

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 876 422**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86	(2006.01)	A61P 43/00	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)		
C12N 15/113	(2010.01)		
A61K 48/00	(2006.01)		
C12N 9/16	(2006.01)		
C12N 9/64	(2006.01)		
A61K 38/46	(2006.01)		
A61K 38/48	(2006.01)		
A61P 21/00	(2006.01)		
A61P 25/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2014** **E 18182802 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.06.2021** **EP 3404106**

54 Título: **Sistema de expresión para una terapia genética selectiva**

30 Prioridad:

11.04.2013 FR 1353306

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2021

73 Titular/es:

GENETHON (50.0%)
1 bis rue de l'Internationale Boîte Postale 60
91002 Evry Cedex, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)

72 Inventor/es:

BUJ BELLO, ANA MARIA y
RICHARD, ISABELLE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 876 422 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

Sistema de expresión para una terapia genética selectiva

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a la terapia genética, en particular, al tratamiento de enfermedades que afectan a los músculos esqueléticos.

10 En este contexto, se describe un sistema de expresión que comprende un transgén que codifica la calpaína 3, que permitirá asegurar la producción de una cantidad terapéuticamente eficaz de la misma a nivel de los músculos esqueléticos, y de una cantidad tóxicamente aceptable de la misma a nivel del corazón.

15 Estado anterior de la técnica

La cuestión del tratamiento de las patologías musculares sigue siendo crucial. La transferencia de genes, en particular con la ayuda de vectores obtenidos a partir de virus asociados a los adenovirus que resultan ser herramientas particularmente adecuadas para la transfección muscular, constituye una estrategia particularmente prometedora. Se trata de administrar al sujeto enfermo una copia del gen intacto, destinado a la producción de una proteína funcional que compensa la proteína mutada e inactiva producida por el sujeto.

20 En el caso de las patologías musculares, la administración se puede realizar mediante inyección local, a nivel muscular, del vector que porta el transgén. Sin embargo, a nivel clínico, una administración sistémica es preferente, lo que implica que el transgén se pueda volver a encontrar a nivel de los diferentes tejidos del organismo.

25 De una manera convencional, el transgén se coloca bajo el control de secuencias reguladoras que gobiernan su expresión, en particular con respecto al nivel de expresión o la especificidad tisular de la expresión. Por lo tanto y en el caso de la terapia genética de una enfermedad muscular, puede ser preferente un promotor que gobierne una expresión de forma más específica en el músculo. A modo de ejemplo, se ha desarrollado un promotor sintético C5-12, bien conocido por el experto en la materia, que se supone que favorece la expresión de los genes al nivel de los músculos.

30 Sin embargo, existe una necesidad evidente de desarrollar nuevas herramientas de terapia genética que permitan el tratamiento de las enfermedades neuromusculares, lo que conduce a la producción de cantidades eficaces de proteína al nivel de los tejidos diana lo que permite compensar la falta de actividad de las proteínas mutadas, y que además no sean peligrosos para los pacientes tratados.

35 En relación con la calpaína 3, Richard I. et al. (Myology 2011, 4º International Congress of Myology, pág. 119) informaron de la toxicidad cardíaca de los vectores AAV recombinantes administrados por vía intravenosa y desarrollaron nuevos AAV con expresión restringida al músculo esquelético, lo que permite evitar esta toxicidad cardíaca.

40 Xie J. et al (2011, Molecular Therapy, 19(3), págs. 526-35) informaron de que los vectores AAV9 recombinantes podían "desdirigirse" del corazón insertando secuencias diana de un miR expresado en este tejido.

45 Objeto de la invención

La presente solicitud se basa en la puesta de manifiesto, por los inventores, de que después de la administración sistémica, un sistema de expresión destinado a la producción de la proteína de interés al nivel de un tejido diana, de forma ventajosa los músculos esqueléticos, puede comprender de manera simultánea una expresión al nivel de los otros tejidos y órganos potencialmente tóxica, haciendo que el sistema no sea adecuado para un uso terapéutico.

50 Se describen soluciones técnicas para este problema recientemente identificado, que se refieren en particular a las filtraciones cardíacas relacionadas con la expresión de un transgén con enfoque muscular esquelético.

55 Más ampliamente, se trata, por lo tanto, para un sistema de expresión dado:

- de determinar si éste presenta una toxicidad;
- de determinar en cuál(s) tejido(s) éste presenta una toxicidad;
- 60 - proporcionar medios para reducir esta toxicidad a un nivel aceptable.

Por lo tanto, las proteínas a las que se refiere son aquellas que, cuando se expresan a partir de un sistema de expresión, presentan una toxicidad en al menos un tejido, en particular, en un tejido no diana.

65 De manera ventajosa, el sistema de expresión se administra de manera sistémica en el organismo, en particular en un animal, incluso de forma más ventajosa en el ser humano.

- De manera preferente, el análisis de la toxicidad se realiza en un organismo que presenta una copia defectuosa de la secuencia que codifica la proteína de interés, a saber, en un organismo que presentaba patología a tratar, por ejemplo, un modelo animal de tipo “Desactivación genética” (KO). En efecto, si en el contexto de la presente solicitud, se pudo observar una toxicidad cardiaca para sistemas de expresión que codifican la miotubularina o la calpaína 3, en el caso de la miotubularina, ésta no se detectó más que en los ratones KO. En otros términos, un análisis de toxicidad que, de acuerdo con la práctica habitual, se hubiera realizado en un animal sano, no habría puesto de manifiesto esta toxicidad.
- Por lo tanto y de manera general, se describe un sistema de expresión que comprende una secuencia que codifica una proteína, dicho sistema de expresión permitiendo:
- la expresión a un nivel terapéuticamente aceptable de la proteína en el o los tejidos diana; y
la expresión a un nivel tóxicamente aceptable de la proteína en otros tejidos distintos a los tejidos diana, es decir, en los tejidos no diana.
- De forma más precisa, la presente invención se refiere a un sistema de expresión para administración sistémica que comprende una secuencia que codifica la calpaína, bajo el control:
- de una secuencia promotora que permite la expresión a un nivel terapéuticamente aceptable de calpaína 3 en los músculos esqueléticos y
 - de al menos una secuencia diana de miR208a
- El tejido diana se define de forma ventajosa como el tejido o el órgano en el que la proteína debe desempeñar un papel terapéutico, en particular en el caso en el que el gen nativo que codifica esta proteína es defectuoso. De acuerdo con la invención, el tejido diana tiene como objeto los músculos estriados esqueléticos, denominados en lo sucesivo músculos esqueléticos, es decir, el conjunto de los músculos implicados en la motricidad, incluyendo el diafragma. Estos músculos están afectados en particular en las patologías denominadas miopatías. Otro tejido diana de interés potencial es el tejido nervioso periférico, que también puede estar afectado en las enfermedades neuromusculares. De acuerdo con la invención, los tejidos diana comprenden los músculos esqueléticos.
- Los tejidos no diana se definen de forma ventajosa como los tejidos u órganos en los que la proteína no tiene papel terapéutico que desempeñar, y opcionalmente en los que la presencia de la proteína en cantidad superior a la cantidad endógena se puede considerar perjudicial, incluso mortal, y por lo tanto tóxica.
- Los tejidos que se deben proteger en particular de esta toxicidad funcional son de forma ventajosa:
- el corazón o músculo estriado cardiaco;
 - el hígado;
 - el cerebro;
 - los pulmones;
 - el riñón; y/o
 - los músculos lisos, en particular el tracto gastrointestinal.
- Por lo tanto, de forma ventajosa se trata de órganos vitales o de tejidos en los que los sistemas de expresión genética tienen tendencia a acumularse.
- En el contexto de la invención, el músculo cardiaco aparece como un tejido particularmente de interés, como se demuestra al menos para la miotubularina y la calpaína 3. De acuerdo con la invención, el sistema de expresión permite por lo tanto una expresión a un nivel tóxicamente aceptable de la proteína en el corazón.
- Por lo tanto, se describe un sistema de expresión que comprende una secuencia que codifica una proteína, dicho sistema de expresión permitiendo:
- la expresión a un nivel terapéuticamente aceptable de la proteína en los tejidos diana que comprenden los músculos esqueléticos y/o el tejido nervioso periférico; y
 - la expresión a un nivel tóxicamente aceptable de la proteína en otros tejidos que no son los tejidos diana, en particular en el corazón.
- De acuerdo con una primera característica, el sistema de expresión comprende una secuencia que codifica una proteína, que corresponde a un transgén. En el contexto de la invención, por “transgén” se hace referencia a una secuencia, de forma ventajosa un marco de lectura abierto, proporcionado en posición trans con la ayuda del sistema de expresión de acuerdo con la invención.
- De acuerdo con un modo de realización particular, esta secuencia constituye una copia, idéntica o equivalente, de una secuencia endógena presente al nivel del genoma del organismo en el que se introduce el sistema de expresión.

- 5 De acuerdo con un modo de realización particular, la secuencia endógena presenta una o varias mutaciones que hacen que la proteína codificada sea poco o nada funcional incluso ausente (defecto de expresión o de actividad de la proteína endógena), en particular a nivel de los tejidos diana, en particular de los músculos esqueléticos. En otros términos y de manera ventajosa, el sistema de expresión de acuerdo con la invención está destinado a su administración a un sujeto que presenta una copia defectuosa de la secuencia que codifica la proteína y que presenta una patología asociada. En este contexto, la proteína codificada por la secuencia portada por el sistema de expresión de acuerdo con la invención por lo tanto se puede definir como una proteína en la que la mutación produce una enfermedad neuromuscular.
- 10 De acuerdo con otro modo de realización, se trata de una secuencia que codifica una proteína capaz de "compensar" el defecto de una proteína defectuosa (al nivel de su expresión o de su actividad) en el sujeto al que se le administra el sistema de expresión. Por lo tanto y a modo de ejemplo con respecto a las patologías neuromusculares:
- 15 - la utrofina se puede usar para reemplazo de una distrofina mutada y deficiente;
 - la decorina, la fibromodulina o el lumicano permiten compensar la fuente muscular observada en el caso de patologías neuromusculares;
 - la activina también permite aumentar la masa muscular en patologías cuya causa no es una mutación de esta proteína.
- 20 Por lo tanto y de manera más general, la secuencia portada por el sistema de expresión se puede definir como codificante de una proteína que presenta una actividad terapéutica en el contexto de una enfermedad neuromuscular. La noción de actividad terapéutica se define como se menciona a continuación en relación con la expresión "nivel terapéuticamente aceptable".
- 25 La secuencia que codifica la proteína es una secuencia de ácido nucleico y en particular puede ser un ADN (ácido desoxirribonucleico), un ARN (ácido ribonucleico) o un ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario).
- 30 De manera ventajosa, dicha secuencia codifica una proteína funcional, es decir, capaz de asegurar su función nativa o esencial, en particular al nivel del músculo esquelético. Para cada proteína de interés, se puede definir la actividad buscada y la secuencia necesaria para la obtención de esta actividad.
- 35 De acuerdo con un modo de realización preferente, dicha secuencia codifica la proteína nativa, dicha proteína siendo de forma ventajosa de origen humano. También se puede tratar de un derivado o de un fragmento de esta proteína, con la condición de que este derivado o este fragmento conserven la actividad buscada. De manera ventajosa, por "derivado" o "fragmento" se hace referencia a una secuencia proteica que presenta al menos un 60 %, preferentemente un 70 %, incluso más preferentemente un 80 %, incluso un 90 %, un 95 % o un 99 % de identidad con la secuencia humana de la proteína de interés. Por ejemplo, de ese modo se hace referencia a las proteínas de otro origen (de mamífero no humano...) o proteínas truncadas, incluso mutadas, pero activas. Por lo tanto y en el
- 40 contexto de la invención, el término "proteína" se entiende como la proteína entera sea cual sea su origen, así como los derivados y fragmentos funcionales de la misma.
- 45 En el contexto de la presente solicitud se tiene como objeto en particular las proteínas que permiten la gestión de la carga terapéutica de enfermedades denominadas neuromusculares, que pueden afectar a los músculos esqueléticos y/o al tejido nervioso periférico. De forma más particular se tiene como objeto las proteínas que permiten la gestión de la carga terapéutica de enfermedades que afectan a los músculos esqueléticos, denominadas "miopatías" de forma genérica.
- 50 De acuerdo con un aspecto particular, estas enfermedades están causadas por mutaciones en al menos un gen que comprende la no producción de la proteína o la producción de una proteína total o parcialmente no funcional. Por lo tanto, el sistema de expresión permite producir esta proteína en una forma activa y en una cantidad que permite compensar al menos parcialmente el defecto de la proteína nativa, u otra proteína capaz de compensar el defecto de la proteína nativa. La administración del sistema de expresión permite de ese modo mejorar incluso restaurar un fenotipo normal a nivel del o de los tejidos diana, en particular a nivel de los músculos esqueléticos en términos de
- 55 movilidad y respiración.
- 60 Una proteína que presenta un interés totalmente particular en el contexto de la presente solicitud es la miotubularina de origen humano (SEQ ID NO: 1), murino (SEQ ID NO: 2) o canino (SEQ ID NO: 3). Cualquier secuencia que codifique estas proteínas, derivados o fragmentos funcionales a nivel terapéutico de las mismas, se puede usar por lo tanto en el contexto del sistema de expresión de acuerdo con la presente solicitud.
- Por lo tanto y a modo de ejemplo, las secuencias de nucleótidos correspondientes (ADNc) sonda secuencias SEQ ID NO: 4, 5 (o 14) y 6, respectivamente.
- 65 De manera conocida, las mutaciones en el gen *MTM1* conllevan una enfermedad muscular denominada miopatía miotubular (MTM o XLMTM). Por lo tanto y de acuerdo con la estrategia de reemplazo o de transferencia genética, la

provisión en trans de una secuencia que codifica una miotubularina terapéutica, por ejemplo, nativa, Permite tratar esta patología.

5 Según la invención, la proteína de interés es la calpaína 3 (CAPN3) cuyas mutaciones causan en particular una enfermedad genética autosómica recesiva denominada distrofia de cinturas de tipo 2A (LGMD 2A o calpainopatía, OMIN 253600). A modo de ejemplo, la calpaína 3 humana presenta la secuencia SEQ ID NO: 7. Por lo tanto y como se ha descrito anteriormente, cualquier secuencia que codifica una calpaína 3 terapéutica, por ejemplo, la de secuencia SEQ ID NO: 7 o un derivado o fragmento de la misma, puede estar presente en un sistema de expresión de acuerdo con la invención. Por ejemplo, se puede tratar de la secuencia de ADNc representada por la secuencia
10 SEQ ID NO: 8 o los nucleótidos 307 a 2772 de la misma que corresponden al marco de lectura abierto.

Un listado no exhaustivo de proteínas implicadas en patologías que afectan a los músculos esqueléticos es la siguiente: Sarcoglicanos (α , β , γ , δ), Distrofina, Disferlina (DYSF), Selenoproteína 1 (SEPN1), Amfifisina 2 (BIN1), dinamina 2 (DNM2), cofilina 2 (CFL2), troponina T (TNNT1), tropomiosina 3 (TPM3), ACTA1, contactina 1 (CNTN1), TRIM32, Rapsina (RASP), DOK7, Agrina (AGRN), COLQ, CHAT, receptores de Acetilcolina (CHRNE, CHRNA1, CHRNB1, CHRND), GFPT1, MUSK.

De acuerdo con un modo de realización particular, la secuencia contenida en el sistema de expresión no codifica una proteína de la familia de los sarcoglicanos, en particular el de a-sarcoglicano, de forma más precisa la secuencia que se describe en el documento Mendell *et al.*, (Annals of Neurology, Vol. 68, N.º 5, pp 629-638, 2010).

De acuerdo con otro modo de realización particular, la secuencia contenida en el sistema de expresión no codifica una proteína de tipo distrofina, en particular una minidistrofina, y en particular la que se describe en el documento Wang *et al.*, (Gene Therapy, Vol. 15, N.º 22, pp 1489-1499, 2008).

25 De forma más general se hace referencia a cualquier proteína que presente una actividad terapéutica en una enfermedad neuromuscular, por ejemplo en la que la mutación causa una enfermedad a nivel de uno o varios tejidos diana, y en el caso en el que su producción a partir de un sistema de expresión presenta una toxicidad en al menos un tejido, de forma ventajosa un tejido no diana, en particular al nivel del corazón, y de manera más exhaustiva en al menos un tejido elegido entre el siguiente grupo: el corazón, el hígado, el cerebro, los pulmones, el riñón y los músculos lisos.

De acuerdo con la invención, el sistema de expresión debe permitir la expresión a un nivel terapéuticamente aceptable de la calpaína 3 en los músculos esqueléticos.

Además, debe permitir la expresión a un nivel tóxicamente aceptable de la calpaína 3 al nivel del corazón.

En el contexto de la presente invención, la expresión “expresión de la proteína” se puede entender como “producción de la proteína”. Por lo tanto, el sistema de expresión debe permitir a la vez la transcripción y la traducción de la proteína a los niveles que se han definido anteriormente.

Los niveles que se definen en el contexto de la invención, es decir “terapéuticamente aceptable” y “tóxicamente aceptable” están relacionados efectivamente con la cantidad de proteína y también con su actividad.

45 La evaluación de la cantidad de proteína producida en un tejido dado se puede realizar por detección inmunológica con la ayuda de un anticuerpo dirigido contra dicha proteína, por ejemplo, por transferencia de Western o ELISA. Como alternativa, se puede realizar la cuantificación de los ARN mensajeros correspondientes, por ejemplo, por PCR o RT-PCR. Esta cuantificación se puede realizar en una muestra del tejido, incluso sobre varias muestras. Por lo tanto y en el caso en el que los tejidos diana son los músculos esqueléticos, se puede realizar a nivel de un tipo muscular o de varios tipos musculares (por ejemplo, cuádriceps, diafragma, tibial anterior, tríceps, ...).

En el contexto de la invención, por “nivel terapéuticamente aceptable”, se hace referencia al hecho de que la proteína producida a partir del sistema de expresión de acuerdo con la invención permite mejorar el estado patológico del paciente en cuestión, en particular en términos de duración de vida y calidad de vida. Por lo tanto y con respecto a una patología que afecta a los músculos esqueléticos, se trata de mejorar el estado muscular del sujeto afectado con la enfermedad, incluso restaurar un fenotipo muscular aproximado al de un sujeto sano. Como se ha mencionado anteriormente, el estado muscular, de forma ventajosa definido por la fuerza, tamaño, histología Y funcionalidad de los músculos, se puede valorar con uno de los siguientes métodos: realización de biopsia, medición de la fuerza, de la tonicidad, del volumen, o de la movilidad de los músculos, examen clínico, formación de imágenes médicas, biomarcadores, ...

Por lo tanto, los criterios que permiten evaluar un beneficio terapéutico al nivel de los músculos esqueléticos y que se pueden evaluar en diferentes momentos después del tratamiento son en particular:

- 65 - el aumento de la esperanza de vida;
- el aumento de la fuerza muscular

- la mejora del aspecto histológico; y/o
- la mejora de la funcionalidad del diafragma.

5 En el contexto de la invención, por “ nivel tóxicamente aceptable ”, se hace referencia al hecho de que la proteína producida a partir del sistema de expresión de acuerdo con la invención no comprende alteración mayor del tejido no diana, en particular al nivel histológico, fisiológico y/o funcional. En particular, la expresión de la proteína no debe ser letal. De forma ventajosa, la cantidad de proteína producida en el tejido no diana no debe superar el nivel endógeno de dicha proteína en este tejido, en particular en comparación con un sujeto sano. Como ya se ha mencionado, la toxicidad a nivel de un tejido se puede evaluar a nivel histológico, fisiológico y funcional. En el caso particular del corazón y a modo de ilustración, la toxicidad funcional de una proteína se puede evaluar mediante el estudio de la morfología y la función cardíaca, mediante examen clínico, electrofisiología, formación de imágenes, biomarcadores, la monitorización de la esperanza de vida o mediante análisis histológicos, en particular la detección de fibrosis y/o infiltrados celulares, por ejemplo, mediante correlación con rojo Sirio o hematoxilina/eosina.

15 De manera ventajosa, el nivel de eficacia y/o de toxicidad del sistema de expresión de acuerdo con la invención se evalúa *in vivo* en el animal, de forma ventajosa incluso más ventajosa en un animal que presenta una copia defectuosa del gen que codifica la proteína y por lo tanto afectado con la patología asociada.

20 Preferentemente, el sistema de expresión se administra de manera sistémica, por ejemplo, mediante inyección intravenosa.

Se describe un sistema de expresión que comprende al menos una secuencia que permite:

- evitar la expresión o disminuir el nivel de expresión de la proteína en los tejidos no diana, en particular En aquellos en los que la expresión de la proteína es tóxica; y/o
- mantener la expresión o aumentar el nivel de expresión de la proteína en el o los tejidos diana.

Se describe un sistema de expresión que comprende al menos una secuencia que permite:

- 30 - evitar la expresión o disminuir el nivel de expresión de la proteína en los tejidos que no son los músculos esqueléticos y/o el tejido nervioso periférico, de forma ventajosa en aquellos en los que la expresión de la proteína es tóxica; y/o
- mantener la expresión o aumentar el nivel de expresión de la proteína en los músculos esqueléticos y/o el tejido nervioso periférico.

35 En el contexto de la invención, la expresión “ evitar la expresión ” se refiere de forma ventajosa al caso en el que, incluso en ausencia de dicha secuencia, no hay expresión, mientras que la expresión “ disminuir el nivel de expresión ” se refiere al caso en el que la expresión se disminuye (o se reduce) por la contribución de dicha secuencia.

40 De manera similar, la expresión “ mantener la expresión ” se refiere de forma ventajosa al caso en el que, incluso en ausencia de dicha secuencia, hay expresión a un nivel comparable, mientras que la expresión “ aumentar el nivel de expresión ” se refiere al caso en el que hay un aumento de la expresión por la contribución de dicha secuencia.

45 En el contexto de la presente solicitud, se destacaron al menos tres medios, combinados opcionalmente, que permiten alcanzar el objetivo buscado:

- el uso de una secuencia capaz evitar la expresión o de reducir el nivel de expresión en la proteína en los tejidos no diana, sin reducir el nivel de expresión en el o los tejidos diana;
- 50 - el uso de una secuencia promotora capaz de asegurar un nivel de expresión elevado en el o los tejidos diana y bajo, incluso nulo, en los tejidos no diana, en particular en aquellos en los que se demuestra que la expresión de la proteína es tóxica;
- el uso de un vector, de forma ventajosa viral, que presenta un tropismo adecuado, en ese caso para el o los tejidos diana que para los tejidos no diana, en particular para los cuales se demuestra que la expresión de la proteína es tóxica.

60 De manera característica, un sistema de expresión de acuerdo con la invención comprende una secuencia promotora que gobierna la transcripción de la secuencia que codifica la calpaína 3, de forma ventajosa colocada en la posición 5' de este transgén y que se relaciona funcionalmente con la misma. De manera ventajosa, ésta permite asegurar un nivel de expresión terapéuticamente aceptable de la proteína en los músculos esqueléticos.

También se puede tratar de promotores naturales o sintéticos (artificiales), inducibles o constitutivos. De la misma manera, pueden ser de cualquier origen, en particular humano, del mismo origen que el transgén en presencia o de otro origen.

65

De acuerdo con un primer modo de realización, esta secuencia promotora correspondía un promotor denominado ubicuo o no selectivo, es decir, que presenta una baja especificidad tisular y que asegura un nivel de expresión globalmente similar en los diferentes tejidos, así como en los tejidos diana que no son diana. A modo de ejemplo se pueden mencionar: el promotor del citomegalovirus (pCMV), el promotor de *Mtm1*.

De acuerdo con un modo de realización particular, il se trata de un promotor adecuado para los músculos esqueléticos y/o para el tejido nervioso periférico pero que se puede expresar en otros tejidos, en particular en otros músculos. A modo de ejemplo se pueden mencionar: el promotor de la desmina, de forma ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 11, el promotor de la alfa-actina esquelética, de la creatina quinasa muscular (MCK), el promotor sintético C5-12, el promotor sinapsina I (Syn) o el promotor CK6. En relación con los músculos esqueléticos, también se pueden mencionar los promotores troponina, factor 5 miogénico (Myf5), rápido 1/3 de cadena Ligera de miosina (MLC1/3f), diferenciación miogénica 1 (Myod1), miogenina (Myog), gen 7 de caja emparejada (Pax7), MEF2. En relación con el tejido nervioso periférico, también se pueden mencionar los promotores P0 y MBP (Proteína Básica de Mielina).

De acuerdo con un modo de realización ventajoso, la secuencia promotora del sistema de expresión se elige por su actividad promotora diferencial entre los tejidos diana y no diana, en el caso superior en los tejidos diana. En este caso en concreto, esta secuencia permite por lo tanto aumentar la expresión de la proteína en los tejidos diana, de forma ventajosa los músculos esqueléticos y/o el tejido nervioso periférico, siempre evitando la expresión en los tejidos no diana, en particular en los que la expresión de la proteína es tóxica.

A modo de ejemplo y en el caso en el que los tejidos diana son los músculos esqueléticos, el promotor es de forma ventajosa un promotor denominado específico de músculo. De acuerdo con otra característica ventajosa, dicho promotor presenta una actividad promotora baja incluso nula en los tejidos no diana, en particular en el corazón, permitiendo una expresión a un nivel tóxicamente aceptable de la proteína en estos tejidos.

De acuerdo con un modo de realización particular, dicha secuencia promotora puede corresponder al promotor del gen de la calpaína 3, de forma ventajosa de origen humano, incluso de forma más ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 12. Otra secuencia promotora adecuada es la del ARNmi 206 (miR206), de forma ventajosa de origen humano, incluso de forma más ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 13.

Por lo tanto y en el contexto de la presente solicitud, se mostró al menos para la calpaína 3, que un sistema de expresión que comprende la secuencia que codifica esta proteína, colocada bajo el control del promotor de la calpaína 3 o del ARNmi 206, era capaz de asegurar la expresión a un nivel terapéuticamente aceptable de la proteína en los músculos esqueléticos, y a un nivel tóxicamente aceptable de la proteína en el corazón y el hígado.

De acuerdo con otro aspecto, por lo tanto se describe un sistema de expresión que comprende una secuencia que codifica una proteína, colocada bajo el control de un promotor que presenta la secuencia SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13. También se hace referencia a secuencias promotoras obtenidas a partir de las secuencias SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 o que corresponden a un fragmento de las mismas pero que presentan una actividad promotora comparable, en particular en términos de especificidad tisular y opcionalmente de eficacia.

En el caso en el que esta secuencia promotora no permite la expresión a un nivel tóxicamente aceptable de la proteína en los tejidos no diana, está asociada de forma ventajosa a una secuencia que tiene como función reducir el nivel de expresión en la proteína en los tejidos no diana, de forma ventajosa en los tejidos no diana en los que se ha demostrado que expresión de la proteína es tóxica.

Por lo tanto y a modo de ejemplo, tanto en el caso de la miotubularina como en el de la calpaína 3, se mostró que el uso de un promotor de la desmina presentaba una toxicidad cardíaca. Por el contrario, y de acuerdo con la invención, el uso de un promotor de la desmina, de forma ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 11, asociada al menos una secuencia diana del ARNmi-208a, de forma ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 10, permite a la vez:

- Un nivel de expresión terapéuticamente aceptable de la proteína a nivel del tejido diana, de forma ventajosa los músculos esqueléticos;
- un nivel de expresión tóxicamente aceptable de la proteína al nivel de los tejidos no diana, de forma ventajosa el corazón, incluso el hígado.

Como ya se ha mencionado, dicha secuencia es capaz de evitar la expresión o de reducir el nivel de expresión en la proteína en los tejidos no diana, de forma ventajosa en el o los tejidos no diana en los que la expresión de la proteína es tóxica. Esta acción se puede ejercer de acuerdo con diferentes mecanismos, en particular:

- al nivel de la transcripción de la secuencia que codifica la proteína;
- a nivel de los transcritos que resultan de la transcripción de la secuencia que codifica la proteína, por ejemplo, mediante su degradación;
- al nivel de la traducción de los transcritos en la proteína.

Una secuencia de ese tipo es de forma ventajosa una diana para una molécula pequeña de ARN elegida entre el siguiente grupo:

- 5 - los microARN ("microARNs);
- pequeños ARN de interferencia endógenos (endogenous small interfering RNA o siRNAs);
- pequeños fragmentos del ARN de transferencia (ARNt);
- ARN de las regiones intergénicas;
- ARN ribosómico (ARNr);
- 10 - pequeños ARN nucleares (ARNsn);
- pequeños ARN nucleolares (ARNsno);
- ARN que interactúan con las proteínas piwi (ARNpi);
- ...

15 De manera ventajosa, esta secuencia permite mantener la expresión, incluso aumentar el nivel de expresión de la proteína en el o los tejidos diana, de forma ventajosa en los músculos esqueléticos.

Preferentemente, una secuencia de ese tipo se elige por su eficacia en el tejido no diana en el que se considera que la expresión de la proteína es tóxica. La eficacia de esta secuencia puede ser variable en función de los tejidos, por lo tanto, puede ser necesario asociar varias de estas secuencias, elegidas por su eficacia en el conjunto de los tejidos no diana que son objeto en los que se demuestra su toxicidad.

20 De acuerdo con un modo de realización preferente, esta secuencia es una secuencia diana para un microARN (ARNmi). De manera conocida, una secuencia de ese tipo elegida con criterio permite reprimir la expresión genética de forma específica en tejidos seleccionados.

25 Por lo tanto y de acuerdo con un modo de realización particular, el sistema de expresión comprende una secuencia diana para un microARN (ARNmi) expresado un presente en el o los tejidos no diana en los que se demuestra que la expresión de la proteína es tóxica, por ejemplo, en el corazón. De manera adecuada, la cantidad de este ARNmi presente en el tejido diana, de forma ventajosa en los músculos esqueléticos, Es inferior a la presente en el tejido no diana, incluso si este ARNmi no se expresa en el tejido diana. De acuerdo con un modo de realización particular, el ARNmi se expresa de forma específica en el tejido no diana objeto, por ejemplo, el corazón.

30 De manera conocida por el experto en la materia, la presencia o el nivel de expresión, en particular en un tejido dado, de un ARNmi de interés se puede evaluar por PCR, de forma ventajosa por RT-PCR, o por transferencia Northern.

35 Los diferentes ARNmi Identificados en la actualidad, así como su secuencia diana y su especificidad tisular, Son conocidos por el experto en la materia y se describen por ejemplo en el documento WO 2007/000668.

40 De acuerdo con la invención, el sistema de expresión comprende la secuencia diana del ARNmi-208a (también denominado miR208a, SEQ ID NO: 9). De forma ventajosa, esta secuencia, idéntica en el ser humano, el perro y el ratón, presenta la secuencia SEQ ID NO: 10 de 22 pb. De forma muy evidente, cualquier secuencia derivada o troncada, reconocida por el ARNmi-208a se puede usar en el contexto de la invención. Por lo tanto, en el contexto de la presente solicitud se mostró que el uso de esta secuencia diana, tanto con respecto a la miotubularina como la calpaína 3, permitía resolver el problema de su toxicidad cardiaca incluso hepática en el caso de la calpaína 3.

45 Como ya se ha mencionado, una secuencia diana para un microARN se puede usar sola o en combinación con otras secuencias, de forma ventajosa secuencias diana para un microARN, idénticas son diferentes. Esta secuencia se puede usar en tándem o en orientación inversa.

50 De acuerdo con un modo de realización preferente, en particular para la secuencia diana del ARNmi-208a, se puede usar una (1) o varias, en particular dos (2) o cuatro (4) secuencias. De forma ventajosa, éstas se usan en tándem, es decir, todas en la misma orientación. En el caso en el que se usen varias secuencias diana, éstas se pueden separar mediante un espaciador de ADN de secuencia aleatoria, de manera conocida por el experto en la materia.

55 De manera ventajosa, en el caso de una secuencia diana de un ARNmi, en particular del miR208a, ésta se coloca en la posición 3' de la secuencia que codifica la proteína, e incluso de forma más ventajosa se inserta en la región en la posición 3' UTR (" Región Sin Traducir ") del sistema de expresión, de forma ventajosa del ADNc que codifica la proteína. Incluso de forma más ventajosa y en el caso en el que el sistema de expresión comprende una señal de poliadenilación en la posición 3' del ADNc que codifica la proteína, esta secuencia se inserta entre el codón de parada del marco de lectura abierto y la señal de poliadenilación.

60 En el contexto de la presente solicitud, se llevó a la conclusión de que al menos una secuencia diana del ARNmi-208a era adecuada para obtener un nivel tóxicamente aceptable de proteína al menos en el corazón, en particular con respecto a la miotubularina y la calpaína 3.

De acuerdo con un modo de realización particular, se describe un sistema de expresión que comprende:

- una secuencia que codifica la miotubularina colocada bajo el control de un promotor, de forma ventajosa el de la desmina, incluso de forma más ventajosa el de la desmina humana (SEQ ID NO: 11);
- al menos una secuencia diana de un ARNmi expresado en el corazón, de forma ventajosa ARNmi-208a, de forma ventajosa una sola secuencia diana natal como la secuencia SEQ ID NO: 10.

De acuerdo con la invención, el sistema de expresión comprende:

- una secuencia que codifica la calpaína 3 colocada bajo el control de un promotor, de forma ventajosa el de la desmina, incluso de forma más ventajosa el de la desmina humana (SEQ ID NO: 11), o el de la calpaína 3, incluso de forma más ventajosa el de la calpaína 3 humana (SEQ ID NO: 12), o el del ARNmi206, incluso de forma más ventajosa el del ARNmi206 humano (SEQ ID NO: 13);
- al menos una secuencia diana de ARNmi-208a, incluso de forma más ventajosa dos secuencias diana en tándem.

Por lo tanto, los diferentes tipos de secuencias que se han detallado anteriormente se pueden combinar en un mismo sistema de expresión.

De acuerdo con la presente solicitud, un sistema de expresión o casete de expresión comprende los elementos necesarios para la expresión del transgén presente. Además, las secuencias tal como se han definido anteriormente permiten asegurar y modular la expresión del transgén, un sistema de ese tipo puede comprender otras secuencias tales como:

- una señal de poliadenilación, por ejemplo, la poliA del SV40 o de la hemoglobina en particular humana, de forma ventajosa insertada en la posición 3' de la secuencia codificante, incluso en la posición 3' de la secuencia diana del ARNmi;
- secuencias para estabilizar los transcritos, tales como el intrón 1 de la hemoglobina en particular humana;
- secuencias de amplificación o "potenciador";
- ...

Un sistema de expresión de acuerdo con la invención se puede introducir a tanto en una célula, un tejido o un organismo, en particular en el ser humano. De manera conocida por el experto en la materia, la introducción se puede realizar *ex vivo* o *in vivo*, por ejemplo, por transfección o transducción. De acuerdo con otro aspecto, se describe una célula o un tejido, de forma ventajosa de origen humano, que comprende un sistema de expresión de acuerdo con la invención.

El sistema de expresión de acuerdo con la invención, en este caso un ácido nucleico aislado, se puede administrar en el estado en un sujeto, es decir, en forma de un ADN desnudo. Para facilitar la introducción de este ácido nucleico en las células, éste se puede asociar a diferentes medios químicos tales como sistemas de dispersión coloidal (complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas) o sistemas basados en lípidos (emulsiones de aceite en agua, micelas, liposomas).

Como alternativa y de acuerdo con otro modo de realización preferente, el sistema de expresión de acuerdo con la invención comprende un plásmido o un vector. De manera ventajosa, un vector de ese tipo es un vector viral. Los vectores virales usados normalmente en terapia genética en los mamíferos, en particular en el ser humano, son conocidos por el experto en la materia. Los vectores virales de ese tipo se eligen de forma ventajosa entre el siguiente listado: vector obtenido a partir del virus del herpes, vector baculoviral, vector lentiviral, vector retroviral, vector adenoviral y vector viral adeno-asociado o AAV ("virus adeno-asociado").

De manera preferente, se trata de un vector viral adeno-asociado o AAV ("virus adeno-asociado"), que corresponde bien a serotipos naturales (AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 y AAV9), a variantes de los mismos o a serotipos artificiales. De manera conocida por el experto en la materia, también se pueden usar vectores AAV quiméricos.

De forma ventajosa, el sistema de expresión de acuerdo con la invención se inserta entre dos secuencias ITR ("Inverted Terminal Repeat") del vector AAV.

Con respecto a una administración sistémica para la cual el sistema de expresión de acuerdo con la invención adquiere todo su sentido, son particularmente preferentes los vectores AAV de serotipo 8 o 9. Por ejemplo se puede tratar de vectores AAV2/8 o AAV2/9.

De manera conocida por el experto en la materia, las partículas virales recombinantes se pueden obtener, por ejemplo, por tri-transfección de células 293 HEK o mediante el sistema de baculovirus. Las titulaciones de vector se expresan clásicamente en términos de 100 o más virales por ml (vg/ml).

De acuerdo con un modo de realización preferente, el sistema de expresión de acuerdo con la invención comprende un vector que presenta un tropismo adecuado, en este caso tanto para el o los tejidos diana como para los tejidos no diana, en particular aquellos en los que se ha demostrado que la expresión de la proteína es tóxica. Se puede tratar de un vector AAV que contienen a cápside seleccionada para hacer de diana/transducir poco o nada, los tejidos no diana tales como el corazón, incluso para hacer de diana/transducir de forma específica los tejidos diana, en particular los músculos esqueléticos.

Como se deduce a partir de lo que se ha mencionado anteriormente, los sistemas de expresión de acuerdo con la invención, en particular en forma de vectores AAV recombinantes o de partículas virales recombinantes, tienen aplicaciones evidentes, en particular en el campo terapéutico.

Por lo tanto y de acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere al uso del sistema de expresión que se describe como medicamento. En otros términos, también se hace referencia a una composición farmacéutica que comprende un sistema de expresión de ese tipo. De manera adecuada, ésta puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable e inerte, de forma ventajosa adecuado para una administración sistémica, por ejemplo, intravenosa. A una composición de ese tipo se pueden añadir diversos excipientes, estabilizantes, y otros compuestos adecuados conocidos por el experto en la materia.

La presente invención puso de manifiesto el interés del sistema de expresión que se describe en el caso en el que su administración no se realiza de manera local al nivel de los tejidos diana, sino al contrario de manera general al nivel de todo el cuerpo, llevando su administración a nivel de los tejidos no diana.

Por lo tanto y de manera ventajosa, un sistema de expresión de acuerdo con la invención se administra por una de las siguientes vías: administración enteral, parenteral, oral, intravenosa, intra-arterial y por inhalación.

De manera preferente, se trata de una administración sistémica, de forma ventajosa una inyección intravenosa. Se debe indicar que una administración sistémica se puede realizar en las proximidades de un sitio de tratamiento, por ejemplo, en las proximidades de un músculo esquelético.

De acuerdo con un modo de realización particular, no se trata de una administración loco-regional. De forma más precisa, de ese modo se puede excluir una inyección intravascular en particular intravenosa (realizada bajo presión, y en presencia de un torniquete, en las proximidades de un músculo diana), tal como se lo describe por ejemplo Petrov *et al.*, (Methods Mol Biol 2011; 709: 277-86), o intra-arterial (catéter en una arteria e hinchamiento de las venas en las proximidades así como de la arteria, torrente arriba, para evitar la difusión) tal como lo describe por ejemplo Gonin *et al.*, (J Gene Med 2005; 7: 782-791).

Cuando la composición de acuerdo con la invención se va a inyectar, ésta se presenta preferentemente en forma líquida. La concentración eficaz, en este caso el sistema de expresión de acuerdo con la invención, la cantidad que se va a inyectar y la frecuencia de las inyecciones las determina el experto en la materia. Una administración única se puede considerar suficiente. Un efecto terapéutico se busca de forma ventajosa para un periodo de duración de al menos 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 5 años o más.

Los medicamentos de este tipo están destinados en particular a la terapia genética, en particular para el tratamiento de las enfermedades neuromusculares e incluso de forma más particular las enfermedades que afectan esencialmente a los músculos esqueléticos (miopatías). Más generalmente, la invención permite mejorar en particular la función muscular en un sujeto.

Los pacientes a tratar son, de forma ventajosa, mamíferos, en particular, seres humanos.

Una enfermedad que se tiene como objeto en particular en el contexto de la solicitud, es la miopatía centronuclear, de forma más precisa, la miopatía miotubular relacionada con el cromosoma X (XLMTM). Además, se pueden tratar otras miopatías centronucleares y enfermedades neuromusculares asociadas a la miotubularina, tales como ciertas formas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

La distrofia de cinturas de tipo 2A (LGMD2A) también se puede tratar con un sistema de expresión de acuerdo con la invención.

De forma más general, un listado exhaustivo de las patologías que se tienen como objeto es el siguiente: distrofia muscular congénita con déficit de selenoproteína N, distrofia muscular congénita con déficit primario de merosina, distrofia muscular congénita de tipo Ullrich, distrofia muscular de Duchenne (DMD) o de Becker (BMD), miopatía congénita de núcleo central, miopatía congénita de múltiples mininúcleos, miopatías centronucleares autosómicas, miopatía con desproporción de tipos de fibras, miopatía con bastoncillos, síndromes miasténicos congénitos, otras enfermedades neuromusculares asociadas a las miotubularinas, distrofia de cinturas de tipo 2B o 2D, miopatía distal de tipo Miyoshi, disferlinopatías, sarcoglicanopatías.

De acuerdo con un modo de realización particular, la patología no es la distrofia muscular de Duchenne (DMD) o de Becker (BMD), incluso la LGMD2D.

5 Por lo tanto, lo que se espera del medicamento de acuerdo con la invención es a la vez una mejora de la patología, así como de la calidad de vida y de la longevidad del paciente, a la vez que se evitan los efectos secundarios potenciales al nivel de los otros tejidos de un tratamiento de este tipo.

10 Como se va a demostrar a modo de ejemplo, la presente solicitud puso de manifiesto la posible toxicidad cardiaca de los tratamientos mediante terapia genética de las enfermedades musculares y propone soluciones técnicas que permitan superar este problema.

Ejemplos de realización

15 La invención y las ventajas que resultan de la misma se destacarán mejor a partir de los ejemplos de realización que siguen a continuación, con el apoyo de las figuras adjuntas. Sin embargo, éstos no tienen ningún alcance limitante.

20 La presente invención se ilustra con respecto al gen de la miotubularina (*Mtm1*) et de la calpaína 3 (*CAPN3*). Sin embargo, la estrategia que se describe se puede aplicar a cualquier transgén que codifique una proteína de interés al nivel de los músculos esqueléticos en los que se desvela una toxicidad en particular cardiaca.

Figura 1 (no conforme a la invención): Esquema de las construcciones vectoriales:

25 A/ casete de expresión de *Mtm1* desprovisto de secuencias diana para el ARNmi-208a;
B/ casete de expresión que contiene 1, 2 o 4 secuencias diana para el ARNmi-208a (cajas) en la posición 3' del gen *Mtm1*.

Figura 2 (no conforme a la invención): Sección transversal del corazón de un ratón XLMTM tratado con la ayuda de un vector AAV-pDES-Mtm1. Las zonas de fibrosis se desvelan en color rojo gracias a una coloración con rojo Sirio.

30 Figura 3:

- en la parte superior: distribución del vector en los músculos esqueléticos (músculo tibial anterior = TA; cuádriceps = QUA; tríceps = TRI) y en el corazón de un ratón de tipo silvestre (WT), 1 mes después de la administración intravenosa de los vectores (vg/genoma diploide).
35 - en la parte inferior: nivel de proteína MTM1 en los músculos esqueléticos y el corazón de un ratón de tipo silvestre (WT), 1 mes después de la administración de los vectores. Los valores indican la tasa de multiplicación con respecto a los niveles endógenos. Como controles, los ratones se inyectaron con la ayuda o bien de PBS o bien del vector AAV8 vacío (AAV-MCS).

40 Figura 4 (no conforme a la invención): Curva de supervivencia (a la izquierda) y curva de masa corporal (a la derecha) de ratón KO ("Knock Out") *Mtm1* inyectado con la ayuda de PBS, AAV8-Des-MCS, AAV8-Des-Mtm1 o AAV8-Des-Mtm1-miRHT1. Los ratones de tipo silvestre (WT) recibieron PBS como control.

45 Figura 5: Análisis de las actividades promotoras de *CAPN3* y miR-206 *in vivo*:

A/ Análisis histológico del músculo cardiaco después de inyección de PBS o de los vectores AAV2/9-desm-CAPN3 (pdes.C3), AAV2/9-pC3-CAPN3 (pC3.C3), AAV2/9-pmiR206-CAPN3 (p206.C3) y coloración con rojo Sirio (parte superior, escala = 500 µm) o Hematoxilina Floxina Azafrán (HPS) (en la parte inferior, escala = 100 µm).
50 B/ Evaluación del nivel de ADN vectorial por qPCR en el corazón de ratones de tipo silvestre WT después de inyección.
C/ Evaluación del nivel de ARNm *CAPN3* por qPCR en el corazón de ratones de tipo silvestre WT después de inyección. La línea "H" corresponde al nivel endógeno de ARNm *CAPN3* en el corazón de ratones de tipo silvestre WT.
55 D/ Análisis de enzimas séricas. Los ensayos de alanina aminotransferasa (ALT) se realizaron en sueros de ratones WT tratados con pC3.C3, a la izquierda o p206.C3, a la derecha. La media y el error típico de la media (ETM) para cada condición se indican con un círculo y una barra vertical, respectivamente.

Figura 6: Análisis de la actividad de miR-208aT *in vivo*:

60 A/ Análisis histológico del músculo cardiaco, 35 días después de inyección de PBS o de dosis idénticas de los vectores AAV2/9-desm-CAPN3 (pdes.C3) o AAV2/9-desmina-CAPN3-miR208aT (pdes.C3-T) y tinción con rojo Sirio (en la parte superior, escala = 500 µm) o HPS (en la parte inferior, escala = tiene micrómetros).
65 B/ Evaluación del nivel de ADN vectorial por qPCR en el corazón de ratón WT después de inyección (en la parte superior) y del nivel de ARNm del transgén *CAPN3* (en la parte inferior). La línea "H" corresponde al nivel endógeno de ARNm *CAPN3* en el corazón de ratones de tipo silvestre WT.

C/ Análisis de la expresión de la calpaína 3 mediante transferencia de Western en el músculo esquelético y en el corazón de ratones WT inyectados con PBS o con vectores AAV2/9-desmina-CAPN3 (pdes.C3) o AAV2/9-desm-CAPN3-miR208aT (pdes.C3-T). La proteína completa se indica con una flecha y sus productos de escisión (60, 58 y 55 kDa) con un corchete.

D/ Cuantificación de los niveles de ARNm de miR-208a (miR208a), HOP (Hop) y connexina 40 (Cnx40) en el corazón de ratones WT inyectados con AAV2/9-desmina-CAPN3 (pdes.C3) o AAV2/9-desmina-CAPN3-miR208aT (pdes.C3-T). La cantidad de ARN en la condición pdes.C3-T se proporciona como porcentaje con respecto al nivel de ARN en la condición pdes.C3.

Figura 7: Análisis histológico de la eficacia de la transferencia de la calpaína 3 en los músculos esqueléticos de ratones con déficit de calpaína 3:

A/ Las secciones transversales de los músculos TA de ratones C3KO se tiñeron con HPS, 4 o bien con PBS o con vectores ($1,2 \times 10^{13}$ vg/kg) AAV2/9-desmina-CAPN3-miR208aT (pdes.C3-T), AAV2/9-pC3-CAPN3-miR208aT (pC3.C3-T), AAV2/9-pmiR206-CAPN3-miR208aT (p206.C3-T). Escala = 100 μ m.

B/ Número de fibras centronucleadas (CNF/mm²) medido en secciones teñidas con HPS en músculos TA (a la izquierda) o PSO (a la derecha) de ratones C3KO inyectados con la ayuda de PBS o de los vectores ($1,2 \times 10^{13}$ vg/kg) AAV2/9-desmina-CAPN3-miR208aT (pdes.C3-T), AAV2/9-pC3-CAPN3-miR208aT (pC3.C3-T), AAV2/9-pmiR206-CAPN3-miR208aT (p206.C3-T). Una diferencia con un valor P < 0,05 se indica con un asterisco. TA: músculo tibial anterior; PSO: músculo *Psoas*.

I) MATERIAL Y MÉTODOS

1) Generación de vectores AAV recombinantes:

El vector rAAV-Des-Mtm1 se construyó coronando el marco de lectura abierto del gen murino *Mtm1* (SEQ ID NO: 14) cadena abajo del promotor humano de la desmina (SEQ ID NO: 11) en un vector AAV de serotipo 2. Las secuencias diana (1, 2 o 4 secuencias, miRHT1, miRHT2 y miRHT4, respectivamente) del ARNm-208a de 22 pb (SEQ ID NO: 10), cada una separada por espaciadores de ADN, se añadieron en la región 3'UTR del ADNc de *Mtm1*. Un vector vacío (rAAV-Des-MCS) también se generó como control. Las partículas virales recombinantes de serotipo 8 (AAV8) se obtuvieron usando un protocolo de tri-transfección de las células 293 HEK como se ha descrito anteriormente (Buj Bello et al., 2008, Hum Mol Genet 17(14): 2132-43). Las titulaciones de vector se expresan en términos de genomas virales por ml (vg/ml).

De manera similar, el vector rAAV-desm-CAPN3 (o AAV-desmina-CAPN3 o AAV-pDes-CAPN3) se construyó usando el ADNc de la calpaína 3 humana (SEQ ID NO: 8) bajo el control del promotor humano de la desmina (SEQ ID NO: 11). Los vectores rAAV-pC3-CAPN3 y rAAV-pmiR206-CAPN3 se obtuvieron sustituyendo este promotor por la región promotora de la calpaína 3 humana (SEQ ID NO: 12) o la del ARNm206 (SEQ ID NO: 13), respectivamente. Los vectores AAV-desm-CAPN3-miR208aT, AAV-pC3-CAPN3-miR208aT y AAV-pmiR206-CAPN3-miR208aT se obtuvieron añadiendo 2 secuencias diana para el ARNm208a (SEQ ID NO: 9) en tándem (miR208aT), en la posición 3' del gen de la calpaína 3. Se produjeron partículas virales recombinantes de serotipo 1 (AAV1), 8 (AAV8) y/o 9 (AAV9).

2) Experimentos *in vivo*:

f

Los ratones se trataron de acuerdo con las legislaciones francesa y europea con respecto a la experimentación animal. En este estudio, se usaron ratones de tipo silvestre WT C57B1/6 (Laboratoires Charles River) y una línea de ratón inactivada de manera constitutiva para la miotubularina (desactivación genética) KO-*Mtm1*, también denominada BS53d4-129pas. Para la calpaína 3, se usó el modelo murino C3KO, descrito por Laure et al., (Febs J., 2010, 277: 4322-4337).

Los vectores recombinantes, a las dosis indicadas, se inyectaron en la arena de la cola de los ratones tal como se ha indicado (edades de 3 semanas a 2 meses). Como control se administró un volumen equivalente de tampón salino (PBS). La situación clínica y el peso de los animales se siguieron cada semana para los animales WT y tres veces a la semana para los ratones mutantes. Los ratones se sacrificaron en los momentos indicados.

3) Transferencia de Western:

Los músculos congelados en isopentano se cortaron en secciones transversales de 30 μ m y se sometieron a lisis en hielo en un tampón que contenía NaCl 150 mM, Tris HCl 10 mM (pH 7,4), EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, fluoruro de sodio 100 mM, pirofosfato de sodio 4 mM, ortovanadato de sodio 2 mM, Triton X100 al 1 %, e IGEPAL al 0,5 % suplementado con un cóctel completo de inhibidores de proteasas (Roche). Los extractos musculares se incubaron 1 h y se centrifugaron a 4 °C a 12.000 x g durante 30 min. Las concentraciones de proteínas en el sobrenadante se determinaron con la ayuda del kit Bio-Rad "kit de ensayo de proteína". Las proteínas se sometieron a una migración

en SDS-PAGE y, después de transferencias sobre una membrana de nitrocelulosa, se incubaron con anticuerpos policlonales dirigidos contra la miotubularina (p2348; Buj Bello et al., 2008, Hum Mol Genet 17(14): 2132-43) y GAPDH (N.º MAB374, Millipore). Las bandas proteicas se visualizaron mediante fluorescencia de infrarrojos usando el sistema "Odyssey Imaging System" (LICOR Biotechnology Inc.) y se cuantificaron con la ayuda del programa "Odyssey Infrared Imaging System Software" (Application software, versión 1.2, 2003).

Para la detección de la calpaína 3, se usó un protocolo similar:

Los músculos se homogeneizaron mediante FastPrep usando el siguiente tampón de lisis [Tris 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EGTA 2 mM, un 0,1 % de Triton X-100, E64 2 uM (Sigma)] e inhibidores de proteasas (cóctel completo de inhibidor de proteasa mini; Roche Applied Sciences; 25 µl por mg de tejido). Las muestras de ensayo se trataron con 250 U/100 µl de Benzonasa (Calbiochem) durante 30 min a 4 °C para digerir el ADN. Los elementos de lisado muscular se mezclaron con el tampón de carga [NuPage LDS (Invitrogen), TNT 3M (Sigma)], seres naturalizaron durante 10 minutos a 70 °C y se centrifugaron brevemente. Los sobrenadantes se separaron mediante gel de poliacrilamida NuPAGE Bis-Tris en gradiente de un 4-12 % (Invitrogen). Después de la transferencia, las membranas se hibridaron con anticuerpos contra la calpaína 3 (anticuerpo monoclonal de ratón, Novocastra NCL-CALP-12A2, dilución a 1/200), a 4 °C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Por último, las membranas se incubaron con IRDye ® para su revelación en el escáner de infrarrojos Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA).

4) PCR:

4-1- Miotubularina (no conforme a la invención):

El aislamiento del ADN a partir de músculos se realizó usando el kit "Gentra Puregene Tissue Kit" (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se determinó usando un espectrofotómetro Nanodrop ND-8000 (Nanodrop Technologies, Francia), y se usaron 80 ng de ADN para cada muestra de ensayo como matriz para la PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real Taqman se realizó sobre cada muestra de ensayo para a la vez una parte del esqueleto común para el vector rAAV2/X para determinar las copias del genoma viral, y del gen murino de la titina, para estandarizar el número de gen o masculinos presentes en cada muestra de ensayo. Los cebadores usados para la amplificación de los vectores rAAV fueron: 5'- CTCCATCACTAGGGGTTTCCTTG -3' (directo; SEQ ID NO: 15), 5'-GTAGATAAGTAGCATGGC -3' (inverso; SEQ ID NO: 16). Las sondas MGB se marcaron de manera doble (FAM-NFQ): 5'- TAGTTAATGATTAACCC -3' (sonda; SEQ ID NO: 17). Los cebadores y una sonda usados para la titina fueron: 5'-AAAACGAGCAGTGACGTGAGC-3' (directo; SEQ ID NO: 18), 5'-TTCAGTCATGCTGCTAGCGC-3' (inverso; SEQ ID NO: 19), y 5'-TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC-3' (sonda; SEQ ID NO: 20) (Applied Biosystem). La amplificación es de la titina se realizaron usando 80 ng de ADN diluido en una mezcla "Absolute QPCR ROX Mix" (Thermo Fischer científico), 0,1 µM de sondas Taqman y 0,2 µM de cebadores (directo e inverso), en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de los ciclos consistieron en: una etapa de activación de la ADN Polimerasa Thermo-Start a 95 °C durante 15 min, seguido por 40 ciclos de 2 etapas, 15 s de desnaturalización a 95 °C y 60 s de hibridación y de extensión a 60 °C. Las aplicaciones de los rAAV se realizaron usando 0,1 µM de sondas Taqman, 0,3 µM de cebador inverso y 0,5 µM de cebador directo en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de los ciclos consistieron en: una etapa de activación de la ADN Polimerasa Thermo-Start a 95 °C durante 15 min, seguido por 40 ciclos de 2 etapas, 15 s de desnaturalización a 95 °C y 60 s de hibridación y de extensión a 54 °C. La PCR se realizó sobre un termociclador 7900 HT (Applied Biosystem). Una gama de dilución estándar de un plásmido que contenía las secuencias de un esqueleto de rAAV y de la titina se usó sobre cada placa de PCR en tiempo real como control de número de copias. Todas las muestras de ensayo y los controles se duplicaron. Los datos se expresan el número de copias del genoma viral por genoma diploide.

4-2- Calpaína 3:

Los músculos se extrajeron con la ayuda del método Trizol (Invitrogen). En el transcurso de la extracción, una fracción de la muestra de ensayos y conservó para extracción de ADN en vista de la cuantificación por PCR cuantitativa. El ARN total se extrajo del extractor residual tratado con el kit "ADN-free" (Ambion) para eliminar el ADN residual.

Para la cuantificación de la expresión de los microARN endógenos, 20 ng de ARN total se sometieron a una transcripción inversa usando el kit "microARN TaqMan transcription inverse" (Applied Biosystems) y se analizaron con el ensayo Taqman microARN ID511 para miR-208a (Applied Biosystems). La normalización de las masas de ensayo se realizó con la expresión de snoRNA202 con el ensayo ID1232 (Applied Biosystems).

Para la amplificación de los ARNm de la calpaína 3 endógena o transgénica, un µg de ARN se transcribió mediante transcripción inversa usando hexámeros aleatorios y oligodT y el kit Verso ADNc (Abgene) o el kit "RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis" (Fermentas). La PCR en tiempo real se realizó con el método TaqMan ® usando el sistema ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) y la solución "Absolute QPCR Rox Mix" (ABgene) con la ayuda de los siguientes pares de cebadores (.f et .r) y la sonda Taqman (.p): para la cuantificación de la calpaína transgénica: CAPN3sfr.f (SEQ ID NO: 21) 5'_CGCCTCCAAGGCCCGT_3' ; CAPN3sfr.r (SEQ ID NO: 22) 5'_GGCGGAAGCGCTGGCT_3'; MGBTUCAPN3.p (SEQ ID NO: 23) 5'_CTACATCAACATGAGAGAGGT_3; para la

cuantificación de la calpaína humana: CAPN3.f (SEQ ID NO: 24) 5'_CGCCTCCAAGGCCAGG_3', CAPN3.r (SEQ ID NO: 25) 5'_GGCGGAAGCGCTGGGA_3 y CAPN3.p (SEQ ID NO: 26) 5'_TACATCAACATGCGGGAGGT_3. Una dilución en serie de un ARN de control se usó en cada experimento y se trató con las muestras de ensayos experimentales para rodear la variabilidad de la eficacia de la preparación de ADNc y de la PCR con el fin de estar en condiciones de comparar los diferentes experimentos. Este ARN ase preparó mediante una reacción de transcripción *in vitro* a partir de un plásmido portador de una calpaína 3 ADNc mutada y amplificable con todos los pares de cebadores.

El análisis de la expresión de la connexina 40 y HOP se realizó usando los siguientes ensayos TaqMan® Gene Expression (Applied Biosystems): para Cnx40; Gja-5 [*Mus musculus*]: Mm00433619_s1 y hop: HOP homeobox [*Mus musculus*]: Mm00558630_m1. Los resultados de qRT-PCR se expresan en unidades arbitrarias con respecto a la expresión del gen murino ubicuo ácido fosfoproteína ribosómica (P0 GI: 15029771; MH181PO.F (SEQ ID NO: 27): 5'_CTCCAAGCAGATGCAGCAGA_3'/ M267PO.R (SEQ ID NO: 28): 5'_ACCATGATGCGCAAGGCTAT_3' / M225PO.p (SEQ ID NO: 29): 5' " CCGTGGTGCTGATGGGCAAGAA_3').

5) Histología:

Las criosecciones transversales (8 µm de grosor) de los músculos cardiaco, hepático o esqueléticos se tiñeron con la ayuda de hematoxilina y eosina (HE), rojo Sirio o Hematoxilina Floxina Azafrán (HFS) usando protocolos convencionales.

Las secciones se montaron con el medio Eukitt (LABONORD). Las imágenes digitales se capturaron con la ayuda de una cámara CCD (Sony). Los análisis morfométricos de los músculos esqueléticos para definir los números de fibras centronucleadas (CNF/mm²) se realizaron con la ayuda del software Histolab (Microvision, Evry).

6) Medición de la actividad de ALT:

Se tomaron muestras de sangresin coagulante. Después de centrifugación (8000g, 10 min, 4 °C), los sueros se analizaron con la ayuda del dispositivo VITROS DT60 (Ortho Clinical Diagnostics, Reino Unido) con la ayuda de los casetes " Vitros ALT DT slides " para la determinación de la tasa de alanina aminotransferasa (ALT).

II) RESULTADOS

A – MIOTUBULARINA (no conforme a la invención):

1) Toxicidad cardiaca de la construcción AAV-pDES-Mtm1:

A partir del documento de Buj-Bello et al., (2008, Hum Mol Genet 17(14):2132-43) se conocía el efecto beneficioso de una inyección intramuscular única del gen de la miotubularina (Mtm1) colocado bajo el control del promotor de CMV en un vector AAV2/1.

Un enfoque de terapia genética por vía sistémica en ratones KO (" Desactivación Genética ") *Mtm1* se intentó y mostró que la administración de un vector AAV8 (rAAV-Des-Mtm1) de expresa la miotubularina bajo el control del promotor humano de la desmina (Fig. 1A) en un ratón mutante tenía éxito para un periodo de vida prolongado de al menos 6 meses, una mejora notable de la patología en los músculos estriados en todo el cuerpo incluyendo el diafragma, y una actividad motora normalizada (los resultados no se muestran).

Sin embargo, después de una administración sistémica del vector AAV8-DES-Mtm1 en ratones KO *Mtm1*, se observó que el nivel de proteína miotubularina era muy elevado en el corazón en comparación con los músculos esqueléticos (los resultados no se muestran). Además, se observó la presencia de infiltrados inflamatorios y de fibrosis en el corazón de los ratones XLMTM tratados con la ayuda de AAV en diferentes momentos después de la inyección viral (Figura 2).

2) Desarrollos de sistemas de expresión sin toxicidad cardiaca

En vista de la dificultad para predecir la biodistribución y la expresión del transgén a partir de un vector AAV8 después de administración sistémica, en particular en el ser humano, se desarrollaron nuevos vectores que portaban secuencias reguladoras que aumentan la especificidad muscular, para evitar los efectos secundarios potenciales a nivel cardiaco.

Se desarrollaron tres construcciones virales (rAAV-Des-*Mtm1*-miRHT1; rAAV-Des-*Mtm1*-miRHT2 y rAAV-Des-*Mtm1*-miRHT4), tal como se muestran en la Figura 1B, que comprenden respectivamente 1, 2 o 4 secuencias diana para el ARNmi-208a. Esta secuencia presenta la secuencia SEQ ID NO: 10 y está constituida por 22 pares de bases. De manera notable, esta secuencia está conservada en el ser humano, el perro y el ratón.

3) Producción muscular y cardiaca de MTM1 después de inyección en un ratón WT

Con el objeto de seleccionar el vector de expresión más adecuado para MTM1, una dosis única de 3×10^{13} genomas virales (vg)/kg de estos vectores se administró en la vena de la cola del ratón de tipo silvestre (WT, por “wild type”) con edades de 3 semanas. Como controles internos se usaron un vector vacío (AAV-Des-MCS) y PBS (“Solución Salina Tamponada con Fosfato”).

La distribución vectorial y el nivel proteico de miotubularina en el corazón y en diferentes músculos esqueléticos (Tibial anterior = TA; cuádriceps = QUA; tríceps = TRI) se evaluaron 1 mes después de la inyección. Los resultados mediante transferencia de Western demuestran que todos estos vectores son capaces de disminuir el nivel de miotubularina producida a partir de los vectores de manera específica en el corazón. Además, una sola secuencia diana del ARNmi208a es suficiente para reducir la expresión en este tejido (Figura 3 y Tabla 1).

		PBS	Mtm1	miRHT1	miRHT2	miRHT4
Músculos esqueléticos	TA	1	50	70	100	30
	QUA	1	45	45	50	15
	TRI	1	20	17	30	10
Corazón		1	> 90	1,6	1,1	0,7

Tabla 1: Cuantificación semicuantitativa de la proteína MTM1 al nivel de los músculos esqueléticos y al nivel del corazón, 1 mes después de la liberación del vector en un ratón WT.

4) Validación de la construcción vectorial después de inyección en un ratón mutado *Mtm1*

Basándose en los resultados precedentes, la construcción rAAV-Des-*Mtm1*-miRHT1 se seleccionó para la continuación de los experimentos. Los ratones de tipo silvestre (WT por “wild type”) y con mutación en el gen *Mtm1* (KO por “Knock Out”) recibieron 3×10^{13} vg/kg de AAV-Des-*Mtm1*, rAAV-Des-*Mtm1*-miRHT1 y rAAV-Des-MCS, respectivamente, o PBS a la edad de 3 semanas, y se siguieron a nivel clínico durante 1 mes.

Todos los ratones mutantes que recibieron AAV8-Des-*Mtm1*-miRHT1 sobrevivieron hasta el final del estudio, con una curva de crecimiento similar a la de los ratones KO tratados con la ayuda de AAV8-Des-*Mtm1*, lo que indica que la inclusión de la secuencia miRHT1 no influye en la eficacia terapéutica del transgén (Fig. 4).

La histología del corazón de los ratones WT y KO se analizó 1 mes después del tratamiento, mediante tinción con hematoxilina-eosina y con rojo Sirio. Se conservaron regiones de fibrosis en el corazón de 7 ratones KO de 9 tratados con AAV8-Des-*Mtm1*, pero no en los ratones KO tratados con AAV8-Des-*Mtm1*-miRHT1 (n = 10). La administración del vector AAV8-Des-*Mtm1* no comprendió fibrosis en los animales WT 1 mes después de la inyección (n = 8).

En conclusión, estos resultados indican que la inclusión de una sola secuencia diana de ARNmi208a es suficiente para reducir la toxicidad cardíaca de una construcción AAV8-Des-*Mtm1*.

Se realizaron experimentos similares con respecto a la calpaína 3 (CAPN3):

B - CALPAÍNA 3

A partir del documento Bartoli *et al.*, (Molecular Therapy, 2006, Vol. 13, N.º 2, 250-259) se conocía el efecto beneficioso y la no toxicidad de construcciones de tipo AAV portadoras del gen de la calpaína 3 colocado bajo el control de promotores denominados específicos de músculo, después de administración intramuscular o local. Sin embargo, los experimentos realizados desvelaron la toxicidad de las construcciones de este tipo después de administración sistémica:

1) Toxicidad cardíaca de las construcciones AAV-desm-CAPN3:

La transformación de los ratones WT se siguió, después de la inyección intravenosa de diferentes construcciones, y se presenta en la tabla 2 que sigue a continuación:

Serotipo	Dosis (vg/kg)	Número de muertes	Aspecto histológico del corazón a los 35 días
AAV9	4,0 x 10 ¹¹	0/3	fibrosis
"	1,0 x 10 ¹²	0/9	fibrosis
"	1,6 x 10 ¹³	5/7	fibrosis
"	4,3 x 10 ¹³	2/6	fibrosis
AAV8	7,0 x 10 ¹²	2/4	fibrosis

(continuación)

Serotipo	Dosis (vg/kg)	Número de muertes	Aspecto histológico del corazón a los 35 días
AAV1	1,6 x 10 ¹³	0/3	fibrosis

5

Tabla 2: Consecuencias de las inyecciones intravenosas de diferentes AAV a diferentes dosis

Para todos los AAV sometidos a ensayo, se observa una destrucción del tejido cardíaco en caso de administración sistémica, excluyendo el uso de objeto terapéutico de estos sistemas de expresión genética.

10

2) Reducción de la toxicidad cardíaca de las construcciones AAV-desm-CAPN3 o reemplazo del promotor:

15

Dos vectores se construyeron intercambiando el promotor de la desmina por el de CAPN3 (AAV2/9-pC3-CAPN3) o miR-206 (AAV2/9-pmiR206-CAPN3). Después de la preparación viral de los vectores, las consecuencias *in vivo* de las modificaciones introducidas por inyección intravenosa (6 x 10¹² vg/kg) se analizaron en ratones C57BL/6 (WT) con edades de 2 meses.

20

35 días después de la inyección, no se observó ninguna fibrosis cardíaca en los ratones tratados con los vectores AAV2/9-pC3-CAPN3 y AAV2/9-pmiR206-CAPN3, a diferencia de los ratones inyectados con AAV2/9-desm-CAPN3 (Fig. 5A), a pesar de un nivel de transducción similar (Fig. 5B). El nivel de la ARNm del transgén CAPN3 en el corazón de ratones tratados con AAV2/9-desm-CAPN3 era aproximadamente 15 veces más elevado que el nivel endógeno (Fig. 5C), mientras que permanece más bajo para los ratones tratados con AAV2/9-pC3-CAPN3 y AAV2/9-pmiR206-CAPN3 (un 13 % y un 30 %, respectivamente, Fig. 5C), lo que correlaciona el efecto perjudicial de estos dos últimos vectores.

25

Además, se verificó que estos dos promotores no presentaban toxicidad hepática midiendo durante 5 semanas el nivel de actividad de alanina aminotransferasa (ALT) en ratones WT que habían recibido una inyección de 10¹³ vg/kg. No se observó ningún aumento de actividad enzimática en los animales inyectados con respecto a los inyectados con PBS (Fig. 5D).

30

En conclusión, los promotores CAPN3 y miR-206 reducen la toxicidad cardíaca del transgén CAPN3, sin producir toxicidad hepática.

35

3) Reducción de la toxicidad cardíaca de las construcciones AAV-desm-CAPN3 por adición de dos secuencias diana de miR208a:

40

Dos secuencias diana de ARNm208a (SEQ ID NO: 10) se clonaron en tándem en un casete miR208aT. A continuación, éste se introdujo en la región 3'UTR de la construcción AAV2/9-desm-CAPN3, para proporcionar la construcción AAV2/9-desm-CAPN3-miR208aT.

45

Después de inyección de una dosis de 6 x 10¹² vg/kg, no se observó ninguna fibrosis cardíaca en los ratones tratados, a diferencia de los ratones inyectados con AAV2/9-desm-CAPN3 (Fig. 6A), a pesar de un nivel de transducción similar y un nivel de ARNm 5 veces más elevado con respecto al nivel endógeno de la calpaína 3 en el corazón (Fig. 6B). Al nivel proteico, la calpaína 3 no se expresa normalmente al nivel del miocardio y no se detecta (Fig. 6C). En los ratones WT inyectados con AAV2/9-desm-CAPN3, la proteína completa no se detecta, pero los fragmentos que resultan de su escisión (60, 58 y 55 kDa) si se detectan (Fig. 6C). Por el contrario, no se observa ni la proteína completa, ni fragmentos de escisión en el corazón de ratones WT inyectados con AAV2/9-desm-CAPN3-miR208aT (Fig. 6C), lo que indica una regulación a nivel de traducción (Fig. 6D).

50

En conclusión, estos resultados muestran que miR208aT es capaz de reducir la toxicidad cardíaca del transgén CAPN3.

4) Combinación de las dos estrategias:

5 Se construyeron nuevos vectores asociando los promotores CAPN3 y miR-206 y 2 copias de la secuencia diana de miR-208a: AAV2/9-pC3-CAPN3-miR208aT y AAV2/9-pmiR206-CAPN3-miR208aT. Los ratones C3KO (desactivación genética para la calpaína 3) recibieron una inyección de $1,2 \times 10^{13}$ vg/kg de estos vectores. Como se observó anteriormente en ratones silvestres, ninguno de los 3 vectores (AAV2/9-desm-CAPN3-miR208aT, AAV2/9-pC3-CAPN3-miR208aT y AAV2/9-pmiR206-CAPN3-miR208aT) resultó ser tóxico para el corazón, 3 meses después de la inyección (los resultados no se muestran).

10 Por el contrario, un examen histológico y morfológico de los músculos esqueléticos de ratones C3KO con una edad de 4 semanas y a los que se les inyectó con ayuda de estos vectores desveló un efecto positivo de la expresión de la calpaína 3 en los signos patológicos del modelo murino. Los músculos del tibial anterior (TA) inyectados con la ayuda de estos vectores mostraron características histológicas mejoradas con respecto a los inyectados con PBS (Fig. 7A). Un análisis morfométrico de secciones de músculos de TA coloreados con HPS desveló una disminución significativa de las fibras centronucleadas (CNF) en los músculos inyectados con la ayuda del vector (Fig. 9B a la izquierda). Con los músculos PSO (músculo ilio-*psoas*) se obtuvieron resultados similares e incluso si la disminución observada con AAV2/9-pC3-CAPN3-miR208aT y AAV2/9-pmiR206-CAPN3-miR208aT no era estadísticamente significativa.

20 En conclusión, estos resultados indican que la expresión de la calpaína 3 en los músculos esqueléticos transducidos con la ayuda de estos vectores recombinantes puede corregir los signos patológicos de un ratón con déficit de calpaína 3, sin presentar toxicidad cardíaca.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENETHON
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

30 <120> SISTEMA DE EXPRESIÓN PARA UNA TERAPIA GENÉTICA SELECTIVA

<130> G143-B-33520 EP DIV

35 <140> PCT/FR/2014/050866
<141> 10-04-2014

<150> FR1353306
<151> 11-04-2013

40 <160> 29

<170> BiSSAP 1.2

45 <210> 1
<211> 603
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50 <220>
<223> N.º de Registro NCBI: NP_000243.1

<400> 1

ES 2 876 422 T3

Met Ala Ser Ala Ser Thr Ser Lys Tyr Asn Ser His Ser Leu Glu Asn
1 5 10 15
Glu Ser Ile Lys Arg Thr Ser Arg Asp Gly Val Asn Arg Asp Leu Thr
20 25 30
Glu Ala Val Pro Arg Leu Pro Gly Glu Thr Leu Ile Thr Asp Lys Glu
35 40 45
Val Ile Tyr Ile Cys Pro Phe Asn Gly Pro Ile Lys Gly Arg Val Tyr
50 55 60
Ile Thr Asn Tyr Arg Leu Tyr Leu Arg Ser Leu Glu Thr Asp Ser Ser
65 70 75 80
Leu Ile Leu Asp Val Pro Leu Gly Val Ile Ser Arg Ile Glu Lys Met
85 90 95
Gly Gly Ala Thr Ser Arg Gly Glu Asn Ser Tyr Gly Leu Asp Ile Thr
100 105 110
Cys Lys Asp Met Arg Asn Leu Arg Phe Ala Leu Lys Gln Glu Gly His
115 120 125
Ser Arg Arg Asp Met Phe Glu Ile Leu Thr Arg Tyr Ala Phe Pro Leu
130 135 140
Ala His Ser Leu Pro Leu Phe Ala Phe Leu Asn Glu Glu Lys Phe Asn
145 150 155 160
Val Asp Gly Trp Thr Val Tyr Asn Pro Val Glu Glu Tyr Arg Arg Gln
165 170 175
Gly Leu Pro Asn His His Trp Arg Ile Thr Phe Ile Asn Lys Cys Tyr
180 185 190
Glu Leu Cys Asp Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Val Val Pro Tyr Arg Ala
195 200 205
Ser Asp Asp Asp Leu Arg Arg Val Ala Thr Phe Arg Ser Arg Asn Arg
210 215 220
Ile Pro Val Leu Ser Trp Ile His Pro Glu Asn Lys Thr Val Ile Val
225 230 235 240
Arg Cys Ser Gln Pro Leu Val Gly Met Ser Gly Lys Arg Asn Lys Asp
245 250 255
Asp Glu Lys Tyr Leu Asp Val Ile Arg Glu Thr Asn Lys Gln Ile Ser
260 265 270
Lys Leu Thr Ile Tyr Asp Ala Arg Pro Ser Val Asn Ala Val Ala Asn

ES 2 876 422 T3

		275					280					285			
Lys	Ala	Thr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Glu	Ser	Asp	Asp	Ala	Tyr	His	Asn	Ala
	290					295					300				
Glu	Leu	Phe	Phe	Leu	Asp	Ile	His	Asn	Ile	His	Val	Met	Arg	Glu	Ser
305					310					315					320
Leu	Lys	Lys	Val	Lys	Asp	Ile	Val	Tyr	Pro	Asn	Val	Glu	Glu	Ser	His
				325					330					335	
Trp	Leu	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Thr	His	Trp	Leu	Glu	His	Ile	Lys	Leu
			340					345					350		
Val	Leu	Thr	Gly	Ala	Ile	Gln	Val	Ala	Asp	Lys	Val	Ser	Ser	Gly	Lys
		355					360					365			
Ser	Ser	Val	Leu	Val	His	Cys	Ser	Asp	Gly	Trp	Asp	Arg	Thr	Ala	Gln
370						375					380				
Leu	Thr	Ser	Leu	Ala	Met	Leu	Met	Leu	Asp	Ser	Phe	Tyr	Arg	Ser	Ile
385					390					395					400
Glu	Gly	Phe	Glu	Ile	Leu	Val	Gln	Lys	Glu	Trp	Ile	Ser	Phe	Gly	His
				405					410					415	
Lys	Phe	Ala	Ser	Arg	Ile	Gly	His	Gly	Asp	Lys	Asn	His	Thr	Asp	Ala
			420					425					430		
Asp	Arg	Ser	Pro	Ile	Phe	Leu	Gln	Phe	Ile	Asp	Cys	Val	Trp	Gln	Met
		435					440					445			
Ser	Lys	Gln	Phe	Pro	Thr	Ala	Phe	Glu	Phe	Asn	Glu	Gln	Phe	Leu	Ile
	450					455					460				
Ile	Ile	Leu	Asp	His	Leu	Tyr	Ser	Cys	Arg	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Phe
465					470					475					480
Asn	Cys	Glu	Ser	Ala	Arg	Glu	Arg	Gln	Lys	Val	Thr	Glu	Arg	Thr	Val
				485					490					495	
Ser	Leu	Trp	Ser	Leu	Ile	Asn	Ser	Asn	Lys	Glu	Lys	Phe	Lys	Asn	Pro
			500					505						510	
Phe	Tyr	Thr	Lys	Glu	Ile	Asn	Arg	Val	Leu	Tyr	Pro	Val	Ala	Ser	Met
		515					520					525			
Arg	His	Leu	Glu	Leu	Trp	Val	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Arg	Trp	Asn	Pro	Arg
	530					535					540				
Ile	Lys	Gln	Gln	Gln	Pro	Asn	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Tyr	Met	Glu	Leu
545					550					555					560
Leu	Ala	Leu	Arg	Asp	Glu	Tyr	Ile	Lys	Arg	Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Leu
				565					570					575	
Ala	Asn	Ser	Ala	Lys	Leu	Ser	Asp	Pro	Pro	Thr	Ser	Pro	Ser	Ser	Pro
			580				585							590	
Ser	Gln	Met	Met	Pro	His	Val	Gln	Thr	His	Phe					
		595					600								

ES 2 876 422 T3

<210> 2
 <211> 603
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<220>
 <223> N.º de Registro NCBI: AAC77821.1

<400> 2

10

```

Met Ala Ser Ala Ser Ala Ser Lys Tyr Asn Ser His Ser Leu Glu Asn
1          5          10          15
Glu Ser Ile Lys Lys Val Ser Gln Asp Gly Val Ser Gln Asp Val Ser
20          25          30
Glu Thr Val Pro Arg Leu Pro Gly Glu Leu Leu Ile Thr Glu Lys Glu
35          40          45
Val Ile Tyr Ile Cys Pro Phe Asn Gly Pro Ile Lys Gly Arg Val Tyr
50          55          60
Ile Thr Asn Tyr Arg Leu Tyr Leu Arg Ser Leu Glu Thr Asp Ser Ala
65          70          75          80
Leu Ile Leu Asp Val Pro Leu Gly Val Ile Ser Arg Ile Glu Tyr Met
85          90          95
    
```

Gly Gly Ala Thr Ser Arg Gly Glu Asn Ser Tyr Gly Leu Asp Ile Thr
 100 105 110
 Cys Lys Asp Leu Arg Asn Leu Arg Phe Ala Leu Lys Gln Glu Gly His
 115 120 125
 Ser Arg Arg Asp Met Phe Glu Ile Leu Val Lys His Ala Phe Pro Leu
 130 135 140
 Ala His Asn Leu Pro Leu Phe Ala Phe Val Asn Glu Glu Lys Phe Asn
 145 150 155 160
 Val Asp Gly Trp Thr Val Tyr Asn Pro Val Glu Glu Tyr Arg Arg Gln
 165 170 175
 Gly Leu Pro Asn His His Trp Arg Ile Ser Phe Ile Asn Lys Cys Tyr
 180 185 190
 Glu Leu Cys Glu Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Val Val Pro Tyr Arg Thr
 195 200 205
 Ser Asp Asp Asp Leu Arg Arg Ile Ala Thr Phe Arg Ser Arg Asn Arg
 210 215 220
 Leu Pro Val Leu Ser Trp Ile His Pro Glu Asn Lys Met Val Ile Met
 225 230 235 240
 Arg Cys Ser Gln Pro Leu Val Gly Met Ser Gly Lys Arg Asn Lys Asp
 245 250 255
 Asp Glu Lys Tyr Leu Asp Val Ile Arg Glu Thr Asn Lys Gln Thr Ser
 260 265 270
 Lys Leu Met Ile Tyr Asp Ala Arg Pro Ser Val Asn Ala Val Ala Asn
 275 280 285
 Lys Ala Thr Gly Gly Gly Tyr Glu Ser Asp Asp Ala Tyr Gln Asn Ser
 290 295 300
 Glu Leu Ser Phe Leu Asp Ile His Asn Ile His Val Met Arg Glu Ser
 305 310 315 320
 Leu Lys Lys Val Lys Asp Ile Val Tyr Pro Asn Ile Glu Glu Ser His
 325 330 335
 Trp Leu Ser Ser Leu Glu Ser Thr His Trp Leu Glu His Ile Lys Leu
 340 345 350
 Val Leu Thr Gly Ala Ile Gln Val Ala Asp Gln Val Ser Ser Gly Lys
 355 360 365
 Ser Ser Val Leu Val His Cys Ser Asp Gly Trp Asp Arg Thr Ala Gln
 370 375 380
 Leu Thr Ser Leu Ala Met Leu Met Leu Asp Ser Phe Tyr Arg Thr Ile
 385 390 395 400
 Glu Gly Phe Glu Ile Leu Val Gln Lys Glu Trp Ile Ser Phe Gly His
 405 410 415
 Lys Phe Ala Ser Arg Ile Gly His Gly Asp Lys Asn His Ala Asp Ala
 420 425 430
 Asp Arg Ser Pro Ile Phe Leu Gln Phe Ile Asp Cys Val Trp Gln Met
 435 440 445
 Ser Lys Gln Phe Pro Thr Ala Phe Glu Phe Asn Glu Gly Phe Leu Ile
 450 455 460
 Thr Val Leu Asp His Leu Tyr Ser Cys Arg Phe Gly Thr Phe Leu Phe
 465 470 475 480
 Asn Cys Asp Ser Ala Arg Glu Arg Gln Lys Leu Thr Glu Arg Thr Val
 485 490 495
 Ser Leu Trp Ser Leu Ile Asn Ser Asn Lys Asp Lys Phe Lys Asn Pro
 500 505 510
 Phe Tyr Thr Lys Glu Ile Asn Arg Val Leu Tyr Pro Val Ala Ser Met
 515 520 525
 Arg His Leu Glu Leu Trp Val Asn Tyr Tyr Ile Arg Trp Asn Pro Arg
 530 535 540
 Val Lys Gln Gln Gln Pro Asn Pro Val Glu Gln Arg Tyr Met Glu Leu
 545 550 555 560
 Leu Ala Leu Arg Asp Tyr Ile Lys Arg Leu Glu Glu Leu Gln Leu
 565 570 575
 Ala Asn Ser Ala Lys Leu Ala Asp Ala Pro Ala Ser Thr Ser Ser Ser
 580 585 590
 Ser Gln Met Val Pro His Val Gln Thr His Phe
 595 600

<210> 3

<211> 603

<212> PRT

5 <213> *Canis lupus*

<220>

<223> N.º de Registro NCBI : XP_855209.1

10 <400> 3

Met Ala Ser Ala Pro Thr Ser Lys Tyr Asn Ser His Ser Leu Glu Asn
 1 5 10 15
 Glu Ser Ile Lys Arg Thr Ser Arg Asp Gly Val Asn Trp Asp Leu Ser
 20 25 30
 Glu Ala Val Pro Arg Leu Pro Gly Glu Thr Arg Ile Thr Asp Lys Glu
 35 40 45
 Val Ile Tyr Ile Cys Pro Phe Asn Gly Pro Ile Lys Gly Arg Val Tyr
 50 55 60
 Ile Thr Asn Tyr Arg Leu Tyr Leu Arg Ser Leu Glu Thr Asp Ser Ala
 65 70 75 80
 Leu Ile Leu Asp Val Pro Leu Gly Val Ile Ser Arg Ile Glu Lys Met
 85 90 95
 Gly Gly Ala Thr Ser Arg Gly Glu Asn Ser Tyr Gly Leu Asp Ile Thr
 100 105 110
 Cys Lys Asp Met Arg Asn Leu Arg Phe Ala Leu Lys Gln Glu Gly His
 115 120 125
 Ser Arg Arg Asp Met Phe Glu Ile Leu Thr Arg Tyr Ala Phe Pro Leu
 130 135 140
 Ala His Ser Leu Pro Ile Phe Ala Phe Leu Asn Glu Glu Lys Phe Asn
 145 150 155 160
 Val Asp Gly Trp Thr Val Tyr Asn Pro Val Glu Glu Tyr Arg Arg Gln
 165 170 175
 Gly Leu Pro Asn His His Trp Arg Ile Thr Phe Ile Asn Lys Cys Tyr
 180 185 190
 Glu Leu Cys Asp Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Val Val Pro Tyr Arg Ala
 195 200 205
 Ser Asp Asp Asp Leu Arg Arg Val Ala Thr Phe Arg Ser Arg Asn Arg
 210 215 220
 Ile Pro Val Leu Ser Trp Ile His Pro Glu Asn Lys Thr Val Ile Val
 225 230 235 240
 Arg Cys Ser Gln Pro Leu Val Gly Met Ser Gly Lys Arg Asn Lys Asp
 245 250 255
 Asp Glu Lys Tyr Leu Asp Val Ile Arg Glu Thr Asn Arg Gln Ile Ser
 260 265 270
 Lys Leu Thr Ile Tyr Asp Ala Arg Pro Asn Val Asn Ala Val Ala Asn
 275 280 285
 Lys Ala Thr Gly Gly Gly Tyr Glu Ser Asp Asp Ala Tyr His Asn Ala
 290 295 300
 Glu Leu Phe Phe Leu Asp Ile His Asn Ile His Val Met Arg Glu Ser
 305 310 315 320
 Leu Lys Lys Val Lys Asp Ile Val Tyr Pro Asn Val Glu Glu Ser His
 325 330 335
 Trp Leu Ser Ser Leu Glu Ser Thr His Trp Leu Glu His Ile Lys Leu
 340 345 350
 Val Leu Thr Gly Ala Ile Gln Val Ala Asp Arg Val Ser Ser Gly Lys
 355 360 365
 Ser Ser Val Leu Val His Cys Ser Asp Gly Trp Asp Arg Thr Ala Gln
 370 375 380
 Leu Thr Ser Leu Ala Met Leu Met Leu Asp Ser Phe Tyr Arg Ser Ile
 385 390 395 400
 Glu Gly Phe Glu Ile Leu Val Gln Lys Glu Trp Ile Ser Phe Gly His
 405 410 415

ES 2 876 422 T3

```

Lys Phe Ala Ser Arg Ile Gly His Gly Asp Lys Asn His Ala Asp Ala
      420                      425          430
Asp Arg Ser Pro Ile Phe Leu Gln Phe Ile Asp Cys Val Trp Gln Met
      435                      440          445
Ser Lys Gln Phe Pro Thr Ala Phe Glu Phe Asn Glu Arg Phe Leu Ile
      450                      455          460
Thr Ile Leu Asp His Leu Tyr Ser Cys Arg Phe Gly Thr Phe Leu Tyr
      465                      470          475          480
Asn Cys Glu Ser Ala Arg Glu Lys Gln Lys Val Thr Glu Arg Thr Val
      485                      490          495
Ser Leu Trp Ser Leu Ile Asn Ser Asn Lys Asp Lys Phe Lys Asn Pro
      500                      505          510
Phe Tyr Thr Lys Glu Ile Asn Arg Val Leu Tyr Pro Val Ala Ser Met
      515                      520          525
Arg His Leu Glu Leu Trp Val Asn Tyr Tyr Ile Arg Trp Asn Pro Arg
      530                      535          540
Ile Lys Gln Gln Gln Pro Asn Pro Val Glu Gln Arg Tyr Val Glu Leu
      545                      550          555          560
Leu Ala Leu Arg Asp Glu Tyr Ile Gln Arg Leu Glu Glu Leu Gln Leu
      565                      570          575
Ala Ser Ser Ala Lys Leu Pro Asp Pro Ser Thr Ser Pro Ala Gly Pro
      580                      585          590
Ser Gln Met Met Pro His Val Arg Thr His Phe
      595                      600

```

<210> 4

<211> 3452

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..3452

<223> /mol_tipo="ADN sin asignar"

/nota="N.º de Registro NCBI : NM_000252.2"

/organismo="*Homo sapiens*"

15 <400> 4

ES 2 876 422 T3

agagggggcg gagcagggcc cggcagccga gcagcctggc aacggcgggtg gcgcccggag	60
cccgagagtt tccaggatgg cttctgcata aacttctaaa tataattcac actccttgga	120
gaatgagtct attaagagga cgtctcgaga tggagtcaat cgagatctca ctgaggctgt	180
tcctcgactt ccaggagaaa cactaatcac tgacaaagaa gttatttaca tatgtccttt	240
caatggcccc attaagggaa gagtttacat cacaaattat cgtctttatt taagaagttt	300
ggaaacggat tcttctctaa tacttgatgt tcctctgggt gtgatctcga gaattgaaaa	360
aatgggaggc gcgacaagta gaggagaaaa ttctatggt ctagatatta cttgtaaaga	420
catgagaaac ctgaggttcg ctttgaaaca ggaaggccac agcagaagag atatgtttga	480
gatcctcacg agatacgcgt ttcccctggc tcacagtctg ccattatttg catttttaa	540
tgaagaaaag tttaacgtgg atggatggac agtttacaat ccagtggaag aatacaggag	600
gcagggcttg cccaatcacc attggagaat aacttttatt aataagtgct atgagctctg	660
tgacacttac cctgctcttt tgggtggtcc gtatcgtgcc tcagatgatg acctccggag	720
agttgcaact tttagggtccc gaaatcgaat tccagtgctg tcatggattc atccagaaaa	780

ES 2 876 422 T3

taagacggtc attgtgcggt gcagtcagcc tcttgtcggt atgagtggga aacgaaataa	840
agatgatgag aaatatctcg atgttatcag ggagactaat aaacaaatth cttaaactcac	900
catttatgat gcaagaccca gcgtaaatgc agtggccaac aaggcaacag gaggaggata	960
tgaaagtgat gatgcatatc ataacgccga acttttcttc ttagacattc ataatattca	1020
tgttatgctg gaatctttaa aaaaagtga ggacattggt taccctaag tagaagaatc	1080
tcattgggtg tccagtttg agtctactca ttggttagaa catatcaagc tcgttttgac	1140
aggagccatt caagtagcag acaaagtthc ttcagggaag agttcagtgc ttgtgcattg	1200
cagtgcagga tgggacagga ctgctcagct gacatccttg gccatgctga tgttgatag	1260
cttctatagg agcattgaag ggttcgaaat actggtacaa aaagaatgga taagtthtg	1320
acataaatth gcactctgaa taggtcatgg tgataaaaac cacaccgatg ctgaccgthc	1380
tcctatthth ctccagthta ttgattgtgt gtggcaaatg tcaaaacagt tccctacagc	1440
thttgaatth aatgaacaat thttgattat aatthtgat catctgtata gttgccgatt	1500
tggtactthc ttattcaact gtgaatctgc tcgagaaaga cagaaggth cagaaaggac	1560
tgthtctthta tggctactga taaacagtha taaagaaaa thcaaaaacc cthtctatac	1620
taaagaaatc aatcgagtht tatatccagt tgccagtatg cgtcacttg aactctgggt	1680
gaattactac attagatgga accccaggat caagcaaca cagccgaatc cagtggagca	1740
gcgttacatg gagctcttag ccttacgcga cgaatacata aagcggcttg aggaactgca	1800
gctcgccaac tctgccagc thtctgatcc cccaactthc ccttccagtc cthcgcaaat	1860
gatgccccat gtgcaaaact acttctgagg ggggaccctg gcaccgcatt agagctcgaa	1920
ataaaggcga tagctgactt tcattthggg cattthgtaa aagtagatta aaataththc	1980
ctccatgtag aactthgaact aacataatct taaactcttg aatatgtgcc thctagaata	2040
catattaca gaaaactaca gggctccacac ggcaatcaga agaaaggagc tgagatgagg	2100
thttggaaaa ccctgacacc thtaaaaagc agththtgaa agacaaaatt tagatthaat	2160
thacgtcttg agaaacta tatatacaat atathththg tgggctthaat tgaaacaaca	2220
thathththaa atcaagggg ataththth gtggaatgga ththctgaa gctgctthaac	2280
agthgctthg gattctctaa gatgaatcca aatgtgaaag atgcatgth cthgcaaaac	2340
caaatthgagc tcagcttct aggcattacc caaaagcaag gtgthtaagt aatthgacgc	2400
thttatacca tcatgagthg tgactthagg agaaatagct gtatagatga gthththcatt	2460
aththgaaat thaggthtag aaaaatgthth cccctaatth tccagagaag cctathththta	2520
taththththaa aaactgacag ggcccagthta aatatgathth gcathththta aatthgcccag	2580
thththththc taaaththth catgagctth cctaaaatthc ggaatgthth thgggththg	2640

ES 2 876 422 T3

```

gcaaacccca aagagagcac tgtccaagga tgtcgggagc atcctgctgc ttaggggaat 2700
gttttcgcaa atgttgctct agtcagtcca gctcatctgc caaatgtag ggctaccgctc 2760
ttggatgcat gagctattgc tagagcatca tccttagaaa tcagtgcccc agatgtacat 2820
gtggtgagcg tattcttgaa agtattgtgt ttatgcattt caatttcaat ggtggtggct 2880
tcccccccc accccacgcg tgcataaaaa ctggttctac aaatttttac ttgaagtacc 2940
aggccgtttg ctttttcagg ttgttttggt ttatagtatt aagtgaaatt ttaaatgcac 3000
agttctattt gctatctgaa ctaattcatt tattaagtat atttgtaaaa gctaaggctc 3060
gagttaaaac aatgaagtgt tttacaatga tttgtaaagg actatttata actaatatgg 3120
ttttgttttc aatgaattaa gaaagattaa atatatcttt gtaaattatt ttatgtcata 3180
gtttaattgg tctaccaagt aagacatctc aaatacagta gtataatgta tgaattttgt 3240
aagtataaga aattttatta gacattctct tactttttgt aaatgctgta aatatttcat 3300
aaattaacaa agtgtcactc cataaaaaga aagctaatac taatagccta aaagattttg 3360
tgaaatttca tgaaaacttt ttaatggcaa taatgactaa agacctgctg taataaatgt 3420
attaactgaa acctaataaaa aaaaaaaaaa aa 3452

```

```

<210> 5
<211> 3339
5 <212> ADN
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> fuente
10 <222> 1..3339
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
      /nota="N.º de Registro NCBI : AF_073996"
      /organismo= "Mus musculus"

```

```

15 <400> 5

```

ES 2 876 422 T3

cggtgagttc gctttcttgg ctgacctggc tcggagccgg gcattgcggg gatccaggat	60
tggaaagggt ccaggatggc ttctgcatca gcatctaagt ataattcaca ctcccttgag	120
aatgaatcca ttaagaaagt gtctcaagat ggagtcagtc aggatgtgag tgagactgtc	180
cctcggctcc caggggagtt actaattact gaaaaagaag ttatttacat atgtcctttc	240
aatggcccca ttaaggaag agtttacatc acaaattatc gtctttattt aagaagtttg	300
gaaacggatt ctgctctaat acttgatggt cctctgggtg tgatatcaag aattgaatat	360
atgggaggcg cgactagtag aggagaaaat tcctatggtc tagatattac ttgtaaagat	420
ttgagaaacc tgaggtttgc attgaagcaa gaaggccaca gcagaagaga tatgtttgag	480
atccttgtaa aacatgcctt tcctctggca cacaatctgc cattatttgc atttgtaa	540
gaagagaagt ttaacgtgga tgggtggact gtttataatc cagttgaaga atatagaag	600
cagggcctgc ccaatcacca ttggaggata agttttatta acaagtgcta tgagctctgt	660

ES 2 876 422 T3

gagacatacc ctgctctttt ggtggttccc tatcggacct cagatgatga tcttaggag 720
atcgcaacgt ttagatcccg aaatcggcct cctgtactgt cgtggattca cccagaaaac 780
aaaatgggtca ttatgcgctg cagtcagcct cttgtcggta tgagtggtaa aagaaataaa 840
gatgacgaga aatacctgga tgtgatcagg gaaactaaca aacaaacttc taagctcatg 900
atztatgatg cacgaccag tgtaaatgca gtcgccaaca aggcaacagg aggaggatat 960
gaaagtgatg acgcatatca aaactcagaa ctttccttct tagacattca taatattcat 1020
gttatgcgag aatctttaaa aaaagtgaaa gatattgttt atcccaacat agaagaatct 1080
cattggttgt ccagtttgga gtctactcat tggtagaac atatcaagct tgttctgacc 1140
ggtgccattc aagtggcaga ccaagtgtct tcaggaaaga gctcggtaact tgtgcactgc 1200
agtgacggat gggacaggac cgctcagctg acatccttgg ccatgctgat gttggacagc 1260
ttctacagaa ctattgaagg ctttgagata ttggtacaga aagagtggat aagttttggc 1320
cataaatttg catctagaat aggtcatggt gataaaaacc atgctgatgc tgatcgatct 1380
cctatttttc ttcagtttat tgactgtgtg tggcagatgt cgaaacagtt ccccacagct 1440
tttgagttca atgaaggctt tttgattacc gttttggatc atctgtatag ctgtcagattt 1500
ggtactttct tattcaactg tgactcggct cgagaaagac agaaacttac agaaagaaca 1560
gtttctctat ggtcgctaat taacagcaat aaagacaaat tcaaaaaccc cttctataca 1620
aaagaaatca atcgggtttt gtatccagtt gccagcatgc gtcacttgga actgtgggtg 1680
aattattaca tccgatggaa tcccagggtc aagcagcaac agcccaaccc agtggagcag 1740
cgttacatgg agcttttggc cttgcgtgac gattatataa agaggctcga ggaattgcag 1800
ctggccaact ccgccaagct tgotgatgoc cccgcttoga cttccagttc gtcacagatg 1860
gtgccccatg tgcagacgca cttctgaggg gactcacttc tggcactgca cttgaactct 1920
agataagtga aatagctgac tctcattctg ggcagtgga caaagtagat ttaaagtgtc 1980
tgcctccatt tagaagttca actaacatct tagacttttg agtatgtgcc ttctgtaata 2040
catatcacia gaaatcgatg gtgtccgtgt ggcaatcata aggaaggagt caagaggggg 2100
ttctggaaaa tctcatact tttttttaca aagcactttt gcaaagataa aacttaaatt 2160
taatttacct ctatataaat tctacatata cagtatgtat tttgtgggct taattgaaat 2220
attattttaa atccaggggg gagatthgtt tgcaaaatgt attttcctcc agctgcttat 2280
aacagttgct ttggattatc taaaattaat ccaaatgtga aagatgggta ttactgccaa 2340
agccaaattg cactctgctt cttcagcaaa ttccaagagc aaggcgttta aataattgcc 2400
aatttttatt ttaccataag tggtaaggta aaaagaaaga tgaacatttc atcattttga 2460
atttttgaaa ataaaagggtt ctccatcat ttttcaagag aagcacattt ttatattaag 2520

ES 2 876 422 T3

```

aaaaagtgat aaggtttgat ttttttttcc ctcaacattc tcagctttgc tttctaaatt 2580
atcccatgat ttttgtctaa cactgagtca tactcagggt gaaggaaacc cataaatagc 2640
actgtgcgag gagctggctg gcttctgctg cttagaggaa tatgttcgca aacatgcctc 2700
tagtcaattc gccttatctg ctgaagtgta ggggcaccgc cttgaatgga tgagctatgg 2760
ctagagcadc tttctttaca gtaatgcccc aggtgtattc tgtttatgtc tctctgttta 2820
aatgggtgtg gtgcataaaa acttgctctg cacattatta cttgaagtac tgggcaattt 2880
gctttttcag gtttttttcc attttgtttt gtagtatgaa atggaatttt aaatgcacag 2940
ttctatttga tatccgaact aattcattta gtaaataat ttgtaaaagc taaagttaaa 3000
tcaattaatg ttttacagtg atttgtaaag gattatztat agctaatatg gttttgtttt 3060
cagtgaatta agagagatta catttatctt tgtaaattat tttatgtcat agcttaatgg 3120
cctaccaaat gagacatctc aatataata gtataatgta tggattttgt aagtataaaa 3180
attattagat attcgtttgc tttttgtaaa cactgtaa atttcataaa ttaaaatgtg 3240
tcaactcata agaagaaaaa actaatacta atagttgaca ggaattggtg aaatttcatg 3300
aaaatatttt cattgcaata aatattaaaa gacctgctg 3339

```

```

<210> 6
<211> 1841
5 <212> ADN
<213> Canis lupus

```

```

<220>
<221> fuente
10 <222> 1..1841
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
      /nota="N.º de Registro NCBI : XM_850116"
      /organismo= "Canis lupus"

```

```

15 <400> 6

```

ES 2 876 422 T3

cgggtggcgcc cggacccccga gtttccagta tggcttctgc accaacttct aatataatt 60
 cacactcctt ggagaacgag tctattaaga ggacttctag ggatggagtt aattgggacc 120
 tgagtgaggc tgttcctcga cttccaggag aaactcgtat cactgacaaa gaagttatth 180
 acatatgtcc tttcaatggc cccattaagg gaagagttha catcacaaat tategtctth 240
 atttaagaag tttggaaaacg gattctgctc taataactga tgttcctctg ggtgtgatct 300
 ccagaattga aaaaatggga ggcgcgacaa gtagaggaga aaattcgtat ggtctagata 360
 ttacttghaa agacatgagg aacttgaggt tgcgcgtgaa acaggaaggc cacagcagga 420
 gggatatgth tgagatcctc acaagatacg cctttccctt ggcccacagt ctgccaatat 480
 ttgcatttct aaacgaagaa aagtttaacg tggatgggtg gacagtttat aatccagtcg 540
 aagaatacag aaggcagggc ttgcccattc accactggag aataacttht atcaacaagt 600
 gctatgagct ctgtgacact tatectgctc tcttgggtgt tccatategt gcctcagatg 660
 acgatctcag gagagttgca acttttagat ccagaaatcg aattccagtg ctgtcatgga 720
 ttcatccaga aaacaagacg gtcattgtgc gctgcagcca gcctcttgtc ggaatgagtg 780
 gtaaaccgaa taaagatgat gagaagtac tcatgttat cagggagact aacagacaaa 840
 tttctaaact cacaatctat gatgccagac ccaatgtaa tgccgtggcc aacaaggcaa 900
 caggaggag agatgaaagt gatgatgcat atcataacgc cgaacttht tcttagaca 960
 ttcataacat tcatgttatg cgggaatctt taaaaaagt caaagacatc gtttatccta 1020
 atgtggaaga gtctcactgg ctgtccagtt tggagtctac ccattggtta gaacatatca 1080
 agcttghtht gacgggagcc attcaagtag cagacagagt tcttcaggg aagagctcag 1140
 tgctcgtgca ctgcagcagat ggatgggaca ggactgcca gctgacgtcc ttggccatgc 1200
 tgatgctcga cagcttctat cggagcatcg agggcttga aatattggtta caaaggaat 1260
 ggataagtht tggacataag tttgcatcta gaataggtca tggtgataaa aaccacgccg 1320
 acgctgaccg gtctcctatt tttctccagt ttattgattg tgtatggcaa atgtcaaac 1380
 agttccctac agctthtgaa ttcaatgaac gattthtgat tacaaththg gatcatctgt 1440
 atagttgccg gthtggtacc tcttgtaca actgtgaatc tgctcgggaa aaacagaaag 1500
 tgacggaacg aacagtatct ttatggtcac tgataaacag taataaggac aaattcaaaa 1560
 atcccttcta tactaaagaa atcaatcgag ttttatatcc agttgccagt atgcgtcact 1620
 tggaaactthg ggtgaattac tacattagat ggaaccccag gatcaagcaa caacagccca 1680
 acccagtgga gcagcgttac gtggagctgt tggccttgcg tgacgaatac atacagcggc 1740
 tcgaggagct gcagctcgc agctcggcca agctgccga cccctcgacc tcaccggccg 1800
 ggccctcgca gatgatgcc cagtgcgca cacacttctg a 1841

<210> 7
 <211> 821
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> N.º de Registro NCBI: NP_000061.1

<400> 7

10

```

Met Pro Thr Val Ile Ser Ala Ser Val Ala Pro Arg Thr Ala Ala Glu
1          5          10          15
Pro Arg Ser Pro Gly Pro Val Pro His Pro Ala Gln Ser Lys Ala Thr
          20          25          30
Glu Ala Gly Gly Gly Asn Pro Ser Gly Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Ser
          35          40          45
Arg Asn Phe Pro Ile Ile Gly Val Lys Glu Lys Thr Phe Glu Gln Leu
          50          55          60
His Lys Lys Cys Leu Glu Lys Lys Val Leu Tyr Val Asp Pro Glu Phe
65          70          75          80
Pro Pro Asp Glu Thr Ser Leu Phe Tyr Ser Gln Lys Phe Pro Ile Gln
          85          90          95
    
```

Phe Val Trp Lys Arg Pro Pro Glu Ile Cys Glu Asn Pro Arg Phe Ile
 100 105 110
 Ile Asp Gly Ala Asn Arg Thr Asp Ile Cys Gln Gly Glu Leu Gly Asp
 115 120 125
 Cys Trp Phe Leu Ala Ala Ile Ala Cys Leu Thr Leu Asn Gln His Leu
 130 135 140
 Leu Phe Arg Val Ile Pro His Asp Gln Ser Phe Ile Glu Asn Tyr Ala
 145 150 155 160
 Gly Ile Phe His Phe Gln Phe Trp Arg Tyr Gly Glu Trp Val Asp Val
 165 170 175
 Val Ile Asp Asp Cys Leu Pro Thr Tyr Asn Asn Gln Leu Val Phe Thr
 180 185 190
 Lys Ser Asn His Arg Asn Glu Phe Trp Ser Ala Leu Leu Glu Lys Ala
 195 200 205
 Tyr Ala Lys Leu His Gly Ser Tyr Glu Ala Leu Lys Gly Gly Asn Thr
 210 215 220
 Thr Glu Ala Met Glu Asp Phe Thr Gly Gly Val Ala Glu Phe Phe Glu
 225 230 235 240
 Ile Arg Asp Ala Pro Ser Asp Met Tyr Lys Ile Met Lys Lys Ala Ile
 245 250 255
 Glu Arg Gly Ser Leu Met Gly Cys Ser Ile Asp Asp Gly Thr Asn Met
 260 265 270
 Thr Tyr Gly Thr Ser Pro Ser Gly Leu Asn Met Gly Glu Leu Ile Ala
 275 280 285
 Arg Met Val Arg Asn Met Asp Asn Ser Leu Leu Gln Asp Ser Asp Leu
 290 295 300
 Asp Pro Arg Gly Ser Asp Glu Arg Pro Thr Arg Thr Ile Ile Pro Val
 305 310 315 320
 Gln Tyr Glu Thr Arg Met Ala Cys Gly Leu Val Arg Gly His Ala Tyr
 325 330 335
 Ser Val Thr Gly Leu Asp Glu Val Pro Phe Lys Gly Glu Lys Val Lys
 340 345 350
 Leu Val Arg Leu Arg Asn Pro Trp Gly Gln Val Glu Trp Asn Gly Ser
 355 360 365
 Trp Ser Asp Arg Trp Lys Asp Trp Ser Phe Val Asp Lys Asp Glu Lys
 370 375 380
 Ala Arg Leu Gln His Gln Val Thr Glu Asp Gly Glu Phe Trp Met Ser
 385 390 395 400
 Tyr Glu Asp Phe Ile Tyr His Phe Thr Lys Leu Glu Ile Cys Asn Leu
 405 410 415
 Thr Ala Asp Ala Leu Gln Ser Asp Lys Leu Gln Thr Trp Thr Val Ser
 420 425 430
 Val Asn Glu Gly Arg Trp Val Arg Gly Cys Ser Ala Gly Gly Cys Arg
 435 440 445
 Asn Phe Pro Asp Thr Phe Trp Thr Asn Pro Gln Tyr Arg Leu Lys Leu
 450 455 460
 Leu Glu Glu Asp Asp Asp Pro Asp Asp Ser Glu Val Ile Cys Ser Phe
 465 470 475 480
 Leu Val Ala Leu Met Gln Lys Asn Arg Arg Lys Asp Arg Lys Leu Gly
 485 490 495
 Ala Ser Leu Phe Thr Ile Gly Phe Ala Ile Tyr Glu Val Pro Lys Glu
 500 505 510
 Met His Gly Asn Lys Gln His Leu Gln Lys Asp Phe Phe Leu Tyr Asn
 515 520 525
 Ala Ser Lys Ala Arg Ser Lys Thr Tyr Ile Asn Met Arg Glu Val Ser
 530 535 540
 Gln Arg Phe Arg Leu Pro Pro Ser Glu Tyr Val Ile Val Pro Ser Thr
 545 550 555 560
 Tyr Glu Pro His Gln Glu Gly Glu Phe Ile Leu Arg Val Phe Ser Glu
 565 570 575
 Lys Arg Asn Leu Ser Glu Glu Val Glu Asn Thr Ile Ser Val Asp Arg
 580 585 590
 Pro Val Lys Lys Lys Lys Thr Lys Pro Ile Ile Phe Val Ser Asp Arg

		595					600					605			
Ala	Asn	Ser	Asn	Lys	Glu	Leu	Gly	Val	Asp	Gln	Glu	Ser	Glu	Glu	Gly
	610					615					620				
Lys	Gly	Lys	Thr	Ser	Pro	Asp	Lys	Gln	Lys	Gln	Ser	Pro	Gln	Pro	Gln
625					630					635					640
Pro	Gly	Ser	Ser	Asp	Gln	Glu	Ser	Glu	Glu	Gln	Gln	Gln	Phe	Arg	Asn
				645					650					655	
Ile	Phe	Lys	Gln	Ile	Ala	Gly	Asp	Asp	Met	Glu	Ile	Cys	Ala	Asp	Glu
			660					665					670		
Leu	Lys	Lys	Val	Leu	Asn	Thr	Val	Val	Asn	Lys	His	Lys	Asp	Leu	Lys
			675					680					685		
Thr	His	Gly	Phe	Thr	Leu	Glu	Ser	Cys	Arg	Ser	Met	Ile	Ala	Leu	Met
	690					695					700				
Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Lys	Leu	Asn	Leu	Gln	Glu	Phe	His	His	Leu
705					710					715					720
Trp	Asn	Lys	Ile	Lys	Ala	Trp	Gln	Lys	Ile	Phe	Lys	His	Tyr	Asp	Thr
				725					730					735	
Asp	Gln	Ser	Gly	Thr	Ile	Asn	Ser	Tyr	Glu	Met	Arg	Asn	Ala	Val	Asn
			740					745					750		
Asp	Ala	Gly	Phe	His	Leu	Asn	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asp	Ile	Ile	Thr	Met
		755					760					765			
Arg	Tyr	Ala	Asp	Lys	His	Met	Asn	Ile	Asp	Phe	Asp	Ser	Phe	Ile	Cys
	770					775					780				
Cys	Phe	Val	Arg	Leu	Glu	Gly	Met	Phe	Arg	Ala	Phe	His	Ala	Phe	Asp
785					790					795					800
Lys	Asp	Gly	Asp	Gly	Ile	Ile	Lys	Leu	Asn	Val	Leu	Glu	Trp	Leu	Gln
				805					810					815	
Leu	Thr	Met	Tyr	Ala											
				820											

<210> 8
 <211> 3316
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..3316
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 /nota="N.º de Registro NCBI: NM_000070"
 /organismo="*Homo sapiens*"

15 <400> 8

ES 2 876 422 T3

cactctcttt ctctctccct ctggcatgca tgctgctggt aggagacccc caagtcaaca	60
ttgcttcaga aatccttttag cactcatttc tcaggagaac ttatggcttc agaatcacag	120
ctcggttttt aagatggaca taacctgtac gaccttctga tgggctttca actttgaact	180
ggatgtggac acttttctct cagatgacag aattactcca acttcccctt tgcagttgct	240
tcctttcctt gaaggtagct gtatottatt ttctttaaaa agctttttct tccaaagcca	300
cttgccatgc cgaccgtcat tagcgcacct gtggctccaa ggacagcggc tgagccccgg	360
tcccagggc cagttcctca cccggcccag agcaaggcca ctgaggctgg gggtggaac	420
ccaagtggca tctattcagc catcatcagc cgcaattttc ctattatcgg agtgaaagag	480
aagacattcg agcaacttca caagaaatgt ctagaaaaga aagttcttta tgtggaccct	540
gagttccac cggatgagac ctctctcttt tatagccaga agttcccat ccagttcgtc	600

ES 2 876 422 T3

tggaagagac	ctccggaat	ttgcgagaat	ccccgattta	tcattgatgg	agccaacaga	660
actgacatct	gtcaaggaga	gctagggggac	tgctggtttc	tcgcagccat	tgctgcctg	720
accctgaacc	agcaccttct	tttccgagtc	ataccccatg	atcaaagttt	catcgaaaac	780
tacgcagggg	tcttccactt	ccagttctgg	cgctatggag	agtgggtgga	cgtggttata	840
gatgactgcc	tgccaacgta	caacaatcaa	ctggttttca	ccaagtccaa	ccaccgcaat	900
gagttctgga	gtgctctgct	ggagaaggct	tatgctaagc	tccatggttc	ctacgaagct	960
ctgaaagggtg	ggaacaccac	agaggccatg	gaggacttca	caggaggggt	ggcagagttt	1020
tttgagatca	gggatgctcc	tagtgacatg	tacaagatca	tgaagaaagc	catcgagaga	1080
ggctccctca	tgggctgctc	cattgatgat	ggcacgaaca	tgacctatgg	aacctctcct	1140
tctggctctga	acatggggga	gttgattgca	cggatggtaa	ggaatatgga	taactcactg	1200
ctccaggact	cagacctcga	ccccagaggc	tcagatgaaa	gaccgaccgg	gacaatcatt	1260
ccggttcagt	atgagacaag	aatggcctgc	gggctggcca	gaggtcacgc	ctactctgtc	1320
acggggctgg	atgaggtccc	gttcaaaggt	gagaaagtga	agctgggtgcg	gctgcggaat	1380
ccgtggggcc	aggtggagtg	gaacggttct	tggagtgata	gatggaagga	ctggagcttt	1440
gtggacaaag	atgagaaggc	ccgtctgcag	caccaggtca	ctgaggatgg	agagttctgg	1500
atgtcctatg	aggatttcat	ctaccatttc	acaaagttgg	agatctgcaa	cctcacggcc	1560
gatgctctgc	agtctgacaa	gcttcagacc	tggacagtgt	ctgtgaacga	gggccgctgg	1620
gtacgggggt	gctctgccgg	aggctgcgcg	aaacttccag	atactttctg	gaccaaccct	1680
cagtaccgtc	tgaagctcct	ggaggaggac	gatgaccctg	atgactcgga	ggtgatttgc	1740
agcttcctgg	tggccctgat	gcagaagaac	cggcggaagg	accggaagct	aggggccagt	1800
ctcttcacca	ttggcttcgc	catctacgag	gttcccaaag	agatgcacgg	gaacaagcag	1860
cacctgcaga	aggacttctt	cctgtacaac	gcctccaagg	ccaggagcaa	aacctacatc	1920
aacatgcggg	aggtgtccca	gcgcttccgc	ctgcctccca	gcgagtacgt	catcgtgcc	1980
tccacctacg	agccccacca	ggagggggaa	ttcatcctcc	gggtcttctc	tgaaaagag	2040
aacctctctg	aggaagttga	aaataccatc	tccgtggatc	ggccagtgaa	aaagaaaaa	2100
accaagccca	tcatcttcgt	ttcggacaga	gcaaacagca	acaaggagct	gggtgtggac	2160
caggagtcag	aggagggcaa	aggcaaaaca	agccctgata	agcaaaagca	gtccccacag	2220
ccacagcctg	gcagctctga	tcaggaaagt	gaggaacagc	aacaattccg	gaacattttc	2280
aagcagatag	caggagatga	catggagatc	tgtgcagatg	agctcaagaa	ggtccttaac	2340
acagtcgtga	acaaacacaa	ggacctgaag	acacacgggt	tcacactgga	gtcctgccgt	2400
agcatgattg	cgctcatgga	tacagatggc	tctggaaagc	tcaacctgca	ggagttccac	2460
cacctctgga	acaagattaa	ggcctggcag	aaaattttca	aacactatga	cacagaccag	2520

ES 2 876 422 T3

tccggcacca tcaacagcta cgagatgcga aatgcagtca acgacgcagg attccacctc 2580
aacaaccagc tctatgacat cattaccatg cggtaacgag acaaacacat gaacatcgac 2640
tttgacagtt tcatctgctg ctctggttagg ctggagggca tgttcagagc ttttcatgca 2700
tttgacaagg atggagatgg tatcatcaag ctcaacgttc tggagtggct gcagctcacc 2760
atgtatgcct gaaccaggct ggccatcc aaagccatgc aggatcactc aggatttcag 2820
tttcaccctc tatttccaaa gccatttacc tcaaaggacc cagcagctac acccctacag 2880
gcttcaggc acctcatcag tcatgctcct cctccatttt acccctacc catccttgat 2940
cggctatgcc tagcctgacc cttagttaa gcaatgaggt aggaagaaca aacccttgtc 3000
cctttgccat gtggaggaaa gtgctgctc ctggctccgag ccgcctcgggt tctgaagcga 3060
gtgctcctgc ttaccttgct ctaggctgtc tgcagaagca cctgccggtg gcaactcagca 3120
cctccttgct ctagagccct ccatcacctt cacgctgtcc caccatgggc caggaaccaa 3180
accagcactg ggttctactg ctgtggggta aactaactca gtggaatagg gctggttact 3240
ttgggctgtc caactcataa gtttggtgctc attttgaaaa aagctgatct aaataaaggc 3300
atgtgtatgg ctggtc 3316

<210> 9
<211> 22
5 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> fuente
10 <222> 1..22
<223> /mol_tipo="otro ARN"
/nota="N.º de Registro: MIMT0000241"
/organismo="*Homo sapiens*"

15 <400> 9

auaagacgag caaaaagcuu gu 22

<210> 10
20 <211> 22
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
25 <221> fuente
<222> 1..22
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
/organismo="*Homo sapiens*"

30 <400> 10

acaagctttt tgctcgtctt at 22

<210> 11

<211> 1050
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..1050
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 /nota="Promotor de Desmina"
 10 /organismo="*Homo sapiens*"

<400> 11

```

ccccacagc tcctctcctg tgccttggtt cccagccatg cgttctcctc tataaatacc      60
cgctctggta tttggggttg gcagctgttg ctgccagggg gatggttggg ttgacatgcg      120
gctcctgaca aaacacaaac ccctggtgtg tgtgggcgtg ggtggtgtga gtaggggat      180
gaatcagggg gggggcgggg gaccagggg gcaggagcca cacaaagtct gtgccccggg      240
gggagcgcac atagcaattg gaaactgaaa gcttatcaga ccctttctgg aatcagccc      300
actgtttata aacttgaggc cccaccctcg acagtaccgg ggaggaagag ggcctgcact      360
agtccagagg gaaactgagg ctccagggcca gctcgcccat agacatacat ggcaggcagg      420
ctttggccag gatccctccg cctgccaggc gtctccctgc cctcccttcc tgcctagaga      480
ccccaccct caagcctggc tggcttttgc ctgagacca aacctcttgc acttcaagag      540
aatatntagc aacaaggttg tttagggcct ttctgggaa caggccttga ccctttaaga      600
aatgacccaa agtctctcct tgaccaaaaa ggggaccctc aaactaaagg gaagcctctc      660
ttctgctgtc tcccctgacc ccactcccc ccaccccagg acgaggagat aaccagggct      720
gaaagaggcc cgctggggg ctgcagacat gcttctgtgc tgcctggcg aaggattggt      780
aggcttgccc gtcacaggac ccccgctggc tgactcaggg gcgcaggcct cttgccccgg      840
agctggcctc cccgccccca cggccacggg ccgccccttc ctggcaggac agcgggatct      900
tgcagctgtc aggggagggg aggcgggggc tgatgtcagg agggatacaa atagtgccga      960
cggtggggg cctgtctctc cctcgcgcga tccactctcc ggccggccgc ctgccccccg     1020
cctcctccgt gcgccccca gcctcgcctg     1050
    
```

15 <210> 12
 <211> 1654
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..1654
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 25 /nota="Promotor de Calpaína 3"
 /organismo="*Homo sapiens*"

ES 2 876 422 T3

<400> 12

cacatgcctc cactctgcc	tacttgaat gtgctcatct	ccttacagcc cagggagcag	60
ctattgtggg tagaagacia	ggtggaggcc aggcaggcac	tcccttccc cagagccact	120
tatgctctca tctaagagcc	ctgaaaccag gtgtgacatc	ccaggagttg acagacagtc	180
tggttcagta tctaattcca	acttctgtct cagatgccta	atgtggcatg gctgaatgag	240
tcaacatata acctgtacag	taagtccctca cttaacatca	ttgatagggtg cttgtaaact	300
gtgactttaa cgaaaacata	ccgtgtgctg tagggactta	actcttgttt atatcagtta	360
gcctggtttc actatacagt	acatcatttt gcttaaagtc	acagcttacg agaacctatc	420
gatgatgtta agtgaggatt	ttctctgctc aggtgcactt	ttttttttt ttttaagcgg	480
agtctctttc tgtcacctgg	gctggagtgc agtggcgcga	tctgggttca ctacaacctc	540
tgctcctgg gttcaagcaa	ttcttctgtc tcagcctccc	aagtagctgg gattacaggc	600
acccgcggcc acaccggct	tatttttgta ttttagtag	agacagggtt tcaactattgt	660
tggccatgct ggtctcgaa	tcctgacctc atgtgatcca	ccgcctcgg cctcccaaag	720
tgacagagatt agagacgtga	gccacatggc ccagcaggac	cactttttag cagattcagt	780
cccagtgttc attttgtgga	tggggagaga caagaggtgg	caaggtcaag tgtgcaggta	840
gagacaggga ttttctcaaa	tgaggactct gctgagtagc	atcttccatg cagacatttc	900
caatgagcgc tgaccaaga	acattctaaa aaagatacca	aatctaacat tgaataatgt	960
tctgatatcc taaaatttta	ggactaaaa tcatgttctc	taaaattcac agaataattt	1020
tgtagaattc agtacctccc	gttcacccta actagctttt	ttgcaatatt gttttccatt	1080
catttgatgg ccagtagttg	ggtggtctgt ataactgcct	actcaataac atgtcagcag	1140
ttctcagctt ctttccagtg	ttcaccttac tcagatactc	ccttttcatt ttctggcaac	1200
accagcactt catggcaaca	gaaatgtccc tagccagggt	ctctctctac catgcagtct	1260
ctcttgctct catactcaca	gtgtttcttc acatctattt	ttagttttcc tggctcaagc	1320
atcttcaggc cactgaaaca	caacctcac tctctttctc	tctccctctg gcatgcatgc	1380
tgctggtagg agaccccaa	gtcaacattg cttcagaaat	cctttagcac tcatttctca	1440
ggagaactta tggcttcaga	atcacagctc ggtttttaag	atggacataa cctgtacgac	1500
cttctgatgg gctttcaact	ttgaaactgga tgtggacact	ttctctcag atgacagaat	1560
tactccaact tccccttgc	agttgcttcc tttcctgaa	ggtagctgta tcttattttc	1620
tttaaaaagc tttttcttcc	aaagccactt gcc		1654

5

<210> 13
 <211> 805
 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> fuente

5 <222> 1..805

<223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
/nota="promotor de miARN206"
/organismo="*Homo sapiens*"

10 <400> 13

```

gggggccaac tcttcctttg gcatatgttt cccattttc tggcagagaa tcagatacca      60
caaagttcaa aaccccatct ccctccagcc aggggtggcca tccagaccct gagtggctca      120
acagctgcca atgtccctca tccttctgag gctcaggcct cacagattgt ggggcaggtg      180
atgggctagg gggagcagaa gcccgacaaa aggatccttc ccacagtgaa caatgggtgct      240
tggaatgctg gatgggcagc tgctgcccac caacaagcac caaaacaga tagacgtaca      300
gtaggaagta caggagggcc ggtgtgtttc taagcatgag tggctctctg cgtgaatgtg      360
gaaaatttct ctgttggatt ctctcttctt ttaattttc cttcactgg atcccaaaca      420
ttaaaaaaga atcacattca aatgcacaa aacagcagc agtgaattaa ttagtagtaa      480
taacaaagga ctggatagac ttagctgca caagaataag ccagggaac gtggtgctgc      540
ttatctgtga acaaacagta ggaaggattt ggtcccaagc agcactgcca ttctcacia      600
cagatttatt tcagcatgat ttggtcgggc gggggggatt taggatgagt tgagatccca      660
gtgatcttct cgctaagagt ttctgcctg ggcaaggagg aaagatgcta caagtggccc      720
acttctgaga tgcgggctgc ttctggatga cactgcttcc cgaggccaca tgcttcttta      780
tatccccata tggattactt tgcta                                           805

```

<210> 14

15 <211> 1812

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

20 <221> fuente

<222> 1..1812

<223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
/nota="ORF MTMI"
/organismo= "*Mus musculus*"

25

<400> 14

ES 2 876 422 T3

atggcttctg catcagcatc taagtataat tcacactcct tggagaatga atccattaag 60
 aaagtgtctc aagatggagt cagtcaggat gtgagtgaga ctgtccctcg gctcccaggg 120
 gagttactaa ttactgaaaa agaagttatt tacatatgtc ctttcaatgg cccattaag 180
 ggaagagttt acatcacaaa ttatcgtctt tatttaagaa gtttggaac ggattctgct 240
 ctaatacttg atgttcctct ggggtgtgata tcaagaattg aaaaaatggg aggcgcgaca 300
 agtagaggag aaaattccta tggctagat attacttgta aagatttgag aaacctgagg 360
 tttgcattga agcaagaagg ccacagcaga agagatatgt ttgagatcct tgtaaaacat 420
 gcctttcctc tggcacacaa tctgccatta tttgcatttg taaatgaaga gaagtttaac 480
 gtggatgggt ggactgttta taatccagtt gaagaatata gaaggcaggg cctgccaat 540
 caccattgga ggataagttt tattaacaag tgctatgagc tctgtgagac atacctgct 600
 cttttgggtg ttccctatcg gacctcagat gatgatctta ggaggatcgc aacgtttaga 660
 tcccgaatc ggcttcctgt actgtcgtgg attcaccag aaaacaaaat ggtcattatg 720
 cgctgcagtc agcctcttgt cggtatgagt ggtaaaagaa ataaagatga cgagaaatac 780
 ctggatgtga tcagggaac taacaacaa acttctaagc tcatgattta tgatgcacga 840
 cccagtgtaa atgcagtcgc caacaaggca acaggaggag gatatgaaag tgatgacgca 900
 tatcaaaaact cagaactttc cttcttagac attcataata ttcattgttat gcgagaatct 960
 ttaaaaaaag tgaaagatat tgtttatccc aacatagaag aatctcattg gttgtccagt 1020
 ttggagtcta ctcatgggtt agaacatc aagcttggtc tgaccgggtgc cattcaagtg 1080
 gcagaccaag tgtcttcagg aaagagctcg gtacttggtc actgcagtga cggatgggac 1140
 aggaccgctc agctgacatc cttggccatg ctgatgttg acagcttcta cagaactatt 1200
 gaaggctttg agatattggt acagaaagag tggataagtt ttggcataa atttgcatct 1260
 agaataggtc atggtgataa aaacctgct gatgctgac gatctcctat ttttcttcag 1320
 tttattgact gtgtgtggca gatgtcgaaa cagttcccca cagcttttga gttcaatgaa 1380
 ggctttttga ttaccgtttt ggatcatctg tatagctgtc gatttggtac tttcttatte 1440
 aactgtgact cggctcgaga aagacagaaa cttacagaaa gaacagtttc tctatggctg 1500
 ctaattaaca gcaataaaga caaattcaaa aacccttct atacaaaaga aatcaatcgg 1560
 gttttgtatc cagttgocag catgcgtcac ttggaactgt gggatgaatta ttacatccga 1620
 tggaatccca ggtcaagca gcaacagccc aaccagtg agcagcgtta catggagctt 1680
 ttggccttgc gtgacgatta tataaagagg ctcgaggaat tgcagctggc caactccgcc 1740
 aagcttgctg atgccccgc ttgacttec agttcgtcac agatgggtgcc ccatgtgcag 1800
 acgcacttct ga 1812

<400> 18

aaaacgagca gtgacgtgag c 21

5

<210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 /nota="inverso de Titina"
 /organismo="Secuencia artificial"

15

<400> 19

20 **ttcagtcatg ctgctagcgc** 20

<210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 /nota="sonda de Titina"
 /organismo="Secuencia artificial"

30

<400> 20

35 **tgcacggaag cgtctcgtct cagtc** 25

<210> 21
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..16
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 /nota="CAPN3sfr.f "
 /organismo="Secuencia artificial"

45

<400> 21

50 **cgcctccaag gcccgct** 16

<210> 22
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>

<221> fuente
 <222> 1..16
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 /nota="CAPN3sfr.r "
 5 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 22

ggcgggaagcg ctggct **16**
 10
 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 20 /nota="MGBTUCAPN3.p "
 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 23

ctacatcaac atgagagagg t **21**
 25
 <210> 24
 <211> 16
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..16
 35 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 /nota="CAPN3.f "
 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 24
 40
cgcctccaag gccagg **16**

 <210> 25
 <211> 16
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 50 <222> 1..16
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 /nota="CAPN3.r "
 /organismo="Secuencia artificial"

 55 <400> 25

ggcgggaagcg ctggga **16**

 <210> 26

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 /nota="CAPN3.p "
 10 /organismo="Secuencia artificial"

<400> 26

tacatcaaca tgcgggaggt 20

15 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 /nota="MHI81PO.F "
 25 /organismo="Secuencia artificial"

<400> 27

30 **ctccaagcag atgcagcaga** 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 40 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 /nota="M267PO.R"
 /organismo="Secuencia artificial"

<400> 28

45 **accatgatgc gcaaggctat** 20

<210> 29
 <211> 22
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 55 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"
 /nota="M225PO.p"
 /organismo="Secuencia artificial"

<400> 29

ccgtggtgct gatgggcaag aa

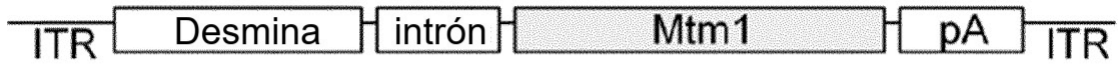
22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sistema de expresión para administración sistémica, que comprende una secuencia que codifica la calpaína 3 colocada bajo el control:
- de una secuencia promotora que permite la expresión, a un nivel terapéuticamente aceptable, de la calpaína 3 en los músculos esqueléticos y
 - de al menos una secuencia diana de miR208a.
- 10 2. Sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 1 *caracterizado* por que la calpaína 3 presenta la secuencia SEQ ID NO: 7.
- 15 3. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 2, *caracterizado* por que la secuencia diana de miR208a presenta la secuencia SEQ ID NO: 10.
4. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, *caracterizado* por que comprende 2 secuencias diana de miR208a, de forma ventajosa en tándem.
- 20 5. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, *caracterizado* por que comprende una secuencia promotora denominada específica de músculo.
- 25 6. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, *caracterizado* por que la secuencia promotora se selecciona del siguiente grupo: la secuencia promotora del gen de la calpaína 3, de forma ventajosa de secuencia SEQ ID NO 12, la secuencia promotora de miR206, de forma ventajosa de secuencia SEQ ID NO 13 y la secuencia promotora del gen de la desmina, de forma ventajosa de secuencia SEQ ID NO 11.
7. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, *caracterizado* por que comprende un vector viral, de forma ventajosa un vector viral adeno-asociado (AAV).
- 30 8. Sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, *caracterizado* por que comprende un vector AAV de serotipo AAV8 o AAV9.
- 35 9. Composición farmacéutica que comprende un sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso como medicamento.
11. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en terapia genética.
- 40 12. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en el tratamiento de una enfermedad neuromuscular, de forma ventajosa de una miopatía, incluso de forma más ventajosa, seleccionada del siguiente grupo: LGMD2A, miopatía congénita multinuclear y miopatías centronucleares autosómicas.
- 45 13. Sistema de expresión para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, *caracterizado* por que el sistema de expresión se administra por vía sistémica, de forma ventajosa por inyección intravenosa.

A/

rAAV-Des-Mtm1



B/

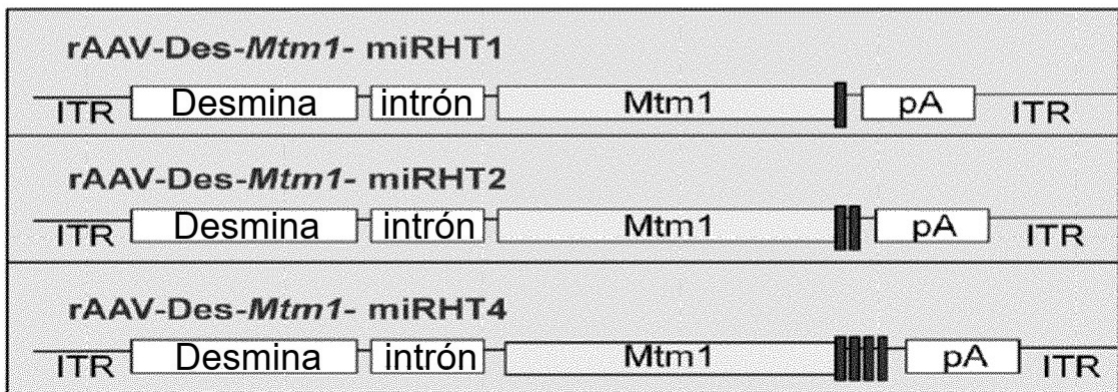


Figura 1

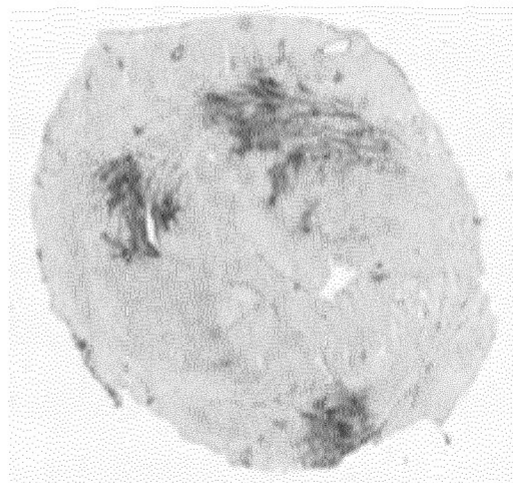


Figura 2

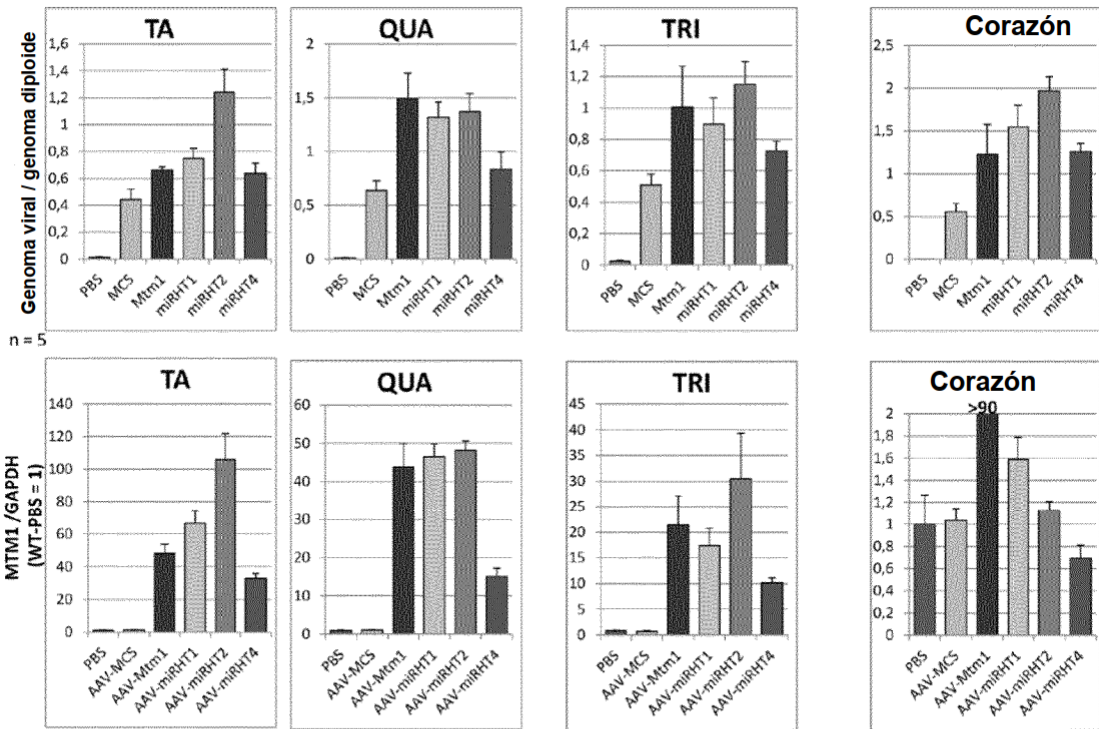


Figura 3

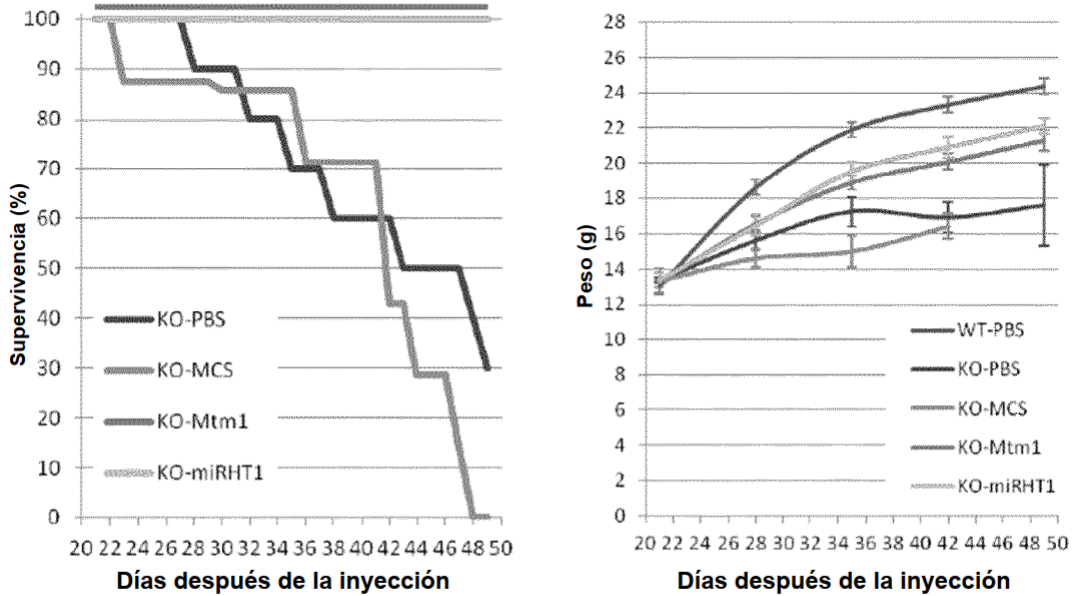


Figura 4

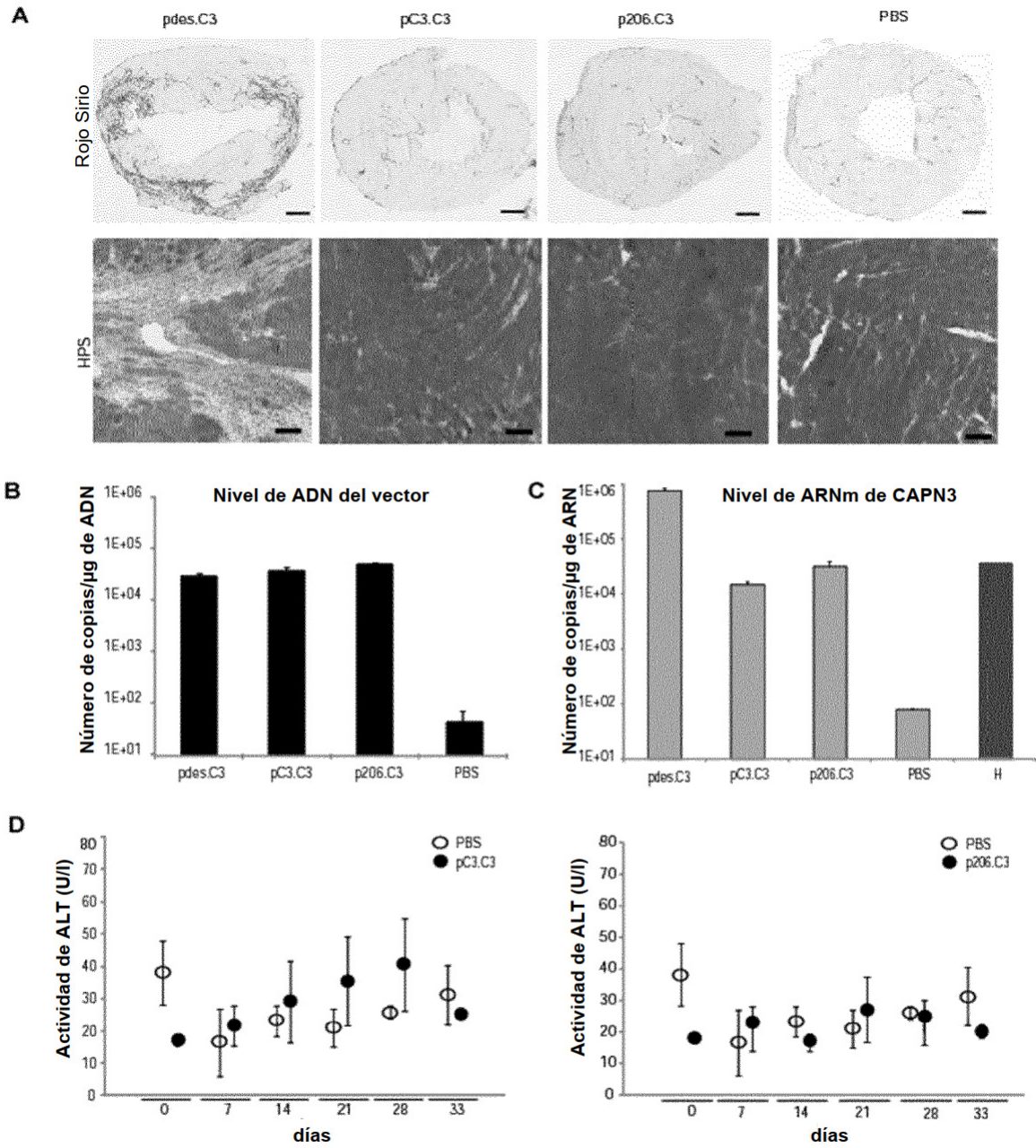


Figura 5

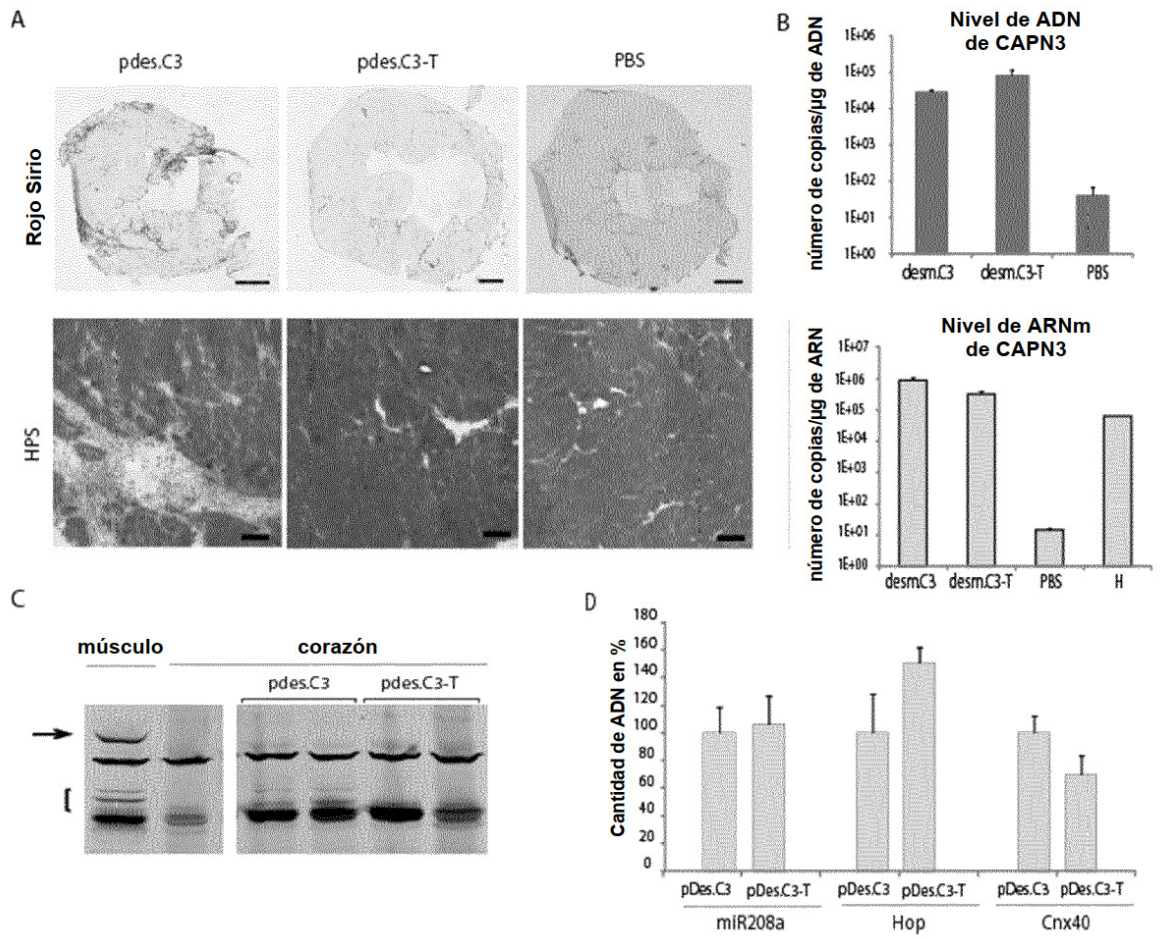


Figura 6

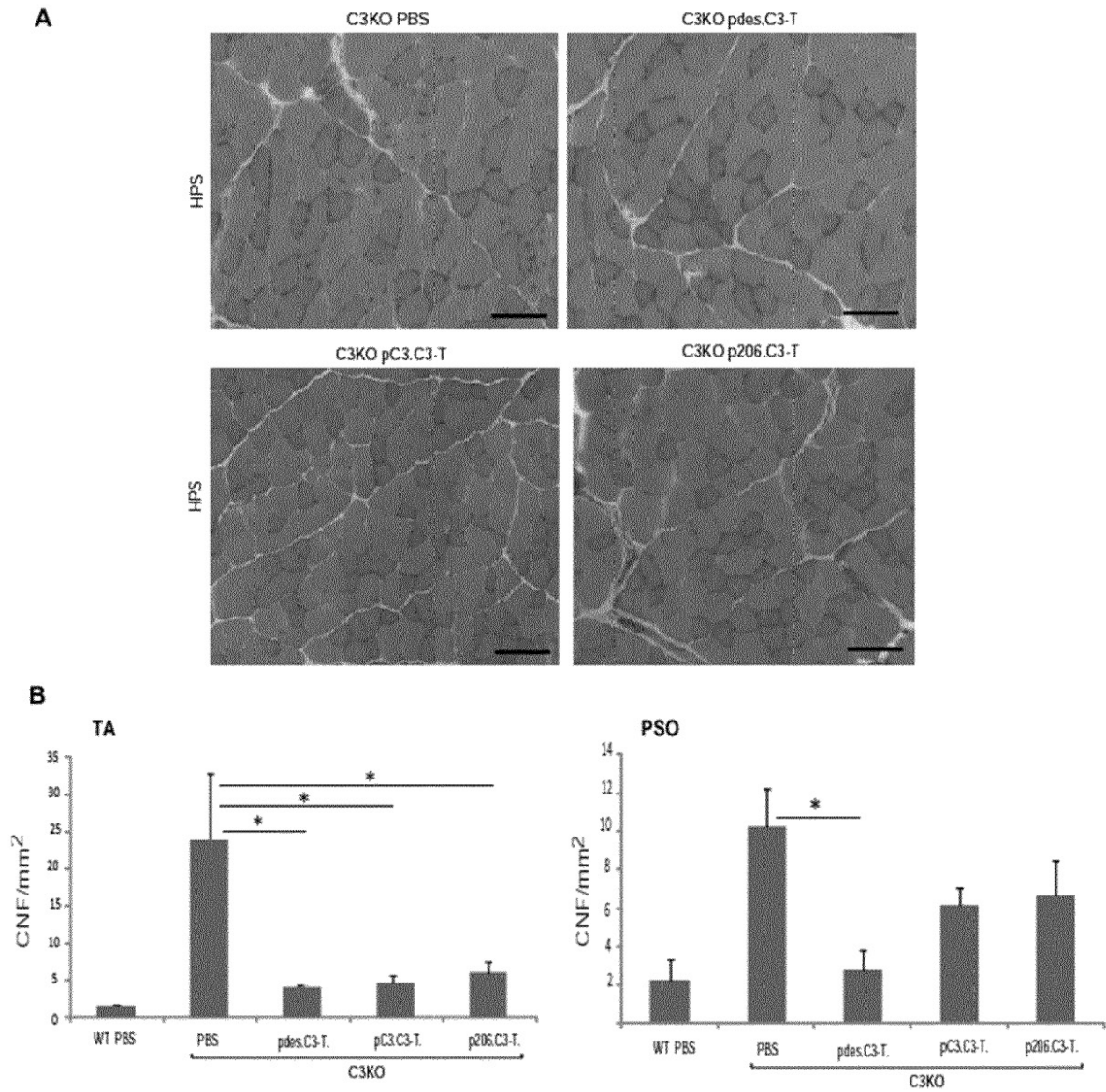


Figura 7