'obiettivo di ristabilire attraverso tecniche di trasferimento genico i livelli di SERCA2a in pazienti con scompenso cardiaco, utilizzando un vettore virale AAV1. Lo studio su 9 pazienti con frazione di eiezione severamente ridotta (frazione di eiezione media $22.2 \pm 4.5\%$) ha dimostrato un buon profilo di sicurezza di AAV1/SERCA2a²⁰. In accordo con questi dati è stato condotto uno studio di fase 2a, randomizzato in doppio cieco, che ha valutato gli effetti della somministrazione intracoronarica AAV1/SERCA2a vs placebo nei pazienti con scompenso cardiaco avanzato. 39 pazienti con scompenso cardiaco e classe NYHA III e IV hanno ricevuto infusione coronarica di placebo (14 pazienti) oppure

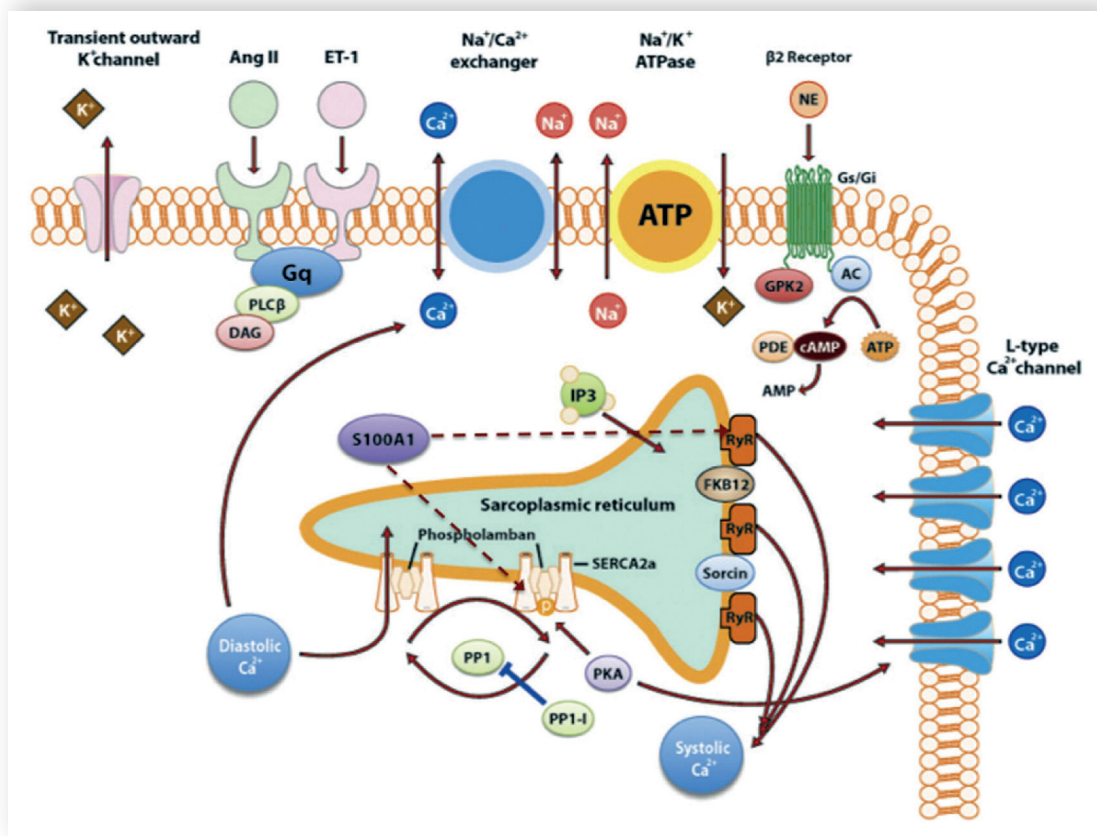


Figura 1. Immagine esemplificativa del processo fisiologico in cui è coinvolto SERCA2a, dei meccanismi molecolari nel processo di eccitazione-contrazione nei cardiomiociti e possibili target terapeutici per la terapia genica.

AC, adenilato ciclasti; AMP, adenosina monofosfato; Ang II, angiotensina II; ATP, adenosina trifosfato; cAMP, adenosina monofosfato ciclico; DAG diacilglicerolo; ET, endotelina; FKB12, FK506-binding protein 12.6; Gi, proteina G inibitoria; GRK2, G-protein-coupled receptor kinase 2; Gq, proteina Gq; Gs, proteina G stimolatoria; IP3, inositolo trifosfato; NE, noradrenalina; PDE, fosfodiesterasi; PKA, proteinchinasi A; PLC, fosfolipasi C; PLCB, fosfolipasi C-beta; PP1, proteina fosfatasi 1; PP1-I, inibitore della proteina fosfatasi; RyR, recettore della rianodina; SERCA2a, reticolo sarcoplasmatico Ca^{2+} -ATPase.

Riprodotta con permesso da Kawase et al.¹⁹.

bassa dose (6×10^{11} particelle vettoriali in 8 pazienti), media dose (3×10^{12} particelle vettoriali in 8 pazienti) o alta dose (1×10^{13} particelle vettoriali in 9 pazienti) di AAV1/SERCA2a. A 12 mesi di follow-up il trattamento si è associato ad un miglioramento in termini di sintomi, capacità funzionale, dimensioni ventricolari e livello di peptidi natriuretici, con un ottimo profilo di tollerabilità e sicurezza²¹. I risultati a 3 anni recentemente pubblicati hanno ulteriormente rafforzato i riscontri positivi, con una miglior prognosi per i pazienti trattati con terapia genica rispetto al placebo, in assenza di eventi avversi a lungo termine attribuibili alla terapia²².

Seppur su una casistica limitata, si è trattato indubbiamente di un risultato importante che ha generato estremo consenso, con conseguenti grandi aspettative nei confronti dello studio successivo, disegnato con numerosità e soprattutto ambizioni di alto profilo per un trial sulla terapia genica.

IL TRIAL CUPID 2

Lo studio CUPID 2 è un trial multicentrico di fase 2b, randomizzato a doppio cieco, condotto in 67 centri distribuiti tra Stati Uniti, Europa ed Israele, che ha indagato su più ampia scala il ruolo del trasferimento genico di SERCA2a in pazienti con scompenso cardiaco cronico e ridotta frazione di eiezione, rappresentando di fatto il primo reale studio randomizzato controllato di terapia genica nello scompenso cardiaco²³. I criteri di inclusione inizialmente comprendevano: età tra 18 e 80 anni, scompenso cardiaco cronico in classe NYHA II-IV secondario a cardiopatia ischemica e non, frazione di eiezione del ventricolo sinistro <35% e terapia medica ottimizzata da almeno 30 giorni, in assenza di terapia endovenosa nell'ultimo mese. Il ridotto numero di eventi ha poi reso necessario modificare il protocollo, includendo tra i requisiti elevati livelli del frammento N-terminale del pro-peptide natriuretico cerebrale (NT-proBNP) o un ricovero per scompenso cardiaco nei 6 mesi antecedenti. Tra i criteri di esclusione senza dubbio il più rilevante è la presenza di titoli anticorpali anti-AAV1 allo screening maggiori di 1:2. Di 1558 pazienti potenzialmente eleggibili, ben 921 sono stati esclusi perché anticorpi anti-AAV1 positivi. Alla fine del processo di screening, 250 pazienti sono stati arruolati e randomizzati a trattamento con infusione intracoronarica di 1×10^{13} AAV1/SERCA2a DNasi-resistenti (n=123) o placebo (n=127). I pazienti sono stati poi attivamente seguiti per un follow-up di almeno 1 anno. L'endpoint primario era definito da una nuova ospedalizzazione per scompenso cardiaco o necessità di visita ambulatoriale per peggioramento clinico (eventi recidivanti), mentre mortalità globale, trapianto cardiaco o supporto meccanico di assistenza ventricolare costituivano l'endpoint secondario (eventi terminali). Dal punto di vista della sicurezza, non vi è stata evidenza di potenziale pericolosità del trattamento. Tuttavia, ad un follow-up mediano di 17 mesi il tasso di eventi è risultato sovrapponibile sia per eventi recidivanti (74% nel gruppo placebo vs 63% nel gruppo trattamento, p=0.81) che per gli eventi terminali (17 vs 22%, p=0.41). Nessuna differenza rilevante è stata osservata anche nell'analisi per sottogruppi o nelle analisi esplorative per altri endpoint surrogati (cambiamenti di classe NYHA, test del cammino di 6 min, qualità di vita valutata tramite Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire e concentrazioni di NT-proBNP).

I POSSIBILI PERCHÉ DI UN (IN)ATTESO FALLIMENTO

Le grandi aspettative generate dai risultati dello studio embrionale CUPID 1 sono state quindi apparentemente disattese quando la posta in gioco è aumentata. È davvero tutto da buttare e gli iniziali risultati dello studio CUPID 1 vanno archiviati come puro frutto del caso? Oppure c'è modo di comprendere il perché di una simile conclusione? Nel ripercorrere punto per punto lo svolgimento dello studio vi sono tre aspetti da analizzare distintamente per provare ad ipotizzare le responsabilità di questo risultato negativo: 1) la popolazione dello studio, 2) la tecnica di trasferimento genico, 3) il target terapeutico.

Per quanto riguarda la popolazione dello studio, gli iniziali criteri di inclusione (scompenso cardiaco cronico in classe NYHA II-IV, frazione di eiezione <35%) potrebbero aver inizialmente portato ad arruolare una popolazione potenzialmente troppo poco compromessa quando si mira ad un impatto significativo su endpoint "hard". Infatti il protocollo è stato modificato in corsa per il ridotto numero di eventi, che comunque sono stati circa la metà di quelli osservati nel CUPID 1²¹. D'altro canto invece, se l'obiettivo della terapia genica fosse effettivamente quello di arrestare la naturale progressione di malattia fino anche ad invertirla, potrebbe paradossalmente essere necessario intervenire in fasi meno avanzate di essa in termini di selezione dei pazienti, guardando a diverse misure di efficacia (ad esempio la progressione della disfunzione ventricolare sinistra, livelli dei biomarcatori, performance funzionale sotto sforzo, ecc.) oppure prolungando la finestra temporale di osservazione per consentire la completa espressione dell'efficacia della terapia. In questo senso lo studio recentemente pubblicato su *JAMA Cardiology* da Hammond et al.²⁴ ha riportato un incremento significativo della frazione di eiezione ventricolare sinistra a 4 settimane dalla somministrazione intracoronarica di adenovirus 5 codificante per adenilato ciclasi. Infine, la popolazione era eterogenea, comprendendo sia la cardiopatia ischemica che non ischemica: l'effetto dell'eterogeneità sul risultato del trial non è chiaro.

Per quanto riguarda la tecnica di trasferimento genico, già semplicemente osservando la flow-chart di selezione dei pazienti del CUPID 2 ci si rende conto inoltre di come la terapia di per sé presenti dei limiti sostanziali fin dal principio. Se consideriamo che il numero di pazienti potenzialmente eleggibili, ma esclusi dallo studio poiché anticorpi anti-AAV1 positivi, era di 921 su 1558 candidati, rende una potenziale nuova terapia attuabile in non più del 30% della popolazione con scompenso cardiaco.

Altre possibili problematiche sono state proposte dagli stessi autori e sollevate da Donahue²⁵ nell'interessante editoriale di accompagnamento, relative alla tecnica di somministrazione e trasferimento genico. Il rilascio intracoronarico è semplice e pratico, e permette di raggiungere diffusamente il miocardio, ma risulta purtroppo scarsamente efficiente in termini di uptake del vettore e trasferimento genico. Nel miocardio dei pazienti del braccio trattamento e che sono deceduti o hanno necessitato di supporto meccanico o trapianto, infatti, il livello del vettore DNA era ai limiti inferiori della soglia della curva dose-risposta, probabilmente confermando che un numero limitato di miocardiociti esprimeva il gene veicolato SERCA2a.

Inoltre gli autori hanno identificato una differenza rilevante tra i pazienti del CUPID 1 e dello studio successivo, relativa alla proporzione di capsidi virali vuoti (non veicolanti cioè l'informazione genica), molto maggiore nello studio pilota. I

capsidi vuoti potrebbero fungere da "esca", limitando l'attività inibitoria degli anticorpi anti-AAV1 e migliorando così il trasferimento genico²³.

Infine, per quanto riguarda la scelta del target terapeutico, sebbene in modelli sperimentali il deficit di attività di SERCA2a è associato all'insufficienza ventricolare sinistra^{19,26}, non vi è certezza che esso rappresenti il target ideale nell'essere umano.

CONCLUSIONI

Lo studio CUPID 2 ha rappresentato un passo avanti per gli studi su terapia genica in ambito cardiovascolare in termini di dimensioni della popolazione, fattibilità della metodica e soprattutto sicurezza della stessa. I risultati negativi non dovrebbero essere fonte di abbandono, ma lo spunto da cui partire per comprendere quelli che sono gli attuali limiti e gli ambiti ancora avvolti da incertezza. Il futuro della terapia dello scompenso cardiaco e il desiderio di intervenire efficacemente sui meccanismi patogenetici dello stesso determinandone un'efficace regressione e non più semplicemente limitandone le manifestazioni cliniche, passa attraverso lo sviluppo e la crescita di simili strategie terapeutiche. Dati più confortanti ci giungono da piccoli studi paralleli su altri target genetici, come quello sopracitato condotto da Hammond et al.²⁴, mentre almeno altri due trial focalizzati su SERCA2a e con discreti presupposti sono in fase di realizzazione (SERCA-LVAD, NCT00534703 e AGENT-HF, NCT01966887). Non vi è dubbio tuttavia che ci sia ancora molta strada da fare a tutti i livelli, dalle tecniche di somministrazione, alle modalità di trasferimento ed espressione genica, per poter prima di tutto iden-

tificare definitivamente il modo di veicolare le informazioni geniche a tutti i miociti e a tutti i pazienti, così da creare il presupposto per l'effettivo funzionamento della terapia genica.

RIASSUNTO

Lo scompenso cardiaco è ancora oggi un'importante causa di morbilità e mortalità in tutto il mondo. La terapia genica dei meccanismi implicati nello scompenso cardiaco è emersa sin dagli anni '90 come potenziale target terapeutico incoraggiando studi preclinici su piccoli e poi più grandi modelli animali. Le prime esperienze in letteratura hanno documentato una ridotta espressione del reticolo sarcoplasmatico/endoplasmatico Ca²⁺-ATPasi2a (SERCA2a) nello scompenso cardiaco. Questi risultati hanno portato allo sviluppo di trial clinici sul trasferimento genico di SERCA2a. I primi risultati positivi in termini di fattibilità, sicurezza ed endpoint clinici hanno aperto la strada al primo grande trial randomizzato, il CUPID, su pazienti con scompenso cardiaco e frazione di eiezione ridotta in cui sono stati arruolati 250 pazienti a infusione intracoronarica di virus adeno-associati di tipo 1 (AAV1)/SERCA2a o placebo. Le grandi aspettative riposte sono state disattese e non si è osservato alcun miglioramento in termini di outcome nei pazienti trattati. In questa revisione abbiamo rivisitato i precedenti lavori che hanno portato al disegno di questo trial, analizzato le sue principali caratteristiche e risultati, fornendo infine alcune ipotesi sul motivo di un fallimento parzialmente inatteso in modo da comprendere quali possano essere le future prospettive per la terapia genica nello scompenso cardiaco.

Parole chiave. Scompenso cardiaco; Terapia genica; Virus adeno-associati.

BIBLIOGRAFIA

1. Schocken DD, Benjamin EJ, Fonarow GC, et al. Prevention of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and High Blood Pressure Research; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 2008;117:2544-65.
2. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2016;37:2129-200.
3. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, et al.; PARADIGM-HF Investigators. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med* 2014;371:993-1004.
4. Kay MA. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet* 2011;12:316-28.
5. Tilemann L, Ishikawa K, Weber T, Hajjar RJ. Gene therapy for heart failure. *Circ Res* 2012;110:777-93.
6. Rincon MY, VandenDriessche T, Chuah MK. Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovasc Res* 2015;108:4-20.
7. Petrus I, Chuah M, VandenDriessche T. Gene therapy strategies for hemophilia: benefits versus risks. *J Gene Med* 2010;12:797-809.
8. Schneider CK, SalmiKangas P, Jilma B, et al.; Committee for Advanced Therapies (CAT); CAT Scientific Secretariat. Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:195-201.
9. Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* 2011;12:341-55.
10. Vandendriessche T, Thorrez L, Acosta-Sanchez A, et al. Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy. *J Thromb Haemost* 2007;5:16-24.
11. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, et al. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 1994;75:434-42.
12. Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:951-69.
13. Hayward C, Patel H, Lyon A. Gene therapy in heart failure. SERCA2a as a therapeutic target. *Circ J* 2014;78:2577-87.
14. Kho C, Lee A, Hajjar RJ. Altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling--targets for heart failure therapy. *Nat Rev Cardiol* 2012;9:717-33.
15. Eisner D, Caldwell J, Trafford A. Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase and heart failure 20 years later. *Circ Res* 2013;113:958-61.
16. Gwathmey JK, Yerevanian A, Hajjar RJ. Targeting sarcoplasmic reticulum calcium ATPase by gene therapy. *Hum Gene Ther* 2013;24:937-47.
17. del Monte F, Harding SE, Schmidt U, et al. Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation* 1999;100:2308-11.
18. del Monte F, Lebeche D, Guerrero JL, et al. Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:5622-7.
19. Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, et al. Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene

transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1112-9.

20. Jaski BE, Jessup ML, Mancini DM, et al.; Calcium Up-Regulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID) Trial Investigators. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J Card Fail* 2009;15:171-81.

21. Jessup M, Greenberg B, Mancini D, et al.; Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID) Investigators. Calcium Upregulation by Percutaneous

Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* 2011;124:304-13.

22. Zsebo K, Yaroshinsky A, Rudy JJ, et al. Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circ Res* 2014;114:101-8.

23. Greenberg B, Butler J, Felker GM, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a

randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet* 2016;387:1178-86.

24. Hammond H, Penny, WF, Traverse JH. Intracoronary gene transfer of adenylyl cyclase 6 in patients with heart failure. *JAMA Cardiol* 2016;1:163-71.

25. Donahue JK. Cardiac gene therapy: a call for basic methods development. *Lancet* 2016;387:1137-9.

26. Byrne MJ, Power JM, Prevolos A, Mariani JA, Hajjar RJ, Kaye DM. Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals. *Gene Ther* 2008;15:1550-7.