

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 985 822**

(51) Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2017 PCT/US2017/027630**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017 WO17181011**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2017 E 17783232 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024 EP 3442601**

(54) Título: **Administración de microrna-29 mediante vectores de virus adeno-asociados para el tratamiento de la distrofia muscular**

(30) Prioridad:

**15.04.2016 US 201662323163 P
17.03.2017 US 201762473253 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2024

(73) Titular/es:

**RESEARCH INSTITUTE AT
NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL (100.0%)
700 Children's Drive, Room W172,
Columbus, Ohio 43205, US**

(72) Inventor/es:

**RODINO-KLAPAC, LOUISE;
MENDELL, JERRY, R. y
HELLER, KRISTIN, N.**

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

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

ES 2 985 822 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Administración de microrna-29 mediante vectores de virus adeno-asociados para el tratamiento de la distrofia muscular

- 5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**
- 10 La presente invención proporciona vectores de terapia génica, tales como vectores de virus adeno-asociados (AAV), que expresan el microARN miR-29 y su uso en un método para reducir y prevenir la fibrosis en sujetos que sufren distrofia muscular y para proteger las fibras musculares de lesiones, aumentar la fuerza muscular.

ANTECEDENTES

15 La importancia de la masa y la fuerza musculares para las actividades diarias, tales como la locomoción y respiración, y para el metabolismo de todo el cuerpo, es inequívoca. Los déficits en la función muscular producen distrofias musculares (MD) que se caracterizan por debilidad y atrofia muscular y tienen graves impactos sobre la calidad de vida. Las MD mejor caracterizadas resultan de mutaciones en genes que codifican miembros del complejo proteico asociado a distrofina (DAPC). Estas MD resultan de la fragilidad de la membrana asociada con la pérdida de la unión entre el sarcolema y el citoesqueleto por el DAPC. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una de las enfermedades musculares más devastadoras que afecta a 1 de cada 5000 varones recién nacidos.

20 La presente solicitud incluye dos enfoques traslacionales para desarrollar un tratamiento para la DMD. La infiltración fibrótica es profunda en la DMD y es un impedimento significativo para cualquier terapia potencial. También es importante tener en cuenta que la sustitución genética por sí sola se ve obstaculizada por la gravedad de la fibrosis, ya presente en niños muy pequeños con DMD. De hecho, las biopsias musculares a la edad habitual de diagnóstico, entre los 4 y 5 años, muestran niveles muy significativos de fibrosis.

25 La DMD está provocada por mutaciones en el gen de DMD que conducen a reducciones en el ARNm y a la ausencia de distrofina, una proteína del sarcolema de 427 kD asociada con el complejo proteico asociado a distrofina (DAPC) (Hoffman et al., Cell 51(6):919-28, 1987). El DAPC se compone de múltiples proteínas en el sarcolema muscular que forman un vínculo estructural entre la matriz extracelular (ECM) y el citoesqueleto por medio de la distrofina, una proteína de unión a actina, y alfa-distroglicano, una proteína de unión a laminina. Estos vínculos estructurales actúan estabilizando la membrana de células musculares durante la contracción y protegiendo frente al daño inducido por la contracción. Con la pérdida de la distrofina, la fragilidad de la membrana da como resultado desgarros en el sarcolema y un flujo de entrada de calcio, desencadenando proteasas activadas por calcio y necrosis de fibras segmentarias (Straub et al., Curr Opin. Neurol. 10(2): 168-75, 1997). Este ciclo descontrolado de degeneración y regeneración muscular agota en última instancia la población de células madre musculares (Sacco et al., Cell, 2010. 143(7): págs. 1059-71; Wallace et al., Annu Rev Physiol, 2009. 71: p. 37-57), dando como resultado debilidad muscular progresiva, inflamación del endomisio y cicatrización fibrótica.

30 Sin la estabilización de membrana de la distrofina o una micro-distrofina, la DMD manifestará ciclos incontrolados de lesión y reparación de tejido y finalmente reemplazará las fibras musculares perdidas con tejido cicatrizal fibrótico a través de la proliferación de tejido conectivo. La fibrosis se caracteriza por depósitos excesivos de proteínas de la matriz de ECM, incluidos colágeno y elastina. Las proteínas de la ECM se producen principalmente a partir de citocinas tales como TGFβ que liberan fibroblastos activados en respuesta al estrés y la inflamación. Aunque la característica patológica primaria de la DMD es la degeneración y necrosis de miofibras, la fibrosis como consecuencia patológica tiene las mismas repercusiones. La sobreproducción de tejido fibrótico restringe la regeneración muscular y contribuye a la debilidad muscular progresiva en el paciente con DMD. En un estudio, la presencia de fibrosis en las biopsias musculares iniciales de DMD estaba altamente correlacionada con un mal resultado motor en un seguimiento de 10 años (Desguerre et al., J Neuropathol Exp Neurol, 2009. 68(7): p. 762-7). Estos resultados apuntan a la fibrosis como uno de los principales factores que contribuyen a la disfunción muscular de la DMD y subrayan la necesidad de desarrollar terapias que reduzcan el tejido fibrótico. La mayoría de las terapias antifibróticas que se han probado en ratones mdx actúan bloqueando la señalización de citoquinas fibróticas mediante la inhibición de la vía del TGFβ. Los microARN (miARN) son ARN monocatenarios de ~22 nucleótidos que median en el silenciamiento génico a nivel post-transcripcional emparejándose con bases dentro del 3' UTR del ARNm, inhibiendo la traducción o promoviendo la degradación del ARNm. Una secuencia semilla de 7 bp en el extremo 5' del miARN sirve de diana al miARN; el resto de la secuencia diana, así como su estructura secundaria, proporcionan un reconocimiento adicional. Los miARN desempeñan un papel importante en la patología de las enfermedades musculares y presentan perfiles de expresión que dependen exclusivamente del tipo de distrofia muscular de que se trate (Eisenberg et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2007. 104(43): p. 17016-21). Cada vez hay más pruebas de que los miARN intervienen en el proceso fibrótico de muchos órganos, incluidos el corazón, el hígado, el riñón y el pulmón (Jiang et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(43): p. 17016-21). Recientemente, se ha demostrado que la regulación a la baja de miR-29 contribuye a la fibrosis cardiaca (Caccharelli et al., Cell Metab, 2010. 12(4): p. 341-51) y la expresión reducida de miR-29 se relacionó genéticamente con los músculos de pacientes humanos con DMD (Eisenberg et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2007. 104(43): p. 17016-2). La familia miR-29 consiste en tres miembros que se expresan a partir de dos grupos de

miARN bicistrónicos. MiR-29a se coexpresa con miR-29b (miR-29b-1); miR-29c se coexpresa con una segunda copia de miR-29b (miR-29b-2). La familia miR-29 comparte una secuencia semilla conservada y miR-29a y miR-29b difieren cada uno en sólo una base de miR-29c. Además, la electroporación del plásmido miR-29 (un clúster de miR-29a y miR-29b-1) en el músculo de ratones mdx redujo los niveles de expresión de los componentes de la ECM, colágeno y elastina, y disminuyó fuertemente la deposición de colágeno en secciones musculares en los 25 días posteriores al tratamiento (Cacchiarelli et al., Cell Metab, 2010. 12(4): p. 341-51).

El virus adenoasociado (AAV) es un parvovirus de replicación deficiente, cuyo genoma de ADN monocatenario tiene aproximadamente 4,7 kb de longitud, incluidas repeticiones terminales invertidas (ITR) de 145 nucleótidos.

Hay múltiples serotipos de AAV. Las secuencias de nucleótidos de los genomas de los serotipos de AAV se conocen. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del genoma de AAV serotipo 2 (AAV2) se presenta en Srivastava et al., J Virol, 45: 555-564 (1983) corregida por Ruffing et al., J Gen Virol, 75: 3385-3392 (1994). Como otros ejemplos, se proporciona el genoma completo de AAV-1 en el n.º de registro de GenBank NC_002077; se proporciona el genoma completo de AAV-3 en el n.º de registro de GenBank NC_1829; se proporciona el genoma completo de AAV-4 en el n.º de registro de GenBank NC_001829; se proporciona el genoma de AAV-5 en el n.º de registro de GenBank AF085716; se proporciona el genoma completo de AAV-6 en el n.º de registro de GenBank NC_001862; se proporcionan al menos porciones de los genomas de AAV-7 y AAV-8 en los n.º de registro de GenBank AX753246 y AX753249, respectivamente (véanse también las patentes estadounidenses n.º 7.282.199 y 7.790.449 que se refieren a AAV-8); se proporciona el genoma de AAV-9 en Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004); el genoma del AAV-10 se proporciona en Mol. Ther, 13(1): 67-76 (2006); y se proporciona el genoma de AAV-11 en Virology, 330(2): 375-383 (2004). El serotipo AAVrh74 se describe en Rodino-Klapac et al. J. Trans. Med. 5: 45 (2007). Dentro de las ITR, están contenidas secuencias de actuación en cis que dirigen la replicación (rep) del ADN viral, la encapsidación/empaquetamiento y la integración en el cromosoma de la célula huésped.

Tres promotores de AAV (denominados p5, p19 y p40 por sus ubicaciones relativas en el mapa) dirigen la expresión de los dos marcos de lectura abiertos internos de AAV que codifican los genes rep y cap. Los dos promotores rep (p5 y p 19), junto con el empalme diferencial del intrón único de AAV (por ejemplo, en los nucleótidos 2107 y 2227 de AAV2), dan lugar a la producción de cuatro proteínas rep (rep 78, rep 68, rep 52 y rep 40) a partir del gen rep. Las proteínas rep poseen múltiples propiedades enzimáticas que son responsables en última instancia de la replicación del genoma viral. El gen cap se expresa a partir del promotor p40 y codifica las tres proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. El corte y empalme alternativo y sitios de inicio de la traducción no consenso son responsables de la producción de las tres proteínas de la cápside relacionadas. Un único sitio de poliadenilación consenso está ubicado en la posición 95 del mapa del genoma de AAV. El ciclo de vida y la genética de AAV se revisan en Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992).

El AAV posee características únicas que lo hacen atractivo como vector para suministrar ADN foráneo a células, por ejemplo, en terapia génica. La infección por AAV de células de cultivo no es citopática, y la infección natural de humanos y otros animales es silenciosa y asintomática. Además, AAV infecta a muchas células de mamífero, lo que permite la posibilidad de seleccionar como diana muchos tejidos diferentes *in vivo*. Además, el AAV transduce células que se dividen lentamente y que no se dividen, y puede persistir esencialmente durante la vida útil de esas células como un episoma nuclear transcripcionalmente activo (elemento extracromosómico). El genoma proviral de AAV es infeccioso como ADN clonado en plásmidos, lo que hace viable la construcción de genomas recombinantes. Además, debido a que las señales que dirigen la replicación de AAV, la encapsidación del genoma y la integración están contenidas dentro de las ITR del genoma de AAV, parte o la totalidad de los aproximadamente 4,3 kb internos del genoma (que codifican proteínas de replicación y estructurales de la cápside, rep-cap) pueden reemplazarse por ADN foráneo tal como un casete génico que contiene un promotor, un ADN de interés y una señal de poliadenilación. Las proteínas rep y cap pueden proporcionarse en *trans*. Otra característica significativa del AAV es que es un virus extremadamente estable y abundante. Soporta fácilmente las condiciones usadas para inactivar el adenovirus (56 a 65 °C por varias horas), lo que hace menos crítica la conservación en frío del AAV. El AAV incluso se puede liofilizar. Finalmente, las células infectadas con AAV no son resistentes a la superinfección.

Múltiples estudios han demostrado expresión de proteínas mediada por AAV recombinante a largo plazo (> 1,5 años) en el músculo. Ver, Clark et al., Hum Gene Ther, 8: 659-669 (1997); Kessler et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93: 14082-14087 (1996); y Xiao et al., J Virol, 70: 8098-8108 (1996). Ver también, Chao et al., Mol Ther, 2:619-623 (2000) y Chao et al., Mol Ther, 4:217-222 (2001). Además, debido a que el músculo está sumamente vascularizado, la transducción de AAV recombinante ha resultado en la aparición de productos transgénicos en la circulación sistémica después de la inyección intramuscular como se describe en Herzog et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 5804-5809 (1997) y Murphy et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 13921-13926 (1997). Además, Lewis et al., J Virol, 76: 8769-8775 (2002) demostraron que las miofibras esqueléticas poseen los factores celulares necesarios para una correcta glicosilación, plegamiento y secreción de anticuerpos, lo que indica que el músculo es capaz de una expresión estable de productos terapéuticos proteicos secretados.

La mejora funcional de los pacientes que padecen DMD y otras distrofias musculares requiere tanto la restauración del gen como la reducción de la fibrosis. Se necesitan métodos de reducción de la fibrosis que puedan combinarse con métodos de restauración génica para lograr tratamientos más eficaces de la DMD y otras distrofias musculares. miR29 es un regulador génico potencial y un candidato ideal para reducir la fibrosis muscular.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

- La presente invención proporciona un vector AAV recombinante para expresar miR-29, en el que el vector comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2. La presente invención también proporciona un vector AAV recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO : 1.
- 5 La presente invención también proporciona una composición que comprende el vector AAV recombinante de la invención.
- 10 La presente invención también proporciona el vector AAV recombinante o la composición de la invención para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular. La presente invención también proporciona el vector AAV recombinante o la composición de la invención para su uso en la reducción o prevención de la fibrosis en un sujeto que padece distrofia muscular. La presente invención también proporciona el vector AAV recombinante o la composición de la invención para su uso en el aumento de la fuerza muscular en un sujeto que sufre de distrofia muscular.
- 15 La presente invención también proporciona un método in vitro para producir una secuencia polinucleotídica miR-29 madura que comprende infectar una célula huésped con un vector AAV recombinante de la invención y expresar un polinucleotido miR-29 maduro en la célula huésped.
- 20 La terapia génica puede reducir directamente los tres componentes primarios del tejido conjuntivo (colágeno 1, colágeno 3 y fibronectina) mediante la administración del microARN miR29. En este sistema, el miR29 se une a la UTR 3' del gen del colágeno y la fibronectina para regular a la baja su expresión.
- 25 Terapias de combinación y enfoques para reducir y evitar la fibrosis usando los vectores de terapia génica pueden entregar miR-29 para suprimir la fibrosis junto con micro-distrofina para tratar el defecto génico observado en DMD. Como se muestra en los Ejemplos 5-7, el tratamiento combinado produjo una mayor reducción de la fibrosis, un aumento del tamaño muscular y un aumento de la fuerza muscular.
- 30 Un rAAV ejemplar de la presente invención es el pAAV.CMV.Mir29C que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1; en el que el promotor CMV abarca los nucleótidos 120-526, un intrón EF1a abarca los nucleótidos 927-1087 y 1380-1854, el soporte guía de miR-29c abarca el nucleótido 1257-1284 y el ARNhc-miR29-c con secuencia semilla primaria abarca los nucleótidos 1088-1375, y la secuencia poli A abarca los nucleótidos 1896-2091. En un aspecto, los vectores rAAV de la presente invención son AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh.74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 o AAV13.
- 35 Otro rAAV ejemplar de la presente invención es el pAAV.MCK.Mir29C que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 12; en el que el potenciador MCK abarca los nucleótidos 190-395, el promotor MHC abarca los nucleótidos 396-753, un intrón EF1a abarca los nucleótidos 1155-1315 y 1609-2083, el soporte guía de miR-29c abarca los nucleótidos 1487-1512 y el shARN-miR29-c con secuencia semilla primaria abarca los nucleótidos 1316-1608, y la secuencia poli A abarca los nucleótidos 2094-2146. En un aspecto, los vectores rAAV de la presente invención son AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh.74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 o AAV13.
- 40 En otro aspecto, los vectores rAAV de la presente invención pueden vincularse operablemente a un elemento de control específico del músculo o a un promotor ubicuo, tales como el promotor del citomegalovirus (CMV). Por ejemplo, el elemento de control específico del músculo es el elemento del gen de la actina esquelética humana, el elemento del gen de la actina cardíaca, el factor de unión potenciador específico del miocito MEF, la creatina cinasa muscular (MCK), la tMCK (MCK truncada), la cadena pesada de miosina (MHC), la MHCK7 (una versión híbrida de MHC y MCK), C5-12 (un promotor sintético), el elemento potenciador de la creatina cinasa murina, el elemento genético de la troponina C esquelética de contracción rápida, el elemento genético de la troponina C cardíaca de contracción lenta, el elemento genético de la troponina I de contracción lenta, factores nucleares inducibles por hipozia, el elemento inducible por esteroides o elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE); (por sus siglas en inglés, respectivamente).
- 45 Por ejemplo, cualquiera de los vectores rAAV de la presente invención está unido de forma operable al elemento de control específico del músculo que comprende la secuencia de nucleótidos potenciadores del MHC de SEQ ID NO: 10 y/o la secuencia promotora del CMH de SEQ ID NO: 11. Además, cualquiera de los vectores rAAV de la invención está unido de forma operable al elemento de control específico del músculo que comprende la secuencia nucleotídica potenciadora de MHCK7 de SEQ ID NO: 13.
- 50 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas (o algunas veces denominadas en el presente documento simplemente "composiciones") que comprenden cualquiera de los vectores de rAAV de la invención.
- 55 La invención también proporciona partículas virales que comprenden cualquiera de los vectores de AAV recombinantes de la invención. La invención también proporciona métodos in vitro para producir una secuencia de
- 60
- 65

nucleótidos de miR-29 maduro que comprenden infectar una célula huésped con un vector AAV recombinante que expresa miR-29 de la invención y expresar un miR-29 maduro en la célula huésped.

En otra realización, la invención proporciona el vector AAV recombinante o la composición de la invención para su uso en métodos de reducción de la fibrosis en un sujeto que padece distrofia muscular. Por ejemplo, cualquiera de los rAAV de la presente invención se administra a sujetos que padecen distrofia muscular para reducir la fibrosis, y en particular reduce la fibrosis en el músculo esquelético o en el músculo cardíaco del sujeto. Estos métodos pueden comprender además el paso de administrar un rAAV que expresa micro-distrofina.

Para cualquiera de las composiciones y usos de la presente invención, el término «distrofia muscular» puede ser distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular asociada a la disferlina, distrofia muscular de cinturas de extremidades incluyendo distrofia muscular de cinturas de extremidades tipo 2L o miopatía de Miyoshi tipo 3, miopatía de Bethlem, calpainopatía, miopatía desmina, disferlinopatía, distrofinopatía, miopatía miofibrilar, sarcoglicanopatía, distrofia muscular congénita, miopatía tibial anterior, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia miotónica, distrofia muscular oculofaríngea o miopatía relacionada con ZASP.

"Fibrosis" se refiere al depósito excesivo o no regulado de componentes de la matriz extracelular (ECM) y a procesos de reparación anormales en tejidos tras una lesión, incluyendo músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, pulmón, riñón y páncreas. Los componentes de la ECM que se depositan incluyen fibronectina y colágeno, por ejemplo colágeno 1, colágeno 2 o colágeno 3.

En otra realización, la invención proporciona el vector AAV recombinante o la composición de la invención para su uso en métodos de prevención de la fibrosis en un sujeto que padece distrofia muscular. Por ejemplo, cualquiera de los rAAV de la presente invención se administra a sujetos que padecen distrofia muscular para evitar la fibrosis, por ejemplo, los rAAV de la invención que expresan miR-29 se administran antes de que se observe fibrosis en el sujeto. Además, los rAAV de la presente invención que expresan miR-29 se administran a un sujeto en riesgo de desarrollar fibrosis, tales como aquellos que padecen o han sido diagnosticados con distrofinopatía o distrofia muscular, por ejemplo DMD, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina. Los rAAV de la presente invención se administran al sujeto que padece distrofia muscular para evitar una nueva fibrosis en estos sujetos. Estos métodos pueden comprender además el paso de administrar un rAAV que expresa micro-distrofina.

La invención también prevé el vector AAV recombinante o la composición de la invención para su uso en métodos de aumento de la fuerza muscular en un sujeto que padece distrofia muscular. Estos métodos pueden comprender además el paso de administrar un rAAV que expresa micro-distrofina.

Los términos "terapia de combinación" y "tratamiento de combinación" se refieren a la administración de un vector rAAV de la presente invención que expresa miR-29 y un vector rAAV que expresa micro-distrofina.

El sujeto puede padecer una distrofinopatía o distrofia muscular como DMD, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a la distrofina.

Cualquiera de los métodos anteriores puede comprender un paso adicional de administrar un rAAV que expresa micro-distrofina. La proteína micro-distrofina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. Los métodos pueden comprender el paso de administrar un rAAV que comprende la secuencia codificante para el gen de la micro-distrofina (SEQ ID NO: 7) o que comprenda una secuencia de nucleótidos que sea idéntica en al menos un 85 % a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.

Un rAAV exemplar que expresa micro-distrofina es el pAAV.mck.micro-distrofina que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9 y se muestra en las figuras 10 y 11. Este vector rAAV comprende el promotor MCK, una secuencia de intrón quimérico, la secuencia de codificación para el gen de la micro-distrofina, poli A, resistencia a la ampicilina y la espina dorsal del plásmido pGEX con origen de replicación pBR322. En un aspecto, los vectores AAV recombinantes de la presente invención son AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh.74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 o AAV13.

Los métodos pueden ser llevados a cabo con vectores rAAV que codifican la proteína micro-distrofina que es, por ejemplo, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, u 89 %, más típicamente al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 % y aún más típicamente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 8, en el que la proteína retiene la actividad de micro-distrofina. La proteína microdistrofina proporciona estabilidad a la membrana muscular durante la contracción muscular, por ejemplo la microdistrofina actúa como amortiguador durante la contracción muscular.

Los métodos pueden llevarse a cabo con vectores rAAV que expresan la micro-distrofina que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, u 89 %, más típicamente al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, o 94 % y aún

más típicamente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 7, y codifica una micro-distrofina funcional.

Los métodos pueden llevarse a cabo con vectores rAAV que expresan la micro-distrofina que comprende una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones estrictas a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NOS: 7, o sus cumplidos, y codifica una micro-distrofina funcional.

El término "riguroso" se usa para referirse a las condiciones que se entienden comúnmente en la técnica como rigurosas. La rigurosidad de la hibridación se determina principalmente por la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturalizantes tales como formamida. Los ejemplos de condiciones rigurosas para la hibridación y el lavado son cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a 65-68 °C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 50 % a 42 °C. Ver Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. de catálogo 1989). También se pueden usar condiciones más rigurosas (tales como temperatura más alta, fuerza iónica más baja, formamida más alta u otro agente desnaturalizante), sin embargo, la tasa de hibridación se verá afectada. En los casos en que se trate de la hibridación de desoxioligonucleótidos, otras condiciones de hibridación estrictas ejemplares incluyen el lavado en 6× SSC 0,05 % de pirofosfato sódico a 37 °C (para oligos de 14 bases), 48 °C (para oligos de 17 bases), 55 °C (para oligos de 20 bases) y 60 °C (para oligos de 23 bases).

Se pueden incluir otros agentes en los amortiguadores de hibridación y lavado para el fin de reducir la hibridación no específica y/o de fondo. Los ejemplos son albúmina sérica bovina al 0,1 %, polivinilpirrolidona al 0,1 %, pirofosfato de sodio al 0,1 %, dodecilsulfato de sodio al 0,1 %, NaDODSO₄ (SDS, por sus siglas en inglés), ficoll, solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (u otro ADN no complementario) y sulfato de dextrano, aunque también se pueden usar otros agentes adecuados. La concentración y los tipos de estos aditivos se pueden cambiar sin afectar sustancialmente la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Habitualmente se llevan a cabo experimentos de hibridación a pH 6,8-7,4, sin embargo, en condiciones de fuerza iónica típicas, la tasa de hibridación es casi independiente del pH. Ver Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, Inglaterra). Las condiciones de hibridación puede ajustarlas un experto en la técnica con el fin de adaptarse a estas variables y permiten que los ADN de diferente relación de secuencia formen híbridos.

Los vectores rAAV que expresan micro-distrofina pueden comprender la secuencia codificante del gen de la micro-distrofina operablemente unido a un elemento de control músculo-específico. Por ejemplo, el elemento de control específico del músculo es el elemento del gen de la actina esquelética humana, el elemento del gen de la actina cardíaca, el factor de unión del potenciador específico del miocito MEF, la creatina quinasa muscular (MCK), la tMCK (MCK truncada), la cadena pesada de miosina (MHC), el C5-12 (promotor sintético), elemento potenciador de la creatincinasa murina, elemento génico de la troponina C esquelética de contracción rápida, elemento génico de la troponina C cardiaca de contracción lenta, elemento génico de la troponina I de contracción lenta, factores nucleares inducibles por hipozia, elemento inducible por esteroides o elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE).

En los métodos de administrar un vector rAAV que expresa miR-29 y un vector rAAV que expresa micro-distrofina, estos vectores rAAV pueden ser administrados concurrentemente, o administrados consecutivamente con el vector rAAV que expresa miR29 administrado inmediatamente antes del rAAV que expresa micro-distrofina, o administrado consecutivamente con el vector rAAV que expresa miR29 es administrado inmediatamente después del rAAV que expresa micro-distrofina. Alternativamente, los métodos pueden ser llevados a cabo en el que el vector AAV que expresa micro-distrofina es administrado dentro de aproximadamente 1-5 horas o 5-12 horas o 12 a 15 horas o 15 a 24 horas después de administrar el rAAV que expresa miR-29 o los métodos pueden ser llevados a cabo en el que el vector AAV que expresa micro-distrofina es administrado dentro de aproximadamente 1-5 horas o 5-12 horas o 12 a 15 horas o 15 a 24 horas antes de administrar el rAAV que expresa miR-29. Alternativamente, los métodos pueden ser llevados a cabo en el que el vector AAV que expresa micro-distrofina es administrado dentro de aproximadamente 1 o 6 o 12 o 24 horas después de administrar el rAAV que expresa miR-29 o los métodos pueden ser llevados a cabo en el que el vector AAV que expresa micro-distrofina es administrado dentro de aproximadamente 1 o 6 o 12 o 24 horas antes de administrar el rAAV que expresa miR-29.

Los vectores AAV de la presente invención pueden ser administrados a pacientes diagnosticados con distrofinopatía o distrofia muscular tales como DMD, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina antes de que se observe fibrosis en el sujeto o antes de que la fuerza muscular se haya reducido en el sujeto o antes de que la masa muscular se haya reducido en el sujeto.

El rAAV de la presente invención puede ser administrado a un sujeto que sufre de distrofinopatía o distrofia muscular, tales como DMD, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina que ya ha desarrollado fibrosis, con el fin de evitar nueva fibrosis en estos sujetos. El rAAV de la presente invención puede administrarse al paciente que padece distrofia muscular y que ya tiene una fuerza muscular reducida o una masa muscular reducida, con el fin de proteger el músculo de nuevas lesiones.

El vector rAAV puede administrarse mediante inyección intramuscular o intravenosa.

El vector rAAV o su composición pueden administrarse por vía sistémica. Por ejemplo, el vector o composición de rAAV se administra por vía parenteral mediante inyección, infusión o implantación.

En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende los vectores rAAV de la invención que expresan miR29 para su uso en la reducción de la fibrosis en un sujeto que padece distrofia muscular. En algunas realizaciones, esta composición también comprende un vector rAAV que expresa micro-distrofina. Por ejemplo, esta composición comprende un rAAV que comprende la secuencia codificante para el gen de la micro-distrofina (SEQ ID NO: 7) o comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos un 85 % a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.

Además, la presente invención proporciona composiciones que comprenden los vectores AAV recombinantes de la invención que expresan miR29 para su uso en la prevención de la fibrosis en un paciente que sufre de distrofia muscular tales como DMD, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina. En algunas realizaciones, esta composición también comprende un vector rAAV que expresa micro-distrofina. Por ejemplo, esta composición comprende un rAAV que comprende la secuencia codificante para el gen de la micro-distrofina (SEQ ID NO: 7) o puede comprender una secuencia de nucleótidos que sea al menos un 85 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.

La invención también proporciona composiciones que comprenden los vectores rAAV de la invención que expresan miR29 para su uso en el aumento de la fuerza muscular en un sujeto que sufre de distrofia muscular, tales como DMD, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina. En algunas realizaciones, esta composición también comprende un vector rAAV que expresa micro-distrofina. Por ejemplo, esta composición comprende un vector rAAV que comprende la secuencia codificante para el gen de la micro-distrofina (SEQ ID NO: 7) o comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos un 85 % a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones que comprenden los vectores rAAV de la invención que expresan miR29 para su uso en el tratamiento de distrofinopatías musculares, tales como DMD, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina. En algunas realizaciones, esta composición también comprende un vector rAAV que expresa micro-distrofina. Por ejemplo, esta composición comprende un vector rAAV que comprende la secuencia codificante para el gen de la micro-distrofina (SEQ ID NO: 7) o comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos un 85 % a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.

Las composiciones de la invención están formuladas para inyección intramuscular o inyección intravenosa. La composición de la presente invención también está formulada para la administración sistémica, tales como la administración parenteral por inyección, infusión o implantación. Además, cualquiera de las composiciones están formuladas para la administración a un sujeto que sufre de distrofinopatía o distrofia muscular tales como DMD, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina.

En cualquiera de los usos, el medicamento puede formularse para inyección intramuscular. Además, cualquiera de los medicamentos puede prepararse para su administración a un sujeto que padezca distrofinopatía muscular, tales como DMD, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina.

Además, cualquiera de los medicamentos puede ser una terapia de combinación en la cual los vectores rAAV que expresan miR-29 y los vectores rAAV que expresan micro-distrofina son administrados concurrentemente, o administrados consecutivamente con el vector rAAV que expresa miR29 administrado inmediatamente antes del rAAV que expresa micro-distrofina, o administrado consecutivamente con el vector rAAV que expresa miR29 administrado inmediatamente después del rAAV que expresa micro-distrofina. Alternativamente, el medicamento comprende la administración del vector AAV que expresa micro-distrofina administrado dentro de aproximadamente 1-5 horas después de administrar el rAAV que expresa miR-29 o el medicamento comprende el vector AAV que expresa micro-distrofina administrado dentro de aproximadamente 1-5 horas antes de administrar el rAAV que expresa miR-29.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

La **Figura 1** muestra un esquema del vector rAAV scAAVChr.74.CMV.miR29c y la secuencia de nucleótidos del miR-29c en una espina dorsal natural de miR-30 y la secuencia de nucleótidos de la estructura de horquilla predicha.

La **Figura 2A-CD** ilustra que la inyección de miR-29c en el músculo reduce el colágeno en todo el músculo y restaura la expresión de miR-29c.

La **Figura 3A-3C** demuestra que la inyección de miR-29c mejora la fuerza muscular absoluta (panel A) y la fuerza muscular específica (panel B), pero no protege contra el daño inducido por la contracción (panel C).

5 La **Figura 4A-4C** muestra el número de fibras musculares con expresión de micro-distrofina para medir la eficacia de la entrega del transgen.

10 La **Figura 5A-5C** demuestra que la co-entrega de miR-29c con micro-distrofina reduce la expresión de colágeno (panel A) y la expresión de distrofina inducida por fibrosis.

15 La **Figura 6A-6D** ilustra que la inyección intramuscular de miR-29c /micro-distrofina inhibe la matriz extracelular (ECM) en ratones mdx/utrn^{+/−} medida por colágeno 1 alfa (panel A), colágeno 3 alfa (panel B), fibronectina (panel C) y TGF-β (panel D).

20 La **Figura 7A-7C** demuestra que la inyección intramuscular de miR-29c aumentó la fuerza absoluta (panel A), normalizó la fuerza específica (panel B) y añadió protección frente al daño inducido por la contracción (panel C) en el músculo.

25 La **Figura 8** ilustra que la combinación miR-29c/μ-dys aumenta el tamaño muscular en ratones tratados a los 3 meses de edad. Se muestran secciones de músculos mdx/utrn^{+/−}/gastrocnemius tratados y no tratados teñidas con rojo picrosirio para teñir el colágeno. Las zonas fibróticas aparecen en rosa y el músculo intacto en verde. A nivel macroscópico, la combinación miR-29c/μ-dys disminuye la fibrosis y aumenta el área transversal total.

30 La **Figura 9A-F** demuestra que el tratamiento con miR-29c co-entregado con micro-distrofina aumentó la hipertrofia muscular y la hiperplasia como se muestra por un aumento en el peso total de la gastroc inyectada en comparación con cualquiera de las dos inyectadas solas (panel A), un aumento en el un aumento en el tamaño promedio de la fibra (panel B), un aumento en el área de la sección transversal del músculo (panel D; no inyectada: 24,6 versus miR-29c: 26,3 versus micro-dys: 26,6 versus micro-dys/miR-29c: 33,1) y un aumento del número de fibras musculares (panel E), pero el número de fibras musculares por unidad de superficie no se vio afectado (panel F). El panel C compara los controles mdx/utrn^{+/−} con los mdx/utrn^{+/−} tratados con miR-29c/μ-dys; el diámetro medio aumentó de 25,96 a 30,97 μm.

35 La **Figura 10A-G** demuestra que el tratamiento temprano de la terapia de combinación AAV.miR-29c/micro-distrofina es más eficaz en la reducción de la fibrosis y la expresión de ECM. El panel A muestra tinción de rojo picrosírus de tipo salvaje, no inyectado, AAV.miR-29c, AAV.micro-distrofina, y AAV.miR-29c/AAV.micro-distrofina de ratones inyectados a las 4-5 semanas de edad sacados doce semanas después de la inyección. El panel B muestra la cuantificación de la tinción con rojo de picrosirio, que demuestra que el músculo tratado conjuntamente presentaba una reducción del 51,1 % del colágeno en comparación con el músculo no inyectado con GAS. El panel C demuestra que la qRT-PCR confirma un aumento de los niveles de transcripción de miR-29c en las cohortes tratadas. qRT-PCR semi-cuantitativa muestra una reducción significativa en los niveles de colágeno I y III (paneles d, e), fbn (panel f) y TGF-β1 (panel g) en el músculo tratado con AAV.miR-29c/AAV.micro-distrofina en comparación con la extremidad contralateral y cada una de las terapias individuales Barras de error, SEM para n=5 (scAAVrh.74.CMV.miR-29c), n=5 (scAAVrh.74.CMV.miR-29c/AAVrh.74.MCK.micro-distrofina), n=6 (ssAAVrh.74.MCK.micro-distrofina), n=9(ratones mdx/utrn^{+/−}). ANOVA de 1 vía (*p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001)

40 50 La **Figura 11** demuestra que la terapia combinada temprana restaura la fuerza y protege contra el daño inducido por la contracción. La medición de la fuerza absoluta (panel A) y de la fuerza específica normalizada (panel b) tras la contracción tetánica en los tres músculos GAS inyectados con tratamiento aumentó significativamente en comparación con el músculo mdx/utrn^{+/−} no tratado (panel C). A continuación, se evaluó la pérdida de fuerza de los músculos tras contracciones excéntricas repetitivas. Sólo ratones co-tratados con miR-29c/micro-distrofina y micro-distrofina sola mostraron una protección de la pérdida de fuerza comparada con músculos mdx/utrn^{+/−} no tratados (azul). Análisis de varianza de dos vías demuestra significación en curvas de decrecimiento Barras de error, SEM para n=5 (rAAVrh.74.CMV.miR-29c), n=6 (rAAVrh.74.CMV.miR-29c/rAAVrh.74.MCK.micro-distrofina), n=5 (rAAVrh.74.MCK.micro-distrofina), n=15 (ratones mdx/utrn^{+/−}). ANOVA de 1 vía (*p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001, ****p < 0,0001).

55 60 65 La **Figura 12** ilustra que el tratamiento combinado de miR-29c/micro-distrofina aumenta el tamaño del músculo en ratones tratados a 1 mes de edad. Se seccionaron músculos mdx/utrn^{+/−} GAS tratados y no tratados y se tiñeron con rojo picrosirio para teñirlos en busca de colágeno. Las zonas fibróticas aparecen en rosa y el músculo intacto en verde. En el nivel macroscópico, la combinación miR-29c/micro-distrofina disminuye la fibrosis y aumenta el área transversal total.

- 5 La Figura 13A - 13G demuestra que el tratamiento temprano (a las 4-5 semanas) de la terapia de combinación AAV.MCK.miR-29c/micro-distrofina es más eficaz en la reducción de la fibrosis y la expresión de ECM. El panel A proporciona tinción de rojo picrosirius de ratones no inyectados y AAV.MCK.miR-29c/AAV.MCK.micro-distrofina inyectados a las 4-5 semanas de edad sacados doce semanas post-inyección. Ampliación original, x20 El panel B muestra la cuantificación de la tinción con rojo picrosirio que demuestra que el músculo co-tratado presentaba una reducción del 50,9 % del colágeno en comparación con el músculo GAS no tratado El panel C muestra la qRT-PCR que confirma un aumento de los niveles de transcripción de miR-29c en la cohorte tratada. La qRT-PCR semi-cuantitativa muestra una reducción significativa en los niveles de Colágeno 1A (Col1A; panel D) y Colágeno 3A (Col3A; panel E), Fibronectina (Fbn; panel F) y Tgf β 1 (panel G) en el músculo tratado con AAV.MCK.miR-29c/AAV.micro-distrofina comparado con las terapias de la extremidad contralateral. (*p < 0,05, ****p < 0,0001).
- 10 La Figura 14A - 14G demuestra que el tratamiento tardío (tratamiento a las 12 semanas) con la terapia de combinación AAV.MCK.miR-29c/micro-distrofina es eficaz en la reducción de la fibrosis y la expresión de ECM. El panel A proporciona tinción de rojo picrosirius de AAV.MCK.miR-29c no tratado y AAV.MCK.miR-29c/AAV.micro-distrofina doce semanas después de la inyección. Aumento original, x20. El panel B muestra la cuantificación de la tinción con rojo picrosirius, que demuestra que el músculo co-tratado presentaba una reducción del 30,3 % del colágeno en comparación con el músculo GAS no tratado. El panel C muestra una qRT-PCR que confirma un aumento de los niveles de transcripción de miR-29c en las cohortes tratadas. La qRT-PCR semi-cuantitativa demostró una reducción significativa en los niveles de Colágeno 1A (Col1A; panel D), Colágeno 3A (Col3A; panel E), Fibronectina (Fbn; panel F) y Tgf β 1 (panel G) en el músculo tratado con AAV.miR-29c/AAV.micro-distrofina comparado con la extremidad contralateral. ANOVA unidireccional. Todos los datos representan la media ± SEM. (** p < 0,01, ****p < 0,0001).
- 15 La Figura 15A-15C demuestra que la terapia combinada temprana (tratamiento a las 4-5 semanas) restauró la fuerza y protegió contra el daño inducido por la contracción. Medición de fuerza absoluta (panel A) y fuerza específica normalizada (panel B) después de contracción tetánica MCK.miR-29c/micro-distrofina inyectada en músculos GAS fueron significativamente aumentadas en comparación con músculo mdx/utrn $^{+/-}$ no tratado. (C) A continuación, se evaluó la pérdida de fuerza de los músculos tras contracciones excéntricas repetitivas. Ratones co-tratados con miR-29c/micro-distrofina y micro-distrofina sola mostraron protección de la pérdida de fuerza comparada con músculos mdx/utrn $^{+/-}$ no tratados (rojo). ANOVA de dos vías. Todos los datos representan la media ± SEM (****p < 0,0001).
- 20 La Figuras 16A - 16C demuestran que la terapia combinada tardía restauró la fuerza y protegió contra el daño inducido por la contracción. Medida de fuerza absoluta (panel A) y fuerza específica normalizada (panel B) después de contracción tetánica músculos GAS inyectados con rAAV.MCK.miR-29c y rAAV expresando micro-distrofina fueron significativamente aumentados comparados con músculo mdx/utrn $^{+/-}$ no tratado. En el panel C, se evaluó la pérdida de fuerza de los músculos tras contracciones excéntricas repetitivas. Ratones co-tratados con rAAV.MCK.miR-29c/rAAV expresando micro-distrofina mostraron una protección de la pérdida de fuerza comparada con músculos mdx/utrn $^{+/-}$ no tratados (rojo). ANOVA de dos vías. Todos los datos representan la media ± SEM (**p < 0,01, ****p < 0,0001).
- 25 La Figura 17A-17D demuestra que el tratamiento combinado aumenta la hipertrofia muscular 3 meses después de la inyección. El panel A demuestra que el rAAV. MCK.miR-29c co-entregado con rAAV expresando micro-distrofina falló en aumentar el peso total del GAS inyectado. El panel B demuestra que el tratamiento combinado rAAV.MCK.miR-29c/rAAV expresando micro-distrofina indujo un aumento en el tamaño medio de la fibra. Comparando controles mdx/utrn $^{+/-}$ con miR-29c/micro-distrofina tratados mdx/utrn $^{+/-}$, el diámetro medio aumentó de 28,96 a 36,03/ μ m . El panel C muestra que la co-distribución produjo un cambio hacia la distribución del tamaño de las fibras de tipo salvaje. Panel D con la condición de que el número de fibras musculares por mm 2 en el tratamiento de combinación miR-29c/micro-distrofina fue significativamente menor que los ratones no tratados y de tipo salvaje (***p < 0,01, ****p < 0,0001).
- 30 Las Figuras 18A-18B proporcionan la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1 pAAV.CMV.Mir29C) de un vector rAAV ejemplar que comprende la cadena guía madura de miR-29c (nucleótidos 1257-1284) y la espina dorsal natural de mi-30 (nucleótidos 1088-1375). El constructo también comprende el promotor CMV (nucleótidos 120-526), dos intrones EF1a en los nucleótidos 927-1087 y 1380-1854 y un polA en los nucleótidos 1896-2091.
- 35 Las Figuras 19 proporciona un esquema del vector rAAV pAAV.MCK.micro-distrofina.
- 40 Las Figuras 20A-D proporcionan la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 9; pAAV.MCK.micro-distrofina) de un vector rAAV ejemplar expresando micro-distrofina.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Las Figuras 21A-D proporcionan la secuencia de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la micro-distrofina humana (SEQ ID NO: 7)

5 La Figura 22 proporciona la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 12 pAAV.MCK.Mir29C) de un vector rAAV ejemplar que comprende la cadena guía madura de miR-29c (nucleótidos 1487-1512) y la espina dorsal natural de mi-30 (nucleótidos 1088-1375). El constructo también comprende el potenciador MCK (nucleótidos 190-395), el promotor MCK (nucleótidos 396-753), dos intrones EF1a en los nucleótidos 1155-1315 y 1609-2083 y un polA en los nucleótidos 2094-2148.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Biopsias musculares tomadas a la edad más temprana de diagnóstico de DMD revelan una proliferación prominente de tejido conjuntivo. La fibrosis muscular es perjudicial de múltiples modos. Reduce el tránsito normal de nutrientes del endomisio a través de las barreras del tejido conjuntivo, reduce el flujo de sangre y priva al músculo de constituyentes nutricionales derivados del sistema vascular, y contribuye funcionalmente a la pérdida temprana de la deambulación por contracturas en las extremidades. Con el tiempo, los desafíos del tratamiento se multiplican como resultado de una marcada fibrosis en el músculo. Esto puede observarse en biopsias musculares que comparan la proliferación de tejido conjuntivo en puntos de tiempo sucesivos. El proceso sigue exacerbándose, lo que conduce a la pérdida de la deambulación y a una aceleración fuera de control, especialmente en pacientes dependientes de sillas de ruedas.

20 Sin un enfoque paralelo para reducir la fibrosis, es poco probable que puedan alcanzarse plenamente los beneficios de la omisión de exón, la lectura de código de parada o las terapias de sustitución génica. Incluso estrategias de moléculas pequeñas o de reemplazo de proteínas pueden fallar sin un enfoque para reducir la fibrosis muscular. 25 El trabajo previo en ratones *mdx* envejecidos con fibrosis existente tratados con AAV.micro-distrofina demostró que no podíamos lograr la restauración funcional completa (Rodino-Klapac et al., Human molecular genetics 22, 4929-4937 (2013)). También se sabe que la progresión de la miocardiopatía de DMD va acompañada por cicatrización y fibrosis en la pared ventricular. La administración de micro-ARN es especialmente innovadora debido a la ausencia de barreras inmunológicas y a la relativa facilidad de administración. Los micro-ARN son pequeños (~200 pb) y, por tanto, pueden empaquetarse en AAV junto con un casete terapéutico para corregir o evitar el defecto genético.

30 Como se usa en la presente, el término "AAV" es una abreviatura convencional de virus adenoasociado. El virus adenoasociado es un parvovirus de ADN de hebra única que crece solamente en células en las que ciertas funciones se proporcionan por un virus auxiliar coinfectante. Actualmente hay trece serotipos de AAV que se han caracterizado. Se puede encontrar información general y revisiones de AAV en, por ejemplo, Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, vol. 1, pp. 169-228, y Berns, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (Nueva York). Sin embargo, se espera plenamente que estos mismos principios sean aplicables a serotipos de AAV adicionales ya que se sabe bien que los varios serotipos están muy estrechamente relacionados, tanto estructural como funcionalmente, incluso a nivel genético. (Ver, por ejemplo, Blacklowe, 1988, pp. 165-174 de Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; y Rose, Comprehensive Virology 3:1-61 (1974)). Por ejemplo, todos los serotipos de AAV aparentemente presentan propiedades de replicación muy similares mediadas por genes *rep* homólogos; y todos llevan tres proteínas de la cápside relacionadas, tales como las expresadas en AAV2. El grado de parentesco lo sugiere además el análisis heterodúplex que revela una hibridación cruzada extensa entre los serotipos a lo largo de la longitud del genoma; y la presencia de segmentos de autoapareamiento análogos en los extremos terminales que corresponden a "secuencias repetidas terminales invertidas" (ITR). Los patrones de infectividad similares también sugieren que las funciones de replicación en cada serotipo están bajo un control regulatorio similar.

40 45 50 55 60 Un "vector de AAV", como se usa en la presente, se refiere a un vector que comprende uno o más polinucleótidos de interés (o transgenes) que están flanqueados por secuencias repetidas terminales (ITR) de AAV. Tales vectores de AAV se pueden replicar y empaquetar en partículas virales infecciosas cuando están presentes en una célula huésped que se ha transfundido con un vector que codifica y expresa los productos de los genes *rep* y *cap*.

55 Un "virión de AAV" o "partícula viral de AAV" o "partícula de vector de AAV" se refiere a una partícula viral compuesta por al menos una proteína de la cápside de AAV y un vector de AAV de polinucleótido encapsulado. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido distinto de un genoma de AAV de tipo natural, tal como un transgén que se va a administrar a una célula de mamífero), típicamente se denomina "partícula de vector de AAV" o simplemente "vector de AAV". Por lo tanto, la producción de una partícula de vector de AAV incluye necesariamente la producción de un vector AAV, ya que tal vector está contenido dentro de una partícula de vector de AAV.

AAV

65 Los genomas AAV recombinantes de la presente invención comprenden la molécula de ácido nucleico de la invención y una o más AAV ITR que flanquean una molécula de ácido nucleico. El ADN AAV en los genomas rAAV

puede proceder de cualquier serotipo AAV del que pueda derivarse un virus recombinante, incluyendo, entre otros, los serotipos AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 y AAV-13. Se da a conocer la producción de rAAV pseudotipado, por ejemplo, en WO 01/83692. También se contemplan otros tipos de variantes de rAAV, por ejemplo, rAAV con mutaciones de la cápside. Ver, por ejemplo, Marsic *et al.*, *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Como se indicó en la sección de Antecedentes anterior, las secuencias de nucleótidos de los genomas de varios serotipos de AAV se conocen en la técnica. Para promover la expresión específica del músculo esquelético, pueden utilizarse AAV1, AAV6, AAV8 o AAVrh.74.

5 Los plásmidos de ADN pueden comprender genomas de rAAV de la presente invención. Los plásmidos de ADN se transferen a células permisibles para la infección con un virus ayudante de AAV (por ejemplo, adenovirus, adenovirus con supresión E1 o herpesvirus) para el ensamblaje del genoma del rAAV en partículas virales infecciosas. Las técnicas para producir partículas rAAV, en las que se proporciona a una célula un genoma AAV para ser empaquetado, genes rep y cap, y funciones de virus ayudante, son estándar en la técnica. La producción de rAAV requiere que los siguientes componentes estén presentes en una única célula (denominada en el presente documento célula de empaquetado): un genoma de rAAV, genes rep y cap de AAV separados (es decir, no en) del genoma de rAAV, y funciones de virus ayudante. Los genes rep y cap de AAV pueden ser de cualquier serotipo de AAV para el que pueda derivarse un virus recombinante y pueden ser de un serotipo de AAV diferente al de las ITR del genoma de rAAV, incluidos, pero sin limitarse a, los serotipos de AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAVrh.74, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 y AAV-13. Se da a conocer la producción de rAAV pseudotipado, por ejemplo, en WO 01/83692.

10 Un método de generación de una célula de empaquetamiento es crear una línea celular que exprese de manera estable todos los componentes necesarios para la producción de partículas de AAV. Por ejemplo, un plásmido (o múltiples plásmidos) que comprende un genoma de rAAV que carece de genes rep y cap de AAV, genes *rep* y *cap* de AAV separados del genoma de rAAV, y un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a neomicina, se integran en el genoma de una célula. Los genomas de AAV se han introducido en plásmidos bacterianos por procedimientos como la cola de GC (Samulski *et al.*, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:2077-2081), adición de enlazadores sintéticos que contienen sitios de escisión de endonucleasas de restricción (Laughlin *et al.*, 1983, *Gene*, 23:65-73) o por ligamiento directo de extremos romos (Senapathy & Carter, 1984, *J. Biol. Chem.*, 259:4661-4666). La línea celular de empaquetamiento se infecta entonces con un virus auxiliar tal como un adenovirus. Las ventajas de este método es que las células son seleccionables y son adecuadas para la producción a gran escala de rAAV. Otros ejemplos de métodos adecuados emplean adenovirus o baculovirus en lugar de plásmidos para introducir genomas de rAAV y/o genes *rep* y *cap* en células de empaquetamiento.

15 35 Se revisan los principios generales de producción de rAAV en, por ejemplo, Carter, 1992, *Current Opinions in Biotechnology*, 1533-539; y Muzyczka, 1992, *Curr. Topics in Microbial. y Immunol.*, 158:97-129). Se describen varios enfoques en Ratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4:2072 (1984); Hermonat *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466 (1984); Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:3251 (1985); McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62:1963 (1988); y Lebkowski *et al.*, 1988 *Mol. Cell. Biol.*, 7:349 (1988). Samulski *et al.* (1989, *J. Virol.*, 63:3822-3828); patente de EE.UU. No. 5,173,414; WO 95/13365 y la correspondiente patente de EE.UU. No. 5,658,776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin *et al.* (1995) *Vaccine* 13:1244-1250; Paul *et al.* (1993) *Human Gene Therapy* 4:609-615; Clark *et al.* (1996) *Gene Therapy* 3:1124-1132; patente de EE.UU. No. 5,786,211; patente de EE.UU. No. 5,871,982; y patente de EE.UU. No. 6,258,595. Se describen células empaquetadoras que producen rAAV infeccioso. En una realización, las células empaquetadoras pueden ser células cancerosas transformadas de manera estable, tales como células HeLa, células 293 y células PerC.6 (una línea 293 afín). En otra realización, las células empaquetadoras son células que no son células cancerosas transformadas, tales como células 293 de bajo paso (células de riñón fetal humano transformadas con E1 de adenovirus), células MRC-5 (fibroblastos fetales humanos), células WI-38 (fibroblastos fetales humanos), fibroblastos, células Vero (células de riñón de mono) y células FRHL-2 (células de pulmón fetal rhesus).

20 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 Los AAV recombinantes (es decir, las partículas infecciosas encapsuladas de rAAV) de la presente invención comprenden un genoma de rAAV. En realizaciones a modo de ejemplo, las genomas de ambos rAAV carecen de ADN de rep y cap de AAV, es decir, no hay ADN de rep o cap de AAV entre las ITR de los genomas. Los ejemplos de rAAV que pueden construirse para que comprendan las moléculas de ácido nucleico de la invención se exponen en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2012/047999 (documento WO 2013/016352).

El rAAV se puede purificar por métodos convencionales en la técnica tales como por cromatografía en columna o gradientes de cloruro de cesio. En la técnica se conocen métodos para purificar vectores de rAAV a partir de virus auxiliar e incluyen métodos dados a conocer en, por ejemplo, Clark *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, *Methods Mol. Med.*, 69 427-443 (2002); patente de EE.UU. No. 6,566,118 y WO 98/09657.

En otra realización, la invención contempla composiciones que comprenden rAAV de la presente invención. Las composiciones de la invención comprenden rAAV y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también pueden comprender otros componentes tales como diluyentes y adyuvantes. Los portadores, diluyentes

y adyuvantes aceptables no son tóxicos para los receptores y son preferiblemente inertes a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, como EDTA; alcoholes de azúcar, como manitol o sorbitol; contriones formadores de sal, como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, como Tween, plurónicos o polietilenglicol (PEG).

5 Los títulos de rAAV que van a administrarse en los métodos variarán dependiendo, por ejemplo, del rAAV particular, el modo de administración, el objetivo del tratamiento, el individuo y el/los tipo(s) de células a los que se dirigen, y pueden determinarse mediante métodos convencionales en la técnica. Los títulos de rAAV pueden estar en el rango de aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} y aproximadamente 1×10^{14} o más partículas resistentes a ADNasa (DRP, por sus siglas en inglés) por mL. Las dosis se pueden expresar también en unidades de genomas virales (vg).

10 Se describen métodos de transducción de una célula diana con rAAV, *in vivo* o *in vitro*. Los métodos *in vivo* comprenden el paso de administrar una dosis efectiva, o múltiples dosis efectivas, de una composición que comprende un rAAV de la invención a un animal (incluido un humano) que lo necesite. Si la dosis se administra antes del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es profiláctica. Si la dosis se administra después del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es terapéutica. En realizaciones de la invención, una dosis efectiva es una dosis que alivia (elimina o reduce) al menos un síntoma asociado con el trastorno/estado patológico que está tratándose, que ralentiza o previene la progresión a un trastorno/estado patológico, que ralentiza o previene la progresión de un trastorno/estado patológico, que disminuye el grado de la enfermedad, que da como resultado la remisión (parcial o total) de la enfermedad y/o que prolonga la supervivencia. Un ejemplo de enfermedad contemplada para su prevención o tratamiento con los métodos descritos en el presente documento es la FSHD.

15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65

Se describen métodos de transducción de una célula diana con rAAV, *in vivo* o *in vitro*. Los métodos *in vivo* comprenden el paso de administrar una dosis efectiva, o múltiples dosis efectivas, de una composición que comprende un rAAV de la invención a un animal (incluido un humano) que lo necesite. Si la dosis se administra antes del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es profiláctica. Si la dosis se administra después del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es terapéutica. En realizaciones de la invención, una dosis efectiva es una dosis que alivia (elimina o reduce) al menos un síntoma asociado con el trastorno/estado patológico que está tratándose, que ralentiza o previene la progresión a un trastorno/estado patológico, que ralentiza o previene la progresión de un trastorno/estado patológico, que disminuye el grado de la enfermedad, que da como resultado la remisión (parcial o total) de la enfermedad y/o que prolonga la supervivencia. Un ejemplo de enfermedad contemplada para su prevención o tratamiento con los métodos descritos en el presente documento es la FSHD.

La invención también contempla terapias de combinación. Combinación, tal como se usa en el presente documento, incluye tanto el tratamiento simultáneo como tratamientos secuenciales. Se contemplan específicamente las combinaciones de los métodos con tratamientos médicos estándar (por ejemplo, corticosteroides), así como las combinaciones con terapias novedosas.

La administración de una dosis efectiva de las composiciones se puede realizar por vías convencionales en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, intramuscular, parenteral, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, intracraneal, intraósea, intraocular, rectal o vaginal. Ruta(s) de administración y serotipo(s) de los componentes AAV del rAAV (en particular, los ITRs AAV y la proteína de la cápside) de la invención pueden ser elegidos y/o emparejados por los expertos en la técnica teniendo en cuenta la infección y/o el estado de la enfermedad a tratar y las células/tejido(s) diana que van a expresar el miARN miR-29 y/o la micro-distrofina.

Puede administrarse local o sistémicamente una dosis eficaz de rAAV y composiciones de la presente invención incluyendo terapia combinada. Por ejemplo, la administración sistémica es la administración en el sistema circulatorio de manera que se ve afectado todo el cuerpo. La administración sistémica incluye administración enteral tal como absorción a través del tracto gastrointestinal y administración parental mediante inyección, infusión o implantación.

En particular, la administración real de rAAV de la presente invención se puede lograr usando cualquier método físico que transporte el vector recombinante de rAAV al tejido objetivo de un animal. La administración dac la invención incluye, pero no se limita a, inyección en el músculo, el torrente sanguíneo y/o directamente en el hígado. Se ha demostrado que simplemente resuspender un rAAV en solución salina amortiguadora con fosfato es suficiente para proporcionar un vehículo útil para la expresión del tejido muscular, y no se conocen restricciones sobre los vehículos u otros componentes que se pueden coadministrar con el rAAV (aunque las composiciones que degradan el ADN se debe evitar de la forma habitual con rAAV). Las proteínas de la cápsida de un rAAV se pueden modificar de modo tal que el rAAV se dirija a un tejido objetivo particular de interés, tal como el músculo. Ver, por ejemplo, WO 02/053703. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar como formulaciones inyectables o como formulaciones tópicas para suministrarse a los músculos por transporte transdérmico. Se han desarrollado previamente numerosas formulaciones tanto para inyección intramuscular como para transporte transdérmico y se pueden usar en la práctica de la invención. El rAAV se puede usar con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable para facilitar la administración y manipulación.

La dosis de rAAV que debe administrarse en los métodos divulgados en el presente documento variará dependiendo, por ejemplo, del rAAV concreto, el modo de administración, el objetivo del tratamiento, el individuo y el tipo o tipos celulares a los que se dirige, y puede determinarse mediante métodos habituales en la técnica. Los títulos de cada rAAV administrado pueden oscilar entre aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} , aproximadamente 1×10^{14} y aproximadamente 1×10^{15} o más

partículas resistentes a ADNasa (DRP) por ml. Las dosis también pueden expresarse en unidades de genomas virales (vg) (es decir, 1×10^7 vg, 1×10^8 vg, 1×10^9 vg, 1×10^{10} vg, 1×10^{11} vg, 1×10^{12} vg, 1×10^{13} vg, 1×10^{14} vg, 1×10^{15} respectivamente). Las dosis también pueden expresarse en unidades de genomas virales (vg) por kilogramo (kg) de peso corporal (es decir, 1×10^{10} vg/kg, 1×10^{11} vg/kg, 1×10^{12} vg/kg, 1×10^{13} vg/kg, 1×10^{14} vg/kg, 1×10^{15} respectivamente). Se describen métodos para la titulación de AAV en Clark et al., Hum. Gene Ther., 10: 1031-1039 (1999).

En particular, la administración real de rAAV de la presente invención se puede lograr usando cualquier método físico que transporte el vector recombinante de rAAV al tejido objetivo de un animal. La administración de la invención incluye, pero no se limita a, inyección en el músculo, el torrente sanguíneo y/o directamente en el hígado. Se ha demostrado que simplemente resuspender un rAAV en solución salina amortiguadora con fosfato es suficiente para proporcionar un vehículo útil para la expresión del tejido muscular, y no se conocen restricciones sobre los vehículos u otros componentes que se pueden coadministrar con el rAAV (aunque las composiciones que degradan el ADN se debe evitar de la forma habitual con rAAV). Las proteínas de la cápsida de un rAAV se pueden modificar de modo tal que el rAAV se dirija a un tejido objetivo particular de interés, tal como el músculo. Ver, por ejemplo, WO 02/053703. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar como formulaciones inyectables o como formulaciones tópicas para suministrarse a los músculos por transporte transdérmico. Se han desarrollado previamente numerosas formulaciones tanto para inyección intramuscular como para transporte transdérmico y se pueden usar en la práctica de la invención. El rAAV se puede usar con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable para facilitar la administración y manipulación.

Para fines de inyección intramuscular, se pueden emplear soluciones en un adyuvante tal como aceite de sésamo o de maní o en propilenglicol acuoso, así como soluciones acuosas estériles. Tales soluciones acuosas se pueden amortiguar, si se desea, y hacer primero que el diluyente líquido sea isotónico con solución salina o glucosa. Se pueden preparar soluciones de rAAV como ácido libre (el ADN contiene grupos fosfato ácidos) o una sal farmacológicamente aceptable en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También se puede preparar una dispersión de rAAV en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. En este sentido, todos los medios acuosos estériles empleados se pueden obtener fácilmente mediante técnicas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

Los soportes farmacéuticos, diluyentes o excipientes adecuados para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que sea fácil de inyectar. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir por el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan al incorporar el rAAV en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el principio activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la técnica de liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de la solución del mismo previamente filtrada de forma estéril.

La transducción con rAAV también se puede realizar *in vitro*. En una realización, las células musculares objetivo deseadas se eliminan del sujeto, se transducen con rAAV y se reintroducen en el sujeto. Alternativamente, se pueden usar células musculares singénicas o xenogénicas cuando esas células no generen una respuesta inmunitaria inapropiada en el sujeto.

En la técnica se conocen métodos adecuados para la transducción y reintroducción de células transducidas en un sujeto. En una realización, las células pueden transducirse *in vitro* combinando rAAV con células musculares, por ejemplo, en medios apropiados, y seleccionando aquellas células que alberguen el ADN de interés utilizando técnicas convencionales como Southern blots y/o PCR, o utilizando marcadores seleccionables. A continuación, las células transducidas pueden formularse en composiciones farmacéuticas, y la composición puede introducirse en el sujeto mediante diversas técnicas, tales como la inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal, o la inyección en el músculo liso y cardíaco, utilizando, por ejemplo, un catéter.

- La transducción de células con rAAV de la invención resulta en la expresión sostenida de miR-29 o micro-distrofina. Se describen métodos de administrar/entregar rAAV que expresan miR-29 y/o micro-distrofina a un animal, preferiblemente un ser humano. Estos métodos incluyen la transducción de tejidos (que incluyen, pero no se limita, tejidos tales como músculo, órganos tales como hígado y cerebro, y glándulas tales como glándulas salivales) con uno o más rAAV de la presente invención. La transducción se puede llevar a cabo con cassetes de genes que comprenden elementos de control específicos de tejido. Por ejemplo, una realización proporciona métodos de transducción de células musculares y tejidos musculares dirigidos por elementos de control específicos del músculo, incluyendo, pero sin limitarse a, los derivados de las familias de genes de actina y miosina, tales como de la familia de genes myoD [Véase Weintraub et al., *Science*, 251: 761-766 (1991)], el factor de unión potenciador específico de miocitos MEF-2 [Cserjesi and Olson, *Mol Cell Biol* 11: 4854-4862 (1991)], elementos de control derivados del gen de actina esquelética humana [Muscat et al., *Mol Cell Biol*, 7: 4089-4099 (1987)], el gen de actina cardíaca, elementos de la secuencia de creatina cinasa muscular [ver Johnson et al., *Mol Cell Biol*, 9:3393-3399 (1989)] y el elemento potenciador de creatina cinasa murina (mCK), control elementos derivados del gen esquelético de la troponina C de contracción rápida, el gen de la troponina C cardíaca de contracción lenta y el gen de la troponina I de contracción lenta: factores nucleares inducibles por hipoxia (Semenza et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 5680-5684 (1991)), elementos y promotores inducibles por esteroides, incluido el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) (ver Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5603-5607 (1993)), y otros elementos de control.
- El tejido muscular es un objetivo atractivo para el suministro *in vivo* de ADN, porque no es un órgano vital y es de fácil acceso. La invención contempla la expresión sostenida de miARN a partir de miofibras transducidas.
- Por «célula muscular» o «tejido muscular» se entiende una célula o grupo de células derivadas de músculo de cualquier tipo (por ejemplo, músculo esquelético y músculo liso, por ejemplo del tubo digestivo, vejiga urinaria, vasos sanguíneos o tejido cardíaco). Tales células musculares pueden estar diferenciadas o indiferenciadas, tales como mioblastos, miocitos, miotubos, cardiomiocitos y cardiomioblastos.
- El término «transducción» se usa para referirse a la administración/entrega de la cadena guía miR29 o la región codificante de la micro-distrofina a una célula receptora *in vivo* o *in vitro*, a través de un rAAV de replicación deficiente de la presente invención que resulta en la expresión de un miR29 o micro-distrofina por la célula receptora.
- Así, se describen métodos de administrar una dosis efectiva (o dosis, administradas esencialmente simultáneamente o dosis dadas a intervalos) de rAAV que codifican miR29 y/o micro-distrofina a un paciente que lo necesita.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

40 Confirmación de modelos de distrofia muscular de Duchenne

El ratón *mdx* proporciona un modelo animal conveniente, aunque incompleto, para estudiar la patogénesis de la DMD. Este modelo es un cruce del ratón *mdx* con un knockout heterocigoto del gen de la utrofina (*mdx:utrn^{+/−}*), que presenta un aumento de la fibrosis y recapitula más fielmente la patología de la DMD humana. Los ratones *mdx* tienen una mutación sin sentido en el exón 23 de la DMD que provoca un fenotipo relativamente leve y una esperanza de vida casi normal. A las 3 semanas de edad, el diafragma y el músculo de las extremidades de los ratones *mdx* desarrollan signos de inflamación endomisial. Estos síntomas remiten en el músculo de las extremidades cuando los ratones alcanzan la edad adulta, mientras que la inflamación en el músculo del diafragma sigue empeorando progresivamente. En los ratones *mdx* que carecen de telomerasa, la distrofia muscular empeora progresivamente con la edad; los ratones *mdx* que carecen de utrofina (DKO) tienen un fenotipo más característico de la DMD humana con debilidad muscular de aparición temprana, fibrosis grave y muerte prematura. La utrofina, un paralog autosómico de la distrofina, comparte un alto grado de homología de secuencia que puede compensar la falta de distrofina en el ratón *mdx* en el doble KO (distrofina más utrofina); un fenotipo severo con muerte temprana es observado. La muerte prematura en el ratón DKO impide la progresión de la inflamación y la fibrosis, pero el ratón *mdx:utrn^{+/−}* presenta un modelo con similitudes a la enfermedad humana exhibiendo un grado sorprendente de fibrosis, y una supervivencia más larga que el DKO, proporcionando un mejor modelo para nuestros estudios traslacionales propuestos. Un informe reciente confirma el uso del ratón *mdx:utrn^{+/−}* como modelo ideal para estudiar la fibrosis en el contexto de la DMD. En el presente estudio, el aumento de la fibrosis medido mediante tinción con rojo Sirius se acompañó de un aumento de los niveles de transcripto de colágeno y una disminución de los niveles de mir29c.

Ejemplo 2

65 La administración de miR29 a ratones con DMD reduce la fibrosis

Estudios preliminares han demostrado que hay un aumento significativo en la tinción Sirius Red para colágeno y una disminución en los niveles de miR-29c en pacientes humanos con DMD y en el ratón *mdx/utrn^{+/−}*. La administración génica de miR-29 mediante vectores AAV específicos de músculo es potencialmente segura y eficaz. Para generar el vector rAAV, al que en el presente documento se refiere como rAAVrh.74.CMV.miR29c, la secuencia de 22 nucleótidos de miR29c (cadena diana SEQ ID NO: 3 y la cadena guía SEQ ID NO: 4) se clonó en un armazón de miR-30 dirigido por un promotor de CMV. El casete de expresión (SEQ ID NO: 2) se clonó en un plásmido AAV autocomplementario y se empaquetó utilizando AAVrh.74, un serotipo conocido por expresarse bien en músculo. El ADNc de miR-29c se sintetizó utilizando un cebador personalizado que contenía la cadena diana (sentido) de miR-29c, el bucle madre de miR-30 y la cadena guía (antisentido) de miR-29c en la espina dorsal de miR-30. Se modificaron tres bases de la secuencia de miR-29c. A continuación, esta secuencia se clonó en un plásmido AAV ITR autocomplementario dirigido por el promotor CMV y la secuencia polyA.

Como se muestra en la Figura 1, el plásmido pAAV.CMV.miR29C contiene el ADNc de miR29c en una espina dorsal del bucle madre de miR-30 flanqueado por secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV2. Esta secuencia es la que se encapsuló en los viriones AAVrh.74. Además, se cambiaron algunos nucleótidos de la secuencia diana de miR-29c para imitar el emparejamiento Watson-crick en este sitio, como en el ARNhC-miR(luc). De conformidad con el diseño del ARNhC-luc, la horquilla debe ser perfectamente complementaria en toda su longitud. Además, cuantos más cambios se produzcan en la hebra pasajera, más probable será la eliminación de cualquier mecanismo endógeno que regule el procesamiento de miR-29 y que pudiera reconocer al miARN a través del tallo. La base 19 de la cadena guía se modificó a una citosina para imitar el nucleótido que precede al sitio de corte en la secuencia natural de miR-29c y la base correspondiente en la otra cadena se cambió para preservar el emparejamiento.

El vector de terapia génica scrAAVrh.74.CMV.miR29c (1×10^{11} vgs) se inyectó en el músculo cuádriceps de ratones *mdx/utrn^{+/−}* de 3 meses de edad. El músculo cuádriceps se analizó 3 meses después de la inyección mediante tinción con Sirius Red y se analizó con el software NIH ImageJ como se describe en Nevo et al. (PloS One, 6: e18049 (2011)). Los niveles de MiR29c, colágeno y elastina se cuantificaron mediante RT-PCR. La administración de miR-29c a ratones *mdx/utrn^{+/−}* jóvenes aumenta significativamente los niveles de miR-29c y una reducción significativa de la tinción con rojo Sirius en el músculo cuádriceps de ratones *mdx/utrn^{+/−}* de 6 meses de edad (3 meses después de la inyección). Se observó una reducción de los niveles de colágeno y elastina en los músculos tratados, evaluada mediante RT-PCR.

La demostración de fibrosis aumentada y expresión miR29 disminuida en los ratones *mdx/utrn^{+/−}* y pacientes deficientes en distrofina valida el modelo de ratón como representativo de la enfermedad humana. Los resultados iniciales del uso de miR29 administrado por AAV como terapia antifibrótica sugieren que existe un efecto beneficioso significativo con reducción de la tinción Sirius Red y de los niveles de colágeno y elastina, que son factores clave en la fibrosis.

Ejemplo 3

La inyección de miR-29c reduce el colágeno y restaura miR-29c

Para determinar si rAAVrh.74.CMV.MiR-29c podía reducir la fibrosis, ratones *mdx/utrn^{+/−}* de 12 semanas de edad recibieron una inyección intramuscular de rAAVrh.74.CMV.MiR-29c a 5×10^{11} vgs en el músculo gastrocnemio izquierdo (GAS). Los ratones fueron analizados a las 12 semanas tras la inyección. La tinción con rojo Picosirius reveló una disminución significativa de la tinción con colágeno en todo el músculo GAS (Figura 2a) en comparación con el músculo contralateral *mdx/utrn^{+/−}* GAS no tratado. La cuantificación de la tinción con rojo picosirius muestra que el músculo tratado presentaba una reducción del colágeno del 18,3 % en comparación con el músculo no tratado (tratado- 23,3 % ± 1,3 frente a no tratado- 29,5 % ± 0,7)(Figura 2b). Para confirmar la sobreexpresión de miR-29c en el músculo tratado, se extrajo ARN total del músculo GAS de ratones WT, tratados con miR-29c y *mdx/utrn^{+/−}* de 24 semanas de edad, y se sometió a análisis cuantitativo de transcripción inversa -PCR (qRT-PCR) para la expresión de miR-29c. Los resultados mostraron que miR-29c aumentó significativamente en el músculo GAS de los ratones tratados en comparación con los ratones no tratados (Figura 2d).

Ejemplo 4

MiR-29c mejora la fuerza muscular absoluta y específica pero no protege contra el daño inducido por la contracción

Sabiendo que la fibrosis puede afectar a la función muscular, queríamos probar si la reducción de la fibrosis mediante el aumento de la expresión de MiR-29c podría proteger el músculo *mdx/utrn^{+/−}* de la lesión inducida por la contracción y aumentar la fuerza total. Se evaluaron las propiedades funcionales del músculo gastrocnemio de ratones *mdx/utrn^{+/−}* tratados con rAAVrh.74.CMV.MiR-29c. Doce semanas después de la inyección, se aisló el GAS para realizar mediciones de fuerza *in vivo*.

El procedimiento GAS sigue el protocolo indicado en Hakim et al., (Methods Mol Biol. 709: 75-89, 2011) para analizar la fisiología del músculo transverso abdominal, pero adaptado para el GAS. Brevemente, se anestesió a los ratones con una mezcla de ketamina y xilacina. Se retiró la piel de la extremidad posterior para exponer el músculo GAS y el tendón de Aquiles. Se disecó el tendón distal y se ató un nudo cuadrado doble alrededor del tendón con sutura 4-0 lo más cerca posible del músculo, se ató otro nudo cuadrado doble justo al lado del primer nudo y luego se cortó el tendón. El músculo expuesto se humedeció constantemente con solución salina. A continuación, los ratones se transfirieron a una plataforma térmica controlada y se mantuvieron a 37°. La rodilla se fijó a la plataforma con una aguja a través del tendón rotuliano, la sutura del tendón al brazo de nivel del transductor de fuerza (Aurora Scientific, Aurora, ON, Canadá), y el pie se fijó con cinta adhesiva. Las contracciones del músculo GAS se provocaron estimulando el nervio ciático mediante electrodos bipolares de platino. Una vez estabilizado el músculo, se determinó la longitud óptima estirando el músculo de forma incremental hasta alcanzar la fuerza de contracción máxima. Tras un periodo de descanso de 3 minutos, se estimuló el GAS a 50, 100, 150 y 200 Hz, dejando un periodo de descanso de 1 minuto entre cada estímulo para determinar la fuerza tetánica máxima. Se midió la longitud muscular. Tras un descanso de 5 minutos, se evaluó la susceptibilidad del músculo GAS al daño inducido por la contracción. Tras 500 ms de estimulación, el músculo se alargó un 10 % de la longitud óptima. Consistía en estimular el músculo a 150 Hz durante 700 ms. Tras la estimulación, el músculo recuperó su longitud óptima. El ciclo se repitió cada minuto durante un total de 5 ciclos. La fuerza específica se calculó dividiendo la fuerza tetánica máxima por el área de la sección transversal del músculo GAS. Tras las contracciones excéntricas, se practicó la eutanasia a los ratones y se diseccionó el músculo GAS, se pesó y se congeló para su análisis.

Cada GAS se sometió a una serie de contracciones excéntricas repetidas. Al comparar la relación de fuerza de cada contracción frente a la primera contracción reveló que después de la quinta contracción el músculo no tratado decayó a $0,56 \pm 0,05$ frente al tratado $0,50 \pm 0,04$ ($p \leq 0,0001$). El grupo inyectado mostró una ligera disminución del grado de protección en comparación con los controles WT, que descendió a $0,92 \pm 0,02$ (Figura 3c). Estos datos muestran que la reducción de la fibrosis mediante el aumento de la expresión de miR-29c conduce a un aumento de la fuerza absoluta y específica, pero no protege significativamente el músculo de la lesión inducida por la contracción.

El músculo GAS tratado con rAAVrh.74.miR-29c mostró una mejora significativa de la fuerza absoluta en comparación con el músculo GAS mdx/utrn^{+/−} no tratado ($rAAV.miR-29c- 2277 \pm 161,7$ frente a $mdx/utrn^{+/−}$ no tratado- $1722 \pm 145,7$; Figura 3a), y también una mejora específica de la fuerza normalizada en el músculo GAS tratado con rAAVrh.74.miR-29c- en comparación con el músculo GAS no tratado ($rAAV.miR-29c- 204,7 \pm 11,7$ vs. $mdx/utrn^{+/−}$ no tratado- $151,6 \pm 14,5$; Figura 3b). La fuerza seguía estando significativamente reducida en comparación con los controles de tipo salvaje ($rAAV.miR-29c- 204,7 \pm 11,7$ versus tipo salvaje- $312,0 \pm 34,1$).

Ejemplo 5

Co-entrega con Micro-Distrofina reduce más la fibrosis

Para determinar si el enfoque combinado de terapia génica miR-29c/micro-distrofina sería más beneficioso para reducir la fibrosis, ratones mdx/utrn^{+/−} de 12 semanas de edad recibieron una inyección intramuscular de rAAVrh.74.CMV.MiR-29c a 5×10^{11} vgs al músculo gastrocnemio izquierdo. Los siguientes vectores de terapia génica fueron administrados por inyección intramuscular (IM) en el músculo gastrocnemio izquierdo (GAS) de ratones mdx/utrn^{+/−} de 3 meses de edad, un modelo de ratón DMD: scAAVrh.74.CMV.miR-29c solo, co-entregado con rAAVrh.74.MCK.micro-distrofina, y rAAVrh.74.MCK.micro-distrofina solo.

El plásmido pAAV.MCK.micro-distrofina contiene el casete de expresión de ADNc de micro-distrofina humana flanqueado por secuencias AAV2 de repetición terminal invertida (ITR) como se muestra en la Figura 10. Esta secuencia es la que se encapsuló en los viriones AAV rh.74. El plásmido pAAV.MCK.micro-distrofina fue construido insertando el casete de expresión MCK conduciendo una secuencia de ADNc de micro-distrofina humana de codón optimizado en el vector de clonación AAV como se describe en Rodino-Klapac et al (Mol Ther. 2010 Jan;18(1):109-17). Se utilizó una secuencia promotora/reforzadora MCK para dirigir la expresión génica específica del músculo, compuesta por el reforzador del núcleo MCK de ratón (206 pb) fusionado al promotor del núcleo MCK de 351 pb (proximal). Después del promotor central, está presente el exón 1 de MCK de ratón endógeno de 53 pb (no traducido) para un inicio de transcripción eficiente, seguido por las señales de corte y empalme 16S/19S tardías de SV40 (97 pb) y una UTR en 5' pequeña (61 pb). El intrón y la UTR en 5' se derivan del plásmido pCMVβ (Clontech). El casete de microdistrofina tiene una secuencia Kozak de consenso inmediatamente en frente del inicio de ATG y una señal de poliA sintética de 53 pb para la terminación del ARNm. El casete de micro-distrofina humana contiene los dominios (R4-R23/Δ71-78). El ADN complementario fue sintetizado por GenScript (Piscataway, NJ) con codones optimizados para uso humano.

Los ratones fueron analizados a las 12 y 24 semanas tras la inyección. Primero, el número de fibras musculares que expresaban micro-distrofina fue usado para evaluar la eficacia de la entrega del transgen y para asegurarnos que teníamos niveles similares de micro-distrofina expresada en cada grupo. Encontramos que la micro-distrofina no era diferente entre las cohortes tratadas con micro-distrofina sola ($71,85 \pm 2,25$ %) en comparación con la terapia de combinación miR-29c/micro-distrofina ($75,03 \pm 1,91$ %) (Figura 4).

Se analizó el músculo GAS 12 meses después de la inyección para evaluar la acumulación de colágeno mediante tinción con Sirius Red y su posterior cuantificación con ImageJ. Los resultados adicionales incluyeron miR-29c y niveles de transcripción de colágeno, mediciones de fuerza en el músculo GAS, mediciones del diámetro de las fibras y análisis western blot para proteínas implicadas en la regeneración muscular (MyoD, Myogenin). La cantidad de fibrosis fue analizada por tinción de rojo picrosírus, que reveló una disminución significativa en la tinción de colágeno a lo largo de los músculos GAS en todos los grupos tratados (Figura 5a) en comparación con el músculo contralateral mdx/utrn^{+/−} GAS no tratado o micro-distrofina sola. La cuantificación de la tinción con rojo picrosírus muestra que el músculo co-tratado presentaba una reducción del colágeno del 40,8 % en comparación con el músculo no tratado (tratado- 17,47 % ± 0,75 versus no tratado-29,5 % ± 0,7) (Figura 5b). Para confirmar la expresión de miR-29c, se realizó qRT-PCR en el músculo GAS y todos los grupos de tratamiento presentaron un aumento de miR-29c en comparación con el músculo no tratado (Figura 5c).

De forma análoga al tejido DMD, se observó una reducción significativa en los niveles de miR-29c en el músculo mdx/utrn^{+/−} que se correlacionó con un aumento de la fibrosis medida por tinción con rojo picrosírus. Tras 3 meses de tratamiento con scAAV.miR-29c solo, se produjo una reducción significativa de la fibrosis (tratado-23,5 % ± 1,3 frente a no tratado-27,8 % ± 0,6) en el músculo GAS. Cuando co-dirigido con micro-distrofina, una reducción adicional en el colágeno (41 %) fue observada por la tinción de rojo picrosírus (tratamiento de combinación: 17,47 % ± 0,75 versus no tratado: 29,5 % ± 0,7) ($p < 0,0001$) (Figura 5b). Para confirmar la expresión de miR-29c, se realizó qRT-PCR en el músculo GAS y todos los grupos de tratamiento presentaron un aumento de miR-29c en comparación con el músculo no tratado (Figura 5b).

A las 24 semanas de la inyección, los resultados fueron similares a los observados a las 12 semanas de la inyección. Se observó una reducción del 47 % del colágeno mediante tinción con rojo picrosírio en comparación con el músculo no tratado (tratamiento combinado: 16,5 ± 1,23 versus sin tratar: 31,07 ± 0,93; $p < 0,0001$) y un aumento coincidente del nivel de transcripción de miR-29c.

Para validar aún más la reducción de colágeno observada por la tinción rojo picrosírus, qRT-PCR fue realizada en el músculo para cuantificar los niveles de transcripción de Col1A, Col3A y también otro componente ECM, fibronectina (Fbn). El análisis qRT-PCR detectó una disminución en Col1A y Col3A después de cada tratamiento, sin embargo sólo la cohorte tratada con micro-distrofina y miR-29c mostró una reducción significativa (Figuras 6a y 6b). El análisis reveló que Fbn se redujo significativamente sólo en la cohorte co-tratada (Figura 6c).

Se ha demostrado anteriormente que el TGF-β1 está regulado al alza en el músculo distrófico, lo que probablemente desempeñe un papel en el inicio de la cascada fibrótica. El TGF-β1 es una conocida citocina profibrótica que regula a la baja miR-29c y es responsable de la conversión de mioblastos en miofibroblastos con un aumento del colágeno y de la fibrogénesis muscular. El análisis qRT-PCR muestra que el músculo co-tratado tenía niveles significativamente más bajos de TGF-β1 en comparación con el músculo no inyectado y con cualquiera de los dos tratamientos solos (Figura 6d). A los 6 meses después de la inyección, el músculo co-tratado continuó mostrando niveles reducidos de Col1A, Col3A, Fbn y TGF-β1, mientras que sólo ligeras reducciones en los niveles de ARNm de Col1A en los grupos de miR-29 y micro-distrofina solamente fueron observadas.

Un aumento en la fuerza específica y absoluta fue observado en el músculo tratado con miR-29c solo comparado con la extremidad no tratada, que cuando se combinó con micro-distrofina condujo a fuerza absoluta y específica que no eran significativamente diferentes del tipo salvaje. También observamos un aumento significativo del peso gástrico en aquellos músculos que fueron co-tratados.

Los resultados iniciales del uso de rAAV.miR-29c como terapia antifibrótica sugieren que existe un efecto beneficioso con la reducción de los niveles de colágeno, un factor clave en la fibrosis. Además, cuando se combina con micro-distrofina para mejorar la estabilidad de la membrana, la regulación al alza del miR29 normalizó la fuerza muscular.

Ejemplo 6

55 Además, cuando se combina con micro-distrofina para mejorar la estabilidad de la membrana, la regulación al alza del miR29 normalizó la fuerza muscular.

Sabiendo que el músculo tratado con miR-29 tenía un aumento modesto pero significativo en la fuerza absoluta y específica, la terapia de combinación de la sobreexpresión de miR-29c y el impacto del reemplazo del gen de la micro-distrofina en la función muscular fue investigada. Doce semanas después de la inyección, aislamos los GAS para realizar mediciones de fuerza in vivo. El vector rAAVrh.74.MiR-29c descrito anteriormente en el Ejemplo 2 y un vector rAAV

65 El músculo GAS tratado con rAAVrh.74.MiR-29c y rAAV que expresa Micro-Dys mostró una mejora significativa en la fuerza absoluta en comparación con el músculo GAS mdx/utrn^{+/−} no tratado (co-tratado- 3582,4 ± 79,4 nM versus mdx/utrn^{+/−} no tratado- 1722 ± 145,7 nM versus tipo salvaje- 3005 ± 167,3 nM) (Figura 7), y también se normalizó la fuerza específica en el músculo GAS tratado con rAAVrh.74.miR-29c/micro-dys en comparación con el músculo

GAS no tratado (ratones co-tratados- $244,2 \pm 6,6$ nM/mm² versus mdx/utrn^{+/−} no tratados- $151,6 \pm 14,5$ nM/mm² versus $312,0 \pm 34,1$ nM/mm²) (Figura 7). Tanto la fuerza absoluta como la específica no fueron significativamente diferentes de los controles de tipo salvaje.

- 5 Cada GAS se sometió a una serie de contracciones excéntricas repetidas. Comparando la relación de fuerza de cada contracción contra la primera contracción reveló que después de la quinta contracción el músculo no tratado decayó a $0,54 \pm 0,06$ contra el co-tratado $0,66 \pm 0,04$ ($p \leq 0,0001$), que puede ser contribuido a la micro-distrofina ya que la micro-distrofina sola también decayó a $0,66 \pm 0,04$. El grupo tratado seguía siendo significativamente inferior al de tipo salvaje, que descendió a $0,92 \pm 0,02$ (Figura 7c). Estos datos demuestran que la reducción de la fibrosis y la sustitución génica conducen a un aumento de la fuerza 5 absoluta y específica y protegen significativamente al músculo de las lesiones inducidas por la contracción.

Ejemplo 7

15 El tratamiento combinado aumenta la hipertrofia y la hiperplasia muscular

El MiR-29c co-entregado con micro-distrofina aumentó el peso total del gastroc inyectado comparado con cualquiera de los dos inyectados solos a los tres meses de edad (Figura 8, Figura 9a). Para investigar el origen del aumento de la masa muscular, se miden los diámetros de las miofibras. El tratamiento combinado miR-29c/μ-dys demostró un aumento del tamaño medio de las fibras. Comparando los controles mdx/utrn^{+/−} con los mdx/utrn^{+/−} tratados con miR-29c/μ-dys, el diámetro medio aumentó de 25,96 a 30,97 μm (Figura 9b). La co-distribución produjo un cambio hacia la distribución del tamaño de las fibras de tipo salvaje (Figura 9c). Aunque el tamaño medio de las fibras se incrementó no explica el aumento de ~ 30 % en el peso bruto del músculo. También se midió el área transversal total del músculo. Se escanearon los músculos gastroc de todos los grupos y se midió el área total. Los músculos co-tratados con micro-dys/miR-29c presentaron un aumento significativo del área de la sección transversal en comparación con los no tratados y con cualquiera de los tratamientos solos (no inyectados: 24,6 versus miR-29c: 26,3 versus micro-dys: 26,6 versus micro-dys/miR-29c: 33,1) (Figura 8, Figura 9d).

30 Se ha informado de que miR-29c desempeña un papel en la vía myoD/Pax7/myogenin y se planteó la hipótesis de que miR-29c puede estar influyendo en la regeneración y activación de las células satélite (células madre musculares) para diferenciarse en el linaje miogénico. Para probarlo, se contó el número total de fibras musculares de las imágenes escaneadas del portaobjetos completo. Un mayor número de fibras musculares tras el tratamiento combinado miR-29c/μ-dys (Figura 9e). Por último, dado que los diámetros de las fibras musculares en ratones mdx/utrn^{+/−} son heterogéneos con muchas fibras pequeñas y algunas fibras hipertróficas, se determinó si el número de fibras por unidad de superficie (células/mm²) se veía afectado con el tratamiento. El tratamiento combinado miR-29c/μ-dys no fue diferente al de tipo salvaje (Figura 9f).

Ejemplo 8

40 El tratamiento precoz con la combinación evita la fibrosis

En vista de la importancia potencial de la combinación de miR-29c y micro-distrofina como una terapia profiláctica para DMD, una cohorte de ratones mdx/utrn^{+/−} más jóvenes fueron tratados a las 4 semanas de edad. Usando el mismo paradigma que para otros grupos como se describe en el presente documento, los siguientes tratamientos fueron comparados para la eficacia para la prevención de la fibrosis por inyección intramuscular de GAS: scAAVrh.74.CMV.miR-29c solo, ssAAVrh74.MCK.micro-distrofina + terapia de combinación scAAVrh.74.CMV.miR-29c, o ssAAVrh74.MCK.micro-distrofina solo a la misma dosis. Los ratones fueron necropsiados 12 semanas después de la inyección. Se observó una disminución significativa de la tinción de colágeno en todo el músculo GAS en todos los grupos tratados en comparación con el músculo mdx/utrn^{+/−} GAS contralateral no tratado (Figura 10A). La cuantificación de la tinción roja picrosirius mostró que el músculo co-tratado con micro-distrofina/miR-29c tenía una reducción del 51 % en colágeno comparado con el músculo no tratado (tratado- $11,32 \% \pm 1,18$ versus no tratado- $23,15 \% \pm 0,90$) ($p < 0,0001$) (Figura 10) y qRT-PCR confirmó la reducción de Col1A, Col3A, Fbn y TGF-β1 después de la terapia combinatoria (Figuras 10D y E).

55 Ejemplo 9

La terapia combinada temprana restaura la fuerza y protege del daño inducido por la contracción mejor que el tratamiento tardío

60 La medición de la fuerza *in vivo* se llevó a cabo en los GAS de los ratones tratados precozmente con la terapia combinada descrita en el Ejemplo 8. En ratones mdx/utrn^{+/−} de 4 semanas de edad, el co-tratamiento usando miR-29c/micro-distrofina mostró una mejora significativa en la fuerza absoluta en comparación con ratones mdx/utrn^{+/−} no tratados y no hubo diferencia de tipo salvaje (co-tratados: $2908 \pm 129,5$ mN versus sin tratar: $1639,4 \pm 116,9$ mN versus el tipo salvaje: $3369,73 \pm 154,1$ mN). La fuerza específica también se normalizó a los niveles de tipo salvaje tras el tratamiento combinatorio (co-tratada $338,9 \pm 22,34$ mN/mm² versus no tratada $184,3 \pm 13,42$ mN/mm² versus WT $364,3 \pm 7,79$ mN/mm²) (Figuras 11A y B y 12).

5 A continuación, cada GAS se sometió a una serie de contracciones excéntricas repetidas. Al comparar la relación de fuerza de cada contracción por la quinta contracción, el músculo no tratado decayó a $0,53 \pm 0,04$ frente al co-tratado $0,82 \pm 0,04$ ($p \leq 0,0001$). El grupo de tratamiento combinatorio fue ligeramente inferior al de tipo salvaje, pero no significativamente diferente, que se redujo a $0,93 \pm 0,01$ (Figura 11C). Estos datos demuestran que la reducción de la fibrosis y la sustitución génica conducen a un aumento de la fuerza absoluta y específica y protegen significativamente al músculo de las lesiones inducidas por la contracción.

10 Estos experimentos sugieren que la sustitución genética debe iniciarse en el periodo neonatal. Los esfuerzos van claramente en la dirección de identificar la DMD y otras distrofias musculares en el periodo neonatal. El Ohio Newborn Screening Study ilustra el potencial para la identificación de DMD en recién nacidos usando CK 7 Neurol. como biomarcador (>2000 U/l) con confirmación de ADN en la misma mancha de sangre seca (Mendell et al., Ann. Neurol. 71: 304-313, 2012). Esta metodología se está extendiendo ahora a otros estados de EE. UU. (PPMD 16 de mayo de 2016: Next Steps with Newborn Screening) y en otros países, en particular el Reino Unido (UK National Screening Committee) y China (Perkin Elmer™ lanza el cribado en China).

15 15 El miR-29 también se ha mostrado prometedor como modalidad de tratamiento de la fibrosis cardiaca, pulmonar y hepática. El infarto de miocardio en ratones y humanos está asociado a la regulación a la baja de miR-29. Rooij et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 105:13027-13032, 2008) demonstrated that exposure of fibroblasts to a miR-29b mimic decreased collagen transcripts, thereby opening a clinical translation pathway for cardiac fibrosis. Estudios posteriores demostraron que, en un modelo de ratón con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, era posible atenuar la fibrosis mediante la administración de miR-29b. 14 basada en el sistema de transposones de la Bella Durmiente (SB). Actualmente, un imitador de miR-29b se encuentra en un ensayo clínico intradérmico local de fase 1 de seguridad-tolerabilidad en voluntarios sanos (miRagen Therapeutics™ MRG-201). En comparación con la administración de oligonucleótidos miR-29, que requeriría una administración repetida relacionada con la vida media de los oligonucleótidos, la terapia génica AAV podría proporcionar potencialmente una ruta para la transferencia génica de una sola administración.

Ejemplo 10

30 Tratamiento con Expresión Muscular Específica de miR-29 y Micro-distrofina Redujo Fibrosis y Expresión ECM

35 Los vectores AAV que comprenden la secuencia miR29c y un promotor MCK específico del músculo también fueron generados y probados como una terapia de combinación con vectores AAV que expresan micro-distrofina. Para generar el vector rAAV, al que en el presente documento se refiere como rAAV.MCK.miR29c, la secuencia de 22 nucleótidos de miR29c (cadena diana SEQ ID NO: 3 y la cadena guía SEQ ID NO: 4) en un armazón de miR-30 dirigido por un promotor MCK (SEQ ID NO: de catálogo 11). El casete de expresión (SEQ ID NO: 12) se clonó en un plásmido AAV monocatenario y se empaquetó utilizando AAVrh74, un serotipo conocido por expresarse bien en el músculo. El ADNc de miR-29c se sintetizó utilizando un cebador personalizado que contenía la cadena diana (sentido) de miR-29c, el bucle madre de miR-30 y la cadena guía (antisentido) de miR-29c en la espina dorsal de miR-30. Se modificaron tres bases de la secuencia de miR-29c. A continuación, esta secuencia se clonó en un plásmido AAV ITR monocatenario dirigido por el promotor MCK y la secuencia poliA.

40 45 El plásmido pAAV.MCK.miR29C contiene el ADNc de mir29c en una espina dorsal de bucle madre de miR-30 flanqueado por secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV2. Esta secuencia es la que se encapsuló en los viriones AAVrh74. Además, se cambiaron algunos nucleótidos de la secuencia diana de miR-29c para imitar el emparejamiento Watson-crick en este sitio, como en el ARNhC-miR(luc). De conformidad con el diseño del ARNhC-luc, la horquilla debe ser perfectamente complementaria en toda su longitud. Además, cuantos más cambios se produzcan en la hebra pasajera, más probable será la eliminación de cualquier mecanismo endógeno que regule el procesamiento de miR-29 y que pudiera reconocer al miARN a través del tallo. La base 19 de la cadena guía se modificó a una citosina para imitar el nucleótido que precede al sitio de corte en la secuencia natural de mi-29c y la base correspondiente en la otra cadena se cambió para preservar el emparejamiento.

50 55 El tratamiento temprano de la terapia de combinación AAV.MCK.miR-29c/micro-distrofina fue más eficaz en la reducción de la fibrosis y la expresión ECM. Ratones mdx/utrn^{+/+} de 4-5 semanas de edad recibieron una inyección intramuscular de rAAVrh74.MCK.MiR-29c y rAAVrh74.MCK.micro-distrofina a 5×10^{11} vgs al músculo gastrocnemio izquierdo como se describe en el Ejemplo 5. Los músculos se cosecharon doce semanas después de la inyección. La tinción con rojo Picrosirius del músculo cosechado de ratones no inyectados y ratones inyectados con terapia de combinación de rAAV.MCK.miR-29c/rAAV.MCK.micro-distrofina mostró que el músculo co-tratado tenía una reducción del 50,9 % en colágeno comparado con el músculo GAS no tratado (Ver Figuras 13a y 13b). qRT-PCR confirmó un aumento en los niveles de transcripción de miR-29c en la cohorte tratada (Figuras 13c). La qRT-PCR semi-cuantitativa mostró una reducción significativa en los niveles de Colágeno A1 y Colágeno 3A (Figura 13d, 13e), Fibronectina (Figura 13f) y Tgfβ1 (Figura 13g) en el músculo tratado con AAV.MCK.miR-29c/AAV.micro-distrofina comparado con las terapias de la extremidad contralateral. (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$). El tratamiento tardío de la terapia de combinación AAV.MCK.miR-29c/micro-distrofina es eficaz en la reducción de la fibrosis y la expresión de ECM. Ratones mdx/utrn^{+/+} de tres meses de edad recibieron una inyección intramuscular de

5 rAAVrh.74.MCK.MiR-29c y rAAVrh.74.MCK.micro-distrofina a 5×10^{11} vgs en el músculo gastrocnemio izquierdo como se describe en el Ejemplo 5. Los músculos se cosecharon doce semanas después de la inyección. La tinción con rojo Picrosirius del músculo no tratado, tratado con AAV.MCK.miR-29c y AAV.MCK.miR-29c/AAV.micro-distrofina mostró que el músculo co-tratado tenía una reducción del 30,3 % en colágeno comparado con el músculo GAS no tratado (Ver Figuras 14a y 14b) qRT-PCR confirmó un aumento en los niveles de transcripción de miR-29c en las cohortes tratadas (Figura 14c). La qRT-PCR semi-cuantitativa muestra una reducción significativa en los niveles de Colágeno 1A y Colágeno 3A (Figuras 14d, 14e), Fibronectina (Figura 14f) y Tgf β 1 (Figura 14g) en el músculo tratado con AAV.miR-29c/AAV.micro-distrofina comparado con la extremidad contralateral. ANOVA unidireccional. Todos los datos representan la media \pm SEM. (** p < 0,01, ****p < 0,0001).

10 **Ejemplo 11**

15 **La terapia combinada temprana restaura la fuerza y protege del daño inducido por la contracción mejor que el tratamiento tardío**

20 La medición de fuerza *in vivo* fue llevada a cabo en el GAS de los ratones tratados tempranamente con la expresión músculo-específica de miR-29 y micro-distrofina, como se describe en los Ejemplos 8 y 9. En ratones mdx/utrn $^{+/-}$ de 4 semanas de edad, el co-tratamiento usando rAAV.MCK.miR-29c/rAAV expresando micro-distrofina mostró una mejora significativa en la fuerza absoluta en comparación con ratones mdx/utrn $^{+/-}$ no tratados y no hubo diferencia de tipo salvaje (Figura 15a). La fuerza específica también se normalizó a niveles de tipo salvaje tras la terapia combinada (Figura 15b).

25 A continuación, se evaluó la pérdida de fuerza de los músculos tras contracciones excéntricas repetitivas, tal como se describe en el Ejemplo 9. Ratones co-tratados con rAAV.MCK.miR-29c/rAAV.MCK.micro-distrofina y rAAV.MCK.micro-distrofina solos mostraron una protección de la pérdida de fuerza comparada con músculos mdx/utrn $^{+/-}$ no tratados (Figura 15c).

30 En ratones mdx/utrn $^{+/-}$ de 12 semanas de edad, el co-tratamiento usando rAAV.MCK.miR-29c/rAAV expresando micro-distrofina restauró la fuerza y protegió contra el daño inducido por contracción. Medición de fuerza absoluta (Figura 16a) y fuerza específica normalizada (Figura 16b) después de contracción tetánica músculos GAS inyectados con rAAV.MCK.miR-29c y rAAV expresando micro-distrofina fueron significativamente aumentados comparados con músculo mdx/utrn $^{+/-}$ no tratado. Posteriormente, se evaluó la pérdida de fuerza de los músculos tras contracciones excéntricas repetitivas, tal como se describe en el Ejemplo 9. Los ratones co-tratados con MCK.miR-29c/micro-distrofina mostraron una protección contra la pérdida de fuerza en comparación con los músculos mdx/utrn $^{+/-}$ no tratados (Figura 16c). Estos datos demuestran que la reducción de la fibrosis y la sustitución génica conducen a un aumento de la fuerza absoluta y específica y protegen significativamente al músculo de las lesiones inducidas por la contracción.

35 **Ejemplo 12**
40 **El tratamiento combinado precoz aumenta la hipertrofia y la hiperplasia muscular**

45 La co-entrega de rAAV.MCK.miR-29 con rAAV expresando micro-distrofina no aumentó el peso total del gastrocnemio inyectado comparado con cualquiera de los dos inyectados solos a los tres meses post-inyección (Figura 17a). Los diámetros de las miofibras también fueron medidos. El tratamiento combinado de miR-29c/micro-distrofina demostró un aumento en el tamaño medio de la fibra. Comparando controles mdx/utrn $^{+/-}$ con miR-29c/micro-distrofina tratados mdx/utrn $^{+/-}$, el diámetro medio aumentó de 28,96 a 36,03 μ m (Figura 17b). La co-distribución produjo un cambio hacia la distribución del tamaño de las fibras de tipo salvaje (Figura 17c). El número de fibras musculares por mm 2 en el tratamiento de combinación miR-29c/micro-distrofina fue significativamente menor que los ratones no tratados y de tipo salvaje (Figura 17d; ***p<0,01, ****p<0,0001).

50 **BIBLIOGRAFÍA**

- 55 1. Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr. & Kunkel, L.M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919-928 (1987).
- 60 2. Straub, V. & Campbell, K.P. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* 10, 168-175 (1997).
- 65 3. Sacco, A., et al. Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* 143, 1059-1071 (2010).
4. Wallace, G.Q. & McNally, E.M. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* 71, 37-57 (2009).

65

5. Zhou, L. & Lu, H. Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 771-776 (2010).
- 5 6. Desguerre, I., et al. Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 762-773 (2009).
- 10 7. Kim, J., et al. microRNA-directed cleavage of ATHB 15 mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J* 42, 84-94 (2005).
- 10 8. Ambros, V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* 113, 673-676 (2003).
- 15 9. Eisenberg, I., et al. Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17016-17021 (2007).
- 15 10. Jiang, X., Tsitsiou, E., Herrick, S.E. & Lindsay, M.A. MicroRNAs and the regulation of fibrosis. *FEBSJ277*, 2015-2021 (2010).
- 20 11. van Rooij, E., et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 13027-13032 (2008).
- 25 12. Cacchiarelli, D., et al. MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the Duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin/nNOS pathway. *Cell Metab* 12, 341-351 (2010).
- 25 13. DiPrimio, N., McPhee, S.W. & Samulski, R.J. Adeno-associated virus for the treatment of muscle diseases: toward clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* 12, 553-560 (2010).
- 30 14. Mendell, J.R., et al. Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann Neurol* 68, 629-638 (2010).
- 30 15. Mendell, J.R., et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol* 66, 290-297 (2009).
- 35 16. Mendell, J.R., et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 23, 192-201 (2015).
- 35 17. Carnwath, J.W. & Shotton, D.M. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci* 80, 39-54 (1987).
- 40 18. Coulton, G.R., Morgan, J.E., Partridge, T.A. & Sloper, J.C. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14, 53-70 (1988).
- 45 19. Cullen, M.J. & Jaros, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne distrofia muscular. *Acta Neuropathol* 77, 69-81 (1988).
- 45 20. Dupont-Versteegden, E.E. & McCarter, R.J. Differential expression of muscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* 15, 1105-1110 (1992).
- 50 21. Stedman, H.H., et al. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352, 536-539 (1991).
- 55 22. Deconinck, A.E., et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 717-727 (1997).
- 55 23. Grady, R.M., et al. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 729-738 (1997).
- 60 24. Love, D.R., et al. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339, 55-58 (1989).
- 60 25. Tinsley, J.M., et al. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* 360, 591-593 (1992).
- 65 26. Tinsley, J., et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 4, 1441-1444 (1998).

27. Squire, S., et al. Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. *Hum Mol Genet* 11, 3333-3344 (2002).
- 5 28. Rafael, J.A., Tinsley, J.M., Potter, A.C., Deconinck, A.E. & Davies, K.E. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet* 19, 79-82 (1998).
- 10 29. Zhou, L., et al. Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. *J Neurol Sci* 264, 106-111 (2008).
- 15 30. Gutpell, K.M., Hrinivich, W.T. & Hoffman, L.M. Skeletal Muscle Fibrosis in the mdx/utrn+/- Mouse Validates Its Suitability as a Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS one* 10, e0117306 (2015).
- 15 31. Rodino-Klapac, L.R., et al. Micro-dystrophin and follistatin co-delivery restores muscle function in aged DMD model. *Human molecular genetics* 22, 4929-4937 (2013).
- 20 32. Cushing, L., et al. MIR-29 is a Major Regulator of Genes Associated with Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2010).
- 20 33. Roderburg, C., et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* 53, 209-218 (2011).
- 25 34. Nevo, Y., et al. The Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid (FTS), decreases fibrosis and improves muscle strength in dy/dy mouse model of muscular dystrophy. *PLoS one* 6, e18049 (2011).
- 30 35. Rodino-Klapac, L.R., et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med* 5, 45 (2007).
- 30 36. Mulieri, L.A., Hasenfuss, G., Ittleman, F., Blanchard, E.M. & Alpert, N.R. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res* 65, 1441-1449 (1989).
- 35 37. Rodino-Klapac, L.R., et al. Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 109-117 (2010).
- 40 38. Grose, W.E., et al. Homologous recombination mediates functional recovery of dysferlin deficiency following AAV5 gene transfer. *PLoS one* 7, e39233 (2012).
39. Liu, M., et al. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* 11, 245-256 (2005).

REIVINDICACIONES

1. Un vector AAV recombinante para expresar miR-29, en el que el vector comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2.
5
2. El vector AAV recombinante de la reivindicación 1, en el que el vector comprende un promotor y una señal de poliadenilación.
3. El vector AAV recombinante de la reivindicación 2, en el que el promotor es un promotor CMV o un promotor MCK.
10
4. Un vector AAV recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO : 1.
5. El vector AAV recombinante de la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos está unida de forma operable a un elemento de control específico del músculo.
15
6. El vector AAV recombinante de cualquier reivindicación precedente en el que el vector es del serotipo AA Vrh74.
7. El vector AAV recombinante de la reivindicación 5 o 6, en el que el elemento de control específico de músculo se deriva de un elemento génico de actina esquelética humana, elemento génico de actina cardíaca, factor potenciador de unión específico de miocitos mef, creatincinasa muscular (MCK), MCK truncada (tMCK), cadena pesada de miosina (MHC), MHCK7, C5-12, elemento potenciador de la creatina quinasa murina, elemento génico de la troponina c esquelética de contracción rápida, elemento génico de la troponina c cardiaca de contracción lenta, elemento génico de la troponina i de contracción lenta, factores nucleares inducibles por hipoxia, elemento inducible por esteroides o elemento de respuesta a glucocorticoides (gre).
20
8. El vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 5-7 en el que el elemento de control músculo-específico comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13.
25
9. Una composición que comprende el vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. El vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición de la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular.
30
11. El vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición de la reivindicación 9 para su uso en la reducción o prevención de la fibrosis en un sujeto que padece distrofia muscular.
35
12. El vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición de la reivindicación 9 para su uso en el aumento de la fuerza muscular en un sujeto que padece distrofia muscular.
40
13. El vector AAV recombinante o composición para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el vector AAV recombinante o composición se administra mediante inyección intramuscular.
45
14. El vector AAV recombinante o composición para uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que el vector AAV recombinante o composición se administra antes de que se observe fibrosis en el sujeto o antes de que se reduzca la fuerza muscular en el sujeto o antes de que se reduzca la masa muscular en el sujeto.
50
15. Un método in vitro para producir una secuencia polinucleotídica miR-29 madura que comprende infectar una célula huésped con un vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y expresar un polinucleótido miR-29 maduro en la célula huésped.

Figura 1



SEQ ID NO: 2; miR-29C IN A miR-30 ESPINA DORSAL

ENR sets the norms for the construction industry.

MIR-30 espina dorsal

miR-385a-5p (GTGAAAGCCACAGATG; SGR ID NO: 51)

mR-39c: cadena diana (sentido) ACCGATTCAAATGGTGCTAGA; SEQ ID NO:30

miR-29c, cadena gris (antisentido) | TCTAGGCCATTGAAATCGTTA; SEQ ID NO: 4

Estructura de jerarquía predicha

(SEQ ID NO: 6)

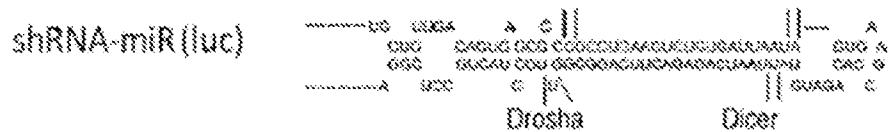
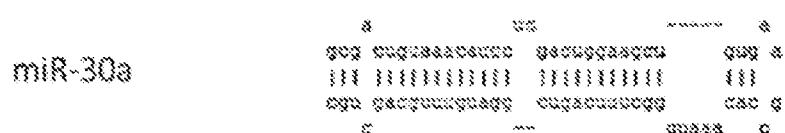
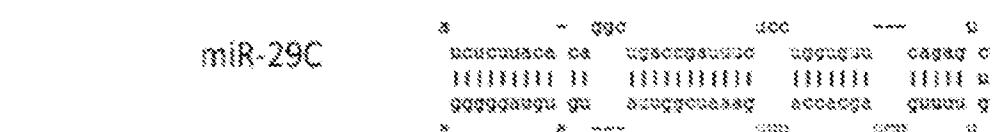
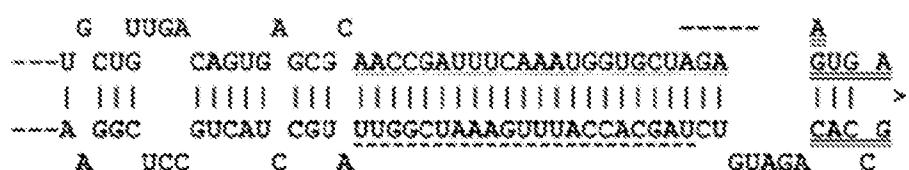


Figura 2A

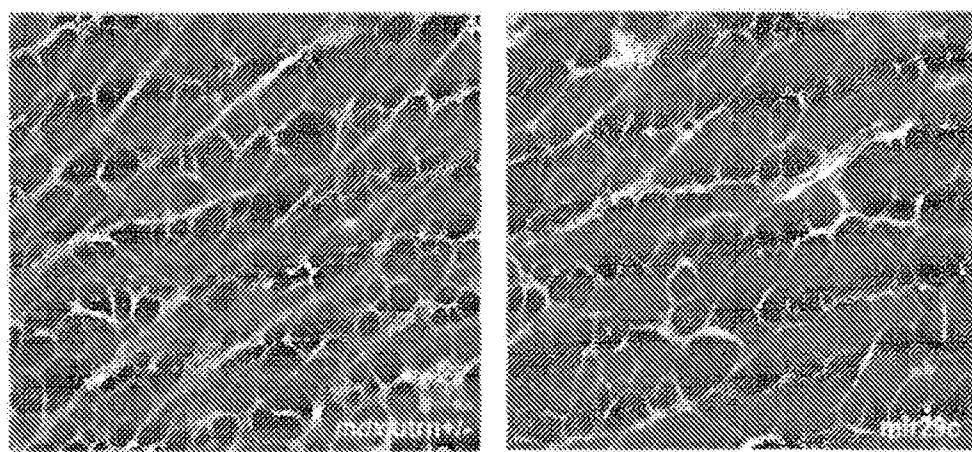


Figura 2B

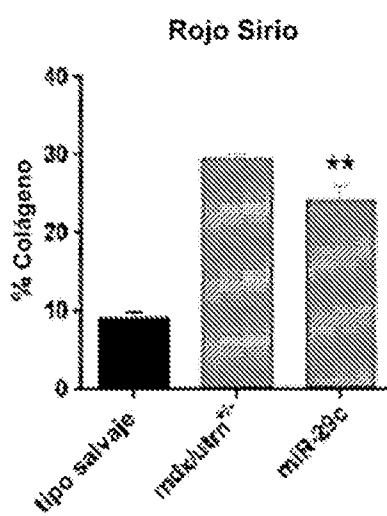


Figura 2C

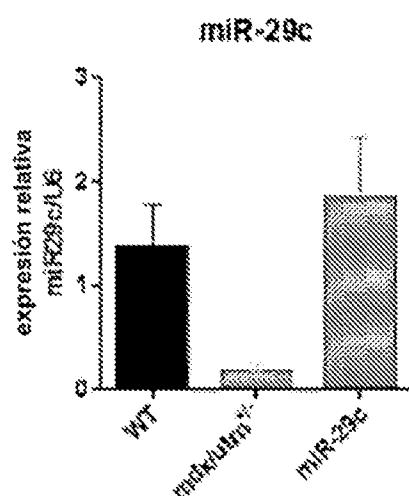


Figura 3A

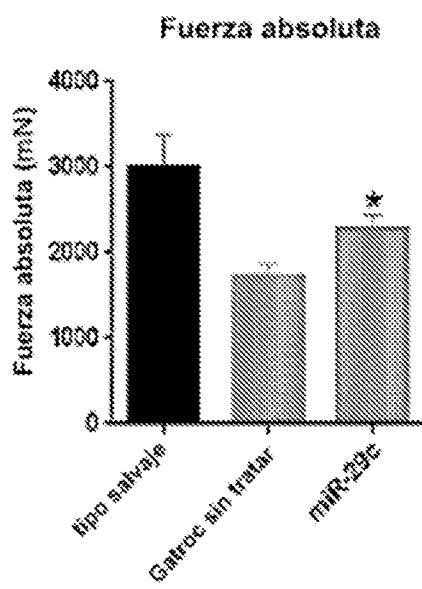


Figura 3B

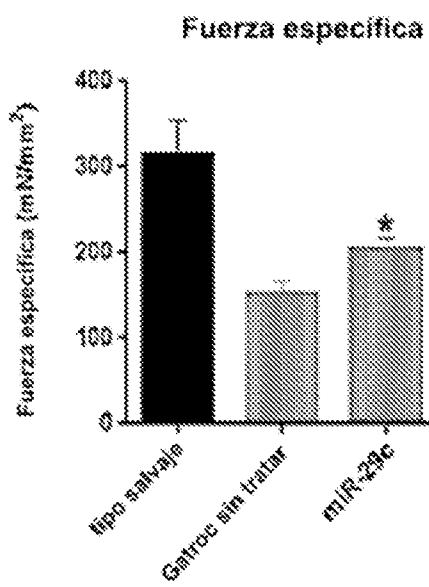
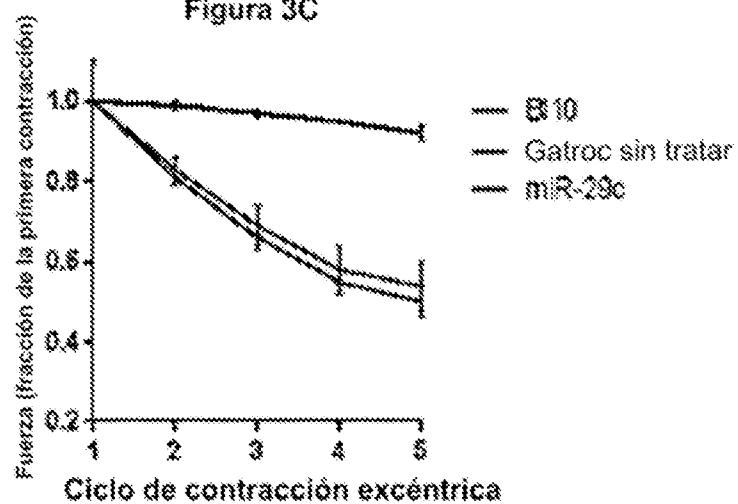


Figura 3C



ES 2 985 822 T3

Figura 4C

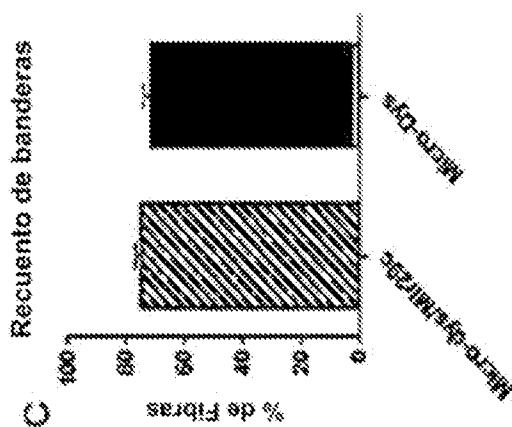


Figura 4B

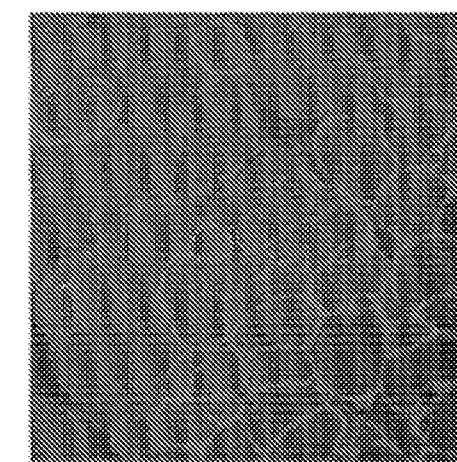
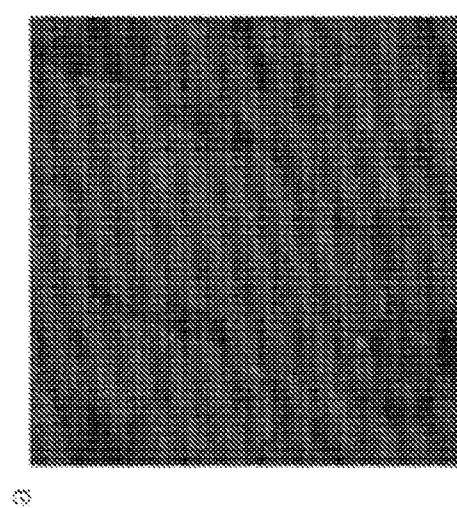


Figura 4A



ES 2 985 822 T3

Figura 3B
Rojo Sirio

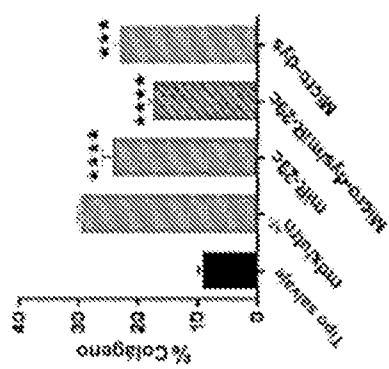
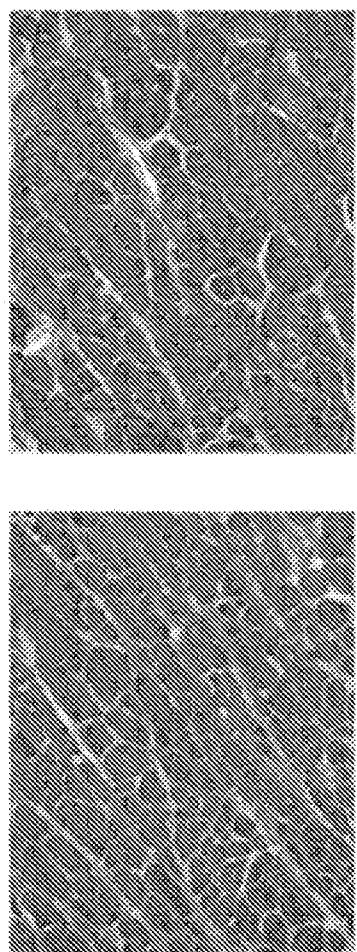
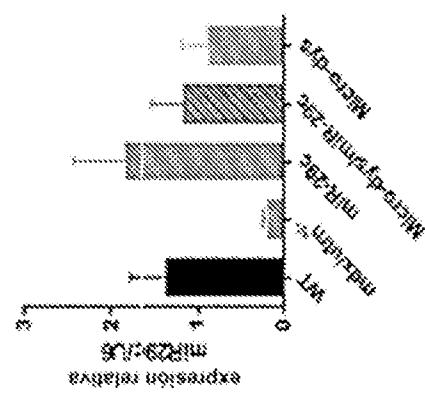


Figure 5A



Signature



Micro-Dys

Figura 6A
Col1A

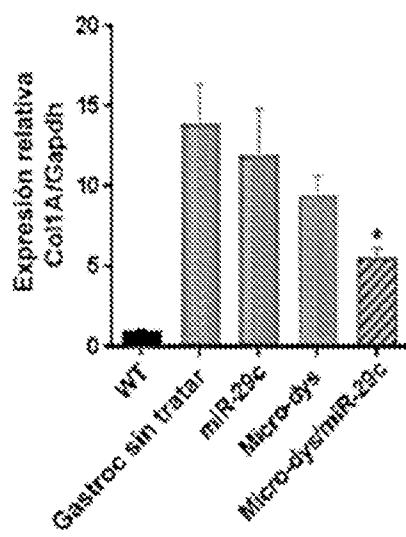


Figura 6B
Col3A

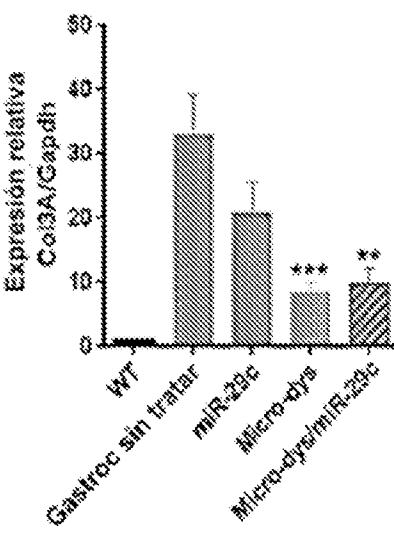


Figura 6C

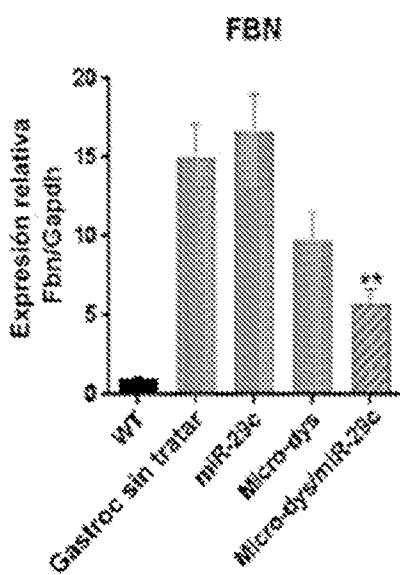


Figura 6D

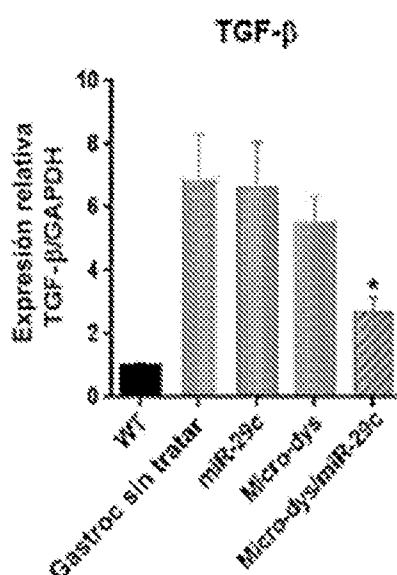


Figura 7A

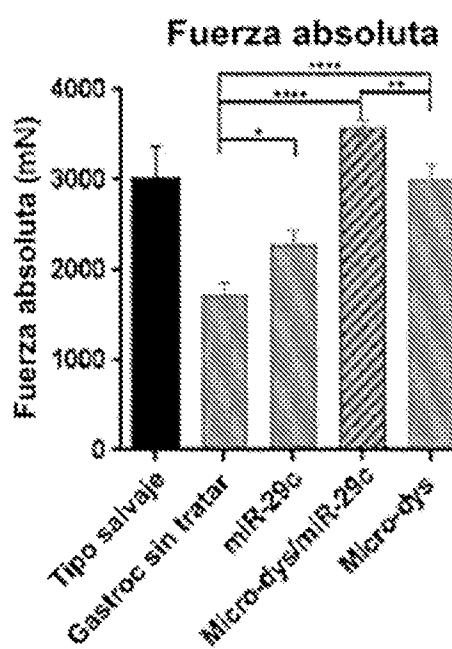


Figura 7B

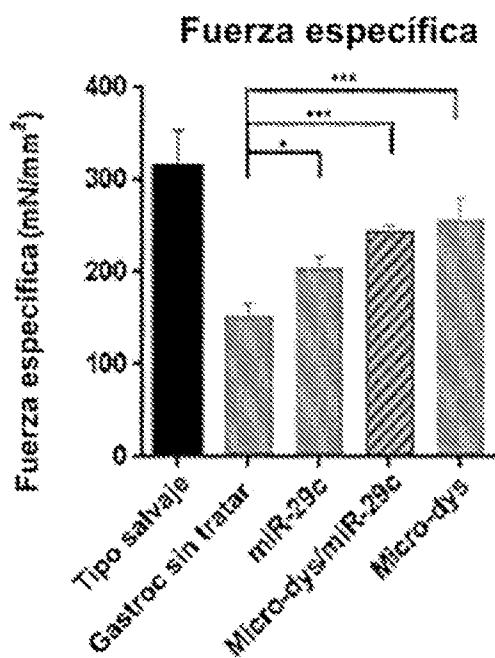


Figura 7C

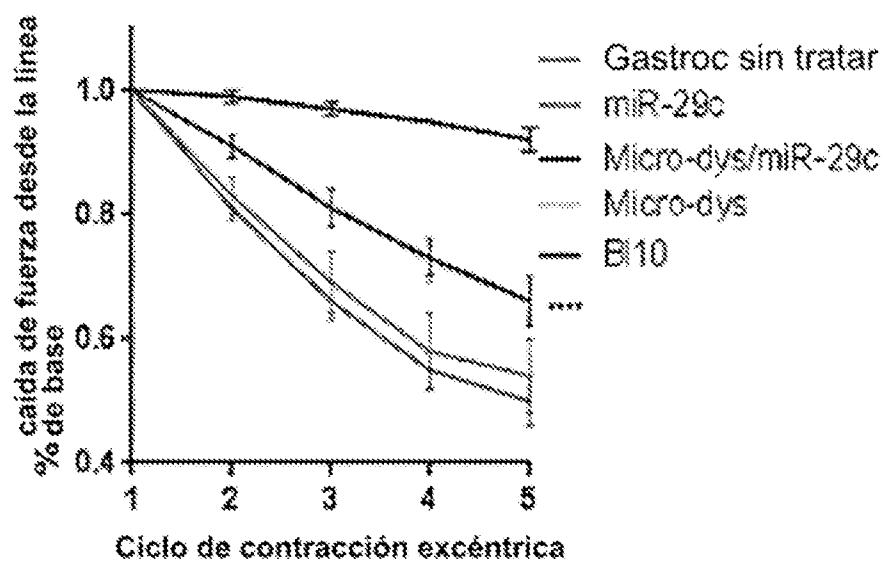
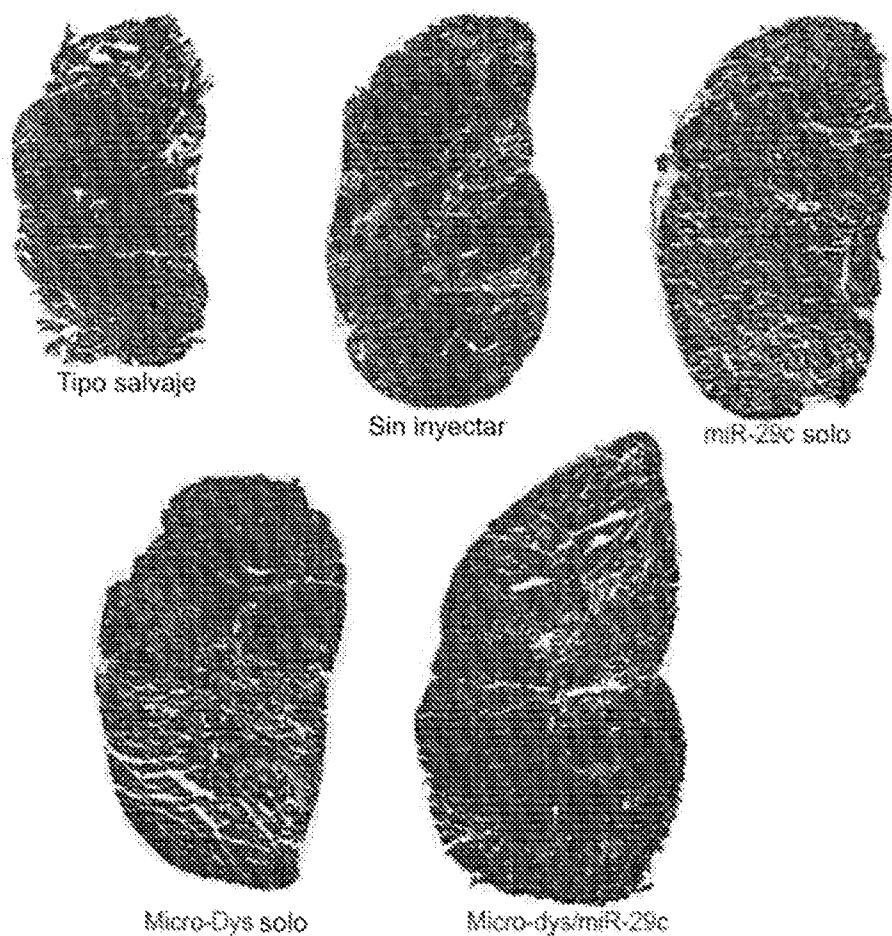
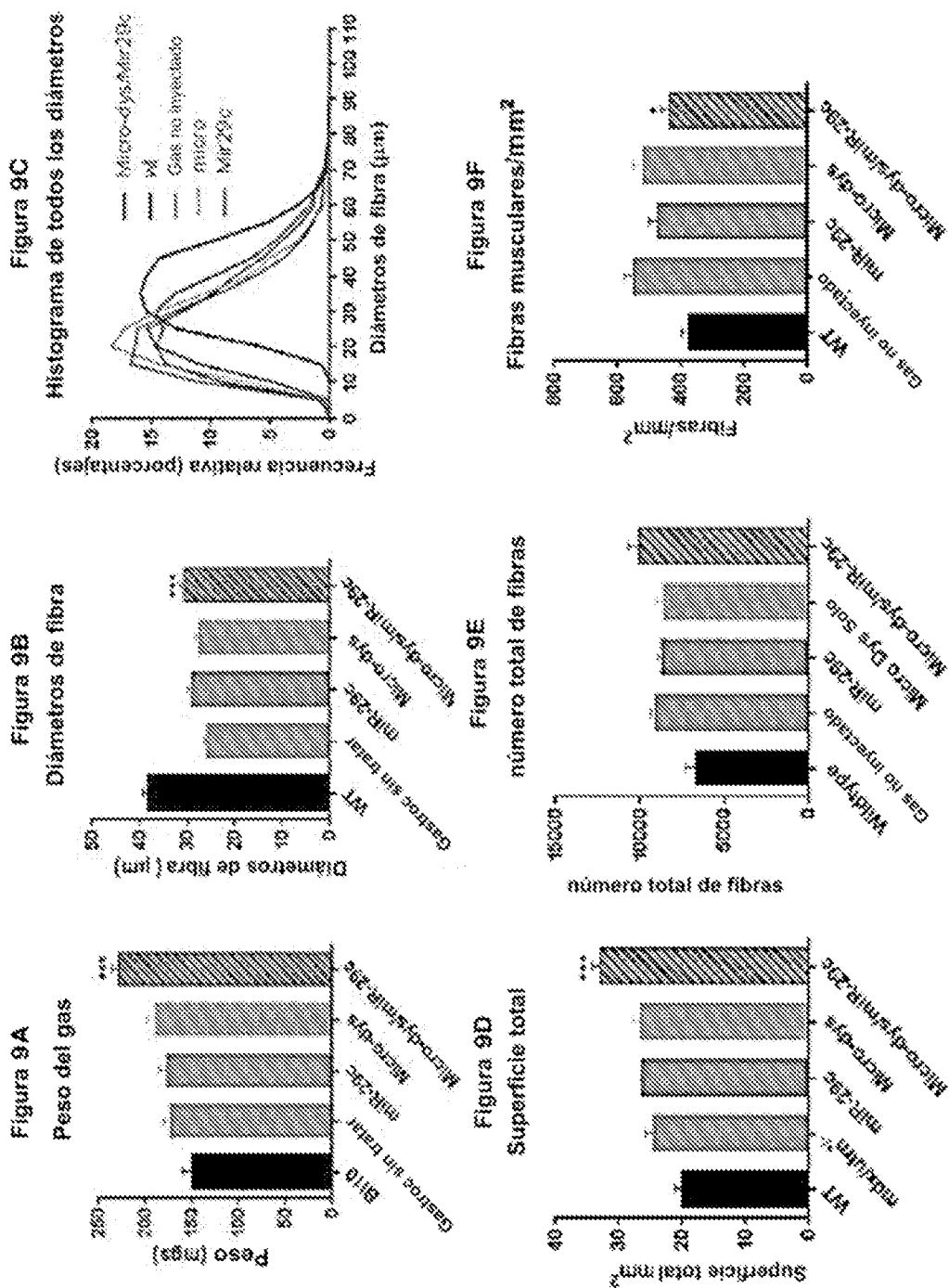


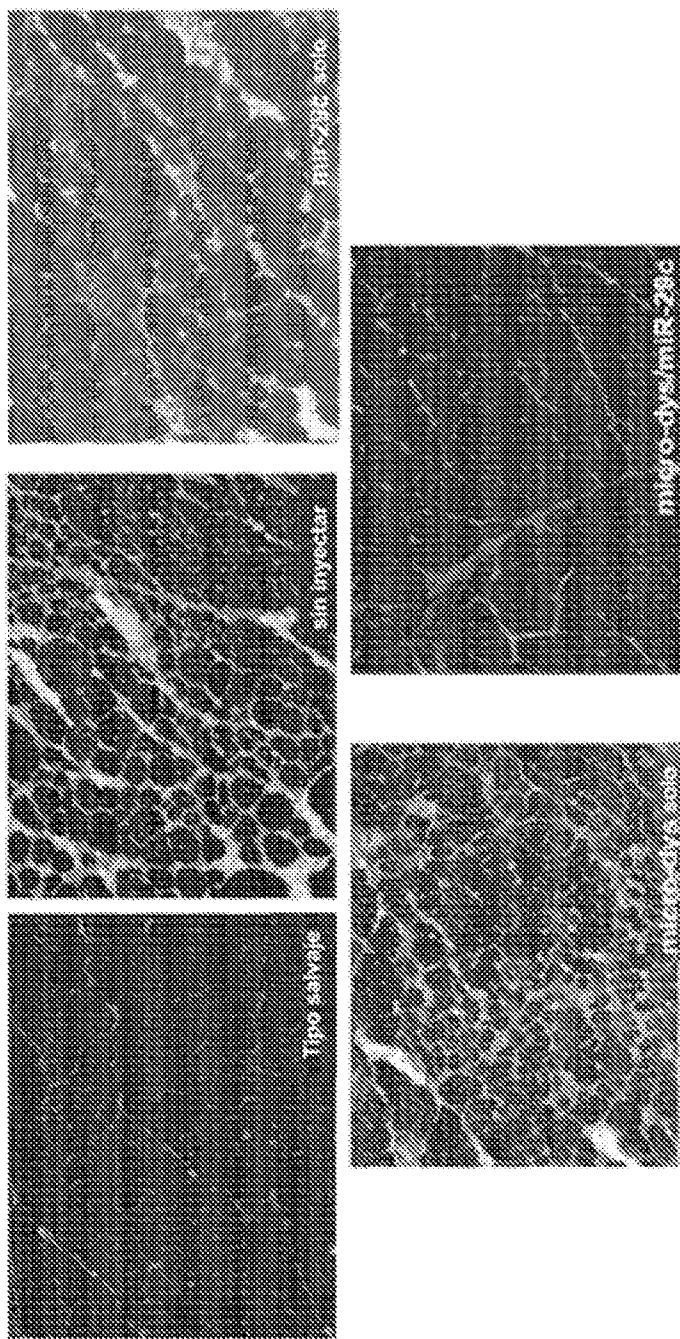
Figura 8

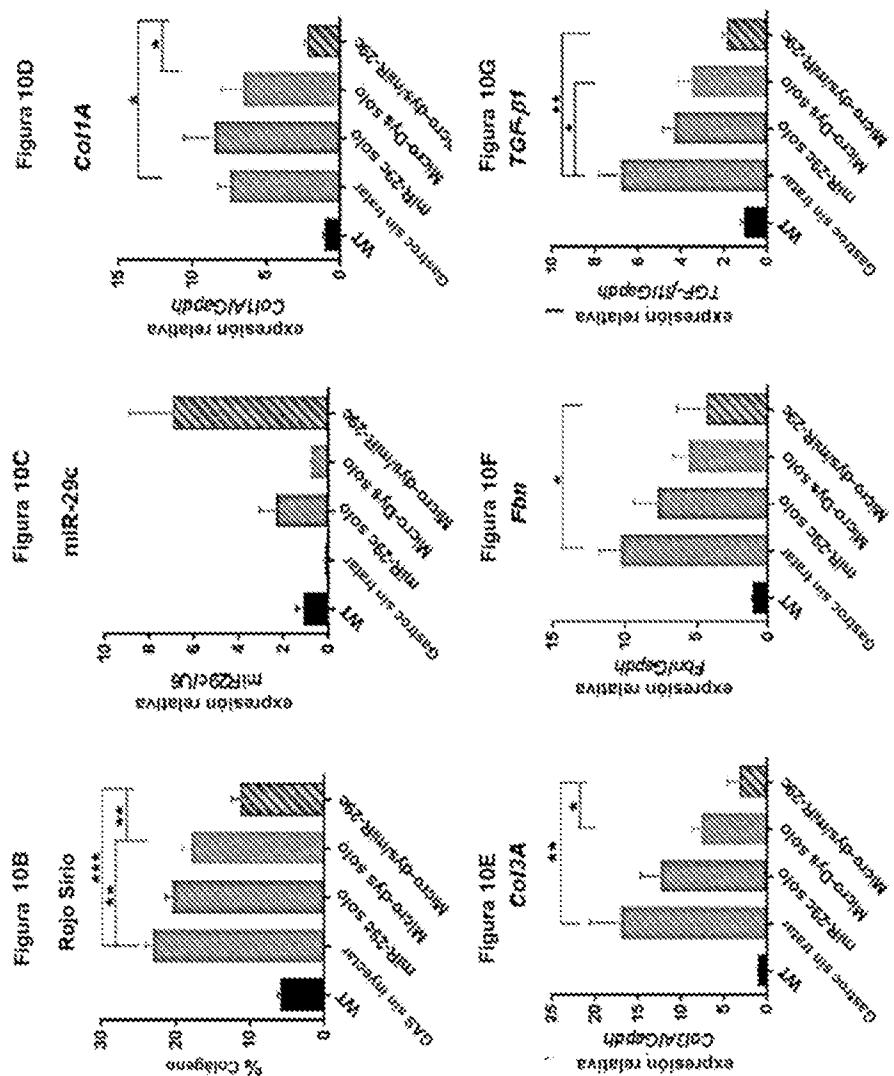




ES 2 985 822 T3

Figura 10A





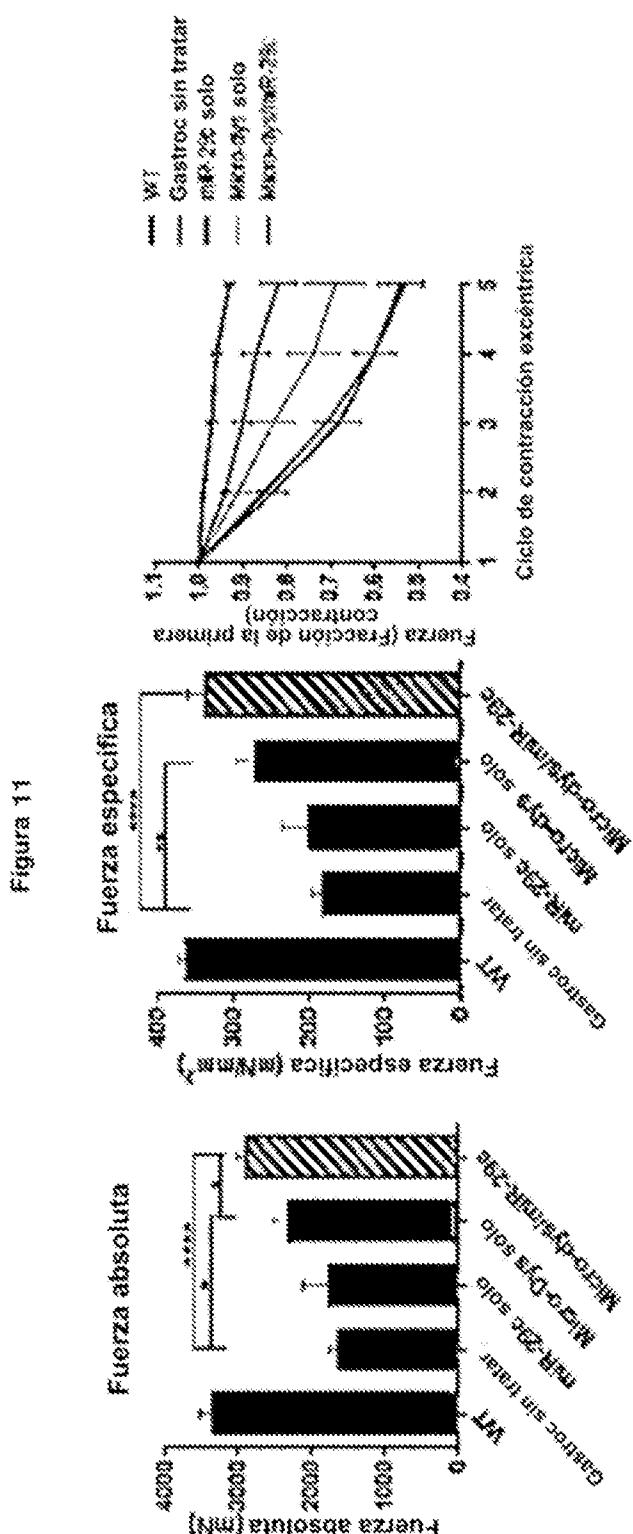
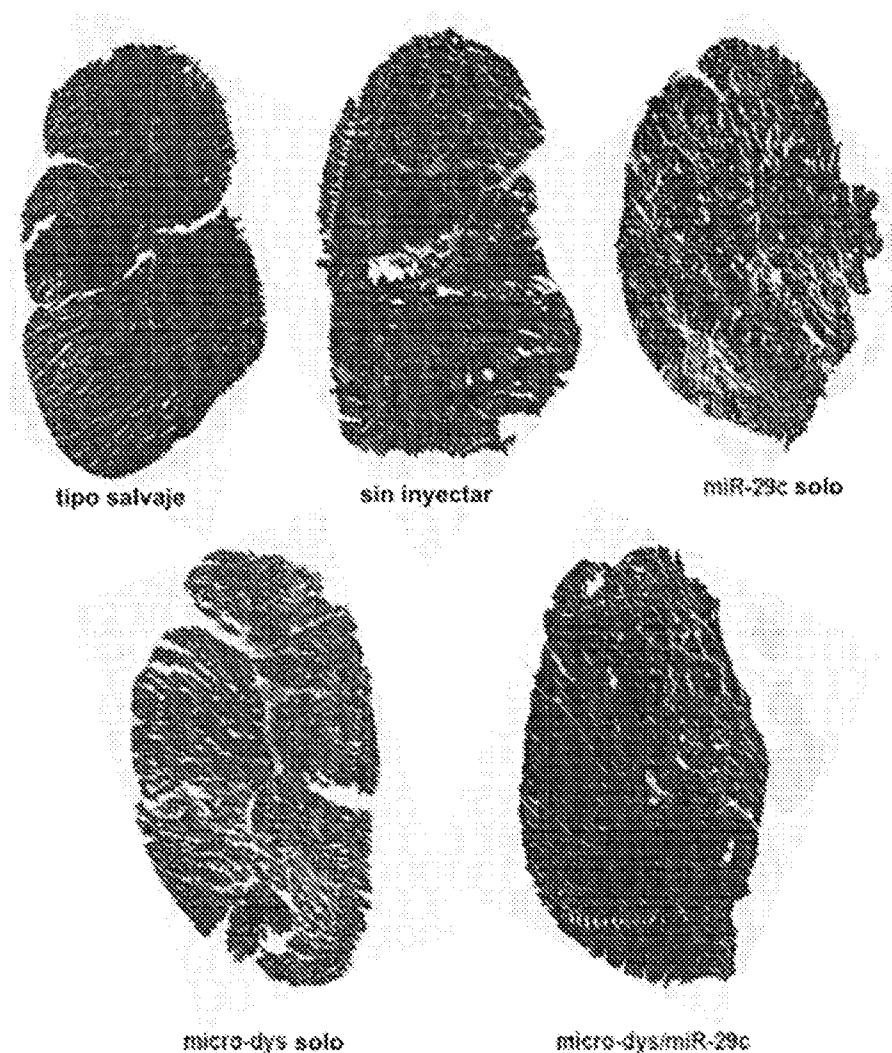
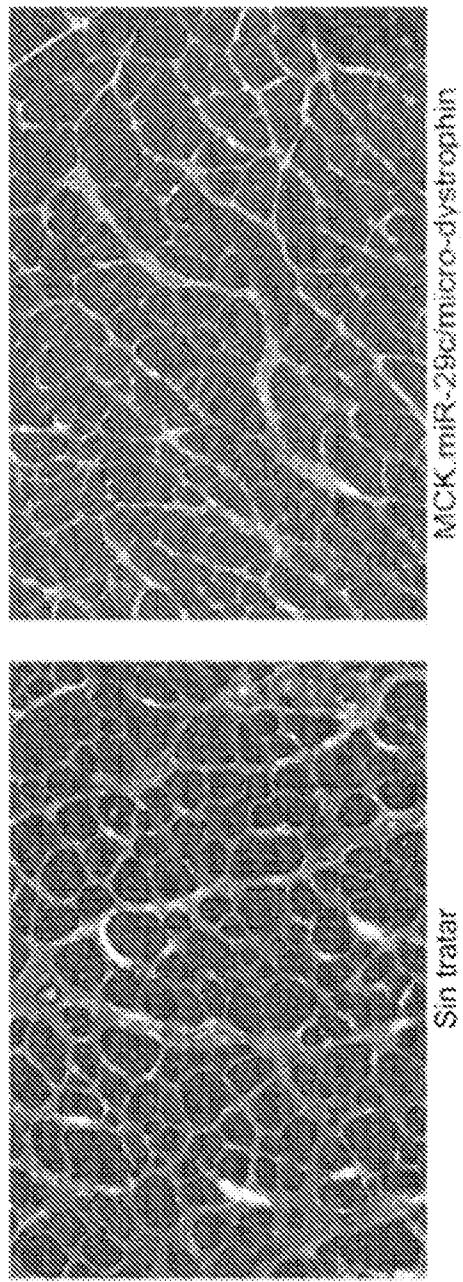


Figura 12

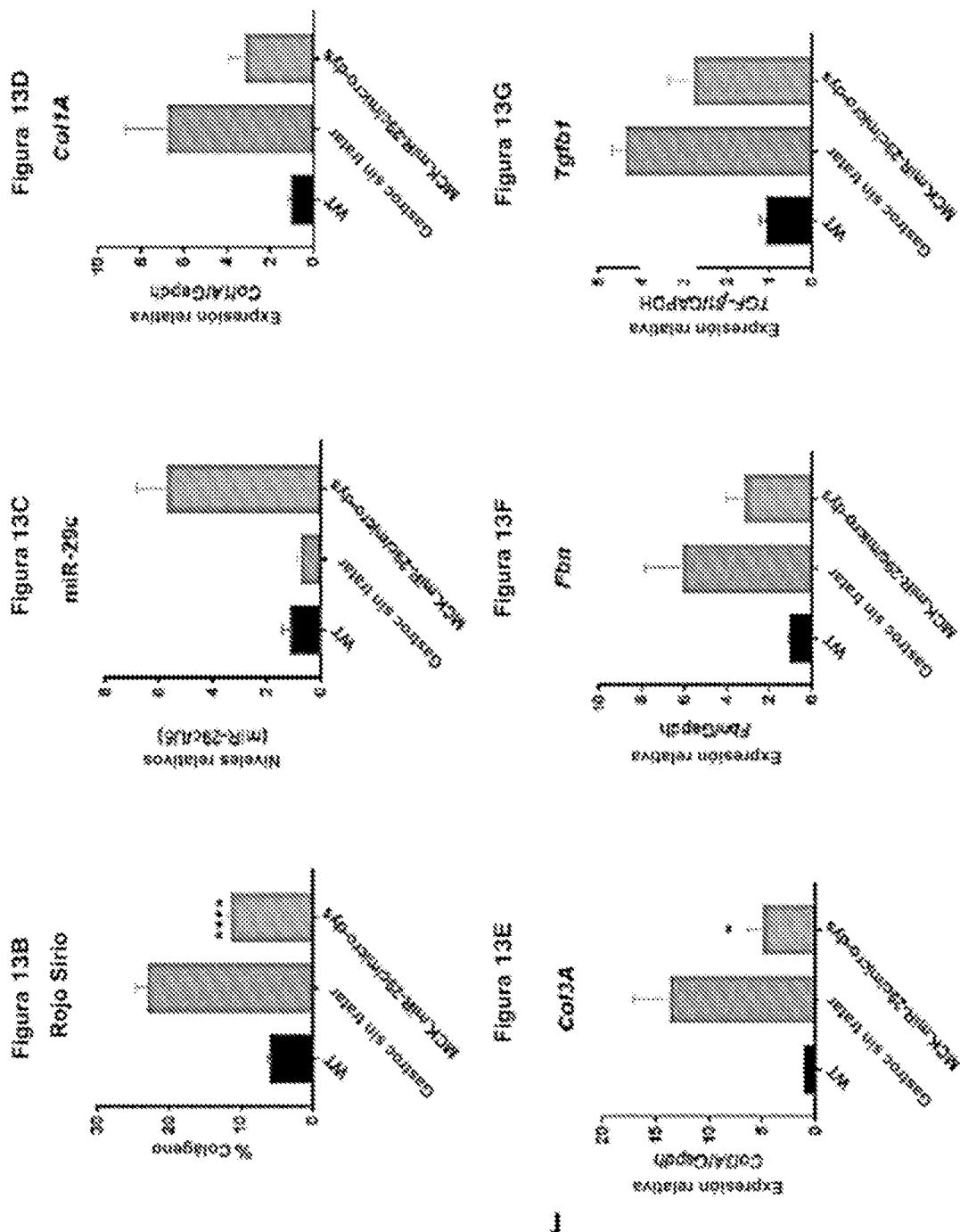


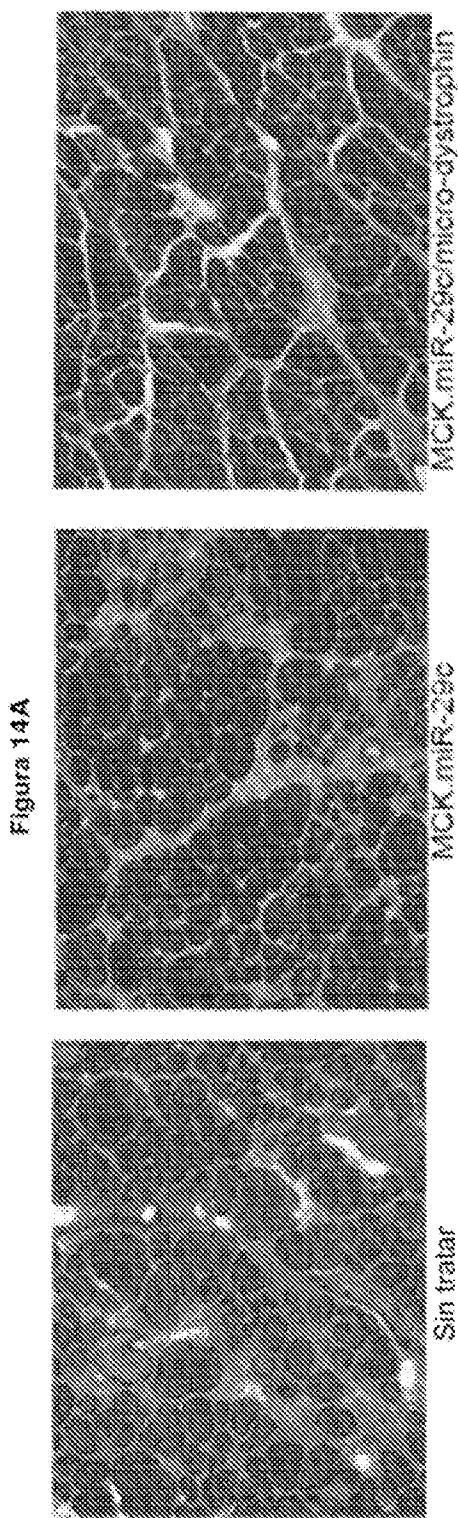
ES 2 985 822 T3

Figura 13a



ES 2 985 822 T3





ES 2 985 822 T3

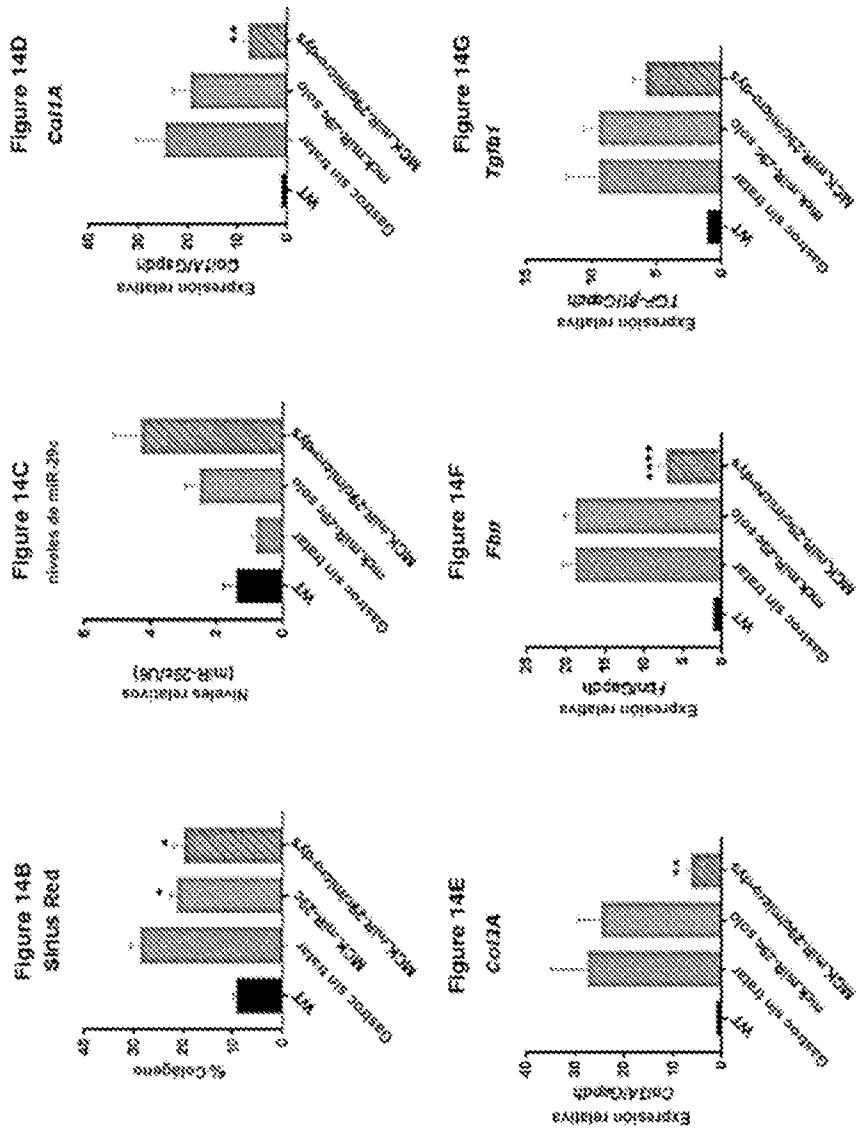


Figura 15A

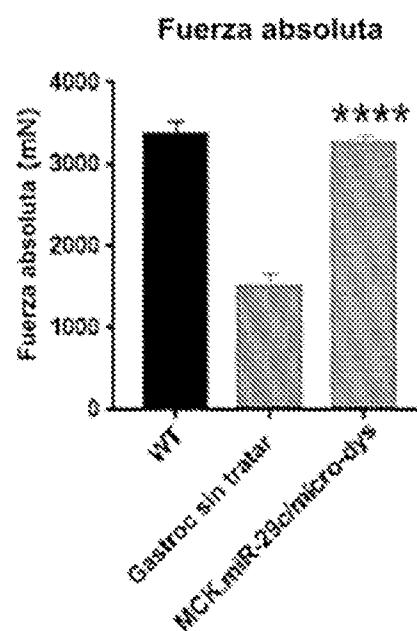


Figura 15B

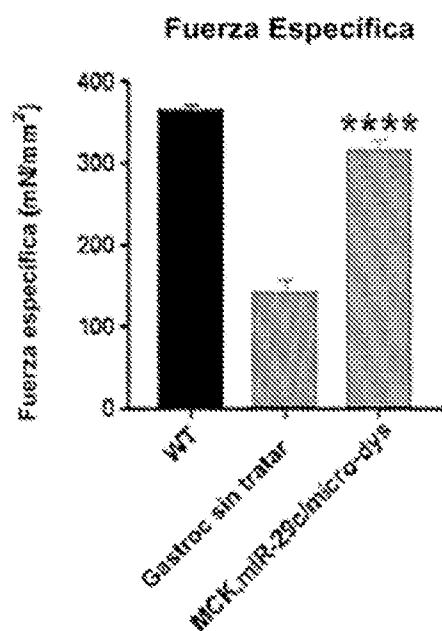


Figura 15C

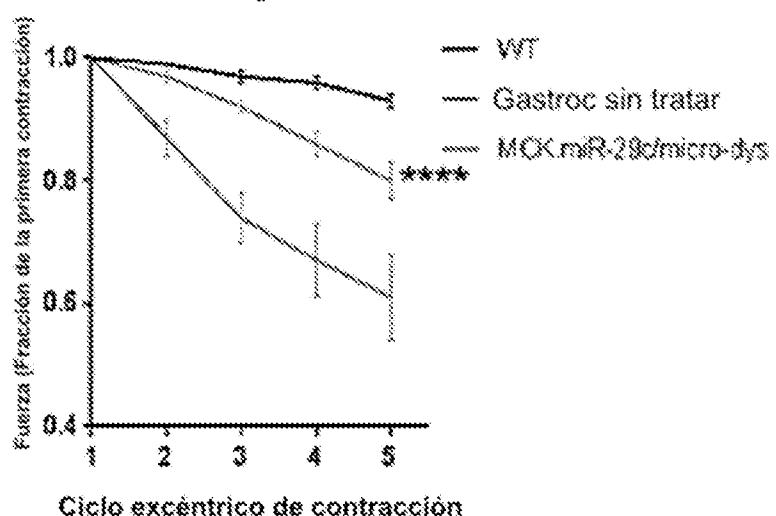


Figura 16A

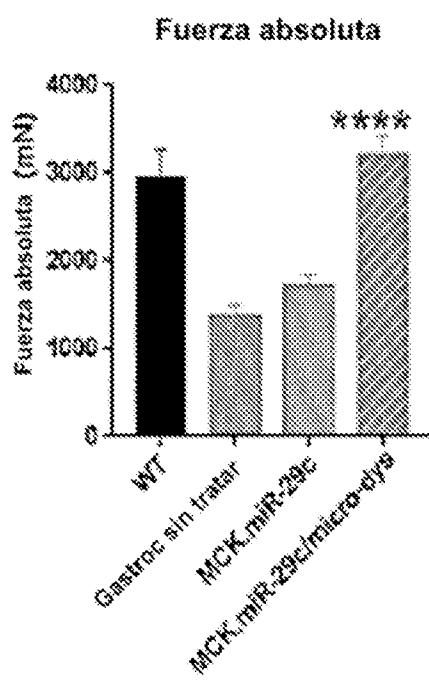


Figura 16B

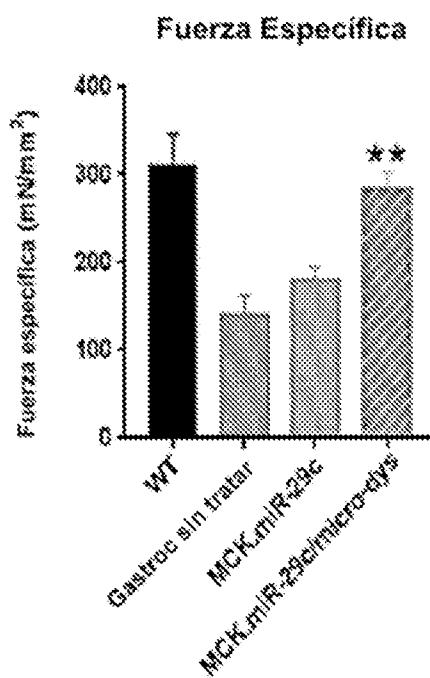


Figura 16C

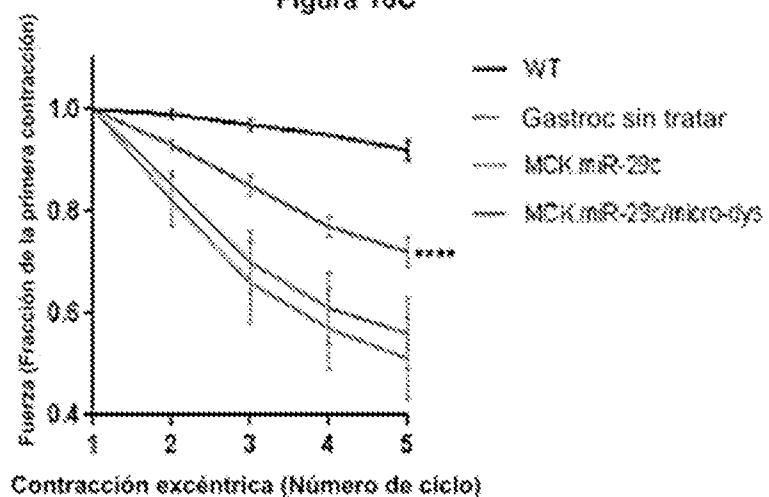


Figura 17A

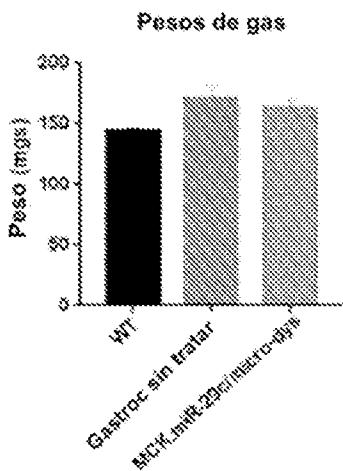


Figura 17B

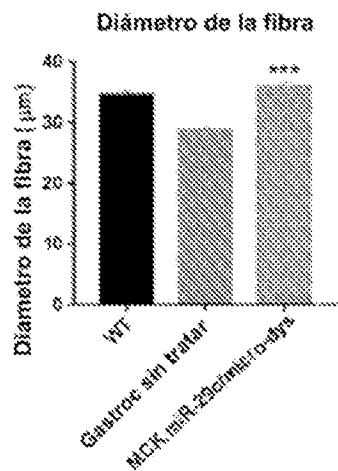


Figura 17C

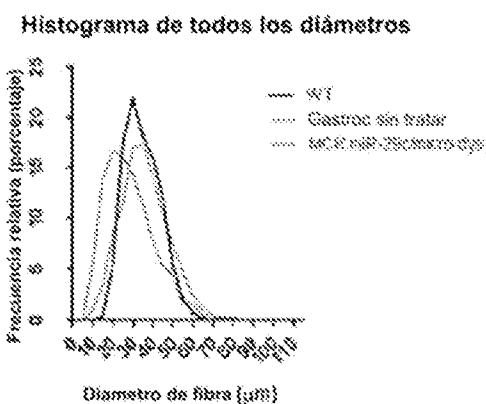
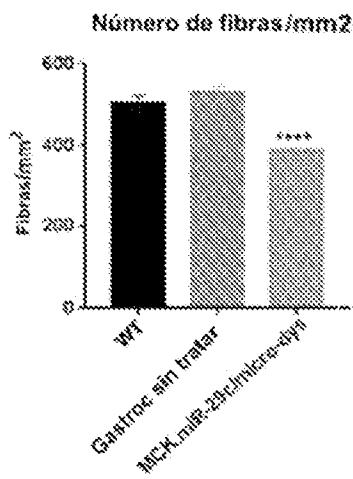


Figura 17D



ES 2 985 822 T3

Figura 18A

pAAV.CMV.miR29C Secuencia (SEQ ID NO: 1)

Características principales:

Promotor CMV-120-526

EE318 Introc-822-1087, 1380-1394

2018-290-1232-1284

chmA-miR29- ζ con secuencia de secuencia primaria - 1088-1375

Babu - 1996-2001

Figura 188

CATAGTACCGCCCTGTAGCGGCCATTAGCGGGCGGGTGTGGGGTTACCGCGCACCGTACACTTG
 CCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCTTGCCTTCCTTCTGCGCGCGCTTCCCGCTAACGCTCT
 AAATCGGGSSCCTTAAAGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTGACCCCCAAAAACTTGATTAGGGAT
 GGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGCGGTTTCGCCCCGGTACGTGGAGTCCACGTTTAAATAGTG
 GACTCTTGTGCAAACGAAACACTCAACCCCTATCGGTCTATTCTTGTATTAAACGGATTTGGCGATT
 CGGGCTATTGGTTAAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAAATTAACGGQAATTAAACAAAATATTAAACSTTACAATT
 TAATAATTTGCTTATACAACTCTCTGTTTGGGGCTTCTGATTATCAACCGGGTACATATGATTGACATGCTA
 GTTTACGATTACCGTTATCGATTCTGTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTGTAGAGACC
 TCTCAAAAATAGCTACCCCTCCGGCATGAATTATCAGCTAGAACCGGTTGAATATCATATTGATGGTATTGACT
 GTCTCCGGCTTCTCACCCGTTGAATCTTACCTACACATTACTCAGGCAATTAAATATGAGGGTTCT
 AAAAATTTTATCTTGCGTTGAAATAAGGCTTCTCCGCAAAGTATTACAGGSETCATAATGTTTGTAGAAC
 CGATTAGCTTATGCTCTGAGGCTTATGCTTAAATTGCTATTCTGCTTGCCTGCTATGATTATGGATGTT
 GGAATTCTGATGCGGTATTCTCTTACGCACTCTGCTTACACCGCATATGGTCACTCTCA-GTACAA
 TCTGCTCTGATGCCCATAGTTAACCGCAGCCCCAACACCGGCTGACGCCCTBACGGGCTTGTCT
 GCTCCCGCATCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTCCGGAGCTGCACTGTCAGAGGTTTACCGCTCATCA
 CGGAACCGCGAGACCGAACAGGGCTCGTGTACGCTTATTTTATAGGTTATGTCATGATATAATGGTTCT
 AGACGTCAGGTTGGCACTTTCGCGGAAATGTCGCGGGACCCCTATTGTTATTTCTAAATACATTCAATATG
 TATCCGCTCATGAGACAAATACCCCTGATAATTCTCAATTATTSMAAAAAGGAAAGTATGAGTATTCAACATT
 TCGGTGCGCCCTTATCCCTTTTGCGGCATTTGCTTCTGTTGCTACCCAGAACCGCTGGTGAAGATCTTGGAGA
 AAGATGCTGAAAGATCAGTTGGGTGCAACGAGCTGCGTACATGAACTGGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCTTGGAGA
 GTTTCCGGGGGAAGAACGTTTCCAAATGATGAGGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTTGGCGGGTATTATCCGTATT
 GACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCCCATACACTATTCTGAAATGACTGGTTGAGTACTCACCAGTCACA
 GAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGACTGATAACACTGCG
 GCCAACTTACCTCTGACAACGATCGGAGGACCGAACGGAGCTAACCGCTTITGCAACAATGCGGGATCATGTA
 ACTCGCTTGTGCGTGGAAACGGGAGCTGAAATGAAAGCCATACCAACGACGAGCGTACACCCAGATGCCGTA
 GCAATGGCAACACGTTGCGCAAACATTAAACTGGCGAAACTACTTACTCTAGCTCCGGCAACAAATTAAAGACT
 GGATGGAGGGGATAAAAGTGCAGGGACCACTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGTTATTGCTGATAAAAT
 CTGGAGCCGCTGAGCTGGCTGGCTCGCGSSTATCTTGTGAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGTATCGTAG
 TTATCTACACGAGGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAAGAAATGAGGATGCTGAGGATAGGTGCTCTACTGA
 TTAAAGCTTGGTAACTGTCAGGCAACTTACTCATATAACTTTAGATTAAACCTCATTAAATTAA
 GGATCTAGGTGAGGATCTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTTGAGGTTTCTGCGGTAACTGCTGCTTCCACTGAGCGCTCA
 GACCCGGTAGAAAAGATCAAAGGATCTCTGAGGATCTTCTGAGGATCTTCTGCGGTAACTGCTGCTTCCACTGAGCGCTCA
 ACCACCGCTACCAACGGTGGTTGTTGGTCTGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTCTGAGGTAACGGCTTCCAGC
 AGAGCGAGATAACAAATACTGTCCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACACTTCAAGAACTCTGTAAGCAACCGC
 CTACATACCTCGCTGCTAATCTGTTACCGACTGCGTGTGCGCAGTGGCGATAAGCTGCTCTTACCGGGTTGG
 CTCAAGACGACTTACCGGATAAGCGCAACGGCGTGGGCTGAAACGGGAGAGCGCACGAGGGAGCTCCAGGGGAAAC
 AGCGAACGACCTACCGGAACTGAGATACTTACAGCGTGGCTATGAGGAAAGGGCCACGCTTCCGAAAGGGAGA
 AAGGGGGAGACGGTATCGGTAAAGCGGCAGGGTGGGAACAGGGAGAGCGCACGAGGGAGCTCCAGGGGAAAC
 GCCTGGTATCTTATAGTCTGTCGGGTTGCGCACCTCTGACTTGAAGCGTGGATTGTTGCTGCTGCTGAGGGGG
 GCGGGAGGCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGCGGCTTTTACGGTCTGGCTTGGCTGGCTTGGCTCACATG
 TTCTTCTGCTGTTATCCCTGATTCTGTTGAGGATAACCGTATTACCGCTTGGAGTGGAGCTGATACCGCTGCCCGAG
 CGGAACGACCGAGCGCACGCGAGTCAGTGAAGCGAGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCCTCCCG
 CGCGTTGGCCGATTCAATTATG

Figura 18

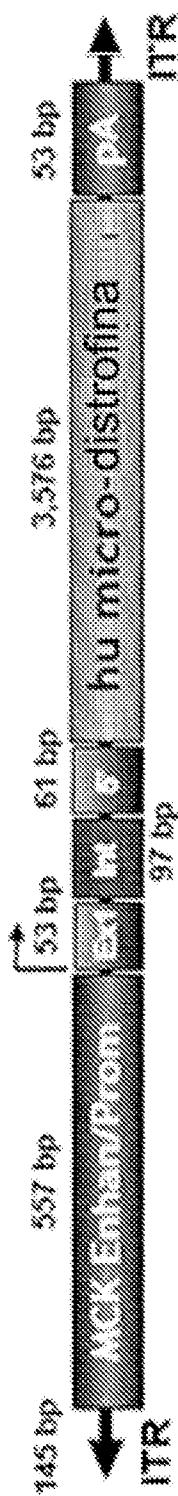


Figura 20ASEQ ID NO: 9

Características principales:

Promotor MCK

Secuencia del intrón quíntérico

Secuencia de micro-distrofina humana

Cola Poly A

Resistencia a la ampicilina

Plásmido pGEX con origen de replicación pBR322

CCCCAATACGCAAACCGCCCTCTCCCCGGCCTTGOCGGATTCAATTAAATGCAGCTGGC
 GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGAAAGGCCGGCGTGGGGACCTTT
 GGTGGCCCGGCGTCAGTGAGCGAGCGAGOGCGCAGAGAGGGAGTGGGAAACTCCAT
 CACTAOGGGTTCTTGTAGTTAATGATTAAACCCGCCATGCTAATTATCTACGTAOGCC
 ATGTCTAGACAGCCACATGGCTAGGCTGCCATGTAAGGAGGCAAGGCCCTGGG
 GACACCCGAGATGCCCTGGTATAATTAAACCCAGACATGTTGGCTGCTCCCCCCCCCA
 ACACCCGCTGCCCTGGCTACCCCCACCCCCCGCTGGCTGGGCTTAGGCTCTGACA
 CCATGGAGGAGAAAGCTCGCTCTAAAAATAAACCTCTGCTGGCTGGCTGGGGGA
 CTGAGGGCAGGCTGTAACAGGCTGGGGGCCAGGGCTTATACTGCTCTGGGACTCC
 CAAAGTATTACGCTCCATGTCCTGGGGAAGGGCCAAGCTGTCCTGGGCAACCCGATA
 CTGAGCAGCTAGTTAGGAACCAGTGAGCAAGTCAGCCCTGGGGCAACCCGATA
 AGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCAAGCCCTGGGGCTGGGGCACGGTGGGG
 GCAACGGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCTGGGGACAGGCCCTCC
 TGGCTACTCACACCCCTGTAAGGCTCTCTATATAACCCAGGGGCCACAGGGCTGGCCC
 CGGGTCAACCAACCTCCACAGCACAGACAGACACTCAGGAGCCAGGCCAGGGT
 AAAGTTAGCTTTTGCTTTTATTCAGGTCCGGATCGGTGGTGGTGGGAAATCAA
 AGAACCTGCTCTAGTGGATGTTGGCTTACTCTCTAGGCCCTGAGGAAGTGTACCT
 CTGCTCTAAAGCTGCGGAATTGTAACCGCGGCCACCATGCTGGTGGGAGG
 AGGIGGGAGGATGTTAAGAAAGGAGGACGCTGAGAAGAAGACCTTACCAAGTGG
 GTGAACGGCTAGCTGCAAAATTGGAAAGCAAGCACATCGAGGAACGCTG
 CTGAGGAGTGGCTGAGAACACAACAAACCTGGAACTGGTGGAAATTTGCAAGTAC
 CTGGAGGCGAAACACAAACCTGACACCTGGCTGAGTCTGGAAACAAATTCTGAC
 CGAGGTGAAAATGIGATGAAGAAGAACATGCGGGGGCTGAGCAGACCAATTGG
 AGAACGATCTGGCTGCTTGGTGGGGCAGAGGCAACCTAACCCAGGGGAAAC
 CTGATTAACCTCACTACATCTGGAGGCGACCGGCTGGGGCTGAAATGCTCTGATC
 AGCCACAGGCCCTGATGTTGAGCTGGAAATAGGCTGGGCTGAGCAGGCTGGCA
 GAGGCCCTGGAAACAATGCCCTCAATAATGGCTGGTACCGAGCTGGGGGATGAA
 AGCTGGGACCCAGAGGAAGGGACACATACCCAGATAAAAAGCTATCTGAG
 AGATTAACGCTGCTTCCAGGCTGGCTGGCAACGCTGGAAATGAAAGGAGG
 AGGIGGGAAATGCTGGGGGGGGGGGGGGAAAGCTGACIAAAAGGAGGAGGATTT
 GAGCTGAGGAGTGGCTTACAGGCCAGGAACTTACCTGAGGCTGGCTGAGG
 GGGCACTTAAAGCTGCTTAAAGCTGCTGGCTGAGCTGAGGCTTAACT

Figura 20B

CCAGGCTGCCAACGGACAACCTAGCGACCCCTACTAGATCCCCCTTCCATCCCAGCA
 CCTTGAGGCCCGAGAGGACAAGAGCTTGGGTCGCCAGCTGATGG
 AAAGCCGAAGCTGAACTCTGGAACTGGTACCCAGACAGCTGGAGGAGGCTGAGGCTGG
 CTGCTTAACTGCTGAAAGACACACTGCAAGCTCAGGCGAAATTCTCAATGACCTGGA
 AGTGGGGAAGGATCACTTCACACACACGGAGGCTATAIGATGGACCTGACAGCTC
 ACCAGGGGCCGGTGGCAATAATCTGCAAGCTGGCTCTAAACTGATGGCACCGGG
 AAACCTGAGGAGGGACAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAAACCTGCTGAGAACA
 GCCCCTGGGAGGTTCTGAGAGCTGCTGAAAGGAAACGAGCTAACCTGCTGACCGGG
 GIGCTTAATGGACCTGAGAACCCAGAAAATGAAAGAGCTGAAAGGACCTGCTGACAAA
 GACCTGAGGAACCTACAGGAAGATGGAGGAGGACCTGAGCTGAAAGGAGCTGAAAG
 GATCTGAAGAGACAGGTGAGCAGCATTAAGTGTCTGAGGAGGATCTGAGAACAG
 ACCAGGTGCTGGGCTGAACTCTGCTGAGCAGCATTAAGTGTCTGAGGAGGACCTG
 GGAGATCACCCCCACCCCTGGAGGAAACAGCTGAAAGGAGCTGCTGGGGGACCGGG
 GCGCAACATTGGGCTGAGGAGCAGGAGGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 TGAAATGGCAAAAGGCTGAGGAGGAGGAGGAGCTGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 AAAGAGGGACGCCGCTGAAAGAAGATGACACACAACCGCTTAAAGGATCAAGAACGAA
 ATCTGCTGAGGCTGAGGAAACCTGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 AGAGCAATGGCAAAACTGCTGAGGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 AAGAGGGGAGACCAGAGAAGACAGAAACCTGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 CAACCTGCTGAGAAACCTGAGAAGATGACGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 CAACCCGACCTAACCCGACCCAGACAAACCTGAGGAGGAGGAGCTGAGGAG
 ACCCCGCAACAGATCCCTGGTGAACACCCAGGAAAGGAGGAGCTGAGGAG
 CCAGAAGAAGAGAACCCCTGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 CTGGACCTAACGGTGGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGG
 GAGCTGCTGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 SCGAATCTGCTGAGGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 CTGAGAACACTGGCAATCCAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGG
 GAAIACCGAGGCTGAGGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 AIGAGGCCCCATGCGACTCTGGGACCCAGGAGGAGCTGAGGAG
 ACGGGGCCCCCTGGGAGGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 AGACCCGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 GCGGAGCTGAGGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAG
 GCTGAGGAGGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAG
 GGAICAGGCTAACCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 ACTGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAG
 GGGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAG
 GCTGAGGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAG
 ATTTGAGGAGGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 ACAGGAGGAGGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAG
 GCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAG
 GGAAGGAGGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGCTGAGGAGGAG

Figura 20C

CCTGCCGCGAAACTGCCAACGACCGCTAAATGCCAACATCTGGAAAGGAATGTGCC
 ATTAICCGGCTTTCGCTACAGGAGCTGAAACATTTAACTACGGAT
 ATTGCGGAGCTCTCTCTCTGGAAAGAGTGGCTAAAGGACACAAGATGCCAATAC
 CCJAIRGIGGGAAATAATGCCAACCTAACATCTGGCTAAAGATGTGCCGATTTCGCC
 AAGGCGCIGAAGAATAAGCTCGGACTAAGGAAGTIACTCTGCCAACGACCCCCCGCAT
 GGKJIACTGCCAGTGCAGAGCTGCTGGAGAGACAAATAAGGAGACCCGATACAA
 XGIGAGCGGCCAATAAAAGAATCTTAACTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTCTTG
 TGTCAGTCAAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCAATGGCGGGTAATCATTAACCTACA
 AGGAACCCCTAGTGTGATGGAGTGGCCACTCCCTCTCTGGCGCTCGTCGCTCACTG
 AGCGAGCGAGCGCOCCAGCTGGCTAATAGCGAACAGGCGCCGACCGATGCCCTT
 CCCAACAGTTGGCAAGCTGAATGGCGAATGGAAGTTCCAGACGATTGAGCGTCAA
 AATGTAAGTATTTCATGAGCGTTTCTCTGTTGCAATGCGTGGCGTAATATGTTIC
 TGGATATTACCAAGCAAGGCCGATAGTTGAGTCTCTACTCAGGCAAGTGTGTTA
 TTACTAATCAAAGAAGTATTGCGACAACGOTTAATTGCGTGTGATGGACAGACTCTT
 TACTCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTCTCAGGATCTCGGTACCGTCTCT
 GTCTAAAATCCCCTTAATCGGCCCTCTGTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAA
 AGCACGTTATACGTCTCGTCAAAGCAACCATACTACCGCCCTGTAGCGGCOCATT
 AACCGCGCGCGCGCGTGTGGTGGTACCGCGACGCGTACACCTGCCAACCGCC
 TAGCGCCCGCTCTTCTGCTTCTCTCTCTGCCCCGCTAACGACGTTACGGCAC
 CTGACCCCCAAAAAACTGATTAGGGTGTGGTACGTAGTGGCCATGCCCTGA
 TAGACGGTTTCTGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGCGACTCTTGT
 TCCAAGCTGAAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCCTTGTATTATAAGGGAT
 TTGCGGATTTCGGCTATGGTTAAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTAAACGC
 GAATTAAACAAATATAACGTTACAATTAAATATTGCTTATACAATCTTCTG
 TTTTGGGCTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTAC
 GATTACCGTTATCGATTCTCTGTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGC
 CTTGTAGAGACCTCTAAAAATAACCTACCGCTCTCCCGCATGATTATCAGCTAGA
 ACGTTGAATATCATATTGATGGTGTGATTGACTGTCTCCGGCTTCTCACCGTTG
 AATCTTACCTACACATTACTCAGGCAATGCTTAAATATATGAGGGTTCTAAAA
 ATTITATCCTTGCGTTGAAATAAAAGGCTCTCCCGAAAAGTATTACAGGGCATA
 ATGTTTGGTACAACCGATTAGCTTATGCTCTGAGGCTTATTGCTTAATTGCT
 AATCTTTCGCTTGCGCTATGATTATGGATGTTGGAAGTCTGATGGGTTATT
 TCTCTTACGCACTCTGCGGTATTACACCGCATATGGCTGCACTCTCAGTACAATC
 TGCTCTGATGCCGATAGTTAACCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACCG
 CCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCGGCATCCGTTACAGACAAGCTGTGACCGCTCC
 GGGAGCTGCTGTCAGAGGTTTACCGTCACTACCGGAAACCGCGGAGACGAAA
 GGGCTCGTGATACGCTATTGTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTCTTAG
 ACGTCAGGTGGCACTTTCGGGAAATGTGCCCGAACCCCTATTGTTTATTCT
 AAATACATTCAAATAATGATGCCGTCATGAGACAATAACCCGATAAAATGCTCAAT
 AATATTGAAAAAGGAAGAGTAAGCTATICAACATTCTGGTGTGCCCTT

Figura 20D

AUCCCTTUTTGCGGCATTTGCCCTGCTTGTGCTACCCAGAAACGCTGCGA
 AACTAAAAGATGCTGAAGATCACTGGGTCGACAGACTGGCTAC
 ATCGAACCTGGATCTCAACASCGGIAAGATCCTTGAGAGCTTCCCCCGAAGAACGT
 TTGCGAATGAGACATTAAAGTCTGCTATGTCGGCGCGTATTATGCTGATATG
 ACGCCCGGGCAAAQAGCAACTCGCTGCCCGCATACACIATTCAGAATGACTTGGTGG
 AGTACTTACCCAGTCACAGAAAAGCATTACCGGATGCCATGACAGTAACAGAAATTA
 TGCAGTGTCTCCATAACCATGAGTGATAACACIOTGCCAACACTTACCTCUCACAACG
 ATCGGAGGACCGAAGGGGCTAACCGGTTTGGCACAACATGGGGATCATGAAAC
 TCCCTTGATGCTGGGAAACCGGAGCTGAATGAAAGCCATACCAAAACGACCGAGCGTGG
 ACACCCAGATGCGTACCAATGCAACACCGTGGGAAACATATAACTGGCGAA
 CTACCTACCTTAACGTTCTGCGAACAAATTAATAGACTGGATGGAGGGCGTAAAGTT
 GCAAGGACCACTTCGCGCTGCGCTTCCCGCTGCGCTGTTATGCTGATAAATCT
 GGAGCCCGGTTAACGGGCGGCTCGCGTACATGGCAGGACCTGGGCGAACAGGIAA
 GCGCTCCGTAATGAGTTACACAGACGGGGAGGTCAGGCAACTATGGATGAACG
 AAATAGACAGATGCTGAGAAAGGCGCICACIGATAAGGATGTTAACTGTCAG
 ACCAAGTTACTCATATATACTTATAGATTGATTAAAACCTCATTTTAAATTAAAAG
 GATCTAGGTGAAGATCTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAGTT
 TTGCTGCCACTGAGGGTCAGACCCCTAGAAAAAGATCAAAGGATCTTGGAGATCC
 TTTTTCCTGCCGTAATCTGCTGCTTGGCAAAACAAAAAAACCACCGCTTACCGGGGT
 GGTGTTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTCCGGAAGGGTAACGGCTTCAG
 CAGAOGCGCAGATACTAAATACCTTCTCTCTAGTGTAGCTGAGGGCGAACACCT
 CAAGAACCTGTAACGACCCGCTAACATACCTCGCTCTGCTAAATGCTGTTACCGGGC
 TGCTGCCAGTOGGGATAAGGGGIGCTAACCGGGTGGGACTCAAGACGAATAGTTAC
 CGATAAGGGCGCACGCTGGCTGGCTGAACCGGGGGTCTGCTGCAACACACCCCTAGCTGG
 AGCGAACGACCTACACCGAACCTGAGATACTAACCGGCTGAGCTATGAGAAAGGGCC
 ACCGCTCCCGAAGGGAGAAAGGGGGACAGGCTAACCGGTAAGGGGGAGGGTCCGGAA
 CAGGAGAGGCGCACCGAGGGAGGCTTCCACGGGGAAACCGGCTGGTATCTTTATAGTOCT
 QTCGGGTTCCACCCCTCTGACTTGAGCTGCTGATTTTGAGATGCTGCTGAGGGGGGG
 CGGAOCCTATGGAAAAGGCCAGCAACGCCGCTTACGGTTCCTGGCTTTCG
 TGGCTTTGCTCACATGTTCTCTGCTGTTATCCCTGATTCTGTTGAGATAACCGTA
 TTACCGGGTTTGAGGTGAGCTGATAACCGCTGCCCGCAGGCCGAACGACCGAGCGCAGC
 GAGTCAGTGAGCGACCAAGGGGAAGAGC

Figura 21A

SEQ ID NO: 7 : gen de la micro-distrofina humana

ATGCTGTGGTGGAGGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGAACGTGCAGAAGA
AGACTTTACCAAGTGCGGTGAACGCTCAGTCAGCAAATTGGAAAGCAGCACATC
GAGAACATCTGTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACCGCTGCTGGATCTGCTGGAAAGG
ACTGACTGCCAGAAGCTGCCAAAGAGAAGGGAGCACTAGGGTGCACGCCCTGA
ACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCAGAACACAACAACGTGGATCTGGTGAAT
ATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCCTGATCTG
GAACATTATCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGCCCGGC
TGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCCTGCTGCTGGGTGCAGGACAGGCACCGGC
AACTATCCCCAOGTGAACGTGATTAACCTCACTACATECTGGAGGGACCGGCGCTGGCC
CTGAATGCTCTGATTACAGCCACAGGCCCTGATCTGTTGACTGGAAATAGCGTGGTG
TGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCTGAAACATGCCTCAATATCCTGGGTACCCAG
CTGGGGATCGAAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACTGGATAA
AAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCAAGGTGCTGCCACAGKAGGTGTC
TATTGAAGCCATTCAAGGAGGTGGAAATGCTGCCCGCCCCCCCCAAAGTGAATAAG
AGGAGCATTTCAGCTOCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGCC
TOGCTCAGGGATATGAGCCCACCACTAGTCCA AAAACCACGGTCAAGTCTACGCTT
ATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACTAGCGACCCCTACTAGATECCCCCTTCCATCCC
AGCACCTGGAGGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTGGGTCCAAGCTGATGAAAGCGAG
GTGAATCTGGATCGTACCAAGACAGCCCTGGAGGGAGGTGCTGAGCTGGCTGCTGAG
TGCTGAAGACACACTGCAGGCCAGGGCGAAATTCCAATGACGTGGAAAGTGGTGA
AGGATCAGTICCACACACACGAGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCACCAGGGG
CGCGTGGCAATATCTGCAAGCTGCTGGCTCTAAACCTGATGGCACCGGGAAACTGAG
TGAGGACGGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGGAGATGAAACCTGCTGAACAGCCGCTGG
GAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCCGGTGTGAT
GGACCTGCAAGAACAGAAAAGTGAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAGACTGAG
GAACCGCACAAOGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGGATCTGA
AGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAAGGAGGATCTGGAACAGGAGCAGGT
GGGGTGAACTOCCTGACACATATGGTGGT

Figura 21B

CGTGGTGGACGAATCTAGTOGAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGA
AGGTCTGGGGACCGGTGGCCAACATTTCCTGCTGAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGACAGTGGGTG
CTGCTGCAGGACATCCTGCTGAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGACAGTGTCTGTT
ATIGCTTGGCTGAGCGAGAAAGAGGACGCCCTGAAACAANGATCCACACAACCGCTT
TAAGGATCAGAACGAAAATGCTGCTAOCCTGCAGAAACTGCTGTGCTGAAGGCCG
ATCTGGAGAAAAAGAACGAGACATGCGCAAACCTGTATAOCCTGAAACAGGACCTG
CTGAGCACCCCTGAAGAACAAAGAGCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATA
ACTTTGCCCGCTGCTGGACAACCTGGCTGAGAAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAG
ATCTCTCAAGGCTGTGACCACAACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAAACCGTGATGGA
AACCGTGACCACCGTGACAACCCGGAAACAGATCTGGCTGAAACATGCCAGGAAG
AGCTGCCACCTCCACCTCCCAGAAGAACAGAGAACCTGGAGCGGCTGAGGAGCTG
CAGGAAGCCACTGACGAACCTGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGG
GTCCTGGCAGCCTGTCGGCGATCTGCTGATTGATTCCTGCAAGGACXACCTGGAAAAA
GGTGAAGGCTCTGAGAOGCGAAATTGCTCCACTGAAAGGAGAACGTGAGTCATGTGA
ACGATCTGGCTAGACACGCTGACAACACTGGCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTG
AGCACACACTGGAGGACCTGAATACCAGGTGGAAAGCTGCTGAGGTGGCTGTGAGAAGA
CCGGGTGCGGCAGCTGCATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCACCT
TTCTGAGCACATCCGTGCAAGGGGCCCTGGAGAGGGGCCATTTCCTCCAAACAAGTG
CCCTACTATATTAATCACGAGACCCAGACCACTTGTGCGACCATCCAAAGATGACA
GAACTGTACCACTCCCTGGCGATCTGAAACAACGTGAGGTTAGCGCTTACAGAAC
GCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAACGCCCTGCGCTGGATCTGCTGCTGCTG
GCCGCCCTGGATGCCCTGGATCTGAGCATAATCTGAAAGCAGAACGATCAAGCCAAATGGA
TATCTGAGATCATCAACTGCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGC
ACAACAAACCTGGTGAACGTGCTCTGTCGCTGAGTATGTGCTGAACTGGCTGCTGA
ACGTGTATGACACTGGCGACCGGCCGGATCAGAGTGTGAGGTTAAACTGGG
ATTATCTCCCTGTGTAAGGCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGCTGCTG
GTGCGTAGTACGACTGGATTGTGACCAAGCGGCCCTGGACTGCTGCTGCTG
AGTATCCAGATTCCTAGACAGCTGCGAGAGG

Figura 21C

TGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCAGCTGTTCCAGTTG
CCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCTGGATTGGATGCOCCTGGAAC
CACAGAGCATGGTGTGGCTGCCCTGCTGCTCACAGAGTGGCTGCCGCCGAAACTGCC
AACCAACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCCATTATCGGCTTTGCTAC
AGGAGTCTGAAACATTAACTACGATATTGCCAGAGCTGCTTCTTTCCCGAAGA
GTGGCAAAGGACACAAGATGCACTACCCCTATGGTOGAATATTGCACCCAACTAC
ATCTGGCGAAGATGTOCGCGATTGGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTAA
GAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGGATGGGTATCTGCCAGTOGAGACAGTGCTGG
AAGGAGACAATATGGAGACCGATAACAATGTGAOC

Figura 22A

pAAV.MCK.miR29C Secuencia(SEQ ID NO: 12)**Características principales:****Promotor MCK- 180-395 (SEQ ID NO: 10)****Promotor MCK- 395-753 (SEQ ID NO: 11)****IF1a Intron- 1155-1315, 1609-2083****miR-29c-1482-1512****shRNA-miR29c gene secuencia de siembra primaria - 1316-1608****SV40 PolyA- 2094-2146**

CTGNNNNNNNGCGCGCTCGCTCGCTACTGAGGCCGCCGGGCAAAAGCCCCGGCGTC
 GGGCGACCTTITGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGCGAGAGAGGGAGTG
 GCCAACCTCCATCACTAGGGTTCTGTAGTTAATGATTAAACCCGCCATGCTAATT
 TCTACGTAGCCATGTCTAGACAGCCACTATGGGCTTAGGCTGCCATGTAAGGAGGC
 AAAGGCTTGGGGACACCCGAGATGCCCTGGTATAATTAAACCCAGACATGTGGCIGCIC
 CCCCCCCCCCAACACCTGCTGCTGAGCCCACCCCCACCCCGTGGCTGGCTTAA
 GCCTCTGACACCATGGAGGAGAAGCTGGCTCTAAAAATAACCCCTGCTCCCTGGGCG
 TGTGGGGACTGAGGGCAGGGCTGTAACAGGGCTTGGGGGCCAGGGCTTACGTGCG
 TGGACTCCCCAAAGTATTAACTGTTCCATGTTCCGGCGAAGGGGCCAGCTGCCCCCG
 CCAOCTAGACTCAACCACTTACGTTAGGAACCAGTGAAGTCAGCCCTTGGGCGA
 CCCATACAAGGCCATGGGGCTGGCAAGCTCACGCCCTGGCTGGGCTGGGCGAC
 GGTCGCCGGCAACGAACTGAAAGCTCATCTGCTCTCACAGGACAGACACTCAAGGAGCCAG
 CCAGCCAGGTAAAGTTAGTCCTTCTGCTCTTATTCAAGGTCCCAGATCCGGTGGTGG
 TGCAAATCAAAGAAACTGCTCTCACTGGATGTTGCCCTTACTTCAGGCCCTGTACCG
 AAGTGTACTCTGCTCTAAAGCTGGGAATTGTAACCCGCCAGAGGATCCCGTAC
 TCGAGGAACGTAAAAACAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTACTCTTCTGCTCTTAT
 TTCAAGGTCCCAGATCCGGTGGTGGTGCCTAAAGAAACTGCTCTCACTGGATGTT
 GCTTTACTCTAGGCCCTGTAACGGAAGTGTACTCTGCTCTAAAGCTGCCGATT
 GTACCCGGGCGCCGATCCACCGGTCTTTTCCOCAACGGGTTGGCCAGAACACAGG
 TAAGTCCGGTGTGTGGTCCCGCGGGCGCGAACGGGCGCCGTCGGCTCCAGGGCAC
 ATGTCGGCGAGGGCGGGGCTGGCGAGCGCGGCCACGGAGAACGGACGGGGTAGT
 CTCAAGCTGGCCGCCCTGTTGAATGAGGCTCAGTACTTACAGAAATGTTGCC
 CACATCTGGAAACACTCTGGATTACTCTCTCAGGTTAACCCAAACAGAAAGCTC
 GAGAAGGTATACTGCTGTGACAGTGAACCGCAACCGATTCAAAATGGTGTAGAGT
 GAAACCCACAGAACTCTGACCATTTAAACGGCTAACGCTACTGCCCTGGAAATTC
 AAAGGGCTACTTAAAGGAGCAATTACTCTGTTACTAAAACGAAATACCTTGCTATCT
 CTTGATACATGCGCCGCCCTGGCTCTGGCTGGCTGGCCCTGCCGCCGTCGATGCC
 CGGGCTTCCCGGCCCTGGCTGCAAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCCGCCGTCGGGAG
 ACGGGGGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCTTCCGCTCAGGCCGTC
 GCTTCATGTACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCAGGCAACCTCGATTAGTT

Figura 22B

CTCGAGCTTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTGGGGGGAGGGGTTTATGCGATGGAA
 GTTCCCCCACACTGACTGGTGGAGACTGAAGTTAOGCCAGCTGGCACCTGATGTA
 ATTCCTCTGGATTGCCCCTTTTGAGTTGGATCTGGTICATCTCAAGCCCTAG
 ACAGTGGTICAAGTTTCTTCCATTCAAGGIGTCUTGAAAAGCTAGTOCGGC
 GCAATAAAAGATCTTATTTTCAATTAGATCTGIGIGTGGTTTGGTGTCTAGAC
 ATGGCTACGTAGATAATTAGCATGGCGGTTAACATTAACATAAGGAACCCCTAG
 TGATGGAGTGGCCACCTCCCTCTCGCGGCTCGCTCGCTCACAGAGGCCGGCGAC
 CAAAGTCGCCGACGCCCGOCTTCCCCGOCGOCCTCACTGAGCGAGCGAGCG
 CGCN>NNNNCAGCTGGCTAATAGCGAAGAGGCCGCACCGATGCCCTCCAAAC
 AGTTGCCAGCCTGAATGCCGAATGAAAGTTCCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTA
 GGTATTCCATGAGCGTTTCTCTGTTGCAATGGCTGGCGTAATATTGTTCTGGATA
 TTACCAAGGCCGATAGTTGAGTTCTACTCAGGCAAGTGTGATGTTATTACTA
 ATCAAAGAAGTATTGCCACAACGGTTAATTGCGTGAATGGACAGACTCTTACTCG
 GTGGCTCACTGATTATAAAAACACTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCTGTCTA
 AAATCCCTTAATCGGCCCTCTGTTAGCTCCCGCTGTGATTCTAACGAGGAAAGCA
 CGTTATACTGCTCGTCAAAGCAACCCATAGTACGCCCGCTGTAGCGGCCGATTAAGC
 CGGCCGGGTGTGGTTACGCCGACCGCTACACTGCCAGGCCCGTAGC
 CCCGCTCCCTTCCGCTTCTCCCTTCTCGCCACGTTGCCCGCTTCCCCGTC
 AAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTAGGGTCTGATTAGTGAATTACGGCACCTCG
 ACCCCAAAAAAACTGATTAGGGTGAATGGTCACTGAGTGGCCATGCCCTGATAGA
 CGGTTTCCGCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTGTTCCA
 AACTGGAACAACACTCAACCTATCTGGCTCTTCTTGTGATTATAAGGGATTG
 CCGATTTCGGCTATTGGTAAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAATTAAACGCGAAT
 TTAAACAAAATTAAACGTTACAATTAAATTGCTTATACAATCTCCCTGTTT
 TGGGCTTCTGATTATCAACCGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTACGATT
 ACCGTTCTGATCTCTGTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTT
 GTAGAGACCTCTAAAAAATAGTACCCCTCTCCGGCATGAAATTATCAGCTAGAACGG
 TTGAATATCATATIGATGGTGAATTGACTGTCCTCCGCTTCTCACCGTTGAAATC
 TTACCTACACATTACTCAOGCATTGCAATTAAATATATGAGGGTCTAAAAAATT
 TATCTTCCGTTGAAATAAAGGCTCTCCCGCAAAAGTATTACACGGCTATAATGTT
 TTGGTACAACCGATTAGCTTATGCTCTGAGGCTTATTGCTTAATTGCTAATT
 CTTCGCTTGCCTGCTGATGATTGAGGCTTACACCCGATATGGTCACTCTCAGTACAATCTGCT
 CTGATGCCOCATAGTTAACGCCAGGCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCC
 GACGGGCTTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTCCGGGA
 CCTGCTAGTGTCAAGGGTTTACCGTCACTACCGAAACGCCGAGACGAAAGGGC
 CTGCTGATACGCCATTGTTAGGTTAATGTCAGATAATAATGGTTCTAGACGT
 CAGGTGGCACTTTGGGGAAATGTCGCCGGAACCCCTATTGTTTATTTCTAAAT
 ACATTCAAATATGATGCCCTCATGAGACAATAACCCGATAAAATGCTTCAATAATA
 TTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTCCGTTGTCGCCCTTATTCCTTTT
 CGGCCATTGCTTCTGTTTGTCAACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGTAAAGAT
 OCTGAAGATCACTGGGTGACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
 TAAGATCTTGAGAGTTTCCCGGAAGAACGTT

Figura 22C

TTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCCTATGTGGCCGGTATTATCCCCTATTGA
 CGCGGGCAAGAGCAACTCGTCGGCATACACTATTCAGAATGACTTGGTTGA
 GTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT
 GCAGTGCTGCCATAACCCTGAGTGTATAACACTGGGCCACTTACTTCTGACAACGA
 TCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGACAAACATGGGGATCATGTAACCTC
 GCCTTGATCTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAAACGACGAGCGTGCAC
 ACCACGATGCCCTGAGCAATGGCAACAACGTTGCCCAAACATTAACTGGCGAACT
 ACTTACTCTAGCTTCCGGCAACAATTAAATAGACTGGATGGAGGGGATAAAGTGC
 AGGACCACTCTGGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATIGCTGATAAAATCTGG
 AGCGGGTAGCGTGGGCTCGCGGTATCTGCAAGCACTGGGCCAGATGTAAGC
 CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAACGA
 AATAGACAGATCGCTGAGATAGGGCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACGTCAGAC
 CAAGTTACTCATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTITTAATTTAAAGGA
 TCTAGGTGAAGATCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTC
 GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCCGAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCTT
 TTTCTGCCGTAATCTGCTGCTGCAAACAAAAACACCGCTACCGCGGTGGT
 TTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTCTGGAAAGCTAACGCTTACCGCAG
 AGCGCAGATACCAAATACTGCTCTAGTGAGCGTAGTTAGGCCACCACTCAA
 GAACTCTGAGCACCGCGTACATACCTCGCTCTGTTAACCGGTTGGACTCAAGAGGATAGTTACCGGA
 TAAGGCCAGCGCGTGGCTGAACGGGGGGTCTGCGTACACACAGCCAGCTGGAGC
 GAACGACCTACACCGAAGTGGAGATAACCTACAGCGTGGACTATGAGAAAGGCCACCG
 CTICCCGAAGGGAGAAAGGGGGACAGGTATCCGGTAAGCGCGAGGGTCCGAACAG
 GAGAGCGCACCGAGGGAGCTTCCAGGGGAACCGCTGCTATCTTATAGCTCTGTC
 GGGTTTCCACCTCTGACTTGAGCGTCTGATTTTGTGATGCTCTGCAAGGGGGCG
 AGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCCCTTTAACGGTCTGGCTTTGCTGG
 CCTTTGCTCACATGTTCTCTGCGTTATCCCTGATCTGTTGATAACCGTATTAC
 CGGTTTGGTGAAGCTGATAACCGCTCCCGCAAGCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
 CAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC