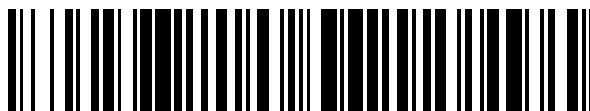


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 936**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A01N 63/00 (2010.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2016 PCT/US2016/029018**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16172608**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2016 E 16784014 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020 EP 3285813**

54 Título: **Suministro del gen Smad7 como un agente terapéutico**

30 Prioridad:

23.04.2015 US 201562151547 P

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

28.09.2021

73 Titular/es:

WASHINGTON STATE UNIVERSITY (50.0%)

Lighty 280/286 P.O. Box 641060

Pullman, WA 99164-1060, US y

BAKER HEART AND DIABETES INSTITUTE (50.0%)

72

Inventor/es:

RODGERS, BUEL, DANTESE y

74 **GREGOREVIC, PAUL**

Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 856 936 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

Suministro del gen Smad7 como un agente terapéutico

5 LISTADO DE SECUENCIAS

El listado de secuencias se presenta como un archivo de texto ASCII llamado 96554-01_SeqList.txt, creado el 22 de abril de 2016, de ~12 KB.

10 Antecedentes

Los factores provenientes de tumores inducen caquexia, un estado de pérdida de peso pronunciada, debilidad y fatiga, caracterizadas por la atrofia grave de músculo y grasa, en hasta el 80 % de los pacientes con cánceres avanzados (Tisdale, *Physiol Rev* 89, 381-410, 2009; Fearon *et al.*, *Cell Metabolism* 16, 153-166, 2012). Se ha puesto mucho interés en las perspectivas terapéuticas de la inhibición de los ligandos del receptor de activina de tipo IIB (ActRIIB) en estos pacientes, ya que esta ruta estimula el catabolismo muscular y la expresión de estos ligandos a menudo se eleva con la atrofia muscular (Fearon *et al.*, *Cell Metabolism* 16, 153-166, 2012; Lee y Glass, *Skelet Muscle* 1, 2, 2011, doi: 10.1186/2044-5040-1-2). De hecho, las formas circulantes de un ActRIIB modificado u otras "trampas de ligandos" (por ejemplo, ActRIIB soluble, ACE-031, inmunoneutralización, etc.) pueden invertir la atrofia muscular y aumentar la esperanza de vida (Klimek *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 391, 1548-1554, 2010; Zhou *et al.*, *Cell* 142, 531-543, 2010) a pesar del hecho de que otras citocinas procaquéticas permanezcan elevadas. Por tanto, los tratamientos que impiden selectivamente la señalización del ActRIIB en el músculo podrían resultar fundamentales en el tratamiento de la caquexia por cáncer (Zhou *et al.*, *Cell* 142, 531-543, 2010). El direccionamiento a ligandos del ActRIIB en circulación o en entornos extracelulares, sin embargo, puede producir efectos inespecíficos adversos y graves ya que estos ligandos son cruciales para muchos aparatos y sistemas, incluida la reproducción y la angiogénesis (Massague, *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 616-630, 2012).

Por ejemplo, un estudio clínico de ACE-031, una trampa de ligando de peptidocuerpo compuesta en gran parte por el dominio extracelular del ActRIIB, se finalizó prematuramente (Smith y Lin, *Curr Opin Support Palliat Care* 7, 352-360, 2013) debido a la inducción de signos observados a menudo en pacientes con telangiectasia hemorrágica hereditaria (THH), que incluían hemorragia de las mucosas y vasodilatación de la piel. Por tanto, otros enfoques que se dirigen a ligandos del ActRIIB en circulación podrían producir efectos inespecíficos similares. Esta enfermedad es el resultado de mutaciones en dos proteínas de señalización, la endoglin o la cinasa similar a activina 1, que finalmente afectan a la señalización del receptor de TGF β en las células endoteliales. La integridad de los vasos sanguíneos está igualmente comprometida en pacientes con THH y en modelos de ratón de la enfermedad (Bourdeau *et al.*, *J Clin Invest* 104, 1343-1351, 1999; Bourdeau *et al.*, *Am J Pathol* 156, 911-923, 2000; Bourdeau, *et al.*, *Trends Cardiovasc Med* 10, 279-285, 2000; Bourdeau *et al.*, *Am J Pathol* 158, 2011-2020, 2001; Satomi, *et al.*, *Stroke* 34, 783-789, 2003; Torsney *et al.*, *Circulation* 107, 1653-1657, 2003). De hecho, estos modelos desarrollan hemorragia en la nariz, orejas y cola, todos fácilmente visibles con una exploración externa e incluso puede provocar pérdida parcial de la cola. La hemorragia también se produce en varios órganos internos y es más evidente histológicamente en el hígado y los pulmones, aunque los sitios principales de hemorragia vuelven a ser claramente evidentes con un examen macroscópico. Algunos ratones incluso tuvieron accidentes cerebrovasculares por malformaciones arteriovenosas en el cerebro y esto se presentó como flacidez muscular y ptosis, lo que, de nuevo, se detectó fácilmente.

Una vez activado, el ActRIIB recluta receptores de activina de tipo I (cinasa similar a activina (ALK) 4/5) para formar un complejo de ActRIIB:ALK4/5 activado que fosforila a Smad2/3 (Massague, *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 616-630, 2012). Estos receptores Smad luego se unen a Smad4, permitiendo que el complejo entre en el núcleo y modifique un programa transcripcional de degradación de proteínas que regula al alza las ubiquitina ligasas E3, MuRF1 y MAFbx, y desfosforila a Akt (Amirouche *et al.*, *Endocrinology* 150, 286-294, 2009; Trendelenburg *et al.*, *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C1258-1270, 2009). Esta ruta también regula al alza la expresión de Smad7, como una forma de autorregulación negativa intracelular, lo que previene la fosforilación de Smad2/3 y estimula la degradación de ActRI (Chen *et al.*, *Genes Dev* 12, 2144-2152, 1998).

Sumario de aspectos ilustrativos

Los inventores buscaron desarrollar una estrategia mejorada para el tratamiento de la caquexia mediante la atenuación de la ruta de señalización intracelular del ActRIIB, en lugar de los ligandos (miostatina, activina y GDF-11), ya que esto podría evitar en potencia los efectos inespecíficos de las trampas de ligandos. Los inventores han demostrado que el aumento de la expresión de Smad7 específicamente en el músculo estriado podría mejorar la atrofia muscular al atenuar la señalización de ActRIIB. Para lograr este objetivo al tiempo que se evitan los posibles efectos inespecíficos de las trampas de ligandos, los inventores han utilizado un vector vírico adenoasociado recombinante (serotipo 6, VAAr6) con tropismo específico para el músculo estriado (Gregorevic *et al.*, *Nat Med* 10, 828-834, 2004). De hecho, los estudios de los inventores indican que la sobreexpresión de Smad7 específicamente en el músculo estriado no solo potencia la masa y la función muscular, sino que puede prevenir la atrofia en distintas afecciones de atrofia muscular que incluyen, pero sin limitación, caquexia por cáncer, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento.

Aspectos particulares demuestran que los pacientes con cáncer terminal a menudo sucumben a la atrofia grave del músculo estriado. La activación del ActRIIB se considera un mecanismo clave subyacente a este catabolismo, aunque los tratamientos para prevenirlo antagonizando los ligandos del ActRIIB circulantes se han visto obstaculizadas por efectos inespecíficos. La atenuación de la señalización del ActRIIB mediante la sobreexpresión de Smad7 con vectores víricos adenoasociados recombinantes (serotipo 6, VAAr6) [VAAr:Smad7] que tienen tropismo definido para el músculo estriado potenció la masa y función del músculo esquelético en ratones sanos, mientras que en ratones portadores de tumores C-26 previno la atrofia del músculo esquelético y cardíaco independientemente de la masa tumoral y de los niveles séricos de ligandos procaquéticos.

De acuerdo con aspectos adicionales, VAAr:Smad7 también previno la atrofia en ratones genosuprimidos para inhibina a y con la sobreexpresión de miostatina o activina A. No se detectaron efectos inespecíficos ya que la expresión de Smad7 se limitó solo al músculo estriado, al igual que los biomarcadores de la actividad de Smad7. Mecanicísticamente, Smad7 suprimió la señalización de Smad2/3 e inhibió la expresión de las ubiquitina ligasas relacionadas con la atrofia MuRF1 y MAFbx.

De acuerdo con aún otros aspectos, estos hallazgos indican que la expresión específica de músculo mediada por vector de Smad7 no es solo un enfoque nuevo para prevenir la atrofia muscular o incluso la señalización excesiva de ActRIIB, sino también un medio para potenciar la masa y la función musculares con riesgos limitados de efectos inespecíficos graves.

Por tanto, en el presente documento se proporciona una composición que comprende un gen o un ADNc de Smad7 en una construcción de virus adenoasistido recombinante (VAAr), en donde la construcción de VAAr proporciona la expresión (de forma constitutiva o de otra forma) del gen o del ADNc de Smad7 en miocitos. La construcción de VAAr es del serotipo 6 (VAAr6), serotipo 8 (VAAr8) o serotipo 9 (VAAr9). A modo de ejemplos no limitantes de tales composiciones, en determinadas realizaciones el gen o el ADNc de Smad7 es de origen humano, de ratón, equino, bovino, ovino, canino o porcino.

En realizaciones adicionales, la construcción de VAAr comprende un promotor o potenciador específico de tejido que dirige la expresión del gen o del ADNc de Smad7 en miocitos. Como alternativa, la construcción de VAAr proporciona la expresión del gen o del ADNc de Smad7 en cardiomiocitos, células de músculo esquelético o en ambos. Y en otras realizaciones adicionales, la construcción del VAAr comprende un silenciador específico de tejido que limita la expresión del gen o del ADNc de Smad7 a miocitos o a células cardíacas.

Una posibilidad adicional no reivindicada es un método para potenciar la masa y/o la fuerza muscular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un gen o un ADNc de Smad7 en una construcción de virus adenoasistido recombinante (VAAr) como se proporciona en el presente documento. En ejemplos de tales métodos, al sujeto no se le diagnostica un trastorno o enfermedad de atrofia muscular. Por ejemplo, en tal método, el sujeto puede estar en general sano. Por tanto, dentro de la divulgación se contemplan usos cosméticos o voluntarios de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, para potenciar la masa y/o la fuerza muscular de un sujeto por encima de una situación inicial o "normal".

Otra posibilidad divulgada es una composición como se define para su uso en un método de tratamiento de la atrofia muscular (por ejemplo, atrofia del músculo cardíaco, del músculo esquelético, o ambos) en un sujeto al que se le ha diagnosticado caquexia por cáncer, que comprende seleccionar un sujeto con caquexia por cáncer y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de una cualquiera de las composiciones que comprenden un gen o un ADNc de Smad7 en una construcción de virus adenoasistido recombinante (VAAr), en donde la construcción de VAAr es una construcción de serotipo 6 (VAAr6), serotipo 8 (VAAr8) o serotipo 9 (VAAr9), en donde la construcción de VAAr proporciona la expresión (de manera constitutiva o de otra forma) del gen o del ADNc de Smad7 en miocitos. Además, se divulgan métodos para el tratamiento de la atrofia muscular para aumentar la fuerza muscular y/o el volumen muscular utilizando dicha composición. Una posibilidad adicional divulgada es un método para la inhibición o la prevención de la atrofia muscular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de tal composición.

A modo de ejemplo, en realizaciones del método de tratamiento, la atrofia muscular en algunos casos está provocada por un trastorno crónico. Sin limitación, en diversos casos, el trastorno crónico comprende cáncer, envejecimiento (sarcopenia), distrofia muscular, miopatías, nefropatía, trastorno pulmonar obstructivo crónico, infección crónica, SIDA, atrofia por desuso, lesión neuromuscular, neuropatías, obesidad, enfermedad cardiovascular o una combinación de dos o más de los mismos. Como alternativa, la atrofia muscular está provocada por estrés por microgravedad.

En cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el método de tratamiento de referencia puede comprender suministrar la composición mediante inyecciones intramusculares o intravenosas.

En cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el método de tratamiento de referencia puede comprender la administración de una única dosis de VAAr o de múltiples dosis de VAAr.

Las características y ventajas anteriores y otras se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

5 Las FIG. 1A-1I muestran, en conformidad con aspectos particulares, que el aumento de la expresión de Smad7 estimula la hipertrofia del músculo esquelético. (FIG. 1A-1B) La inyección de los músculos de las extremidades de los ratones con VAAr6:Smad7 aumentó la masa muscular entre 7 y 28 días. (FIG. 1C-1D) La hipertrofia muscular se asoció con un del diámetro aumentado de las miofibras (*, $p=0,03$ frente al control, ~ 500 miofibras contadas en tres músculos por tratamiento, prueba de la t). Barra de escala, 100 μm . (FIG. 1E-1F) A los ratones se les inyectó VAAr6:Smad7 i.v. y, después de 28 días, esto dio como resultado la hipertrofia del TA (*, $p=0,02$ frente al control, $n=3$, prueba de la t), de cuádriceps (*, $p=0,004$ frente al control, $n=3$, prueba de la t) y de tríceps (*, $p=0,003$ frente al control, $n=3$, prueba de la t), y la expresión elevada de la proteína Smad7 en TA, cuádriceps y corazón. (FIG. 1G) VAAr6:Smad7 suprimió la fosforilación de Smad3 en los tres puntos de tiempo (*, $p=0,006$ frente al control, $n=4$, prueba de la t) posadministración (FIG. 1H) Ratones inyectados con VAAr6:Smad3-CA ($n=3$), VAAr6:Smad7 ($n=5$) o VAAr6:Smad7, y VAAr6:Smad3-CA ($n=5$) se examinaron 28 días postratamiento en cuanto a los efectos sobre la masa del TA y la expresión de proteína (*, $p < 0,001$ frente al control, #, $p < 0,001$ frente al control, +, $p < 0,001$ frente a Smad7, por ANOVA unidireccional). (FIG. 1I) Las criocortes teñidos con hematoxilina y eosina demuestran fibras musculares más pequeñas en los músculos examinados 28 días después de recibir VAAr6:Smad7 y VAAr6:Smad3-CA, en comparación con VAAr6:Smad7 solo. Barra de escala, 100 μm .

10 Las FIG. 2A-2D muestran, en conformidad con aspectos particulares, la especificidad de la administración sistémica de VAAr6:Smad7 y la inducción de hipertrofia del músculo esquelético. (FIG. 2A) Se detectó la expresión (determinada por transferencia de Western) de la proteína Smad7 en los músculos esqueléticos y el corazón, pero no en el hígado, riñón, pulmón, bazo o grasa de los ratones después de la administración intravenosa de VAAr6:Smad7. (FIG. 2B) Expresión génica de dianas del gen Smad2/3 en tejidos no musculares de ratones de tipo silvestre (simulado), en los ratones con tumores C26 y con C26 a los que se les inyectó VAAr6:Smad7 (CTGF, forma siglada de *factor: connective tissue growth*, factor de crecimiento del tejido conjuntivo; COL1A1, colágeno de tipo 1a1; PAI1, inhibidor del activador de plasminógeno 1; FN, fibronectina). No se detectaron diferencias significativas entre C26 y C26+Smad7 (* $p < 0,05$ en comparación con la simulación). (FIG. 2C) Evidencia histológica, utilizando tinción de Van Gieson, de vasos sanguíneos intactos y la falta de hemorragia en tejidos de ratones que recibieron VAAr6:Smad7. (FIG. 2D) El diámetro de las miofibras aumentó mediante VAAr6:Smad7, como se demostró mediante criocortes representativas teñidos con hematoxilina y eosina (barra de escala, 100 μm).

15 Las FIG. 3A-3G muestran, en conformidad con aspectos particulares, que Smad7 regula el crecimiento del músculo esquelético independientemente de la señalización de Akt y mTOR. (FIG. 3A) Los músculos examinados 14 días después de la inyección intramuscular de VAAr6:Smad7 demostraron tasas fraccionales de síntesis de proteínas reguladas al alza ($n=5-6$, prueba de la t). (FIG. 3B) A los ratones se les inyectó VAAr6:Smad7 y, después de 28 días, no hubo aumento en la fosforilación de Akt^{S473} o de sus sustratos GSK3, β ^{S9/21} y TSC2^{S939} (ND=no distinto, $n=6-7$, prueba de la t). VAAr6:Smad7 aumenta la fosforilación de S6RP^{S235/236} ($n=6$ por tratamiento, prueba de la t) y 4EBP1^{T37/42} ($n=4-5$ por tratamiento, prueba de la t). (FIG. 3C) La actividad de la cinasa Akt no estaba alterada 28 días después del suministro de VAAr6:Smad7. Neg = control negativo sin ATP añadido. pAkt se normalizó con respecto a los niveles totales de Akt ($n=5$, prueba de la t). (FIG. 3D) La administración de rapamicina inhibió la fosforilación de S6RP^{S235/236} ($n=4-5$, ANOVA bidireccional) y 4EBP1^{T37/43} ($n=3$, ANOVA bidireccional). (FIG. 3E) Se administró rapamicina diariamente a animales tratados con VAAr6:Smad7 ($n=6$). La masa del tibial anterior (TA) se expresó como un cambio porcentual del músculo contralateral de control. (FIG. 3F) VAAr6:Smad7 suprimió la transcripción de MAFbx ($n=9-11$, prueba de la t) y MuRF1 ($n=9-11$, prueba de la t) mientras que VAAr6:Smad3-CA aumentó a ambas ($n=4$, prueba de la t) 14 días después del tratamiento. (FIG. 3G) La coadministración de VAAr6:Smad3-CA con VAAr6:Smad7 impidió el efecto inhibitorio de Smad7 sobre la transcripción de MAFbx ($n=5$) y MuRF1 ($n=5$) ($n=5$, prueba de la t).

20 Las FIG. 4A-4G muestran, en conformidad con aspectos particulares, Smad7 previene la atrofia muscular inducida por miostatina y activina. (FIG. 4A-4B) Se examinó la masa muscular y la fibra de miofibras en ratones de tipo silvestre y nulos para miostatina 14 días (*, $p < 0,001$ frente a control Mstn+/+, #, $p=0,003$ frente a control Mstn-/-, +, $p < 0,001$ frente a control Mstn-/-, $n=5-6$, ANOVA bidireccional de medidas múltiples) y 28 días (*, $p < 0,001$ frente a control Mstn+/+, #, $p=0,001$ frente a control Mstn-/-, +, $p=0,01$ Mstn-/- frente a Mstn+/+, $n=6-8$, ANOVA bidireccional de medidas múltiples) después de la administración local de VAAr6:Smad7. Barra de escala = 100 μm . (FIG. 4C) Smad7 indujo comparativamente menos hipertrofia en ratones nulos para miostatina después de 28 días (*, $p=0,03$ frente al control, ANOVA bidireccional). (FIG. 4D) La inhibición de la fosforilación de Smad3^{S432/435} por Smad7 se conservó en ratones nulos para miostatina (*, $p=0,006$ frente al control, $n=4$, ANOVA bidireccional de medidas múltiples) en comparación con los ratones de tipo silvestre (*, $p=0,001$ frente al control, $n=4$, ANOVA bidireccional de medidas múltiples). (FIG. 4E-4F) VAAr6:Smad7 administrado solo o con VAAr6:miostatina (*, $p < 0,001$ frente al control, #, $p < 0,001$ frente al control, +, $p=0,004$ frente a Smad7, $n=7-15$, ANOVA unidireccional) o VAAr6:Activina A (*, $p < 0,001$ frente al control, #, $p=0,003$ frente al control, $n=3-6$, ANOVA unidireccional) 28 días después del tratamiento. (FIG. 4G) Fosforilación de Smad3^{S432/435} en músculos que expresan miostatina (*, $p=0,015$ frente al control, #, $p < 0,001$ frente al control, +, $p < 0,001$ frente a tratamiento con Mstn, $n=4-9$, ANOVA unidireccional) o Activina A (*, $p=0,01$ frente al control, #, $p < 0,001$ frente al control, tratamiento, +, $p < 0,001$ frente al tratamiento con Act A $n=5-7$, ANOVA unidireccional) sola y en presencia de

Smad7.

Las FIG. 5A-5C muestran, en conformidad con aspectos particulares, que la miostatina y la Activina A se expresan de forma similar durante la administración única o la coadministración con VAAr6:Smad7. (FIG. 5A) Se determinó mediante RT-PCR la expresión génica del transgén de activina A y (FIG. 5B) miostatina, 28 días después de la administración de VAAr6. La expresión génica de activina A o miostatina no difirió cuando se coexpresó con Smad7 en comparación con el nivel de expresión de activina A o miostatina sola (ND=no distinto, n=3-6, prueba de la t). (FIG. 5C) Niveles de proteína miostatina en el músculo tibial anterior de ratones a los que se les proporcionó de manera similar VAAr6:Smad7 y/o VAAr6:Mstn. Los niveles de proteína activina A también se midieron en ratones a los que se les proporcionó VAAr6:ActA, pero no se detectaron ya que ActA se secreta y no se almacena intra o extracelularmente.

Las FIG. 6A-6I muestran, en conformidad con aspectos particulares, la caquexia por cáncer inducida por la implantación de un tumor C-26. (FIG. 6A) La implantación de tumores C-26 ~ 21 días antes del examen indujo una disminución del 25 % de la masa corporal (*, p < 0,001 frente al control, masa sin tumor, n=13-14, prueba de la t). (FIG. 6B-6C) Los cuádriceps y la masa cardíaca disminuyeron en ratones portadores de tumor C-26 (*, p < 0,001 frente al control, n=13-14, prueba de la t) (FIG. 6D) La masa de grasa epididimaria disminuyó en ratones portadores de tumores C-26 (*, p < 0,001 frente al control, n=6-7, prueba de la t). (FIG. 6E) El aumento de la expresión de Smad7 previno la pérdida de la fuerza tetánica máxima (*, p < 0,001 frente al control, #, p=0,03 frente al control, n=8-9, ANOVA bidireccional) producida por los músculos TA *in situ* de ratones portadores de tumor C-26. (FIG. 6F) Se marcaron doblemente cortes transversales del músculo TA con laminina (rojo) y MHCIIa (tipo IIa, verde) para evaluar el área de las fibras tipo IIa y tipo IIx/b (que no reaccionaban) (FIG. 6G) Smad7 previno reducciones del área de fibras de tipo IIa (*, p < 0,001 frente al control, #, p < 0,001 frente al control, +, p<0,001 frente a C-26, n=8, ANOVA bidireccional) y tipo IIx/b (*, p=0,002 frente al control, +, p=0,001 frente a C-26, n=8, ANOVA bidireccional) en los músculos de ratones portadores de tumor. (FIG. 6H-6I) Relaciones del tipo de fibras de los músculos de ratones sanos y ratones portadores de tumor que recibieron VAAr6:Smad7 o vector simulado (*, p=0,02 frente al grupo de control, n=8, ANOVA bidireccional).

Las FIG. 7A-7K muestran, en conformidad con aspectos particulares, que el aumento de la expresión de Smad7 previene la caquexia por cáncer. (FIG. 7A) VAAr6:Smad7 administrado a los músculos de las extremidades de ratones que recibieron tumores C-26 conservó la masa (*, #, p < 0,001 frente al control, +, p<0,001 frente a C-26, n=11-14), (FIG. 7B) la capacidad de producción de fuerza (*, #, p < 0,001 frente al control, +, p<0,001 frente a C-26, n=11-14) y (FIG.7C) el área transversal de las miofibras (AT, *, #, p < 0,001 frente al control, +, p<0,001 frente a C-26, n=8). (FIG. 7D) Expresión de Smad7 en músculos de ratones sanos y portadores de tumor (transferencia de Western). (FIG. 7E) VAAr6:Smad7 suministrado 7 días (*, p < 0,001 frente al control, #, p=0,01 frente al control, +, p<0,001 frente a control de C-26, n=5-7) y 14 días (*, p=0,03 frente al control, #, p=0,004 frente al control, +, p=0,02 frente a control de C-26, n=5-6) después de la implantación de tumor (cuando la masa tumoral aumentó, panel derecho) conservó la masa muscular (*, p<0,001 frente a 7 días, n=10, prueba de la t). (FIG. 7F) El tratamiento sistémico con VAAr6:Smad7 redujo la pérdida de masa corporal (*, p=0,005 frente al control, #, p < 0,001 frente al control) y (FIG. 7G) previno la pérdida de masa muscular (músculos gemelos - Ge, *, p < 0,001 frente al control, #, p < 0,001 frente al control, +, p=0,04 frente a C-26, n=4-7. Cuádriceps - Cd, *, p < 0,001 frente al control, #, p < 0,001 frente al control, +, p=0,01 frente al control, n=4-14. Tríceps - Tr, *, p < 0,001 frente al control, #, p=0,002 frente al control, +, p=0,007 frente a C-26, n=4-14.). (FIG. 7H) Imágenes de ratones de control y portadores de tumor que recibieron VAAr6:Smad7 o simulación. (FIG. 7I) Criocortes teñidos con hematoxilina y eosina de músculos TA de ratones de control y portadores de tumor que recibieron VAAr6:Smad7 o simulación. (FIG. 7J) Masa muscular de TA (*, p<0,001 frente a grupos, n=4) y (FIG.7K) diámetro de las miofibras (*, p=0,02 frente al control, #, p=0,004 frente al control, +, p=0,006 frente a Gn. (genosuprimidos) para inhib.) en ratones nulos para inhibina (Gn. para inhibina) 4 semanas después de la inyección de VAAr6:Smad7. Datos se analizaron mediante ANOVA bidireccional a menos que se indique. Barras de escala, 100 µm.

Las FIG. 8A-8K muestran, en conformidad con aspectos particulares, que la administración sistémica de VAAr6:Smad7 no afecta la masa de órganos viscerales ni la masa de grasa. (FIG. 8A-8B) La proteína Smad7 y la expresión génica se examinaron en el corazón (*, p=0,001 frente al control, n=3, ANOVA unidireccional), cuádriceps (*, p=0,02 frente al control, n=3, ANOVA unidireccional) y músculo TA (+, p=0,008 frente al control, n=3, ANOVA unidireccional) de ratones sanos y portadores de tumor. (FIG. 8C) La masa muscular del TA se conservó mediante la administración sistémica de VAAr6:Smad7 (*, p < 0,001 frente al control, #, p < 0,001 frente al control, +, p<0,001 frente a C-26, n=8-14, ANOVA bidireccional). (FIG. 8D) Imágenes representativas que demuestran que VAAr6:Smad7 conserva la masa muscular del tríceps y cuádriceps. (FIG. 8E) Las masas tumorales no fueron distintas entre los ratones portadores de tumor C-26 que recibieron vector simulado o VAAr6:Smad7 (ND = no distinto entre grupos, n=8-14, prueba de la t). (FIG. 8F-8G) La administración sistémica de VAAr6:Smad7 no previno la pérdida inducida por tumor de masa de grasa hepática (*, p=0,004 frente al control, n=8-14, ANOVA bidireccional), renal (*, p < 0,001 frente al control, n=4-7, ANOVA bidireccional) o epididimaria (*, p < 0,001 frente al control, n=3-7, ANOVA bidireccional). (FIG. 8H-8U) La administración sistémica de VAAr6:Smad7 previno la atrofia cardíaca (masa normalizada con respecto a la longitud del hueso tibial) en ratones portadores de tumor (*, p < 0,001 frente al control, #, p < 0,001 frente al control, +, p<0,001 frente a C-26, n=7-11, ANOVA bidireccional). Barra de escala de hematoxilina y eosina, 100 µm. Escala de la fotografía, 0,2 cm. (FIG. 8J) El peso auricular se normalizó sobre la longitud del hueso tibial. (FIG. 8K) Smad7 no afectó el peso auricular o la masa pulmonar (normalizado con respecto a la longitud del hueso tibial, ND=no distinto, n=4-11, ANOVA bidireccional).

Las FIG. 9A-9C muestran, en conformidad con aspectos particulares, Los ratones nulos para inhibina presentan una pérdida progresiva de masa magra y grasa. (FIG. 9A) La masa grasa (*, p=0,001 frente al control de TS de 11

semanas, +, $p < 0,001$ frente al control de TS de 12 semanas, la masa magra (*, $p = 0,04$ frente al control de TS de 9 semanas, +, $p = 0,005$ frente al control de TS de 10 semanas, #, $p < 0,001$ frente a los controles de TS de 11-12 semanas) y la masa corporal total (*, $p = 0,008$ frente al control de TS de 10 semanas, +, $p < 0,001$ frente a controles de TS de 11-12 semanas de edad) se evaluaron en ratones nulos para inhibina α y en sus compañero camada de control a partir de las 6 semanas de edad ($n = 4$, datos analizados mediante ANOVA bidireccional). (FIG. 9B) La masa tumoral gonadal aumentó en ratones nulos para inhibina α en comparación con los compañeros de camada de tipo silvestre (*, $p = 0,008$ frente al control de TS, prueba de la t, $n = 4$). (FIG. 9C) La masa del cuádriceps de los ratones nulos para inhibina α disminuyó en comparación con los controles de TS (*, $p = 0,001$ frente al control de TS, prueba de la t, $n = 4$).

Las FIG. 10A-10F muestran, en conformidad con aspectos particulares, Smad7 regula la ruta de señalización canónica de TGF β y la expresión de ligasa E3 para prevenir la atrofia muscular en la caquexia por cáncer. (FIG. 10A) Se midieron los niveles séricos de activina A y activina B en ratones caquéticos (NSD=no se determinó, *, $p < 0,001$ frente al control, $n = 4-11$, prueba de la t). (FIG. 10B) Se recogió suero 21 días después de implantar los tumores y de inyectar VAAr6:Smad7, y se utilizó en ensayos informadores de Smad2/3 activada con células C2C12 (*, $p = 0,01$ frente al control, $n = 3$, se repitió tres veces, ANOVA bidireccional, ND=no distinto). (FIG. 10C) Se midió la fosforilación de Smad3^{S432/435} en músculos TA de ratones portadores de tumor C-26 (*, $p = 0,01$ frente al control, #, $p = 0,005$ frente al control, +, $p < 0,001$ frente a C-26, $n = 8-13$, ANOVA bidireccional) y de ratones nulos para inhibina α (*, $p = 0,03$ frente al control, #, $p < 0,001$ frente al control, +, $p < 0,001$ frente a nulos para inhibina α , $n = 4$, ANOVA bidireccional) tratados con VAAr6:Smad7. (FIG. 10D) Los niveles totales de proteína Foxo se determinaron mediante transferencia de Western de Foxo1 (*, $p < 0,001$ frente al control, #, $p = 0,04$ frente a C-26, $n = 5-6$ por tratamiento, ANOVA bidireccional de medidas múltiples) y Foxo3 (*, $p < 0,001$ frente al control, #, $p = 0,04$ frente a C-26, $n = 5-6$ por tratamiento, ANOVA bidireccional de medidas múltiples) en ratones sanos y ratones portadores de tumor. (FIG. 10E-10F) Smad7 suprimió la transcripción de Foxo1 (*, $p < 0,001$ frente al control, #, $p < 0,001$ frente a C-26, $n = 5-8$, ANOVA bidireccional) y Foxo3 (*, $p = 0,002$ frente al control, #, $p = 0,004$ frente a C-26, $n = 5$, ANOVA bidireccional), así como de MuRF1 (*, $p < 0,001$ frente al control, #, $p < 0,01$ frente a C-26, $n = 4-8$, ANOVA bidireccional) y MAFbx (*, $p < 0,001$ frente al control, #, $p < 0,001$ frente a C-26, $n = 4-8$, ANOVA bidireccional).

Las FIG. 11A-11E muestran, en conformidad con aspectos particulares, Smad7 no altera la fosforilación de Foxo o la señalización de NF- κ B en la caquexia. (FIG. 11A) Se midieron mediante ELISA los niveles séricos de activina A, 21 días después de implantar tumores y de inyectar VAAr6:Smad7 o vector simulado (*, $p < 0,001$ frente al control, $n = 4$ por cohorte, ANOVA bidireccional). (FIG. 11B) Se midieron mediante ELISA los niveles séricos de IL-6 en ratones portadores de tumor tratados con VAAr6:Smad7 o vector simulado ($n = 4-5$). (Figura 11C) Fosforilación de Stat3, (Figura 11D) p65 y (Figura 11E) Foxo1/3 en los músculos esqueléticos TA de ratones portadores de tumor C-26 y tratados con VAAr6:Smad7 (*, $p < 0,02$ frente al control, $n = 5-11$, ANOVA bidireccional).

La FIG. 12 muestra un mapa de un vector de VAA con Smad7, pAAV-MCS_smad7stp 081809.cep; la secuencia correspondiente se proporciona en la SEQ ID NO: 3 (6108 pares de bases).

LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran utilizando las abreviaturas de letras convencionales para las bases nucleotídicas y el código de tres letras para los aminoácidos, como se define en 37 C.F.R. 1.822. Solo se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena que se muestra.

Las SEQ ID NO: 1 y 2 son cebadores directos e inversos representativos utilizados para detectar activina A (F: GGAGTGT-GATGGCAAGGTCAACA, R: GTGGGCACACAGCATGACTTA). Las SEQ ID NO: 3 y 4 son cebadores directos e inversos representativos utilizados para detectar miostatina (F: CCCAGAGGTTCCAGCAGGCCCT, R: TCATGAGCACCCACAGCGGTC). La SEQ ID NO: 5 es la secuencia del vector de VAA para Smad7, pAAV-MCS_smad7stp 081809.cep.

50 I. Abreviaturas

VAA	virus adenoasociado
ActRIIB	receptor de activina de tipo IIB
ALK	cinasa similar a activina
EEl	elemento de eficacia de integración
ITR	forma siglada de <i>repetición terminal invertida</i> , repetición terminal invertida
CTGF	factor de crecimiento del tejido conjuntivo
COL1A1	colágeno de tipo 1a1
FN	fibronectina
ND	no es distinto
ORF	forma siglada de <i>open reading frame</i> , marco de lectura abierto
PAI1	inhibidor del activador de plasminógeno 1
VAAr	VAA recombinante

ETM	error típico de la media
TA	tibial anterior
SRT	sitio de resolución terminal
TS	tipo silvestre

II. Términos y métodos

5 A menos que se indique otra cosa, los términos técnicos se utilizan de acuerdo con el uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes sobre biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

10 Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

15 **Virus adenoasociado (VAA):** Un virus pequeño, de replicación defectuosa y sin envoltura que infecta a seres humanos y algunas otras especies de primate. No se sabe que el VAA provoque enfermedad y suscita una respuesta inmunitaria muy leve. Los vectores de terapia génica que utilizan VAA pueden infectar tanto las células en división como las en reposo y pueden persistir en un estado extracromosómico sin integrarse en el genoma de la célula hospedadora. Estas características hacen que el VAA sea un vector vírico atractivo para terapia génica. Actualmente hay onces serotipos reconocidos de VAA (VAA1-VAA11).

20 **Administración/Administrar:** Proporcionar o dar a un sujeto un agente, tal como un agente terapéutico (por ejemplo, un VAA recombinante), mediante cualquier vía eficaz. Las vías de administración de ejemplo incluyen, pero sin limitación, inyección (tal como subcutánea, las vías intramuscular, intradérmica, intraperitoneal e intravenosa), oral, intraductal, sublingual, rectal, transdérmica, intranasal, vaginal y por inhalación.

25 **Codones optimizados:** Un ácido nucleico "con codones optimizados" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se ha alterado de tal manera que los codones son óptimos para la expresión en un sistema particular (tal como una especie o grupo de especies particulares). Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico puede optimizarse para la expresión en células de mamífero o en una especie de mamífero particular (tal como las células humanas). La optimización de codones no altera la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

30 **Potenciador:** Una secuencia de ácido nucleico que aumenta la tasa de transcripción al aumentar la actividad de un promotor.

35 **Infectivo:** Un virus o vector es "infectivo" cuando transduce una célula, se replica y (sin el beneficio de ningún virus o vector complementario) propaga vectores progenie o virus del mismo tipo que el virus transductor o vector original a otras células en un organismo o cultivo celular, en que los vectores o virus progenie tienen la misma capacidad de reproducirse y propagarse por el organismo o cultivo celular. Por tanto, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una partícula adenovírica no es infectivo si el ácido nucleico no puede empaquetarse (por ejemplo, si la partícula adenovírica carece de un sitio de empaquetamiento), aunque el ácido nucleico puede utilizarse para transfectar una célula. De forma similar, un ácido nucleico adenovírico empaquetado por una partícula adenovírica no es infectivo si no codifica las proteínas de la cápside adenovírica en la que se empaqueta.

40 **Intrón:** Un tramo de ADN dentro de un gen que no contiene información codificante de una proteína. Los intrones se eliminan antes de la traducción de un ARN mensajero.

45 **Repetición terminal invertida (ITR):** Secuencias simétricas de ácido nucleico en el genoma de virus adenoasociados necesarias para una replicación eficaz. Las secuencias de ITR se encuentran en cada extremo del genoma de ADN del VAA. Las ITR sirven como los orígenes de replicación para la síntesis de ADN vírico y son componentes en *cis* esenciales para generar vectores de VAA de integración.

50 **Aislado:** Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína, virus o célula) se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos de la célula o tejido del organismo, o del propio organismo, en el que el componente es de origen natural, tal como otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, proteínas y células. Las moléculas de ácido nucleico y las proteínas que se han "aislado" incluyen los purificados por métodos de purificación convencionales. El término también abarca moléculas de ácido nucleico y proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula hospedadora, así como moléculas de ácido nucleico y proteínas sintetizadas químicamente.

55 **Mamíferos:** Este término incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De forma similar, el término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como veterinarios.

60 **Unido operativamente:** Una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

Células de empaquetamiento: Una célula que proporciona funciones de empaquetamiento en *trans* para un gen introducido en una célula con un vector de transferencia, pero que no encapsida su propio genoma.

Vector de empaquetamiento: Los ácidos nucleicos de los vectores de empaquetamiento carecen de los ácidos

nucleicos necesarios para el empaquetamiento de un ADN correspondiente al ácido nucleico del vector de empaquetamiento en una cápside adenovírica. Es decir, los ácidos nucleicos de los vectores de empaquetamiento no se encapsidan ellos mismos en las partículas víricas que codifican, es decir, no son infectivos. El vector de empaquetamiento incluye opcionalmente todos los componentes necesarios para la producción de partículas víricas, u opcionalmente incluye un subconjunto de los componentes necesarios para el empaquetamiento vírico. Por ejemplo, una célula de empaquetamiento puede transformarse con más de un vector de empaquetamiento, cada uno de los cuales tiene un papel complementario en la producción de una partícula adenovírica. Dos (o más) vectores de empaquetamiento basados en adenovirus son "complementarios" cuando juntos codifican todas las funciones necesarias para el empaquetamiento de adenovirus, y cuando cada uno individualmente no codifica todas las funciones necesarias para el empaquetamiento. Por ejemplo, cuando dos vectores transducen una sola célula y juntos codifican la información para la producción de partículas de empaquetamiento de adenovirus, los dos vectores son "complementarios". El uso de vectores complementarios aumenta la seguridad de cualquier célula de empaquetamiento hecha por transformación con un vector de empaquetamiento, al reducir la posibilidad de que un evento de recombinación produzca un virus infeccioso.

Excipiente farmacéuticamente aceptable: Los excipientes (vehículos) farmacéuticamente aceptables útiles en la presente divulgación son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edición (1975) describen composiciones y formulaciones adecuadas para el suministro farmacéutico de uno o más compuestos, moléculas o agentes terapéuticos.

En general, la naturaleza del excipiente dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales habitualmente comprenden líquidos inyectables que incluyen líquidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables como vehículo tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares. Para composiciones sólidas (por ejemplo, polvo, píldora, comprimido o cápsula), los excipientes sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio de calidad farmacéutica. Además de los excipientes biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponadores del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

Prevenir, tratar o mejorar una enfermedad: "Prevenir" una enfermedad (tal como el cáncer) o un síntoma asociado con una enfermedad (tal como la caquexia por cáncer) se refiere a inhibir el desarrollo completo de una enfermedad o síntoma. "Tratar" se refiere a un tratamiento terapéutico que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica después de haber comenzado a desarrollarse. "Mejorar" se refiere a la reducción del número o de la gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad.

Promotor: Una región de ADN que dirige/inicia la transcripción de un ácido nucleico (por ejemplo, un gen). Un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción. Normalmente, los promotores se ubican cerca de los genes que transcriben. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales que pueden ubicarse hasta varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción.

Purificado: El término "purificado" no implica pureza absoluta; más bien, se concibe como un término relativo. Por tanto, por ejemplo, un péptido, proteína, virus purificado, u otro compuesto activo purificado, es uno que está aislado total o parcialmente de proteínas y otros contaminantes asociados naturalmente. En determinadas realizaciones, la expresión "sustancialmente purificado" se refiere a un péptido, proteína, virus u otro compuesto activo que se ha aislado de una célula, medio de cultivo celular u otra preparación en bruto y sometido a fraccionamiento para eliminar varios componentes de la preparación inicial, tales como proteínas, residuos celulares y otros componentes.

Recombinante: Una molécula de ácido nucleico recombinante es una que tiene una secuencia que no es de origen natural o tiene una secuencia que se fabrica mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia que de otra forma están separados. Esta combinación artificial puede lograrse mediante síntesis química o mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de moléculas de ácidos nucleicos, tal como por técnicas de ingeniería genética.

De forma similar, un virus recombinante es un virus que comprende una secuencia (tal como una secuencia genómica) que no es de origen natural o que se fabrica mediante una combinación artificial de al menos dos secuencias de distinto origen. El término "recombinante" también incluye ácidos nucleicos, proteínas y virus que se han alterado únicamente por adición, sustitución o delección de una parte de una molécula de ácido nucleico, proteína o virus natural. Como se usa en el presente documento, "**VAA recombinante**" se refiere a una partícula de VAA en la que se ha empaquetado una molécula de ácido nucleico recombinante (tal como una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica a Smad7).

Identidad de secuencia: La identidad o similitud entre dos o más secuencias de ácido nucleico o dos o más secuencias de aminoácidos, se expresa en términos de identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de secuencia puede medirse en términos de porcentaje de identidad; cuanto mayor sea el porcentaje, más idénticas son las secuencias. La similitud de secuencias puede medirse en términos de porcentaje de similitud (que tiene en cuenta sustituciones conservativas de aminoácidos); cuanto mayor sea el porcentaje, más similares son las secuencias. Los homólogos y ortólogos de secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos poseen un grado relativamente alto de identidad/similitud de secuencia cuando se alinean utilizando métodos convencionales. Esta homología es más significativa cuando las proteínas o ADNc ortólogos proceden de especies que están más estrechamente relacionadas (tales como secuencias humanas y de ratón), en comparación con especies relacionadas más remotamente (tales como secuencias humanas y de *C. elegans*).

Se conocen bien en la técnica los procedimientos de alineamiento de secuencias para la comparación. Se describen diversos programas y algoritmos de alineamiento en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins y Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90, 1988; Huang *et al.* *Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992; y Pearson *et al.*, *Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994. Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990, presentan una consideración detallada de métodos de alineamiento de secuencias y cálculos de homología.

La herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (BLAST, forma siglada del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990) está disponible en varias fuentes, entre ellas el National Center for Biological Information (NCBI) y en internet, para su uso junto con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, blastn y tblastx. Puede encontrarse información adicional en el sitio de internet del NCBI.

Serotipo: Un grupo de microorganismos estrechamente relacionados (tal como los virus) que se distingue por un conjunto característico de antígenos.

Proteínas Smad (SMAD): Una familia de factores de transcripción que se encuentran en vertebrados, insectos y nematodos. Las SMAD son proteínas intracelulares que transducen señales extracelulares de ligandos al núcleo, donde activan la transcripción de genes aguas abajo. Generalmente, las SMAD forman un trímero de dos SMAD reguladas por receptor y un co-SMAD Smad7 es el homólogo 7 del gen de *Drosophila Madres contra decapentaplégicos*. Es un antagonista del receptor de TGFβ de tipo 1. Bloquea la asociación de TGFβ1 y activina con el receptor, bloqueando el acceso a SMAD2. Es un SMAD inhibidor (I-SMAD) y está potenciado por SMURF2. Las secuencias de nucleótidos representativas que codifican Smad7 incluyen: la de ser humano (NM_005904.3); la de ratón/murina (NM_001042660.1); la de ganado vacuno/bovina (NM_001192865.1); la de perro/canina (XM_005623131.1); la de cerdo/porcina (NM_001244175.1); la de oveja/ovina (XM_012120929.1); y la de caballo/equina (XM_001499061.5).

Sujeto: Organismos vivos multicelulares vertebrados, una categoría que incluye mamíferos humanos y no humanos. A modo de ejemplo, la secuencia de Smad7 utilizada en una composición terapéutica o tratamiento descrito en el presente documento puede adaptarse para que coincida con la especie que se está tratando con ella (por ejemplo, una secuencia humana utilizada en el tratamiento de sujetos humanos; una secuencia de perros sobre sujetos perros, y así sucesivamente).

Sintético: Producido por medios artificiales en un laboratorio, por ejemplo, un ácido nucleico sintético puede sintetizarse químicamente en un laboratorio.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Una cantidad de un agente farmacéutico o terapéutico especificado (por ejemplo, un VAA recombinante) suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto, o en una célula, que se está tratando con el agente. La cantidad eficaz del agente dependerá de varios factores, incluyendo, pero sin limitación, el sujeto o las células a tratar, y la forma de administración de la composición terapéutica.

Tratar o tratamiento: Incluye la aplicación o administración de una composición a un sujeto, o la aplicación o administración de una composición a una célula o tejido de un sujeto que tiene síntomas de atrofia muscular, tal como caquexia por cáncer, con el fin de sanar, curar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, recuperarse de, mejorar o afectar la enfermedad o condición, el síntoma de la enfermedad o afección, o el riesgo de la enfermedad o afección.

Vector: Un vector es una molécula de ácido nucleico que permite la inserción de ácido nucleico extraño sin alterar la capacidad del vector para replicarse y/o integrarse en una célula hospedadora. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula hospedadora, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores de selección y otros elementos genéticos. Un vector de expresión es un vector que contiene las secuencias reguladoras necesarias para permitir la transcripción y traducción del gen o genes insertados. En algunas realizaciones en el presente documento, el vector es un vector de VAA.

A menos que se explique de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Los términos en singular "un", "uno/una", y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. "Que comprende A o B" significa que incluye a A, o a B, o a A y a B. Se entiende además que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos, y todos los valores de pesos moleculares o masas moleculares, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción. Aunque en la práctica o ensayos de la presente divulgación pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no tienen por objeto ser limitantes.

Descripción detallada de aspectos ilustrativos

La pérdida de masa y fuerza muscular es un factor pronóstico importante de mal pronóstico en muchos pacientes con cáncer (Tisdale, *Physiol Rev* 89, 381-410, 2009; Fearon *et al.*, *Cell metabolism* 16, 153-166, 2012; Dodson *et al.*, *Annu Rev Med* 62, 265-279, 2011). Los inventores demuestran en el presente documento por primera vez que un tratamiento basado en terapia génica dirigida a la señalización del ActRIIB (Llovera *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 221, 653-655, 1996; Llovera *et al.*, *Mol Cell Endocrinol* 142, 183-189, 1998; Cai *et al.*, *Cell* 119, 285-298, 2004; Wyke *et al.*, *Br J Cancer* 91, 1742-1750, 2004; Watchorn *et al.*, *Int J Oncol* 27, 1105-1111, 2005; Wyke y Tisdale, *Br J Cancer* 92,

711-721, 2005) es un medio eficaz para la prevención de la atrofia muscular asociada con la progresión tumoral. Dado que actualmente se están desarrollando terapias basadas en genes para trastornos neuromusculares y enfermedades no musculares (Mingozzi y High, *Nat Rev Genet* 12, 341-355, 2011), los inventores sostienen que la estrategia descrita en este caso podría traducirse en tratamientos capaces de reducir la morbilidad y la mortalidad asociadas con la atrofia muscular en el contexto de la caquexia por cáncer y otras enfermedades con una señalización excesiva de ActRIIB.

En conformidad con aspectos particulares, dado que las concentraciones circulantes elevadas de miostatina y activina pueden provocar atrofia del músculo esquelético y se han asociado con cáncer, envejecimiento y procesos de enfermedades crónicas en que se produce atrofia muscular (Fearon *et al.*, *Cell metabolism* 16, 153-166, 2012; Zimmers *et al.*, *Science* 296, 1486-1488, 2002; Coerver *et al.*, *Mol Endocrinol* 10, 534-543, 1996; Harada *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2125-2130, 1996; Costelli *et al.*, *Eur J Clin Invest* 38, 531-538, 2008; Heineke *et al.*, *Circulation* 121, 419-425, 2010; Penna *et al.*, *PLoS One* 5, e13604, 2010; Ju y Chen, *et al.*, *Respir Med* 106, 102-108, 2012; Otani *et al.*, *Gynecol Oncol* 83, 31-38, 2001; Seder *et al.*, *Neoplasia* 11, 388-396, 2009; Wildi *et al.*, *Gut* 49, 409-417, 2001; Han *et al.*, *Int J Biochem Cell Biol*, 45:2333-2347, 2013), se ha invertido un esfuerzo considerable en desarrollar tratamientos que puedan mitigar los efectos dañinos de la señalización excesiva de ActRIIB, dirigiéndose a los ligandos responsables en la circulación (Fearon *et al.*, *Cell metabolism* 16, 153-166, 2012; Benny Klimek *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 391, 1548-1554, 2010; Zhou *et al.*, *Cell* 142, 531-543, 2010).

Sin embargo, la viabilidad de las terapias basadas en tales trampas de ligandos permanece en duda, debido a los posibles efectos secundarios asociados con la inhibición de ligandos pleiotrópicos a nivel extracelular (Massague, *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 616-630, 2012). Para evitar estos problemas, los inventores investigaron si la inhibición de la señalización de ActRIIB dentro de las fibras musculares representa una estrategia para inhibir la atrofia muscular sin la unión directa a ligandos. Los inventores descubrieron que los músculos tratados con VAAr6:Smad7 estaban protegidos de la atrofia cuando se exponían a la sobreexpresión experimental de miostatina y activina A. También determinaron que VAAr6:Smad7 podía mejorar la atrofia muscular sistémica independientemente de la masa tumoral y de los niveles circulantes persistentemente elevados de prolifigandos caquéticos. Estos resultados demuestran la utilidad del enfoque de los inventores para disociar la actividad de los procesos de señalización intracelular claves implicados en el mantenimiento de la masa muscular de los efectos de los ligandos que utilizan estas rutas para estimular la atrofia muscular. Además, la eficacia de VAAr6:Smad7 es virtualmente idéntica a la descrita para una trampa de ligando del ActRIIB soluble en ratones caquéticos (Zhou *et al.*, *Cell* 142, 531-543, 2010), sin embargo, VAAr6:Smad7 es más específico para el músculo estriado y, basándose en los resultados de los inventores, es menos probable que produzca efectos inespecíficos.

En conformidad con aspectos particulares, lo más importante es que ninguno de los signos inespecíficos asociados con ACE-031 (una trampa de ligando de peptiduro compuesto en gran parte del dominio extracelular del ActRIIB) se detectó en ningún ratón tratado con VAAr6:Smad7. Tampoco la expresión de Smad7 en tejidos no musculares o marcadores de bioactividad de Smad7. Estos últimos incluyen marcadores internos tales como cambios en el peso y la morfología de los pulmones o evidencia de microvasculatura comprometida, así como marcadores externos fácilmente evidentes tales como hematomas en las orejas, nariz y colas. Aunque tales marcadores podrían presentarse presumiblemente de forma intermitente, la especificidad combinada del enfoque de los inventores junto con la falta de signos detectables de THH, sugiere fuertemente que VAAr6:Smad7 es una alternativa segura y posiblemente más eficaz a las trampas de ligando de ActRIIB.

En conformidad con aspectos particulares, mecanicísticamente, La señalización de ActRIIB puede estimular el catabolismo muscular al reprimir la síntesis de proteínas musculares y estimular la degradación de proteínas (Amirouche *et al.*, *Endocrinology* 150, 286-294, 2009; Trendelenburg *et al.*, *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C1258-1270, 2009; Durieux *et al.*, *Endocrinology* 148, 3140-3147, 2007; Lokireddy *et al.*, *Mol Endocrinol* 25, 1936-1949, 2011). Los estudios de los inventores descritos en el presente documento demuestran que la sobreexpresión de Smad7 aumenta la señalización de S6K/S6RP asociada con la síntesis de proteínas, pero no por mecanismos que dependen de la activación de Akt y mTOR. Además, los inventores observaron que la sobreexpresión de Smad7 en músculos caquéticos reduce la transcripción de las ubiquitina ligasas E3 MuRF1 y Atrogina-1, cuya actividad facilita la degradación proteasómica en el músculo esquelético. Los efectos de Smad7 sobre la señalización tanto anabólica como catabólica dependían de la inhibición de la fosforilación de Smad2/3, pero Smad7 previno fácilmente la fosforilación excesiva de Smad2/3 asociada con niveles aumentados de miostatina y activina en todos los modelos de ratón estudiados. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la expresión aumentada de Smad7 representa un método potente para inhibir la fosforilación excesiva de Smad2/3 mediada por ActRIIB:ActRI, que de lo contrario contribuye a un catabolismo muscular significativo.

En conformidad con aspectos particulares, la mejora de la atrofia del músculo esquelético en ratones portadores de tumor a los que se les administró VAAr6:Smad7 se compara favorablemente con los efectos anticatabólicos informados anteriormente del tratamiento repetido de modelos de ratón similares con ActRIIB soluble (Zhou *et al.*, *Cell* 142, 531-543, 2010), lo que prolongó la supervivencia a pesar de la progresión del tumor. De manera similar a los estudios en que ratones caquéticos recibieron ActRIIB soluble (Zhou *et al.*, *Cell* 142, 531-543, 2010), ratones portadores de tumor tratados con una administración sistémica de VAAr6:Smad7 como se describe en el presente documento no demostraron una conservación potenciada de la masa grasa en comparación con sus homólogos portadores de tumor tratados de forma simulada. La mejora de la lipólisis en la caquexia se puede lograr de manera más eficaz si se tiene

como objetivo de manera conjunta otras citocinas asociadas a la caquexia, tal como TNF α (Llovera *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 221, 653-655, 1996; Llovera *et al.*, *Mol Cell Endocrinol* 142, 183-189, 1998). Sin embargo, los resultados indican que la conservación de la masa magra debería ser el objetivo principal de los tratamientos destinados a prolongar la supervivencia (Fearon *et al.*, *Cell Metabolism* 16, 153-166, 2012; Lee y Glass, *Skelet Muscle* 1, 2, 2011; Zhou *et al.*, *Cell* 142, 531-543, 2010).

En conformidad con aspectos particulares, la administración intravenosa de VAAr6:Smad7 también previno la atrofia cardíaca en ratones portadores de tumor, ya que los vectores de VAAr6, a través de la circulación, pueden transducir el músculo cardíaco. La expresión aumentada de miostatina y activina A se ha asociado con cardiopatías (Heineke *et al.*, *Circulation* 121, 419-425, 2010; Yndestad *et al.*, *Circulation* 109, 1379-1385, 2004; Rodgers *et al.*, *J Physiol* 587, 4873-4886, 2009), y la hipertrofia fisiológica y la contractilidad cardíaca potenciada y la modulación del Ca² se producen todos en corazones sin miostatina (Rodgers *et al.*, *J Physiol* 587, 4873-4886, 2009; Jackson *et al.*, *J Endocrinol* 213, 263-275, 2012; Jackson *et al.*, *Endocrinology* 155, 1771-1785, 2014), que están comparativamente protegidos frente a las lesiones (Bish *et al.*, *PLoS One* 5, e10230, 2010; Artaza *et al.*, *J Endocrinol* 194, 63-76, 2007). Por lo tanto, la administración sistémica de los vectores VAAr:Smad7 con tropismo por el miocardio también constituye una perspectiva atractiva para la represión de la señalización atrofica mediada por ActRIIB en el corazón y para conservar el rendimiento cardíaco en pacientes caquéticos.

Debido a que ActRIIB se expresa en muchos tejidos no musculares y varios ligandos de la superfamilia del TGF β se acoplan con este receptor para ejercer diversas acciones específicas de tejido, los enfoques de atrapamiento de ligandos presentan un riesgo significativo de provocar efectos inespecíficos (Koncarevic *et al.*, *Endocrinology* 153, 3133-3146, 2012). Los datos presentados en el presente documento introducen a VAAr6:Smad7 como un enfoque nuevo para la atenuación de la señalización de ActRIIB preferentemente en el músculo estriado (Gregorevic *et al.*, *Nat Med* 10, 828-834, 2004; Gregorevic *et al.*, *Nat Med* 12, 787-789, 2006). La inclusión de promotores específicos de tejido, que ya se han desarrollado, capaces de dirigir la expresión de Smad7 de forma exclusiva en el músculo esquelético y/o el cardíaco potenciaría aún más la especificidad (Salva *et al.*, *Mol Ther* 15, 320-329, 2007). Su inclusión podría mejorar la especificidad aún más al proporcionar un mayor control y posiblemente una expresión de Smad7 más robusta. Por lo tanto, se proponen estudios adicionales para optimizar el enfoque de los inventores y determinar su eficacia en otras condiciones de atrofia muscular o incluso de insuficiencia cardíaca.

El VAA pertenece a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*. VAA es un virus pequeño no envuelto que empaqueta un genoma de ADN lineal monocatenario. Las cadenas de ADN del VAA tanto sentido como antisentido se empaquetan en cápsides de VAA con la misma frecuencia.

El genoma del VAA se caracteriza por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean dos marcos de lectura abiertos (ORF). En el genoma de VAA2, por ejemplo, los primeros 125 nucleótidos de la ITR son un palíndromo, que se pliega sobre sí mismo para maximizar el emparejamiento de bases y forma una estructura de horquilla en forma de T. Las otras 20 bases de la ITR, llamada secuencia D, permanecen sin emparejar. Las ITR son secuencias que actúan en *cis* importantes para la replicación del ADN del VAA; la ITR es el origen de replicación y actúa como cebador para la síntesis de la segunda cadena por la ADN polimerasa. El ADN bicatenario formado durante esta síntesis, que se llama monómero de forma replicativa, se utiliza para una segunda ronda de replicación con autocebado y forma un dímero de formas replicativa. Estos intermedios bicatenarios se procesan mediante un mecanismo de desplazamiento de cadena, lo que da como resultado un ADN monocatenario que se utiliza para el empaquetamiento y un ADN bicatenario que se utiliza para la transcripción. Ubicados dentro de la ITR se encuentran los elementos de unión a Rep y un sitio de resolución terminal (SRT). Estas características las utiliza la proteína reguladora vírica Rep durante la replicación del VAA para procesar los intermedios bicatenarios. Además de su papel en la replicación del VAA, la ITR también es esencial para el empaquetamiento del genoma del VAA, la transcripción, la regulación negativa en condiciones no permisivas y la integración específica de sitio (Daya y Berns, *Clin Microbiol Rev* 21(4):583-593, 2008).

El ORF izquierdo del VAA contiene el gen Rep, que codifica cuatro proteínas: Rep78, Rep 68, Rep52 y Rep40. El ORF derecho contiene el gen Cap, que produce tres proteínas de la cápside vírica (VP1, VP2 y VP3). La cápside del VAA contiene 60 proteínas de la cápside vírica dispuestas en una simetría icosaédrica. VP1, VP2 y VP3 están presentes en una relación molar de 1:1:10 (Daya y Berns, *Clin Microbiol Rev* 21(4):583-593, 2008).

El VAA es actualmente uno de los virus más utilizados para terapia génica. Aunque el VAA infecta a los seres humanos y a algunas otras especies de primates, no se conoce que provoque enfermedad y suscita una respuesta inmunitaria muy leve. Los vectores de terapia génica que utilizan VAA pueden infectar tanto las células en división como en reposo y persisten en un estado extracromosómico sin integrarse en el genoma de la célula hospedadora. Debido a las características ventajosas del VAA, la presente divulgación contempla el uso del VAA para las moléculas de ácido nucleico recombinantes y los métodos divulgados en el presente documento.

El VAA posee varias características convenientes para un vector de terapia génica, entre ellas la capacidad de unirse y entrar en las células diana, de entrar en el núcleo, la capacidad de expresarse en el núcleo durante un período prolongado de tiempo y una baja toxicidad. Sin embargo, el pequeño tamaño del genoma del VAA limita el tamaño del ADN heterólogo que se puede incorporar. Para minimizar este problema, se han construido vectores de VAA que no codifican Rep ni el elemento de eficacia de integración (EEI). Las ITR se conservan ya que son señales en *cis*

necesarias para el empaquetamiento (Daya y Berns, Clin Microbiol Rev 21(4):583-593, 2008).

Los métodos de producción de VAAr adecuados para terapia génica son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las Solicitudes de Patente de EE.UU. N.º 2012/0100606; 2012/0135515; 2011/0229971; y 2013/0072548; y Ghosh *et al.*, Gene Ther 13(4):321-329, 2006), y pueden utilizarse con las moléculas de ácido nucleico recombinantes, los vectores y los métodos divulgados en el presente documento.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características y/o realizaciones particulares. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de la divulgación a las características o realizaciones particulares descritas.

Ejemplo 1: materiales y métodos

Anticuerpos - Todos los anticuerpos utilizados se obtuvieron de Cell Signalling (Danvers, MA), excepto los anticuerpos contra Smad7 (Imgenex, San Diego, CA), pSmad3 (Epitomics, Burlingame, CA) y GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX).

Producción de vectores VAAr6 - Las construcciones de ADNc que codifican Smad7, n.º de referencia de GenBank NM_001042660.1), que se amplificó por PCR a partir de una biblioteca de ADNc de ratón, activina A, miostatina y Smad3-CA (todos sintetizados por GenScript, Piscataway, NJ), se clonaron en un plásmido de expresión de VAAr que consiste en un promotor/potenciador de CMV y una región poliA de SV40 flanqueada por repeticiones terminales de VAA2, utilizando técnicas de clonación estándar. La secuencia de los vectores resultantes se proporciona en la SEQ ID NO: 5; se proporciona un mapa en la FIG. 12. La transfección de estos plásmidos con el plásmido de empaquetamiento pDGM6 (que contiene los genes cap de VAA6, los genes rep de VAA2 y también los genes auxiliares de adenovirus; Gregorevic *et al.*, Nat. Med. 10, 828-834, 2004) en células HEK293 generó vectores víricos pseudotipados de tipo 6 que se recogieron y purificaron (Gregorevic *et al.*, Nat Med 10, 828-834, 2004). Brevemente, las células HEK293 se sembraron en placas a una densidad de 3,2-3,8 x 10⁶ células en una placa de cultivo de 10 cm, 8-16 horas antes de la transfección con 10 µg de un plásmido que contiene el genoma del vector y 20 µg del plásmido de empaquetamiento/auxiliar pDGM6, mediante el método de precipitado de fosfato de calcio, para generar vectores de pseudotipo 6. Setenta y dos horas después de la transfección, los medios y las células se recolectaron y homogeneizaron a través de un microfluidificador (Microfluidics, Westwood, MA) antes de la clarificación de 0,22 µm (Merck Millipore, Billerica, MA). El vector se purificó a partir del lisado clarificado mediante cromatografía de afinidad sobre una columna de afinidad de heparina (HITRAP™, GE Healthcare, Pittsburgh, PA) y se ultracentrifugados durante la noche antes de la resuspensión en solución fisiológica estéril de Ringer. Las preparaciones de vector purificado se titularon con una reacción basada en PCR hecha a medida específica de secuencia (Life Technologies, Grand Island, NY).

Experimentos con animales - Todos los experimentos se realizaron en conformidad con los códigos de prácticas pertinentes para el cuidado y uso de animales con fines científicos (National Institutes of Health, EE.UU., 1985; el National Health & Medical Council of Australia, 2013).

Para el suministro local de vectores, los ratones se anestesiaron profundamente con isoflurano o una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg; inyección intraperitoneal, VM Supplies, Chelsea Heights, VIC, AU). Se administraron 1-10 x 10⁹ genomas de vector de un vector dado en 30 µl de solución salina tamponada de Hank (HBSS) directamente en el compartimento anterior de la extremidad trasera, que está ocupado por los músculos tibial anterior (TA) y extensor largo de los dedos (ELD). Las inyecciones de control de la extremidad contralateral utilizaron un vector que carecía de un gen funcional (VAAr6:MCS) (Han *et al.*, Int J Biochem Cell Biol, 45:2333-2347, 2013). Para los estudios de administración sistémica, se administraron 3-5 x 10¹² genomas de vector en un volumen de 200 µl de HBSS a través de la vena de la cola. Para los experimentos con rapamicina, se disolvió la rapamicina durante una noche en una solución que contenía sal de carboximetilcelulosa de sodio al 0,2 % (Sigma, St. Louis, MO) y polisorbato-80 al 0,25 % (Sigma, St. Louis, MO) en agua, como se describe anteriormente (Bourdeau *et al.*, Am J Pathol 156, 911-923, 2000). En estos experimentos, los ratones recibieron 2 mg/kg/día de rapamicina (Calbiochem®, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) o vehículo como una inyección intraperitoneal diaria comenzando 3 horas antes de la inyección de VAAr6:Smad7 y continuando hasta el día 14 incluido. Para la recogida de tejidos, los ratones se sometieron a sacrificio compasivo mediante una dislocación cervical, y los músculos se extirparon y pesaron rápidamente antes del procesamiento posterior. La implantación de tejido tumoral derivado de C-26 se llevó a cabo utilizando ratones CD2F1 o BALB/c. Se implantaron las células o el tejido en el flanco del lomo como se describió anteriormente (Bourdeau, *et al.*, Trends Cardiovasc Med 10, 279-285, 2000; Bourdeau *et al.*, Am J Pathol 158, 2011-2020, 2001). Brevemente, las células se pasaron inmediatamente antes de la implantación y se reconstituyeron en medio DMEM al 10 %, mientras que los trozos de tumor se descongelaron a partir de nitrógeno líquido. A continuación, se implantaron células, o trozos de 1 mm³, utilizando una aguja de trocar, a través de una pequeña incisión en el flanco del lomo y los ratones se sacrificaron 21 días después. Se analizaron las masas corporales grasa, magra y total de los ratones nulos para inhibina utilizando tecnología Echo-MRI (Echo Medical Systems, Houston, TX).

PCR en tiempo real - Se recogió de las células de los músculos TA el ARN total, utilizando Trizol (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se transcribieron de forma inversa 500-1000 ng de ARN utilizando el kit High

Capacity RNA-to-cDNA (Life Technologies). A continuación, se analizó el ADNc para Smad7, Foxo1, Foxo3, MAFbx y MuRF1 mediante RT-PCR utilizando kits de ensayo de polimerasa Taqman™ bajo demanda y un programa informático de detección (Life Technologies). Se utilizó 18S para normalizar las concentraciones de ADNc. Los datos se analizaron utilizando el método de análisis por $\Delta\Delta C_T$. La activina A (F: GGAGTGTGATGGCAAG-GTCAACA, la SEQ ID NO: 1; R: GTGGGCACACAGCATGACTTA, la SEQ ID NO: 2) y la miostatina (F: CCCAGAGGTTTCAG-CAGGCCCT, la SEQ ID NO: 3; R: TCATGAGCACCCACAGCGGTC, la SEQ ID NO: 4) se detectaron mediante el método de detección de PCR en tiempo real SYBR® Green.

ELISA - La concentración de activina A en suero de ratón se determinó mediante ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Oxford Bio-innovations, Oxfordshire, Reino Unido), utilizando modificaciones descritas anteriormente (Satomi, *et al.*, Stroke 34, 783-789, 2003). Se midió la IL-6 sérica de los ratones control y caquéuticos de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Mineápolis, MN).

Experimentos con luciferasa - Se transfectaron células C2C12 en placas de 24 pocillos con 0,35 µg de plásmido Smad7, 0,25 µg de plásmido pCAGA-luc o 0,25 µg de plásmido LacZ por pocillo, utilizando Lipofectamine 2000 (Life Technologies). 16 horas después, se cambió el medio y se complementó con suero de los ratones de control o portadores de tumor C-26 durante 24 horas. A continuación, las células se lisaron con tampón de lisis celular (Promega, Madison, WI) y se midió la actividad luciferasa utilizando un luminómetro (Berthold, Bad Wildbad, Alemania). La actividad de luciferasa se presenta como la relación de la actividad de pCAGA-luciferasa con respecto a la actividad informadora de la β-galactosidasa, y los datos son representativos de tres experimentos independientes. La β-galactosidasa se detectó utilizando un ensayo de detección de β-gal comercial (Promega). Brevemente, se incubó lisados con tampón de β-galactosidasa 2x durante hasta 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se midió la expresión de β-gal a 420 nm.

Histología - Los músculos recogidos se colocaron en crioprotector de OCT (forma siglada de *optimal cutting temperature*, temperatura de corte óptima) y se congelaron en isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se criocortaron posteriormente con un grosor de 10 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina para examinar la morfología. Los cortes se montaron utilizando medio de montaje DePeX (BDH, VWR International, Radnor, PA) y se capturaron imágenes de los cortes teñidos utilizando una cámara U-TV1X-2 montada en un microscopio IX71, y un objetivo PlanC 10x/0,25 (Olympus). Se utilizó el programa informático de adquisición DP2-BSW (Olympus) para adquirir imágenes. Para un análisis de los tipos de fibras, se obtuvieron criocortes transversales en serie a partir de la mitad del vientre de los músculos TA (-20 °C, Criostato CTI; IEC, Needham Heights, MA). Los cortes se tiñeron con: laminina (#L9393, Sigma-Aldrich) para la determinación del diámetro de las miofibras y el área transversal (AT), y/o N2.261 (desarrollado por el Dr. H.M. Blau, obtenido del Development Studies Hybridoma Bank, desarrollado bajo el patrocinio del NICHD y mantenido por la Universidad de Iowa, Department of Biology, Ciudad de Iowa, IA) para evaluar el porcentaje de isoformas de miosina respectivamente de tipo I (Torsney *et al.*, Circulation 107, 1653-1657, 2003) y de tipo IIa (Durieux *et al.*, Endocrinology 148, 3140-3147, 2007). Como se ha demostrado anteriormente (Bourdeau *et al.*, Mol Endocrinol 25, 1936-1949, 2011), se asumió que todas las fibras que no reaccionaban N2.261 en los músculos TA de ratón representaban fibras de tipo IIx/b. Se obtuvieron imágenes digitales utilizando un microscopio convencional con cámara (Axio Imager D1, Carl Zeiss, Wrek, Gatinga, Alemania), controlaron y cuantificaron mediante el programa informático AxioVision AC (AxioVision AC Rel. 4.7.1, Carl Zeiss). Se determinaron el diámetro mínimo de Feret y el área de miofibras utilizando el programa informático ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) mediante la medición de al menos 500 miofibras por músculo TA de ratón y se utilizaron al menos tres ratones por grupo para cuantificar estas variables.

Transferencia de Western - Los músculos TA se homogeneizaron en tampón de lisis basado en RIPA (Merck Millipore) con cócteles de inhibidores de fosfatasa y proteasa sin EDTA COMPLETE™ (Roche, Basilea, Suiza). A la lisis le siguió la centrifugación a 13000 g durante 10 minutos a 4 °C y las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95 °C. La concentración de proteínas se determinó utilizando un kit de ensayo de proteínas Pierce (Thermo Scientific, Rockford, IL). Las fracciones de proteínas se separaron posteriormente mediante SDS-PAGE utilizando geles de Bis-Tris al 4-12 % prefabricados (Life Technologies), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA) y se incubaron con el anticuerpo apropiado durante una noche. Se realizaron cuantificaciones de las transferencias de Western marcadas utilizando análisis de píxeles por ImageJ (National Institutes of Health), y los datos se normalizaron con respecto a un valor de control de 1. Los análisis densitométricos de las transferencias de Western se presentan como densidad de banda normalizada con respecto al control de carga, y estos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Ensayo de cinasa Akt - Se realizó un ensayo de cinasa Akt no radiactivo (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se recolectaron músculos TA inyectados con VAAr6:Smad7 o VAAr6:MCS, se homogeneizaron y, a continuación, se sometieron muestras de proteína a inmunoprecipitación durante una noche, utilizando un anticuerpo contra el sitio Ser473 de la Akt. Se apartó una parte del lisado de proteínas como lisado celular total. A continuación, las perlas inmunoprecipitadas se sedimentaron, se lavaron e incubaron con tampón de cinasa, ATP y una proteína de fusión de GSK3α durante 30 minutos a 30 °C. A continuación, la reacción se inactivó y las muestras se analizaron mediante transferencia de Western. La actividad de la cinasa Akt se normalizó frente a los niveles totales de Akt.

Síntesis de proteínas ex vivo - Se extrajeron los músculos ELD con los tendones intactos y se preincubaron durante 30 minutos en 2,0 ml de tampón *Kreb's-Henseleit* (KHB, forma siglada de *Kreb's-Henseleit buffer*) modificado calentado (30 °C), que consiste en NaCl al 4,5 %, KCl al 5,75 %, CaCl₂ al 6,1 %, KH₂PO₄ al 10,55 %, MgSO₄·7H₂O al 19,1 %, NaHCO₃ al 16 % v/v (pH=7,4) complementado con seroalbúmina bovina al 4 % (Bovostar, Bovogen, East Keilor, VIC, Australia) y glucosa 5 mM antes de gasear con 95: 5 % de O₂:CO₂. El conjunto de proteínas intracelulares se marcó transfiriendo músculos ELD a viales que contenían 2,0 ml de tampón de pulsos (radiactivos) que comprendía 5 (µCi/ml de 3H-tirosina (GE Healthcare) y 500 mM de L-tirosina en KHB durante 1 hora. Después del marcaje, los músculos se enjuagaron con KHB no radiactivo, de transfirieron en seco, se pesaron, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y almacenaron a -80 °C. Los músculos congelados se homogeneizaron en 500 µl de ácido tricloroacético al 10 % y se centrifugaron a 10.000 g durante 15 minutos (4 °C). Los sedimentos correspondientes a las fracciones de proteínas insolubles se resuspendieron en 500 µl de NaOH 1 M y se dejaron disolver durante una noche a temperatura ambiente. Para estimar la incorporación de tirosina, se añadieron 100 µl de cada muestra resuspendida a 5 ml de líquido de centelleo y se midió la radiactividad de 3H por triplicado de cada muestra en un contador de centelleo (Beckman Coulter, Brea, CA).

Evaluación de la función muscular - Como se describió anteriormente (Han *et al.*, Int J Biochem Cell Biol, 45:2333-2347, 2013; Lokireddy *et al.*, Mol Endocrinol 25, 1936-1949, 2011) se evaluaron *in situ* las propiedades contráctiles de los músculos TA de los ratones mediante el suministro de una serie de estímulos eléctricos al nervio motor tibial a través de electrodos percutáneos y el registro de la tensión generada durante la contracción mediante un transductor de fuerza unido al tendón distal con sutura con seda quirúrgica. Los ratones se anestesiaron antes de la prueba con pentobarbitona de sodio (NEMBUTAL®; 60 mg/kg; Sigma-Aldrich) mediante inyección intraperitoneal y se sometieron a sacrificio compasivo mediante escisión cardíaca al final de la evaluación, mientras todavía estaban anestesiados profundamente. Al final del protocolo, los músculos se extirparon rápidamente, se disecaron sin tendones y tejido conjuntivo, y pesado.

Análisis estadístico - Las diferencias estadísticas se evaluaron en múltiples condiciones utilizando pruebas ANOVA unidireccionales o bidireccionales, utilizándose la prueba de Student-Newman-Keuls *a posteriori* para las comparaciones entre las medias de los grupos. Las comparaciones entre dos condiciones solo utilizaron la prueba de la t de Student. Las diferencias entre los grupos se informaron como estadísticamente significativas para valores de p <0,05. Los datos se presentan como la media ± ETM.

Ejemplo 2: El aumento de la expresión de Smad7 estimula la hipertrofia del músculo esquelético

En este ejemplo, la inyección de los músculos tibiales anteriores (TA) de las extremidades posteriores de ratones con vectores los VAAr6 (Gregorevic *et al.*, Nat Med 10, 828-834, 2004; Gregorevic *et al.*, Nat Med 12, 787-789, 2006) portando un cassette de expresión de Smad7 (VAAr6:Smad7) suscitó un aumento de ~ 45 % en la masa muscular al cabo de 28 días de la inyección (FIG. 1A), de forma simultánea con aumentos en la expresión de la proteína Smad7 (FIG. 1B) y del diámetro de las miofibras (FIG. 1C-1D). Transducción sistémica de la musculatura de ratones mediante la administración de VAAr6 en la vena de la cola: Smad7 estimuló la hipertrofia de los músculos esqueléticos en todo el cuerpo (FIG. 1E-1F). Debido a que los vectores VAAr6 presentan tropismo por el músculo estriado (Gregorevic *et al.*, Curr Opin Mol Ther 6, 491-498, 2004), los inventores determinaron posteriormente que la proteína Smad7 se expresaba fácilmente en los músculos estriados (FIG. 1F), pero no en los órganos viscerales o la grasa, y que la expresión de las dianas del gen Smad2/3 (CTGF, COL1A1, PAI1, FN1) tampoco se alteró en una muestra de tejidos no musculares, incluido el riñón, bazo, hígado y pulmón (Fig. 2A-2B). Además, se evaluó la integridad de los vasos sanguíneos, ya que la antagonización de la señalización de ActRIIb utilizando "trampas de ligandos" sistémicas puede producir signos de telangiectasia hemorrágica hereditaria (THH) (Smith y Lin, Curr Opin Support Palliat Care 7, 352-360, 2013; Bourdeau *et al.*, J Clin Invest 104:1343-1351, 1999). Cabe destacar que la administración sistémica de VAAr6:Smad7 no produjo signos de THH, ya sea en el análisis histológico de los inventores o en evaluaciones morfológicas macroscópicas, aunque recapituló aumentos en el tamaño de las fibras musculares que eran comparables a los obtenidos mediante inyección intramuscular (FIG. 2C-2D).

En un ejemplo adicional, los inventores examinaron si los efectos de la administración de VAAr6:Smad7 se atribuían a la inhibición de la señalización de Smad2/3 y descubrieron que la fosforilación de Smad3 S432/435 se suprimió de forma potente en los músculos que expresaban Smad7 (FIG. 1G). Además, los efectos de Smad7 se suprimieron en presencia de una forma constitutivamente activa de Smad3 (Liu *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 94, 10669-10674, 1997) (CA-Smad3, FIG. 1H-1I). Los inventores evaluaron si la expresión de Smad7 influyó en la señalización aguas abajo de Akt y mTOR, un mecanismo clave que estimula la síntesis de proteínas (Bodine *et al.*, Nat Cell Biol 3, 1014-1019, 2001). Mientras que la sobreexpresión de Smad7 en los músculos aumentó las tasas fraccionales de síntesis de proteínas de forma simultánea a la fosforilación aumentada de las dianas aguas abajo de mTOR, incluidas S6RPS235/236 y 4EBP1T37/46, los inventores no pudieron detectar cambios en la fosforilación o actividad de Akt (FIG. 3A-3C) y la administración de rapamicina (un inhibidor de la diana de Akt, mTOR) no suprimió la respuesta hipertrófica de los músculos a VAAr6:Smad7 (FIG. 3D-3E). Esto no es particularmente sorprendente, ya que previamente los inventores habían demostrado que la inhibición de la señalización de Smad3 solo inhibe parcialmente la síntesis de proteínas (Winbanks *et al.*, J Cell Biol 197, 997-1008, 2012), a pesar de la ablación completa de la señalización de mTOR. Otros también han demostrado que S6RP puede regularse mediante la señalización de MEK/ERK aguas arriba de una manera dependiente o independiente de mTOR (Wu *et al.*, Biochem Biophys Res

Commun 400, 679-683, 2010; Iijima *et al.*, J Biol Chem 277, 23065-23075, 2002). Por lo tanto, los inventores investigaron si los efectos anabólicos de VAAr6:Smad7 estaban asociados con la inhibición de mecanismos proteolíticos y descubrieron que Smad7 atenuaba la expresión basal e inducida por Smad3 de las ubiquitina ligasas E3 MuRF1 y MAFbx (FIG. 3F-3G). Por tanto, Smad7 regula la masa muscular no mediante la potenciación de la señalización de Akt/mTOR, sino suprimiendo la actividad de la ligasa E3 y, posteriormente, la degradación de proteínas (FIG. 3F), lo que cambia el equilibrio entre la síntesis y la degradación de proteínas para favorecer el anabolismo muscular.

Ejemplo 3: Smad7 previene la atrofia muscular inducida por miostatina y activina

En este ejemplo, los inventores compararon la eficacia de VAAr6:Smad7 en ratones de tipo silvestre y nulos para miostatina (*mstn*^{-/-}).

Aunque VAAr6:Smad7 indujo cambios absolutos similares en la masa muscular, un aumento del área transversal de las fibras y una atenuación de la fosforilación de Smad3, los cambios relativos en la masa muscular fueron menos pronunciados en los ratones *mstn*^{-/-} (FIG. 4A-4D). Esto es similar a las limitaciones inherentes en la musculatura demostradas previamente mediante la combinación de enfoques para atenuar la actividad de ActRIIB (Lee, PLoS ONE 2, e789, 2007) y, al comparar la hipermuscularidad relativa de ratones y de ganado vacuno *mstn*^{-/-} (Teggren *et al.*, Mol Phylogenet Evol 33, 782-790, 2004) como selección positiva en bóvidos, las especies modernas resultan "parcialmente nulas". No obstante, la acción hipertrófica de VAAr6:Smad7 en ratones *mstn*^{-/-} respalda estudios previos (Lee, PLoS ONE 2, e789, 2007; Lee *et al.*, Mol Endocrinol 24, 1998-2008, 2010) que demuestran acciones redundantes de los ligandos de ActRIIB (activina y GDF-11), y está respaldada por el estudio reciente de los inventores que sugiere que la Activina A y la miostatina son igualmente capaces de estimular la atrofia muscular (Chen *et al.*, FASEB J., 28(4):1711-1723, 2014). De hecho, transducir ratones con VAAr6:activina o VAAr6:miostatina indujo simultáneamente atrofia muscular y fosforilación de Smad3 aumentada. Estos efectos se previnieron completamente mediante la coadministración de VAAr6:Smad7, que no tuvo ningún efecto sobre la expresión de miostatina o de activina A (FIG. 4E-4G; FIG. 5A-5C). Por lo tanto, Smad7 puede inhibir las acciones redundantes de múltiples ligandos de ActRIIB en el músculo.

Ejemplo 4: El aumento de Smad7 previene la atrofia muscular asociada con la caquexia por cáncer

En este ejemplo, dado que se hipotetiza que la señalización de ActRIIB contribuye al desarrollo y progresión de la caquexia por cáncer (Benny Klimek *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 391, 1548-1554, 2010; Zhou *et al.*, Cell 142, 531-543, 2010; Zimmers *et al.*, Science 296, 1486-1488., 2002; Coerver *et al.*, Mol Endocrinol 10, 534-543, 1996; Lokireddy *et al.*, Biochem J 446, 23-36, 2012), los inventores examinaron si VAAr6:Smad7 podía prevenir la atrofia muscular en ratones portadores de tumores procedentes del carcinoma de colon C-26 inductores de caquexia.

La masa corporal, la masa del músculo esquelético, la masa cardíaca y de grasa estaban reducidas en los ratones portadores de tumor (Fig. 5A-5D). Por el contrario, la inyección de VAAr6:Smad7 en los músculos TA de ratones portadores de tumor previno por completo la pérdida de masa muscular (FIG. 7A), de la fuerza isométrica máxima (FIG. 7B, FIG. 6E) y del área de transversal de fibras musculares (AT, FIG. 7C). La caquexia por cáncer también disminuyó la distribución de las fibras de tipo IIa y aumentó la de las de tipo IIx/IIb, aunque VAAr6:Smad7 restableció estas proporciones (Fig. 6F-6G). El número de fibras musculares no cambió con la caquexia o con el tratamiento con VAAr6:Smad7 (FIG. 6G-6I), lo que indica que la pérdida de masa muscular mediada por el tumor se debió a la atrofia, no a la apoptosis. Dado que no siempre es posible administrar terapias para la caquexia antes de que se desarrolle la atrofia muscular, los inventores examinaron si inyectar VAAr6:Smad7 a los 7 o 14 días después del establecimiento del tumor también era protectora. El examen de los animales que recibieron una administración retrasada de VAAr6:Smad7 reveló que el tratamiento todavía mejoraba significativamente la atrofia muscular (FIG. 7E).

En un ejemplo adicional, dado que la caquexia por cáncer provoca atrofia de los músculos en todo el cuerpo, los inventores analizaron si VAAr6:Smad7 podía prevenir la atrofia muscular a nivel sistémico. La inyección intravenosa de VAAr6:Smad7 aumentó de manera robusta la expresión de Smad7 en toda la musculatura estriada de ratones portadores de tumor (FIG. 8A-8B). El tratamiento no previno por completo la reducción de la masa corporal, pero conservó la masa de músculos esqueléticos en todo el cuerpo (FIG. 7F-7I, FIG. 8C-8D), a pesar del desarrollo continuo del tumor (Fig. 8E). Los inventores atribuyen la discrepancia entre la prevención de la atrofia muscular y la conservación incompleta de la masa corporal a los efectos caquéticos sobre otros tejidos (Fearon *et al.*, Cell Metabolism 16, 153-166, 2012), principalmente grasa (FIG. 8F-8G). Dado que la caquexia por cáncer también afecta al corazón, fue alentador observar que la administración sistémica de VAAr6:Smad7 también previno la atrofia cardíaca en ratones portadores de tumor (FIG. 8H-8I), y no suscitó aumentos en la masa auricular o en el peso pulmonar total normalmente asociados con insuficiencia cardíaca (FIG. 8J-8K) (Bernardo *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 109, 17615-17620, 2012). Para confirmar que los efectos terapéuticos de VAAr6:Smad7 en el contexto de la caquexia no eran exclusivos del modelo empleado, los inventores analizaron la eficacia de su tratamiento con VAAr6:Smad7 en ratones genosuprimidos para inhibina α , los cuales presentan una caquexia profunda posterior al desarrollo de tumores gonadales (FIG. 9A-9C) (Zhou *et al.*, Cell 142, 531-543, 2010; Coerver *et al.*, Mol Endocrinol 10, 534-543, 1996; Matzuk *et al.*, Nature 360, 313-319, 1992). De manera concordante con los resultados obtenidos de ratones portadores de tumor C-26, los inventores descubrieron que la administración de VAAr6:Smad7 a los músculos de ratones nulos para

inhibina α previene la atrofia muscular (FIG. 7J-7K), demostrando así que VAAr6:Smad7 puede prevenir la caquexia independientemente del origen del tumor.

Ejemplo 5: Smad7 previene la atrofia muscular al inhibir parcialmente la activación de la ubiquitina ligasa aguas abajo de la señalización de ActRIIB)

En los modelos caquéticos, Smad7 protegió a la musculatura estriada de la atrofia a pesar de que los niveles circulantes de activina A y B permanecieron elevados (el suero de ratones portadores de tumor C-26 siguió siendo capaz de activar un indicador de luciferasa sensible a Smad3 en células miogénicas C2C12, FIG. 10A-10B, FIG. 11A). Los inventores atribuyen los efectos protectores de VAAr6:Smad7 en ratones caquéticos a la supresión de la transcripción y fosforilación de Smad3 en músculos estriados (FIG. 10C-10D). Sin embargo, dado que la interleucina 6 (IL-6) procedente del tumor y del hospedador también está implicada en la etiología de la caquexia (Fearon *et al.*, Cell metabolism 16, 153-166, 2012; Strassmann *et al.*, J Clin Invest 89, 1681-1684, 1992; Fujita *et al.*, Int J Cancer 68, 637-643, 1996; Bonetto *et al.*, Am J Physiol Endocrinol Metab 303, E410-421, 2012), los inventores examinaron si los efectos protectores de Smad7 estaban asociados con la señalización alterada de IL-6. La administración de VAAr6:Smad7 no alteró los niveles circulantes de IL-6, o la fosforilación de Stat3 sensible a interleucina en los músculos de ratones portadores de tumor (FIG. 11B-11C), ni afectó la fosforilación de p65, un regulador clave de la señalización de NFkB que se acopla a citocinas procaquéticas (FIG. 11D). Curiosamente, los inventores descubrieron que, aunque la sobreexpresión de Smad7 no alteró la relación de Foxo1 o 3 fosforilado con respecto al total (reguladores transcripcionales de MuRF1 y MAFbx (Sandri *et al.*, Cell 117, 399-412, 2004; Stitt *et al.*, Mol Cell 14, 395-403, 2004), FIG. 11E), el tratamiento redujo la abundancia de Foxo1/3 en los músculos de ratones portadores de tumor, dando como resultado niveles reducidos de las formas fosforiladas totales (FIG. 10E-10F). Dado que la inhibición de la transcripción de Foxo1/3 puede mejorar la atrofia muscular al reprimir la transcripción de MuRF1 y MAFbx (Reed *et al.*, FASEB J 26, 987-1000, 2012), los inventores examinaron los músculos de ratones portadores de tumor en cuanto a los efectos del tratamiento sobre la transcripción de MuRF1 y MAFbx. Los inventores observaron que la administración de VAAr6:Smad7 suprimió la expresión de MuRF1 y MAFbx en los músculos de ratones portadores de tumor, en comparación con los ratones que recibieron el vector de control (FIG. 10G).

Ejemplo 6: Tratamiento de la atrofia muscular utilizando Smad7

Este ejemplo describe un método ilustrativo para el uso clínico de vectores de VAAr que codifican Smad7 para el tratamiento de la atrofia muscular.

Se selecciona para el tratamiento un sujeto al que se le ha diagnosticado atrofia muscular (tal como caquexia por cáncer). Al sujeto se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un VAA recombinante que expresa Smad7, tal como un VAAr que comprende la SEQ ID NO: 5 o un equivalente del mismo capaz de expresar Smad7, como se divulga en el presente documento. En realizaciones, Smad7 se selecciona para ser de la misma especie que el sujeto. El VAA recombinante puede administrarse por vía intravenosa. El médico de cabecera puede seleccionar una dosis terapéutica adecuada. En algunos casos, la dosis terapéuticamente eficaz está en el intervalo de 1×10^{10} a 1×10^{14} partículas víricas (pv)/kg, tal como aproximadamente 1×10^{11} o 1×10^{12} pv/kg. En la mayoría de los casos, la composición se administra como una dosis única. En ausencia de inmunomodulación, el paciente puede tolerar una sola infusión de VAAr. Si el sujeto ha tenido inmunomodulación preexposición, se pueden administrar dos o más dosis. La salud del sujeto puede controlarse a lo largo del tiempo para determinar la eficacia del tratamiento.

Ejemplo 7: Potenciación de la masa y/o la fuerza muscular utilizando Smad7

Este ejemplo describe un método ilustrativo para el uso cosmético de vectores de VAAr que codifican Smad7 para aumentar o potenciar la masa y/o la fuerza muscular. Habiendo demostrado en el presente documento que VAAr6:Smad7 aumenta la masa y la fuerza muscular en ratones sanos, los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden utilizar en procedimientos voluntarios/cosméticos en sujetos sanos que deseen aumentar la masa muscular, fuerza muscular, o ambas.

Se selecciona para el tratamiento un sujeto que desee aumentar la masa y/o la fuerza muscular. Al sujeto se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un VAA recombinante que expresa Smad7, tal como un VAAr que comprende la SEQ ID NO: 5 o un equivalente del mismo capaz de expresar Smad7, como se divulga en el presente documento. En realizaciones, Smad7 se selecciona para ser de la misma especie que el sujeto. El VAA recombinante puede administrarse por vía intravenosa. El médico de cabecera puede seleccionar una dosis terapéutica adecuada. En algunos casos, la dosis terapéuticamente eficaz está en el intervalo de 1×10^{10} a 1×10^{14} partículas víricas (pv)/kg, tal como aproximadamente 1×10^{11} o 1×10^{12} pv/kg. En la mayoría de los casos, la composición se administra como una dosis única. En ausencia de inmunomodulación, el paciente puede tolerar una sola infusión de VAAr. Si el sujeto ha tenido inmunomodulación preexposición, se pueden administrar dos o más dosis. La salud del sujeto puede controlarse a lo largo del tiempo para determinar la eficacia del tratamiento.

En vista de las muchas realizaciones posibles a las que pueden aplicarse los principios de la invención divulgada, debe reconocerse que las realizaciones ilustradas son únicamente ejemplos preferentes de la invención y no deben tomarse como que limitantes del alcance de la invención. Más bien, el alcance de la invención se define por las

siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> WASHINGTON STATE UNIVERSITY
BAKER IDI HEART AND DIABETES INSTITUTE HOLDINGS LIMITED Gregorevic, Paul
- <120> SUMINISTRO DEL GEN SMAD7 COMO UN AGENTE TERAPÉUTICO
- 10 <130> 4630-96554-01
- <150> US 62/151.147
<151> 23/04/2015
- 15 <160> 5
- <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223>Oligonucleótido sintético
- 25 <400> 1
ggagtgatgac ggcaaggtca aca 23
- 30 <210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223>Oligonucleótido sintético
- 40 <400> 2
gtgggcacac agcatgactt a 21
- <210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223>Oligonucleótido sintético
- 50 <400> 3
cccagagggt cagcaggccc t 21
- <210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<223>Oligonucleótido sintético
- 60 <400> 4
tcatgagcac ccacagcggt c 21
- <210> 5
<211> 6018
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65

ES 2 856 936 T3

<220>

<223> Vector de VAA para Smad7, pAAV-MCS_smad7stp 081809.cep; contiene la secuencia codificante de Smad7 murina

5

<400> 5

```

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgct      60
gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca      120
actccatcac taggggttcc tgcggccgca cgcgtggagc tagttattaa tagtaatcaa      180
ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa      240
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg      300
ttcccatagt aacgtcaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt      360
aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg      420
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta catgacctta tgggactttc      480
ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc      540
agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca      600
ttgacgtcaa tgggagtttg ttttgacca aatcaacgg gactttcaa aatgctgtaa      660
caactccgcc ccattgacgc aaatgggagg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag      720
cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct      780
ccatagaaga caccgggacc gatccagcct ccgcgattc gaatccggc cgggaacggt      840
gcattggaac gcggattccc cgtgccaaga gtgacgtaag taccgcctat agagtctata      900
ggcccacaaa aaatgctttc ttcttttaat atactttttt gtttatctta tttctaatac      960
tttccctaat ctctttcttt cagggcaata atgatacaat gtatcatgcc tctttgcacc     1020
attctaaaga ataacagtga taatttctgg gttaaggcaa tagcaatatt tctgcatata     1080
aatatctctg catataaatt gtaactgatg taagaggttt catattgcta atagcagcta     1140
caatccagct accattctgc ttttatatta tgggtgggat aaggctggat tattctgagt     1200
ccaagctagg cccttttctt aatcatgttc ataccttta tcttctctcc acagctcctg     1260
ggcaacgtgc tggctctgtg gctggcccat cactttggca aagaattggg attcgaacat     1320
cgattgaatt cgcccttgtc atgttcgctc cttagccggc aaacgacttt tctcctcgcc     1380
tcctcgcccc gcatgttcag gaccaaacga tctgcgctcg tccggcgtct ctggaggagc     1440
cgtgcgcccc gcgcgagga cgaggaggag ggcgtggggg gtggcggcgg aggaggcgag     1500
ctgcggggag aagggcgac ggacggccgg gcttatgggg ctggtggcgg cgggtcgggg     1560

```

ES 2 856 936 T3

agggctggct gctgcctggg caaggcagtc cgagggtcca aaggcacca ccatccccat 1620
 cccccaacct cgggtgccgg ggcggccggg ggcgccgagg cggatctgaa ggcgctcacg 1680
 cactcgggtc tcaagaaact caaggagcgg cagctggagc tgctgcttca ggccgtggag 1740
 tcccgcgcg gtacgcgcac cgcgtgcctc ctgctgcccg gccgcctgga ctgcaggctg 1800
 ggccgggggg cgcgccag cgcgcagccc gcgcagccgc cctcgtccta ctgctcccc 1860
 ctctgctgt gcaaagtgt cagggtggccg gatctcaggc attcctcgga agtcaagagg 1920
 ctgtgttgct gtgaatctta cgggaagatc aaccccagc tgggtgtgct caacccccat 1980
 caccttagtc gactctgtga actagagtct cccctcctc cttactccag atacccaatg 2040
 gattttctca aaccaactgc aggtgtcca gatgctgtac cttcctccgc ggaacccggg 2100
 ggaacgaatt atctggccc tggggggctt tcagattccc aacttcttct ggagcctggg 2160
 gatcggtcac actggtgctg ggtggcatac tgggaggaga agactcgcgt ggggaggctc 2220
 tactgtgtcc aagagccctc cctggatata ttctatgac tacctcaggg gaatggcttt 2280
 tgccctggac agctcaattc ggacaacaag agtcagctgg tacagaaagt gcggagcaag 2340
 atcggctgtg gcatccagct gacgcgggaa gtggatggcg tgtgggttta caaccgcagc 2400
 agttaccca tcttcatcaa gtcgccaca ctggacaacc cggactccag gacgctgttg 2460
 gtgcacaaag tgttcctgg tttctccatc aaggcttttg actatgagaa agcctacagc 2520
 ctgcagcggc ccaatgacca cgagttcatg cagcaaccat ggacgggttt caccgtgcag 2580
 atcagctttg tgaagggctg gggccagtgc tacaccgcc agttcatcag cagctgcccg 2640
 tgctggctgg aggtcatctt caacagccgg tagtcggctg tgtggtgaag ggcgaattcc 2700
 ccggggatcc tctagagtgc acctgcagaa gcttgcctcg agcagcgtg ctgcagagat 2760
 ctacgggtgg catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagtggccac 2820
 tccagtgcc accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt 2880
 gtccttctat aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaagggc aagtgggaa 2940
 gacaacctgt agggcctgcg ggtctattg ggaaccaagc tggagtgcag tggcacaatc 3000
 ttggctcact gcaatctccg cctcctgggt tcaagcgatt ctctgcctc agcctcccga 3060
 gttgttggga ttccaggcat gcatgaccag gctcagctaa tttttgttt tttggtagag 3120
 acggggtttc accatattgg ccaggctggt ctccaactcc taatctcagg tgatctacc 3180
 accttgcct cccaaattgc tgggattaca ggcgtgaacc actgctccct tcctgtcct 3240
 tctgattttg taggtaacca cgtcgggacc gacggccgc aggaaccct agtgatggag 3300
 ttggcactc cctctctgcg cgtcgtcgc ctactgagg cggggcgacc aaaggtcgcc 3360
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag ctgcctgcag 3420

ES 2 856 936 T3

gggcgctga tgcggtatth tctccttacg catctgtgog gtatttcaca cgcatacgt 3480
 caaagcaacc atagtacgog ccctgtagog gogcattaag cgcggcgggt gtggtggtta 3540
 cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcog ccctagcogcc cgtcctttc gctttcttcc 3600
 cttcctttct cggcacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt 3660
 tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tgcaccccaa aaaactgat ttgggtgatg 3720
 gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cgttttttcg ccctttgacg ttggagtcca 3780
 cgttctttta tagtggaetc ttgttcaaaa ctggaacaac actcaacct atctcgggct 3840
 attcctttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 3900
 tttacaacaaa atttaacgog aattttaaca aaatattaac gtttacaatt ttatggtgca 3960
 ctctcagtac aatctgctct gatgccgat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac 4020
 ccgctgacgc gccctgacog gcttgtctgc tcccggcatc cgtttacaga caagctgtga 4080
 ccgtctccog gagctgatg tgtcagaggt tttcacctc atcacgaaa cgcgcgagac 4140
 gaaaggcct cgtgatcgc ctatthttat aggttaatgt catgataata atggtttctt 4200
 agacgtcag tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatthttct 4260
 aaatacattc aaatatgat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 4320
 attgaaaaag gaagagtat agtattcaac atthccgtgt cggccttatt ccctthtttg 4380
 cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 4440
 aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tgcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 4500
 ttgagagttt tgcccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactthttaa gttctgctat 4560
 gtggcgcgggt attatccctg attgacccog ggcaagagca actcgtcgc cgcatacact 4620
 attctcagaa tgacttggtt gactactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 4680
 tgacagtaag agaattatgc agtgcctcca taacctagag tgataaacct gggccaact 4740
 tacttctgac aacgatcggg ggaccgaagg agctaaccgc thttttgac aacatggggg 4800
 atcatgtaac tgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 4860
 agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaacta ttaactggcg 4920
 aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 4980
 caggaccact tctgcgctcg gcccttccog ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 5040
 ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 5100
 gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 5160
 togctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa gtttactcat 5220
 atatacttta gattgattta aaacttcatt ttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 5280
 thtttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 5340

ES 2 856 936 T3

accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct	5400
gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccgat caagagctac	5460
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc	5520
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg	5580
ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt	5640
tggactcaag acgatagtta ccgataaagg cgcagcggtc ggctgaacg gggggttcgt	5700
gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc	5760
tatgagaaag cgccacgctt cccgaagggg gaaaggcggg caggtatccg gtaagcggca	5820
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata	5880
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg	5940
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttget	6000
ggccttttgc tcacatgt	6018

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un gen o un ADNc de Smad7 en una construcción de virus adenoasistido recombinante (VAAr), en donde la construcción de VAAr es una construcción de serotipo 6 (VAAr6), serotipo 8 (VAAr8) o serotipo 9 (VAAr9), y la construcción de VAAr proporciona la expresión del gen o del ADNc de Smad7 en miocitos.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la construcción de VAAr es una construcción de VAAr6.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, en donde el gen o el ADNc de Smad7 es de origen humano, de ratón, equino, bovino, ovino, canino o porcino.
4. La composición de la reivindicación 3, en donde el gen o el ADNc de Smad7 es de origen humano.
- 15 5. La composición de la reivindicación 1, en donde la construcción de VAAr comprende un promotor o un potenciador específicos de tejido que dirige la expresión del gen o del ADNc de Smad7 en miocitos.
6. La composición de la reivindicación 5, en donde la construcción de VAAr proporciona la expresión del gen o del ADNc de Smad7 en cardiomiocitos, células de músculo esquelético o en ambos.
- 20 7. La composición de la reivindicación 1, en donde la construcción del VAAr comprende un silenciador específico de tejido que limita la expresión del gen o del ADNc de Smad7 a miocitos o a células cardíacas.
8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en un método de tratamiento de la atrofia muscular en un sujeto al que se le ha diagnosticado caquexia por cáncer, comprendiendo el método seleccionar un sujeto con caquexia por cáncer y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 25 9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en un método terapéutico para la inhibición o la prevención de la atrofia muscular en un sujeto, o para el tratamiento de la atrofia muscular para aumentar la fuerza muscular y/o el volumen muscular, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 30 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde la atrofia muscular está provocada por un trastorno crónico, opcionalmente en donde el trastorno crónico comprende cáncer, envejecimiento (sarcopenia), distrofia muscular, miopatías, nefropatía, trastorno pulmonar obstructivo crónico, infección crónica, SIDA, atrofia por desuso, lesión neuromuscular, neuropatías, obesidad, enfermedad cardiovascular o una combinación de dos o más de los mismos.
- 35 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde la atrofia muscular está provocada por estrés por microgravedad.
- 40 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde la atrofia muscular comprende atrofia del músculo cardíaco, del músculo esquelético o de ambos.
- 45 13. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en donde el método comprende suministrar la composición mediante inyecciones intramusculares o intravenosas.
14. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en donde, en el método, la administración del VAAr comprende la administración de una única dosis de VAAr o de múltiples dosis de VAAr.

FIG. 1A

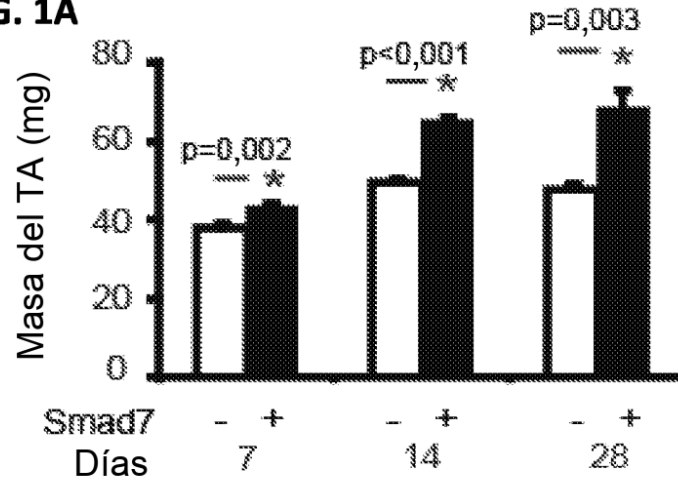


FIG. 1B

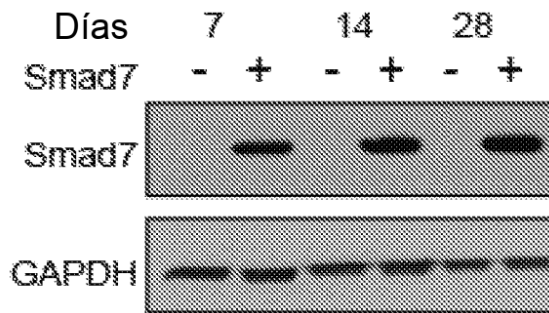


FIG. 1C

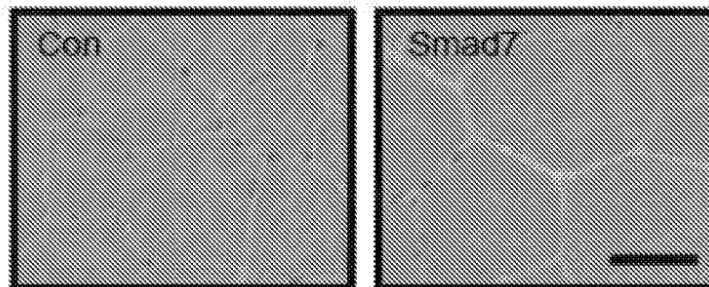


FIG. 1D

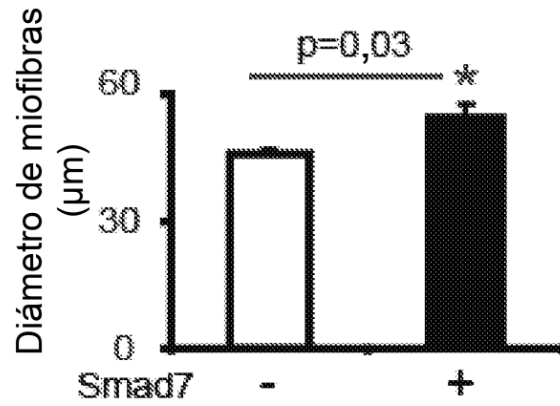


FIG. 1E

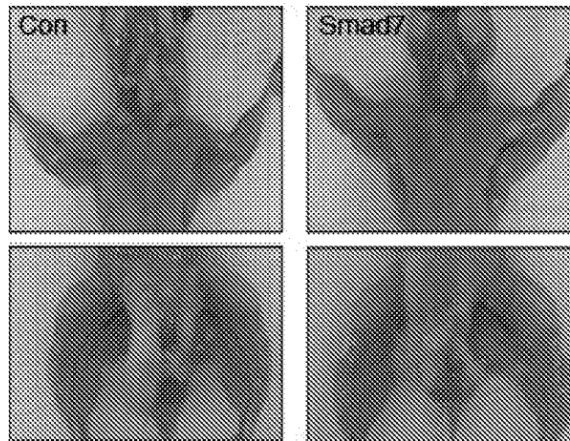


FIG. 1F

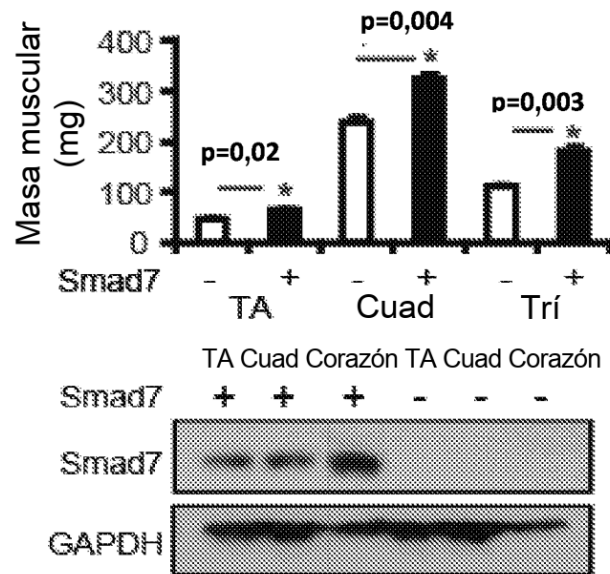


FIG. 1G

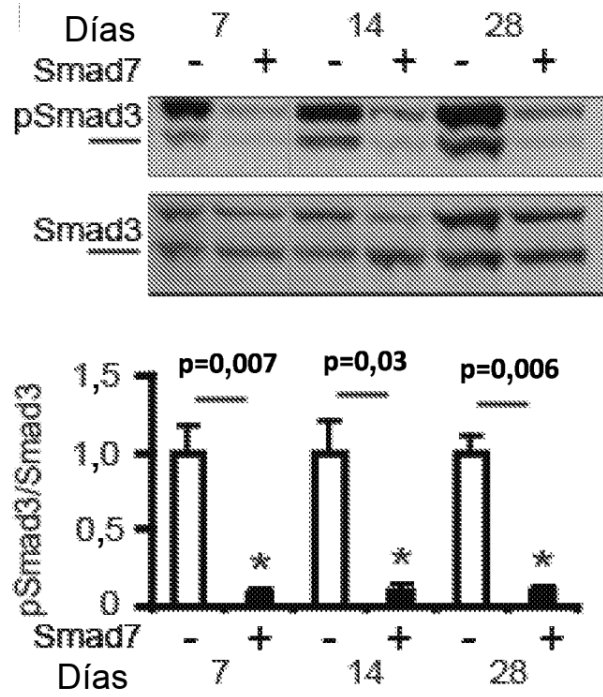


FIG. 1H

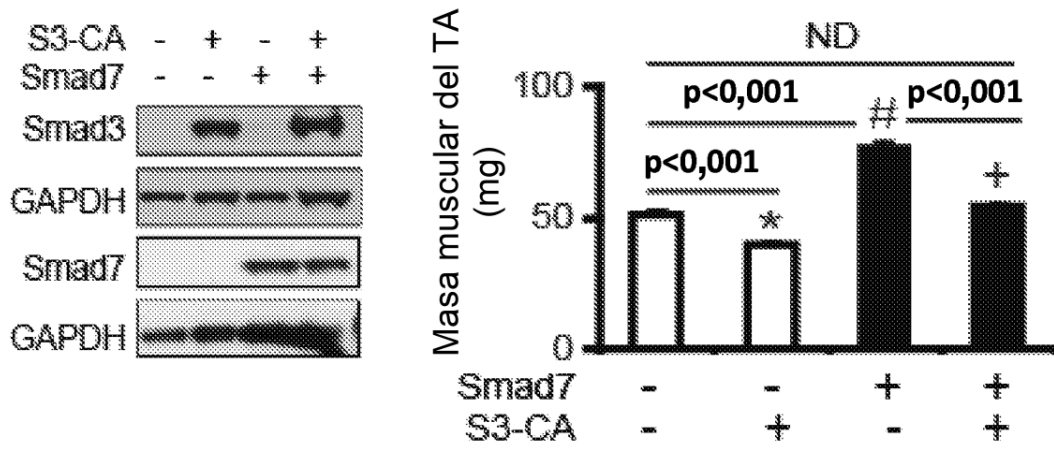
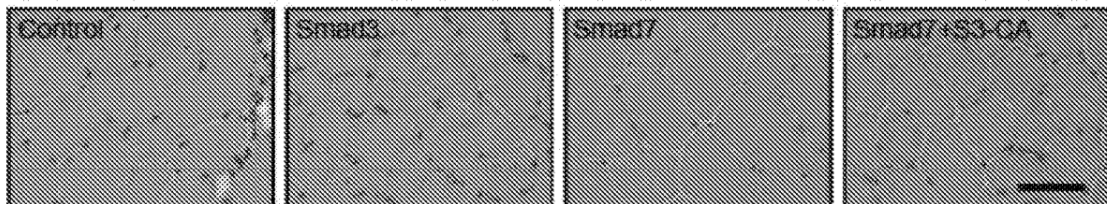


FIG. 1I



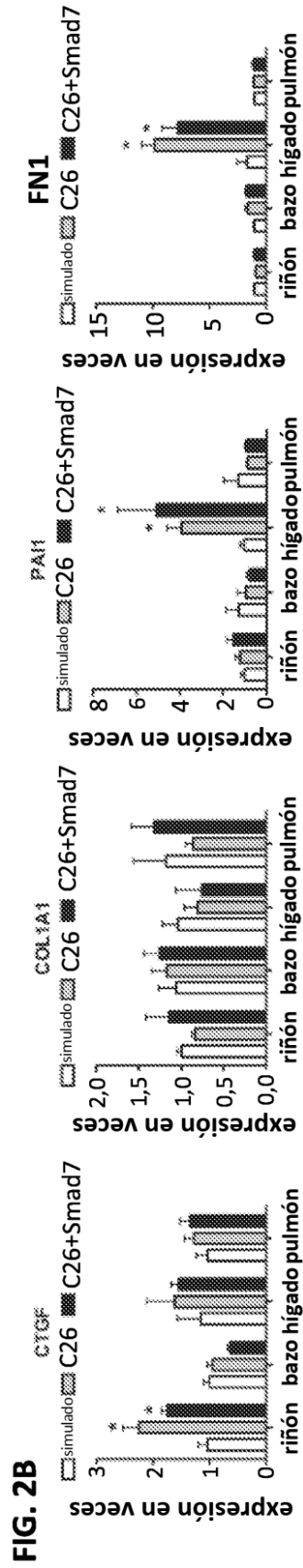
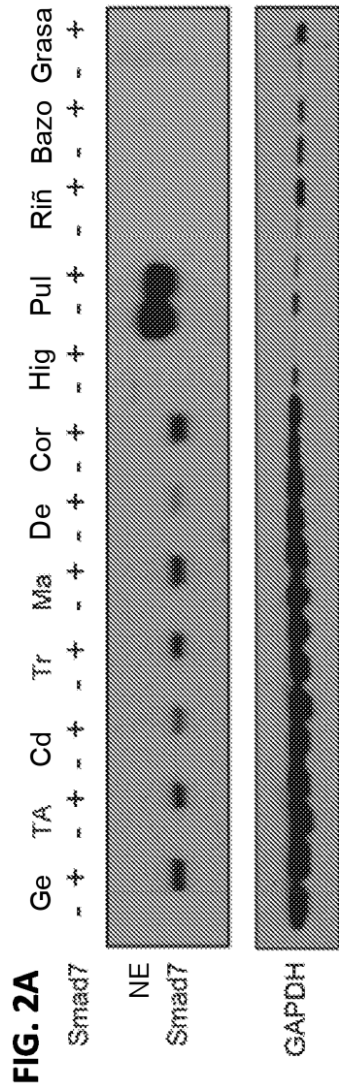


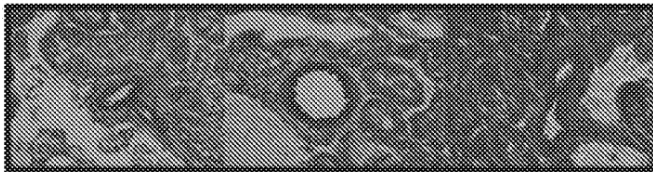
FIG. 2C pulmón



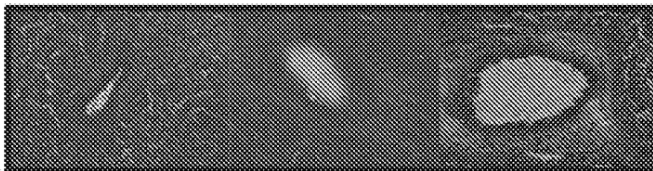
corazón



riñón



bazo



músculo TA



FIG. 2D

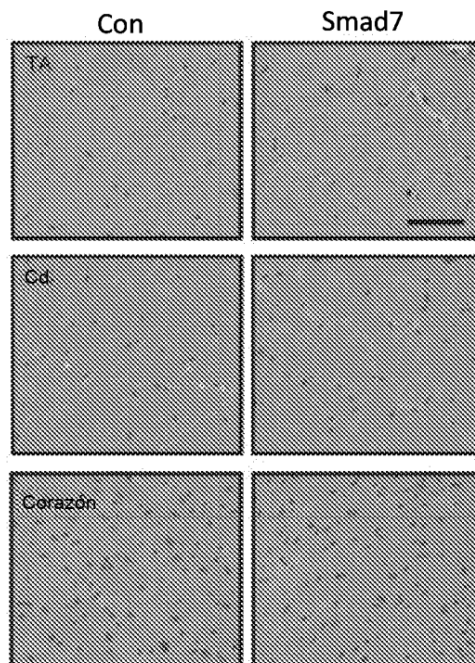


FIG. 3A

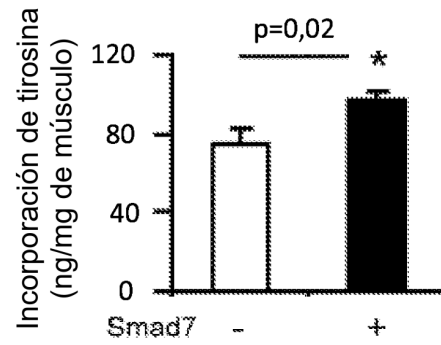


FIG. 3B

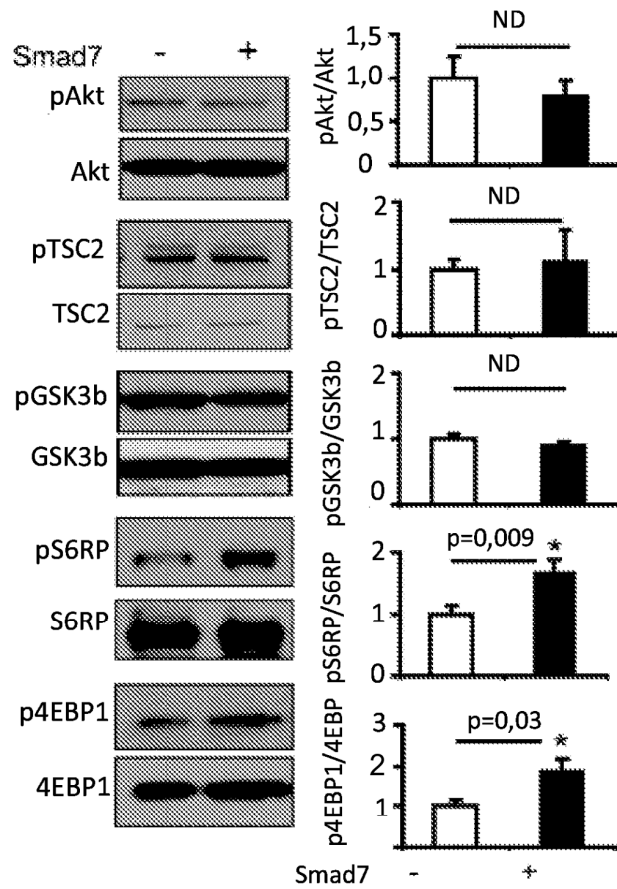


FIG. 3C

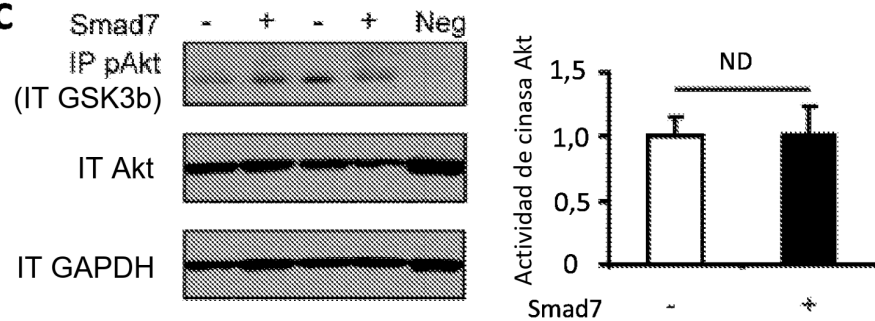


FIG. 3D

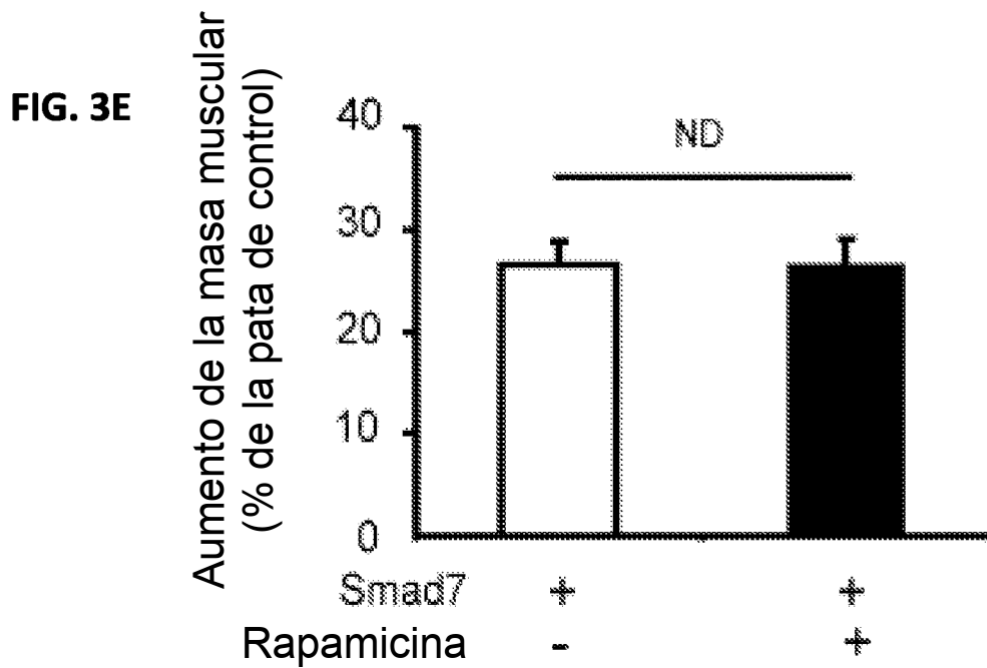
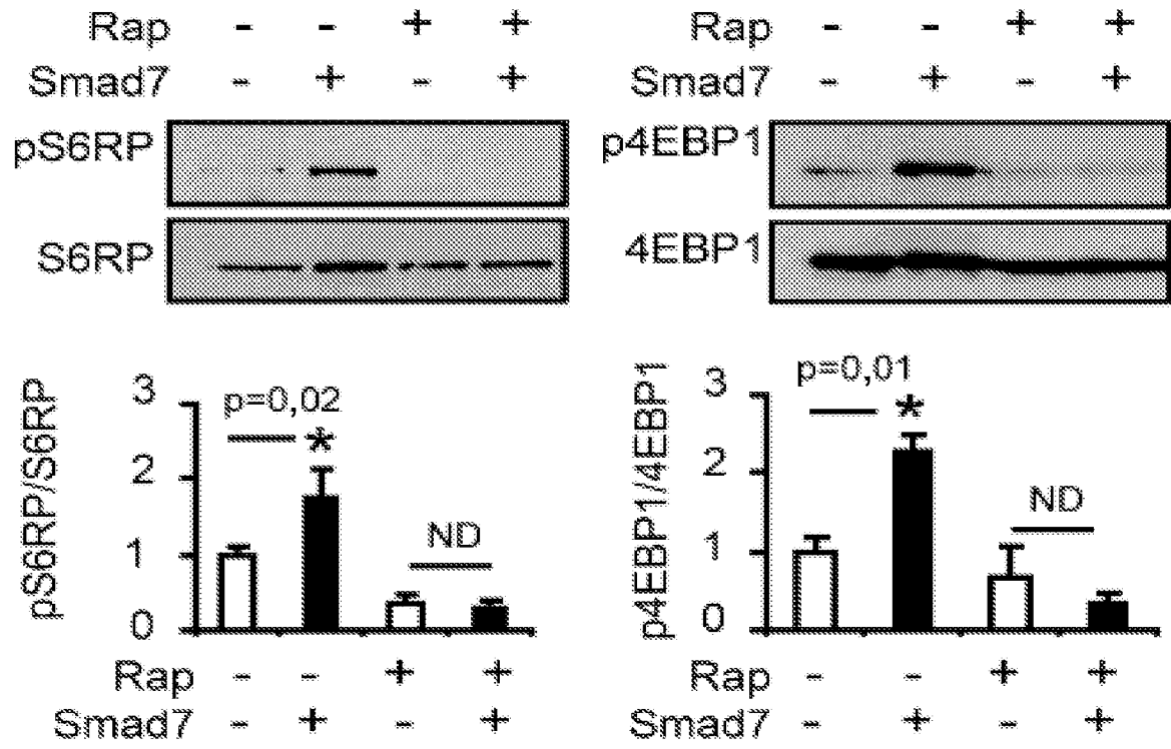


FIG. 3F

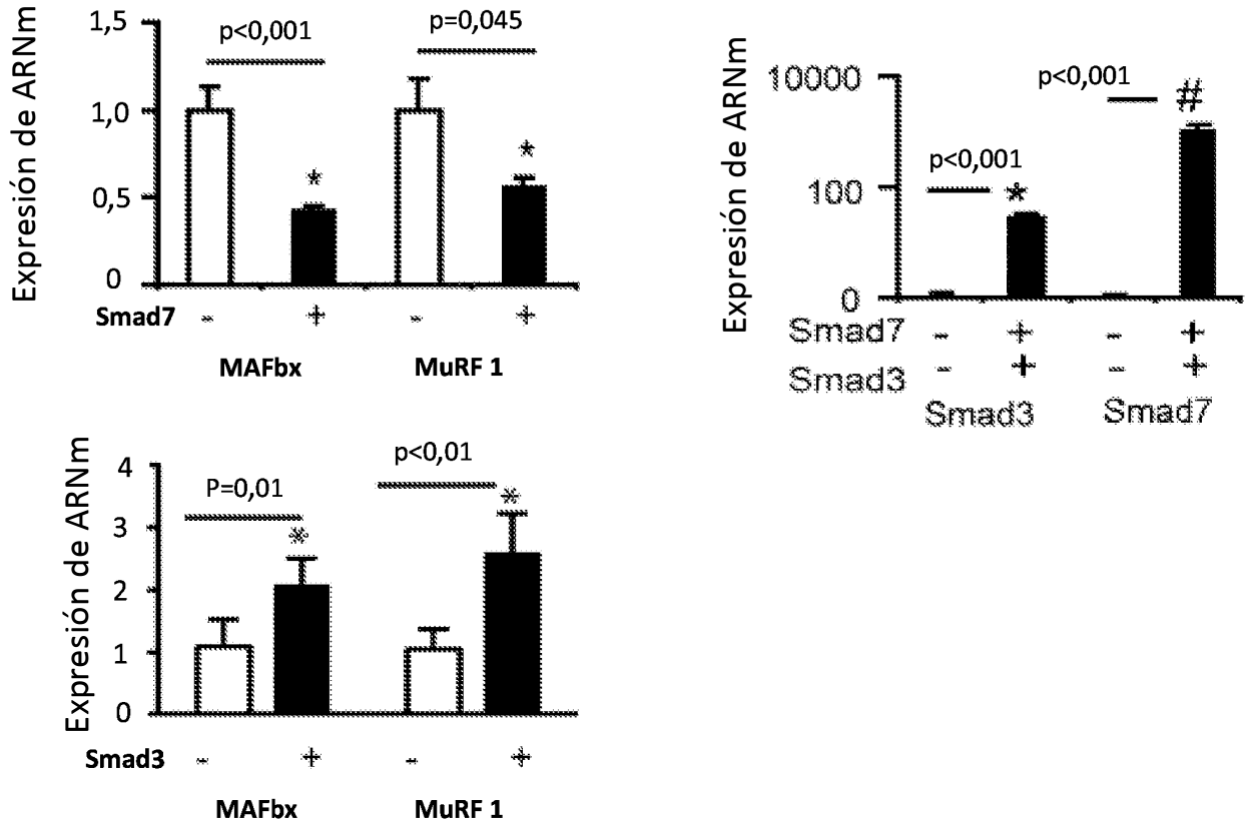


FIG. 3G

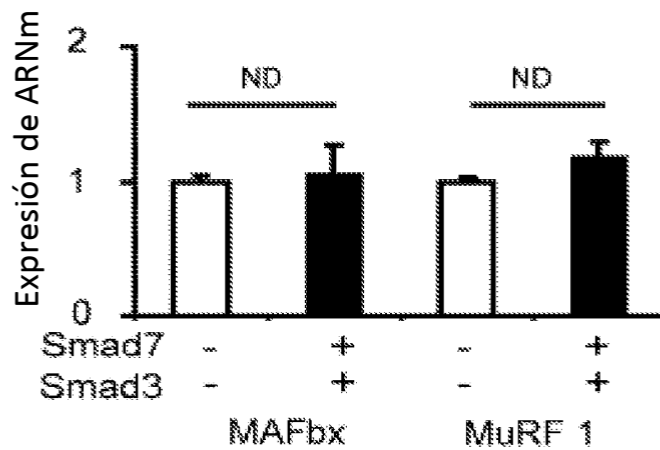


FIG. 4A

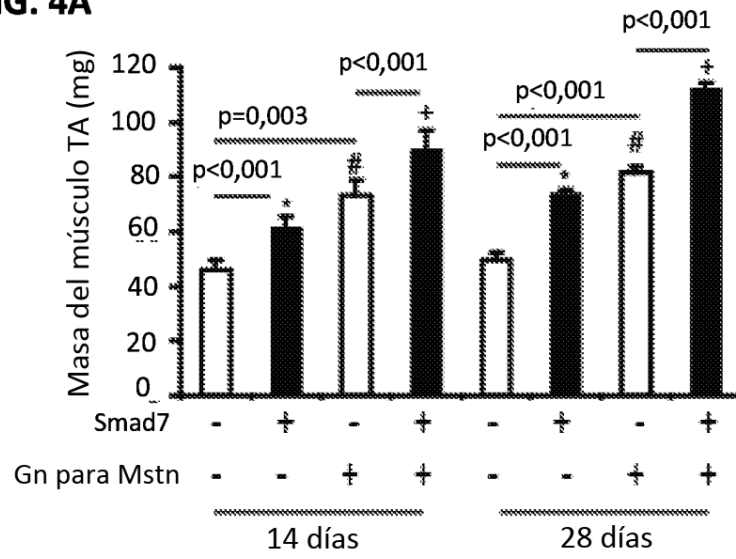


FIG. 4B

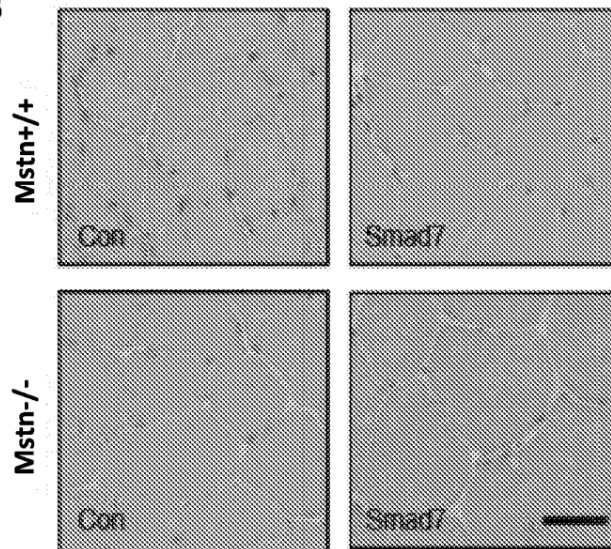


FIG. 4C

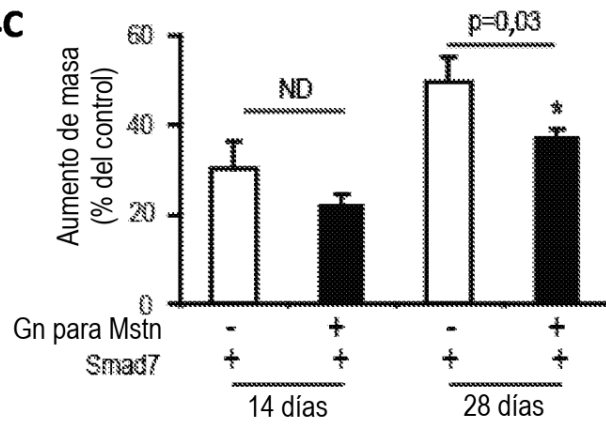


FIG. 4D

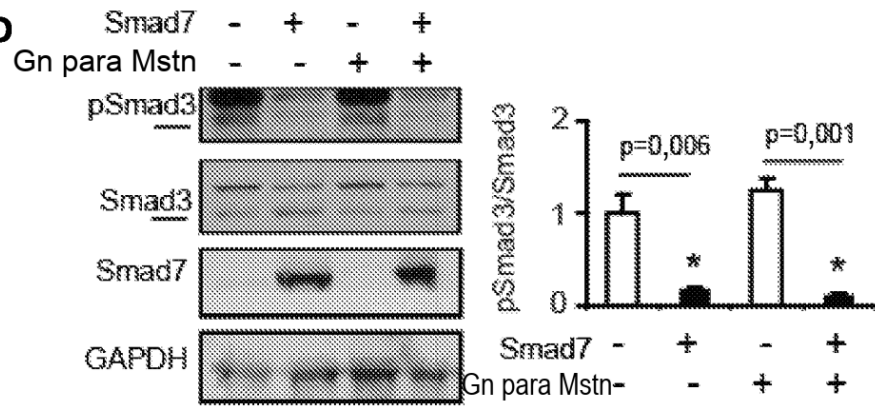


FIG. 4E

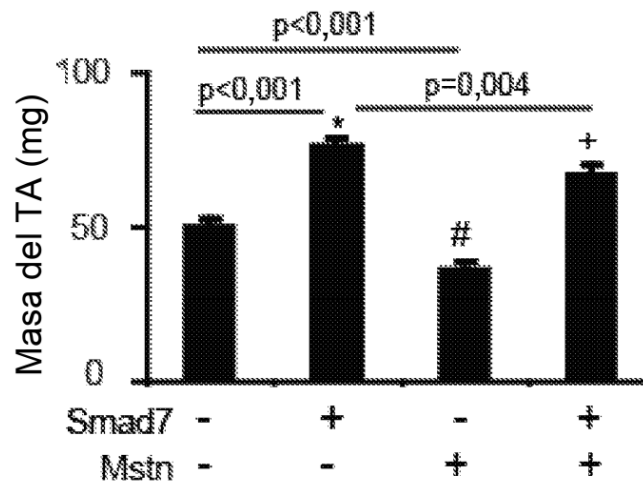


FIG. 4F

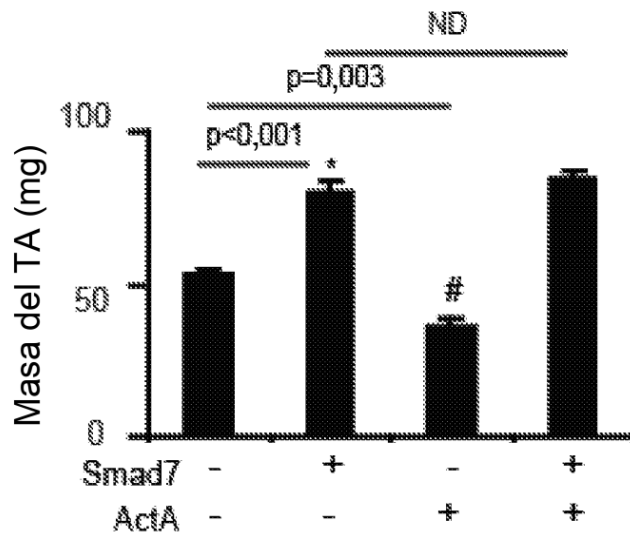


FIG. 4G

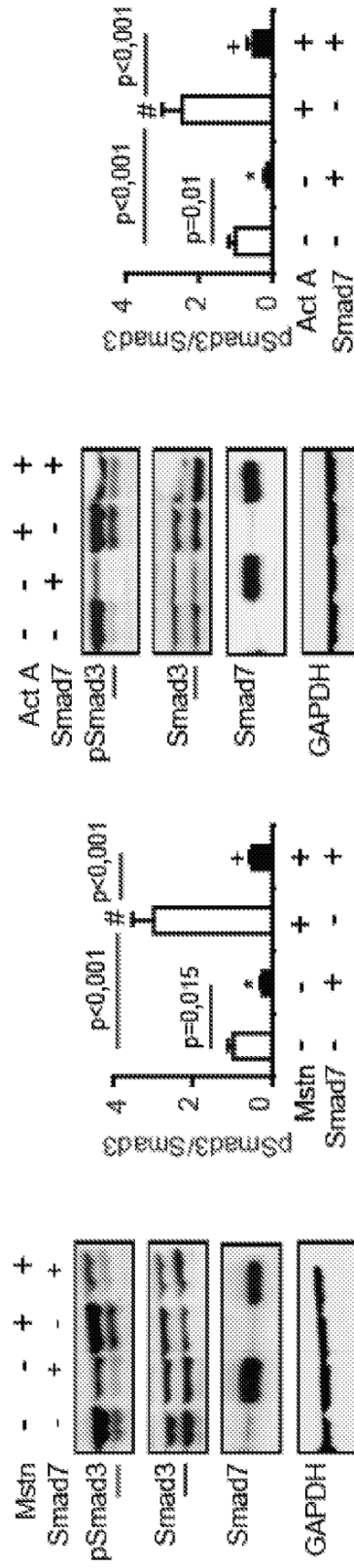


FIG. 5A

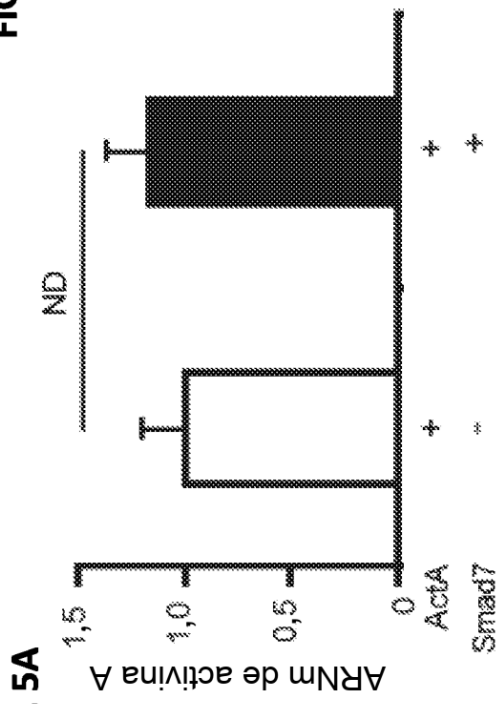


FIG. 5B

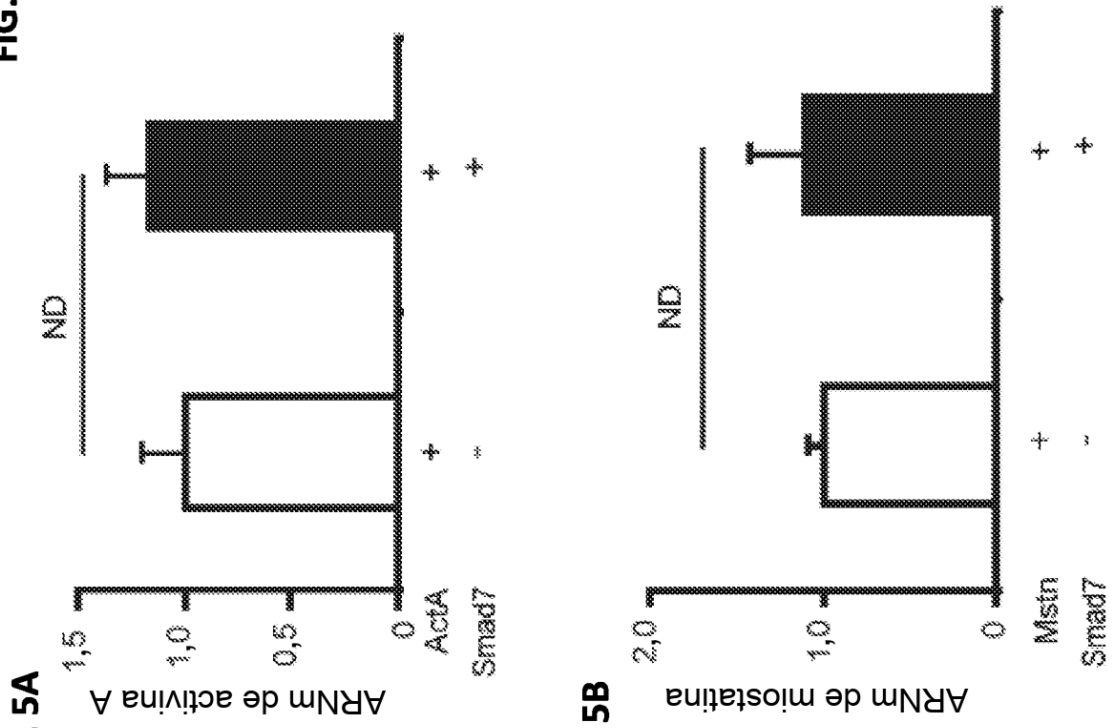


FIG. 5C

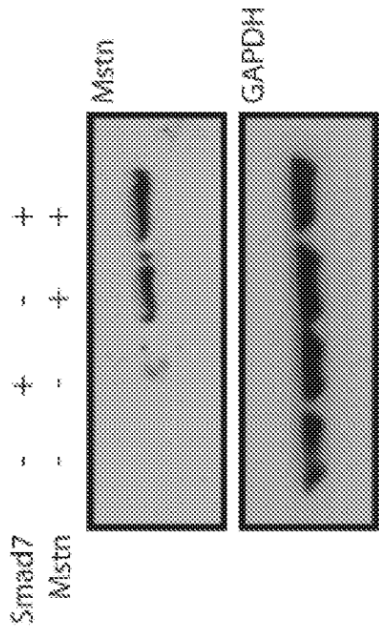


FIG. 6A

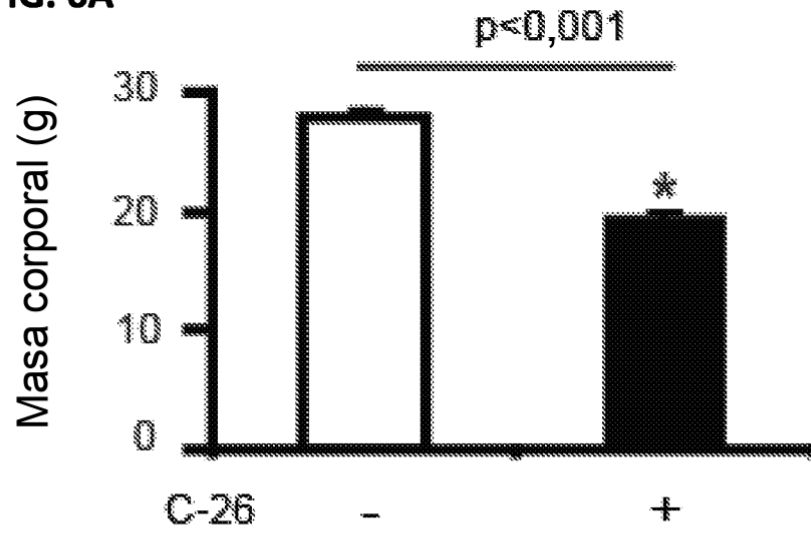


FIG. 6B

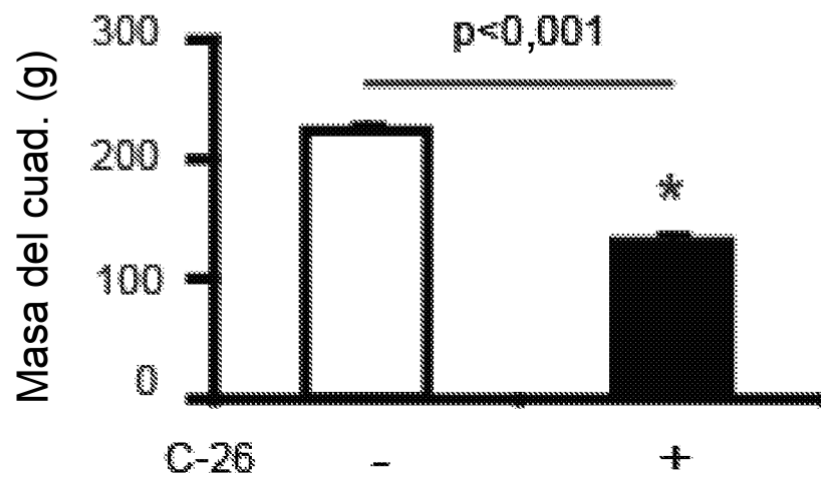


FIG. 6C

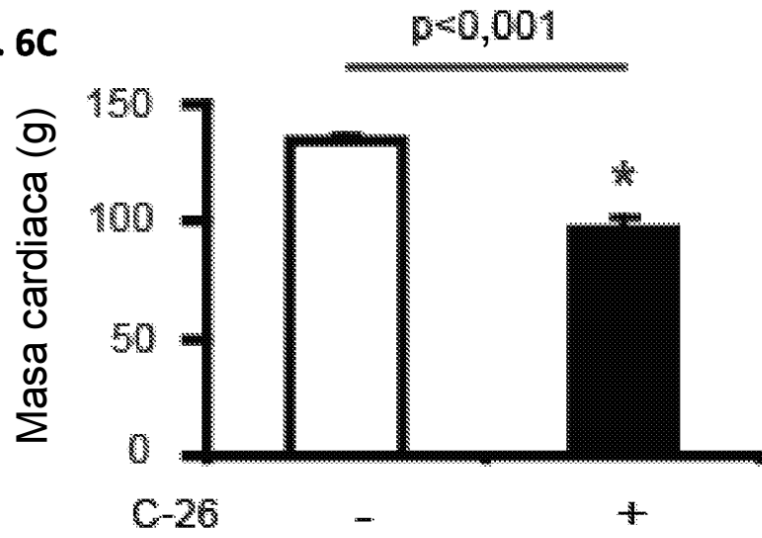


FIG. 6D

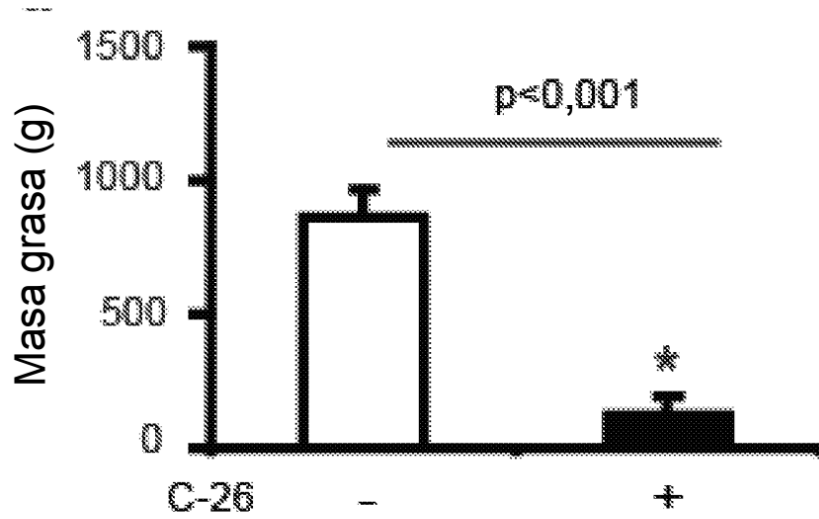


FIG. 6E

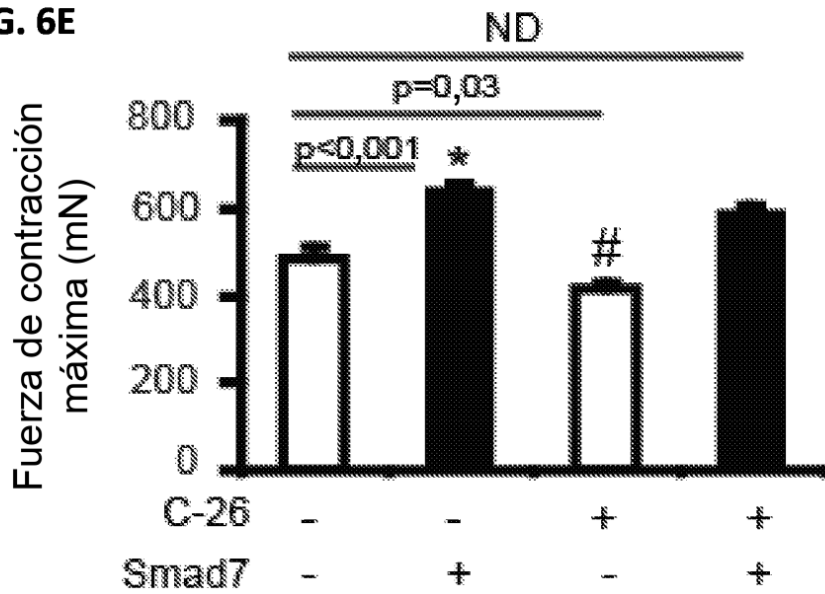


FIG. 6F

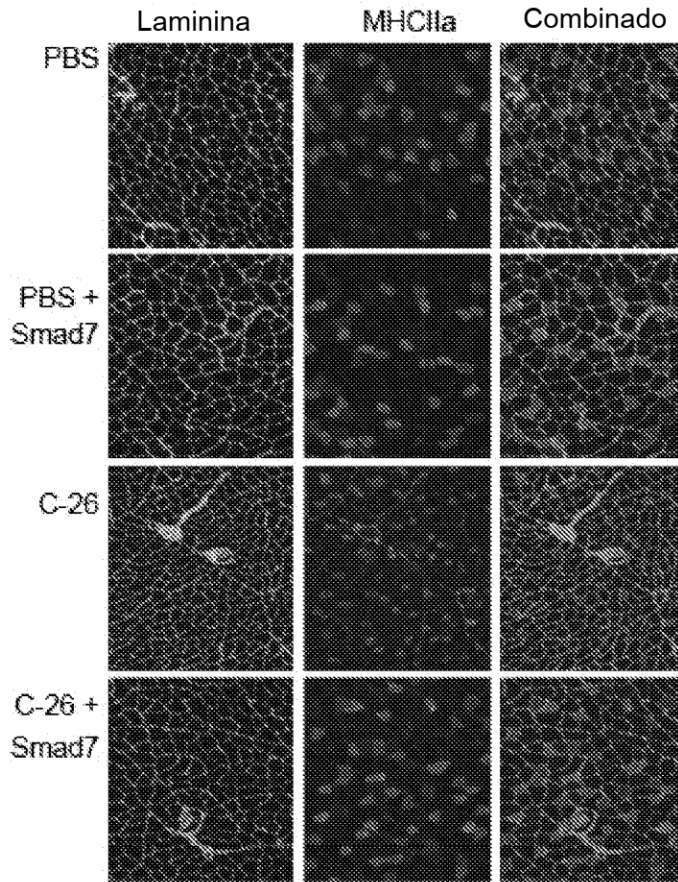


FIG. 6G

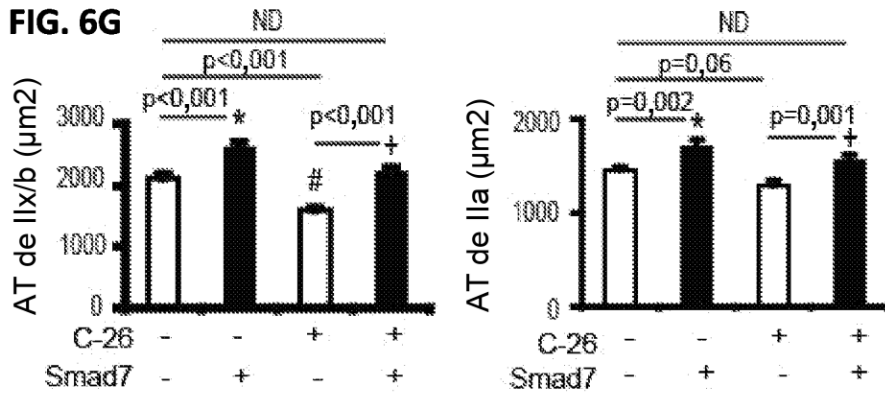


FIG. 6H

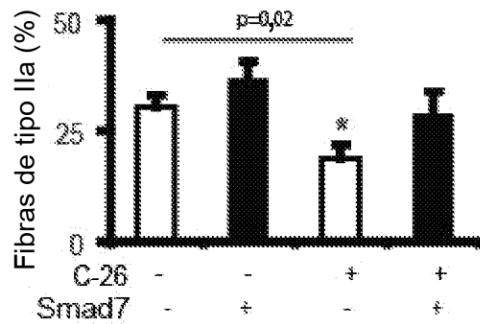


FIG. 6I

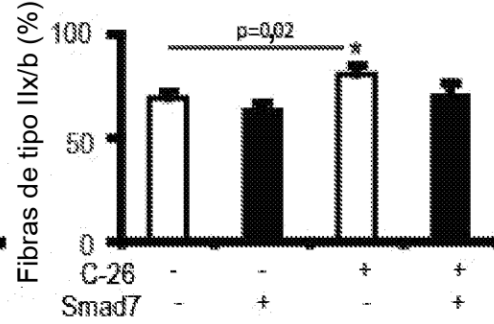


FIG. 7A

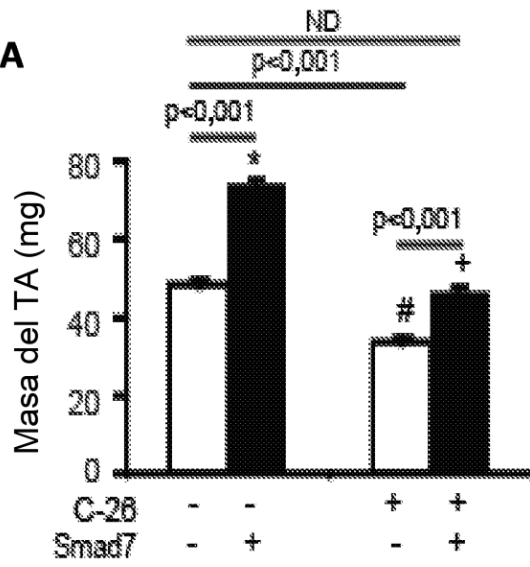


FIG. 7B

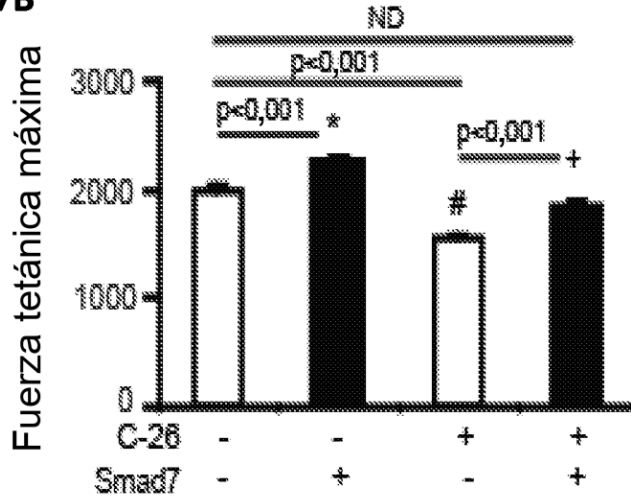


FIG. 7C

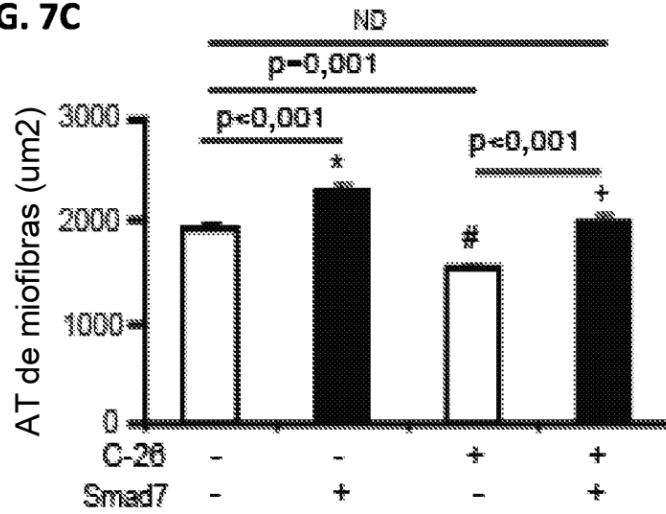


FIG. 7D

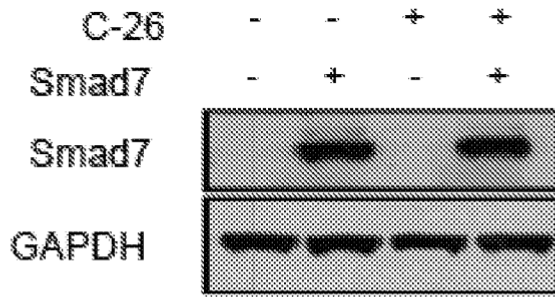


FIG. 7E

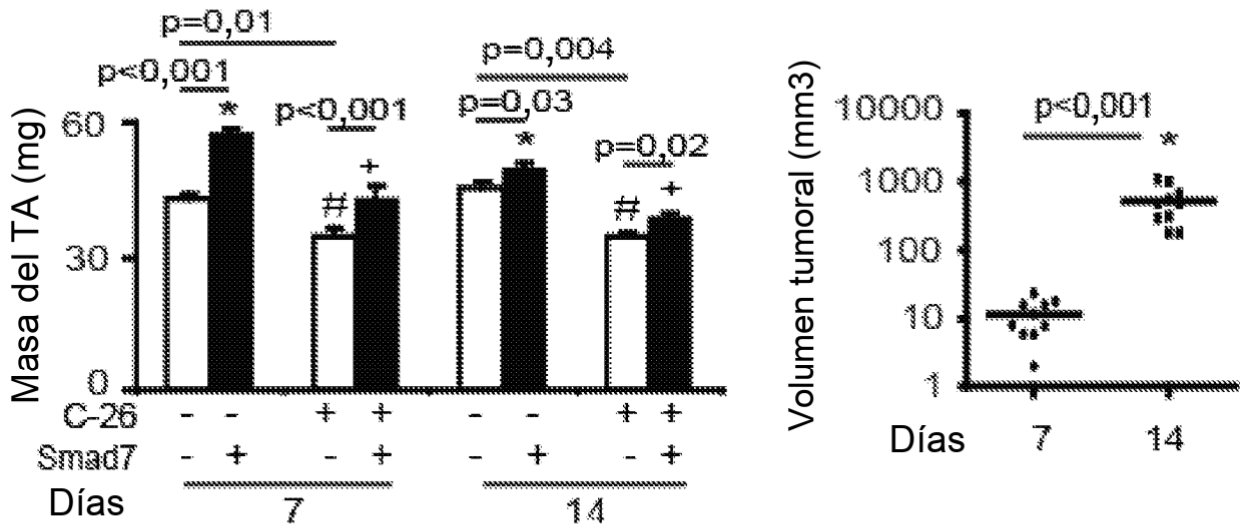


FIG. 7F

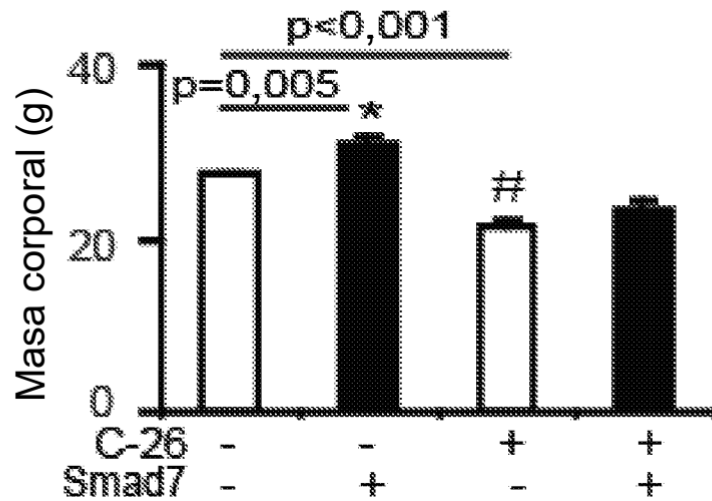


FIG. 7G

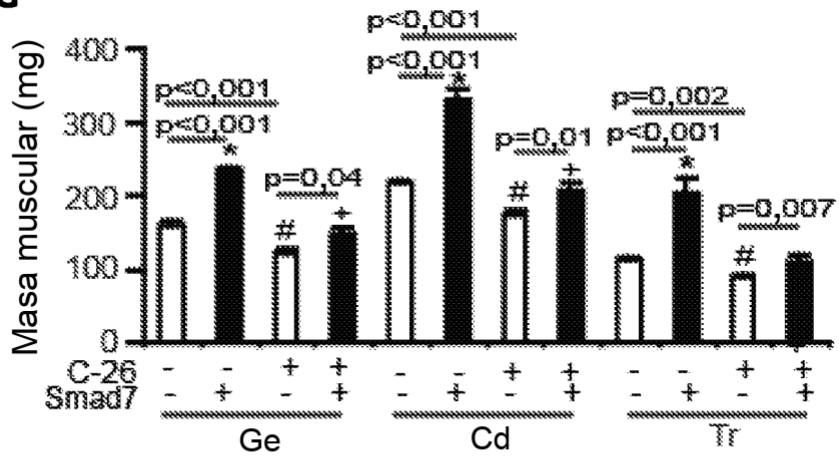


FIG. 7H

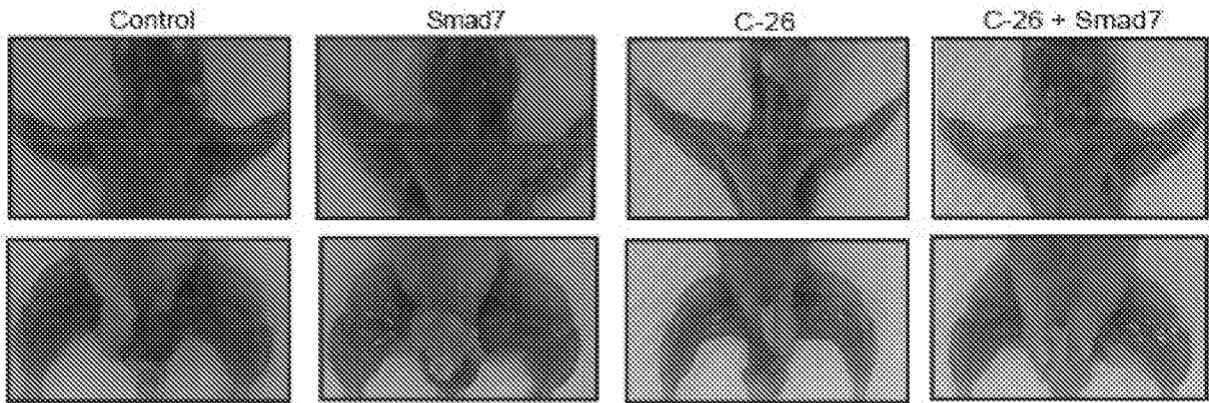
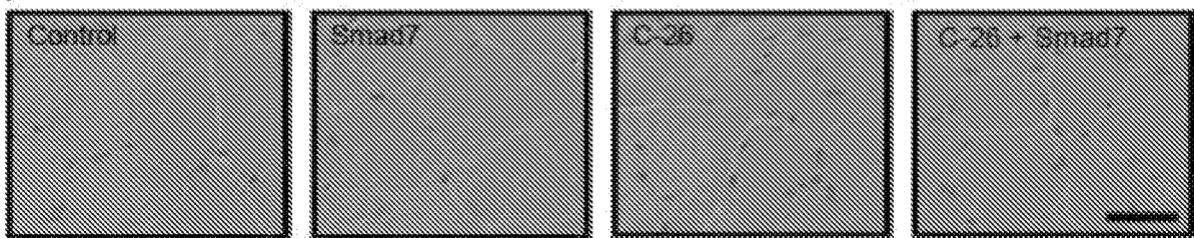


FIG. 7I



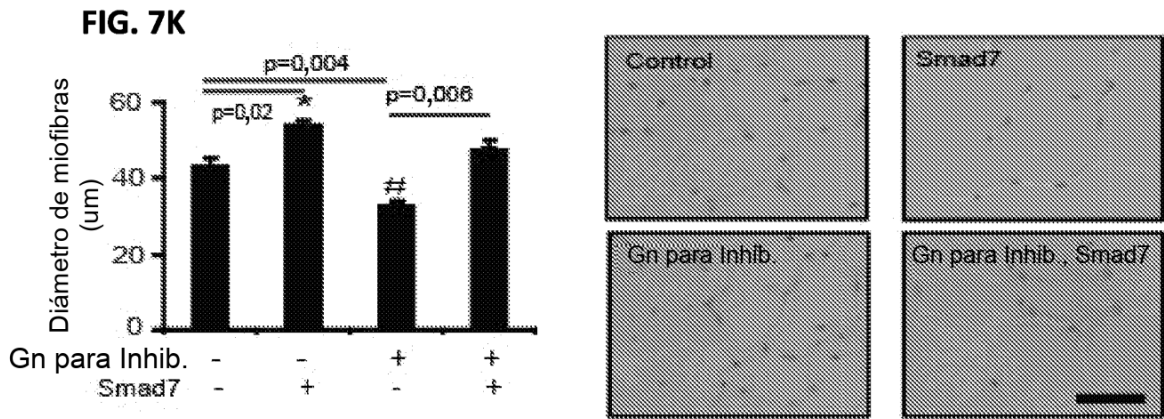
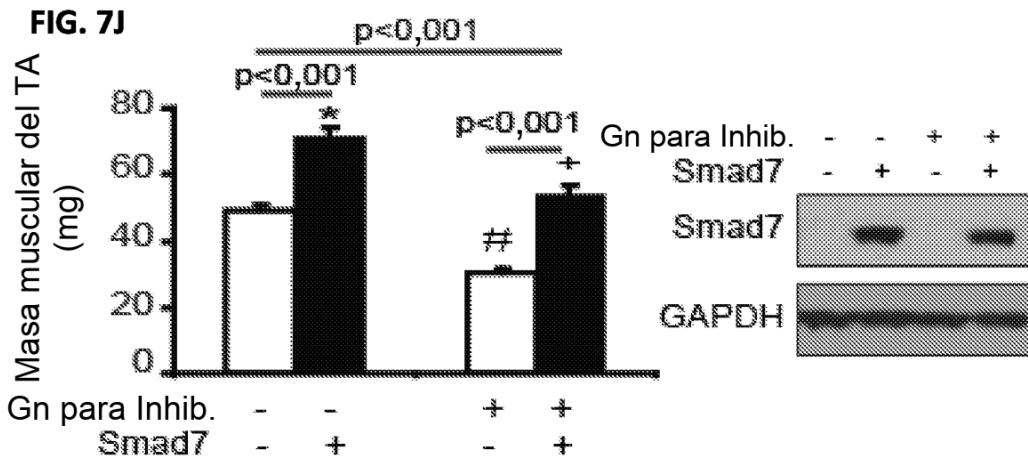


FIG. 8B

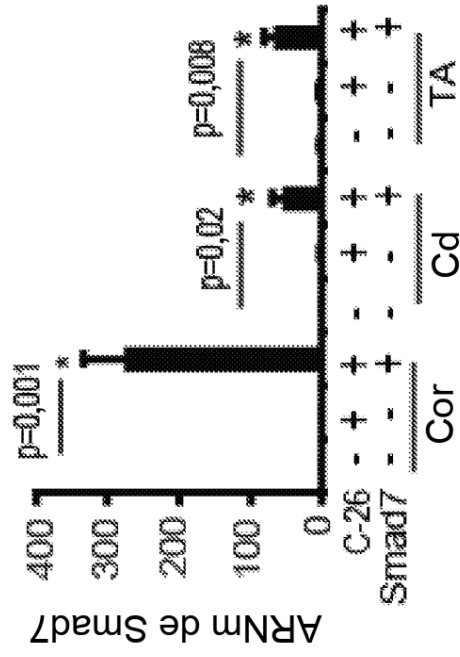


FIG. 8A

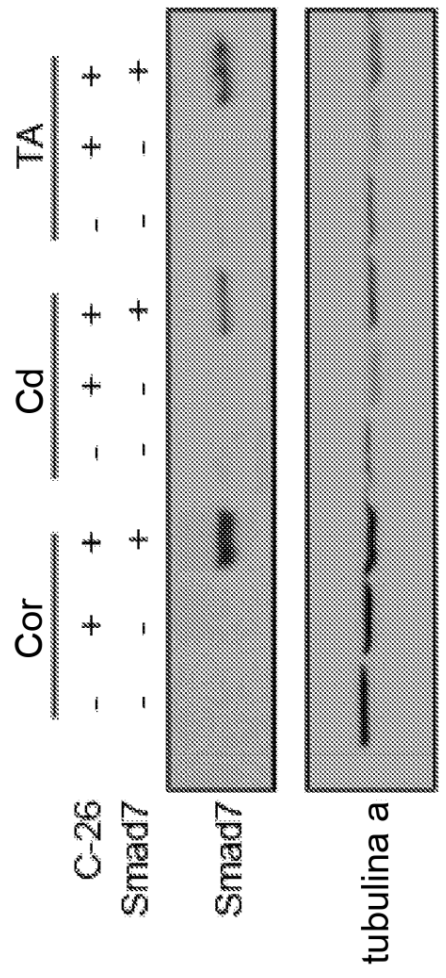


FIG. 8C

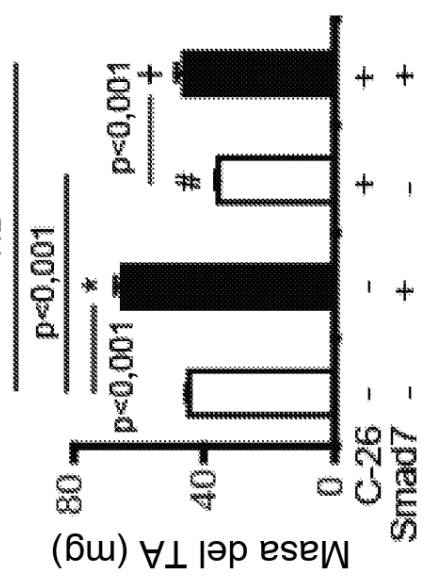


FIG. 8D

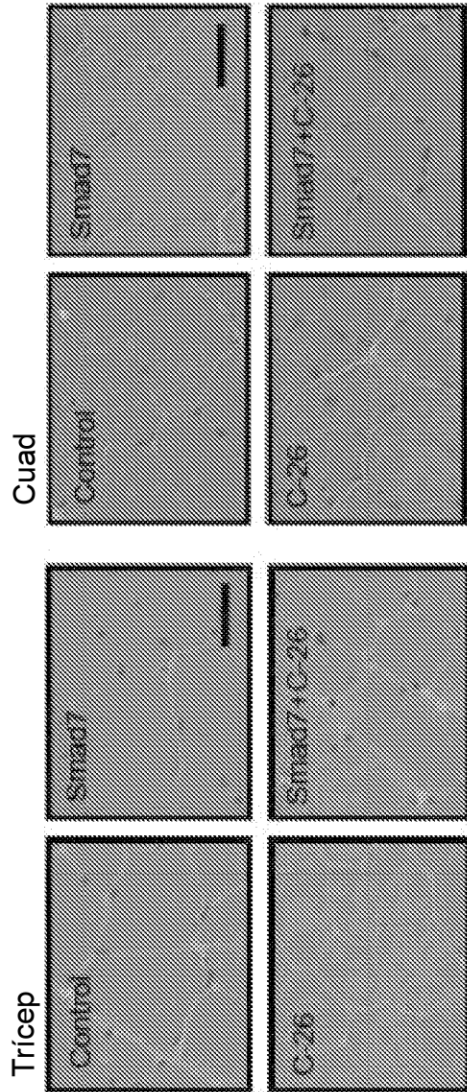


FIG. 8E

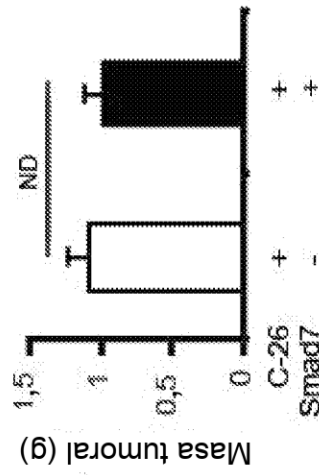


FIG. 8G

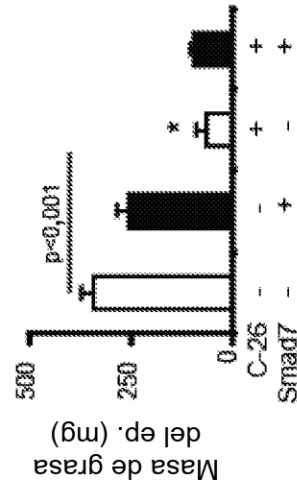


FIG. 8D

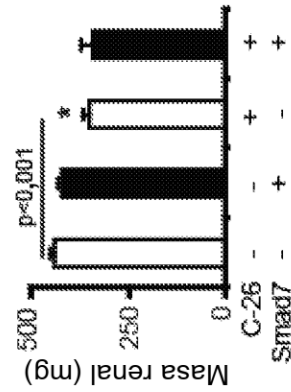
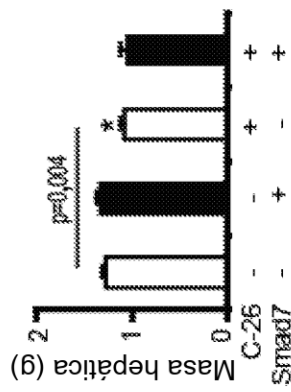
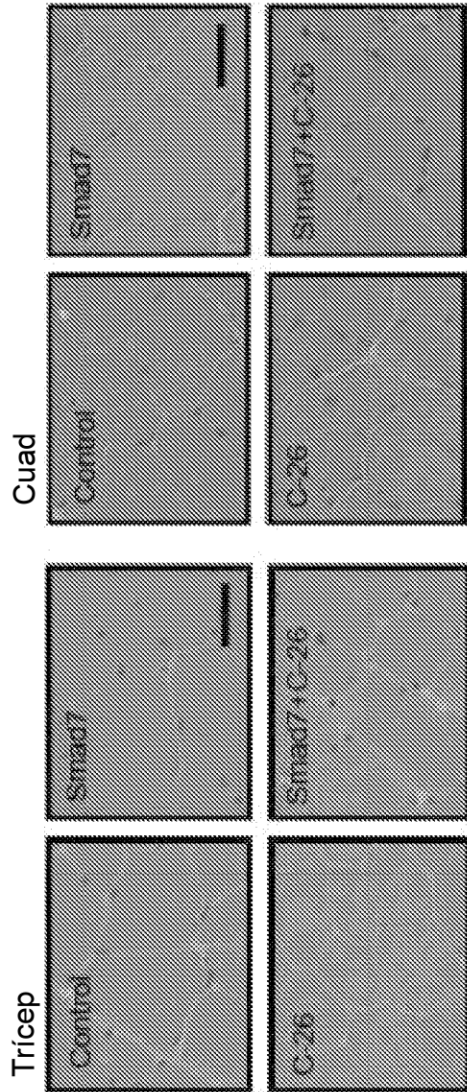


FIG. 8F

FIG. 8H

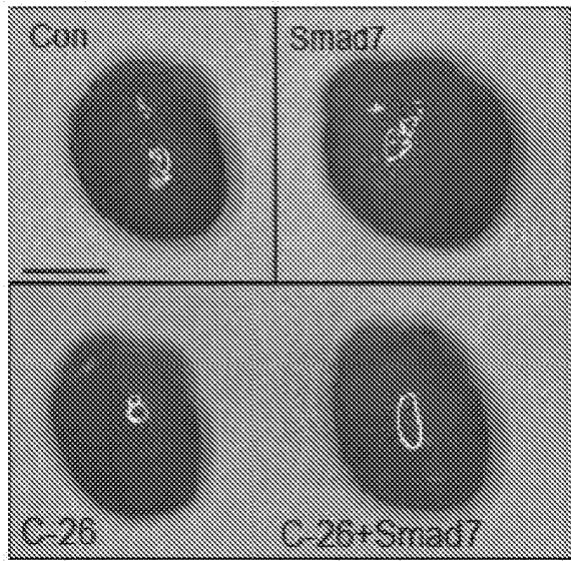


FIG. 8I

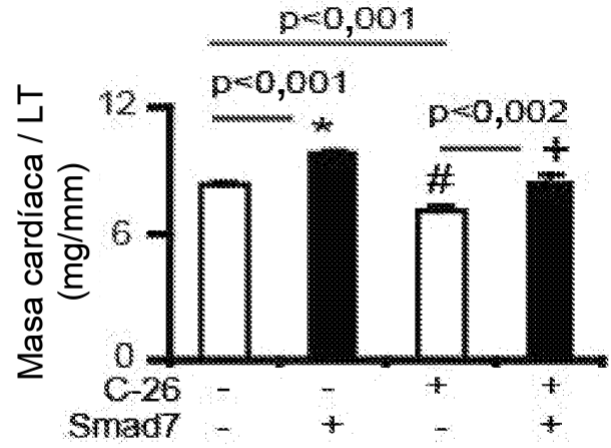


FIG. 8J

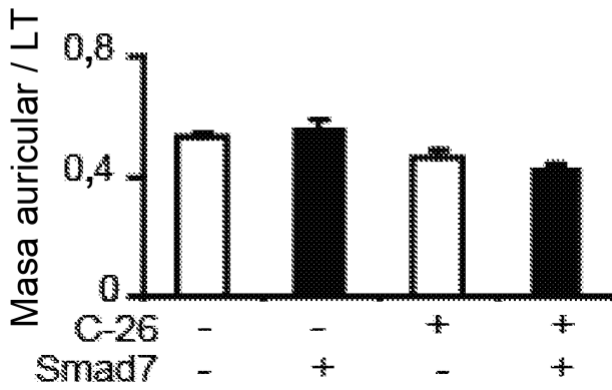


FIG. 8K

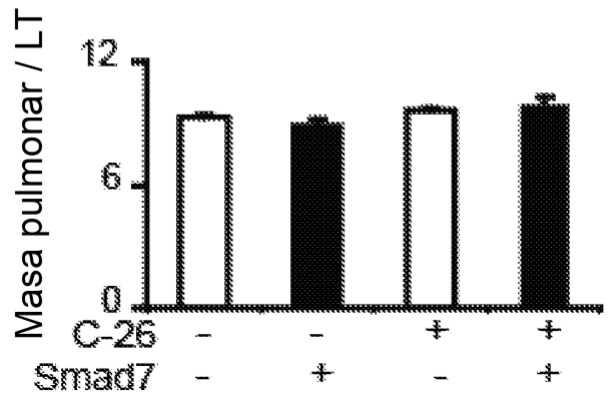


FIG. 10A

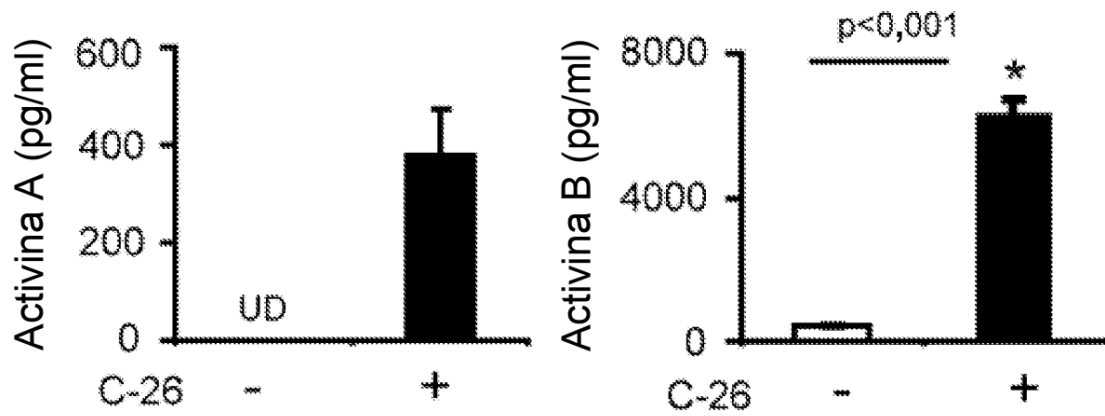


FIG. 10B

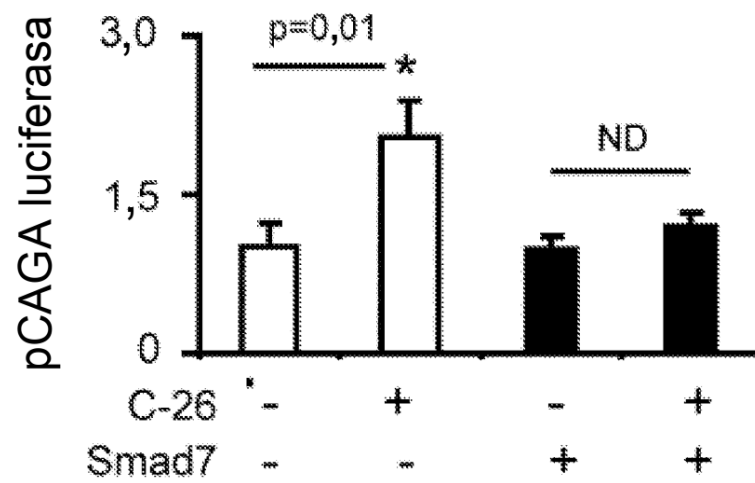


FIG. 10C

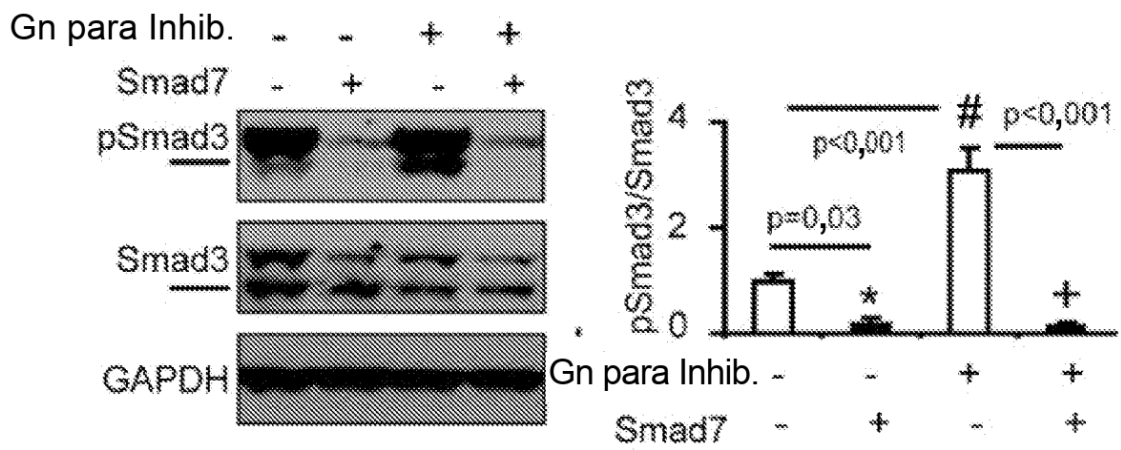
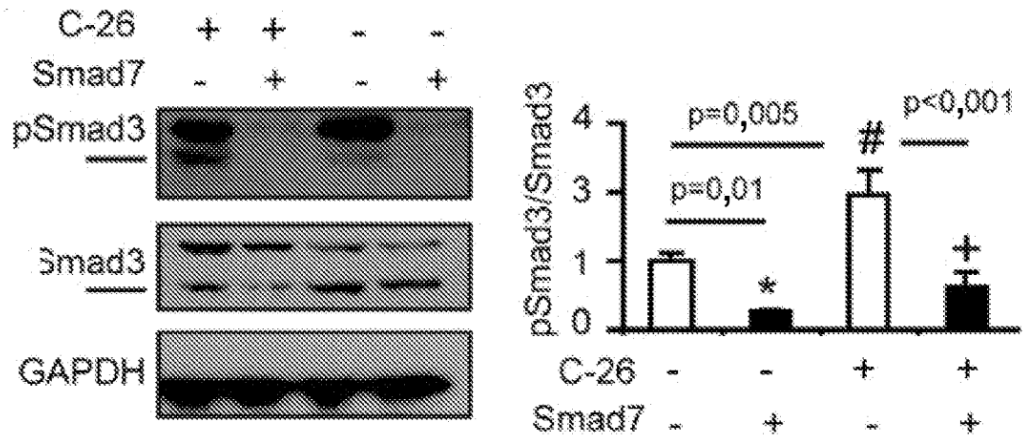


FIG. 10D

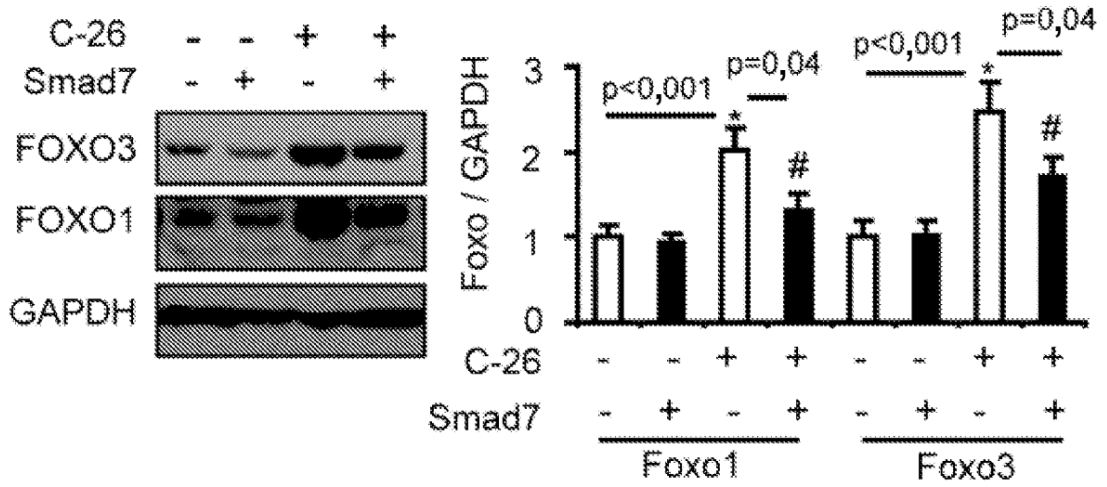


FIG. 10E

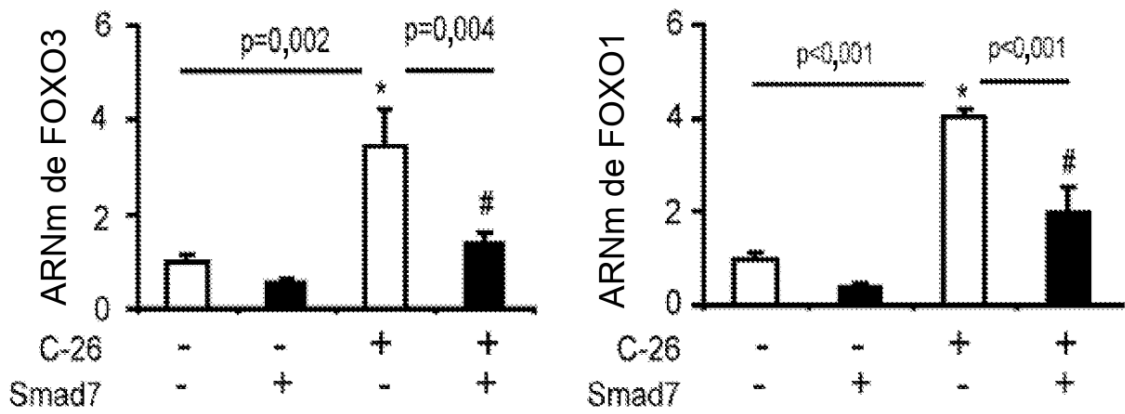


FIG. 10F

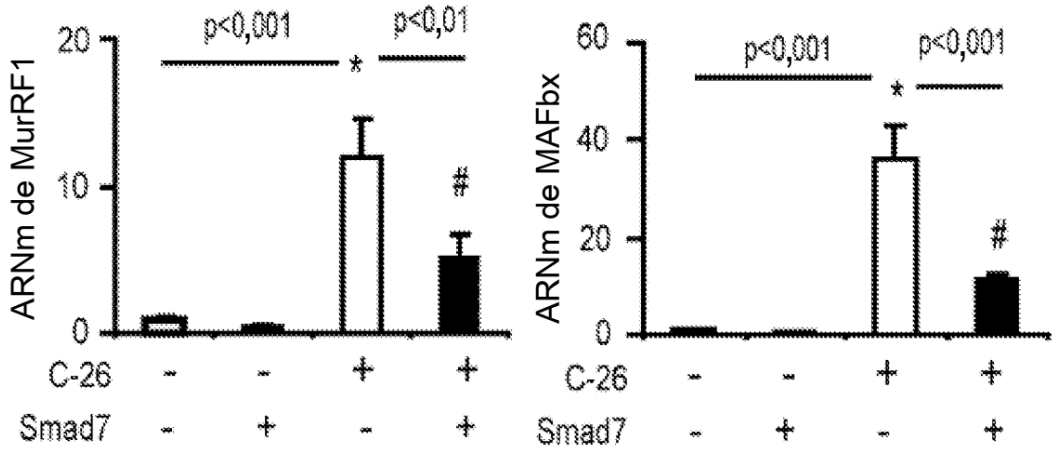


FIG. 11B

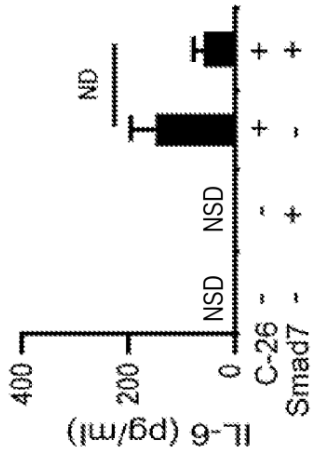


FIG. 11C

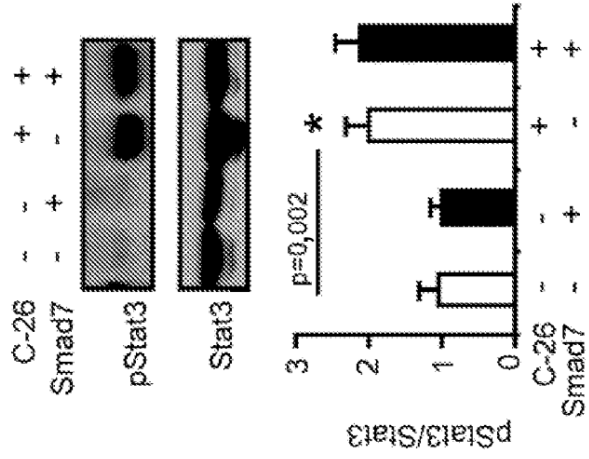


FIG. 11A

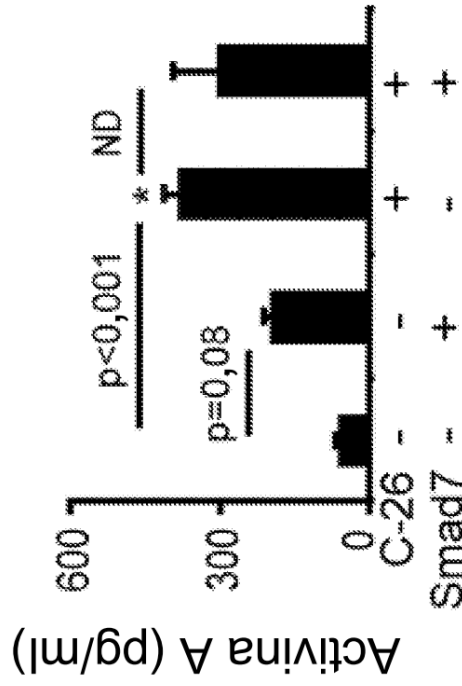


FIG. 11D

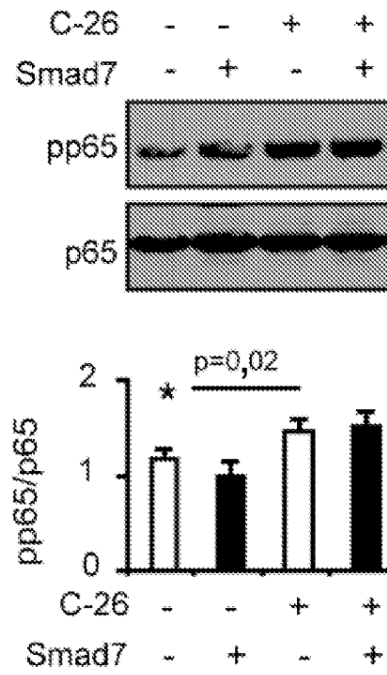


FIG. 11E

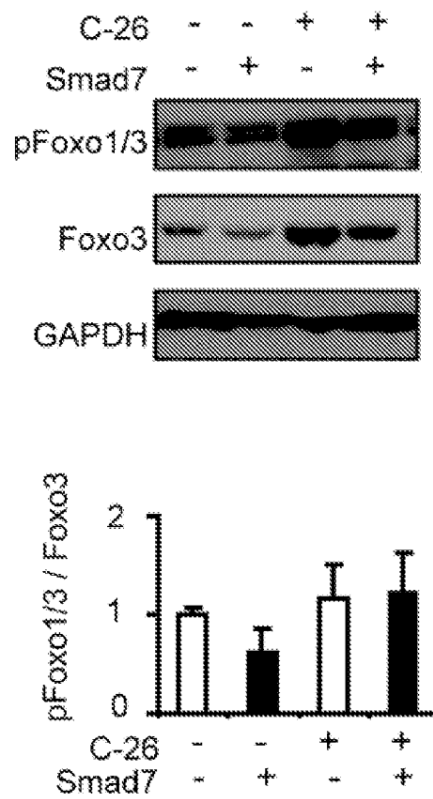
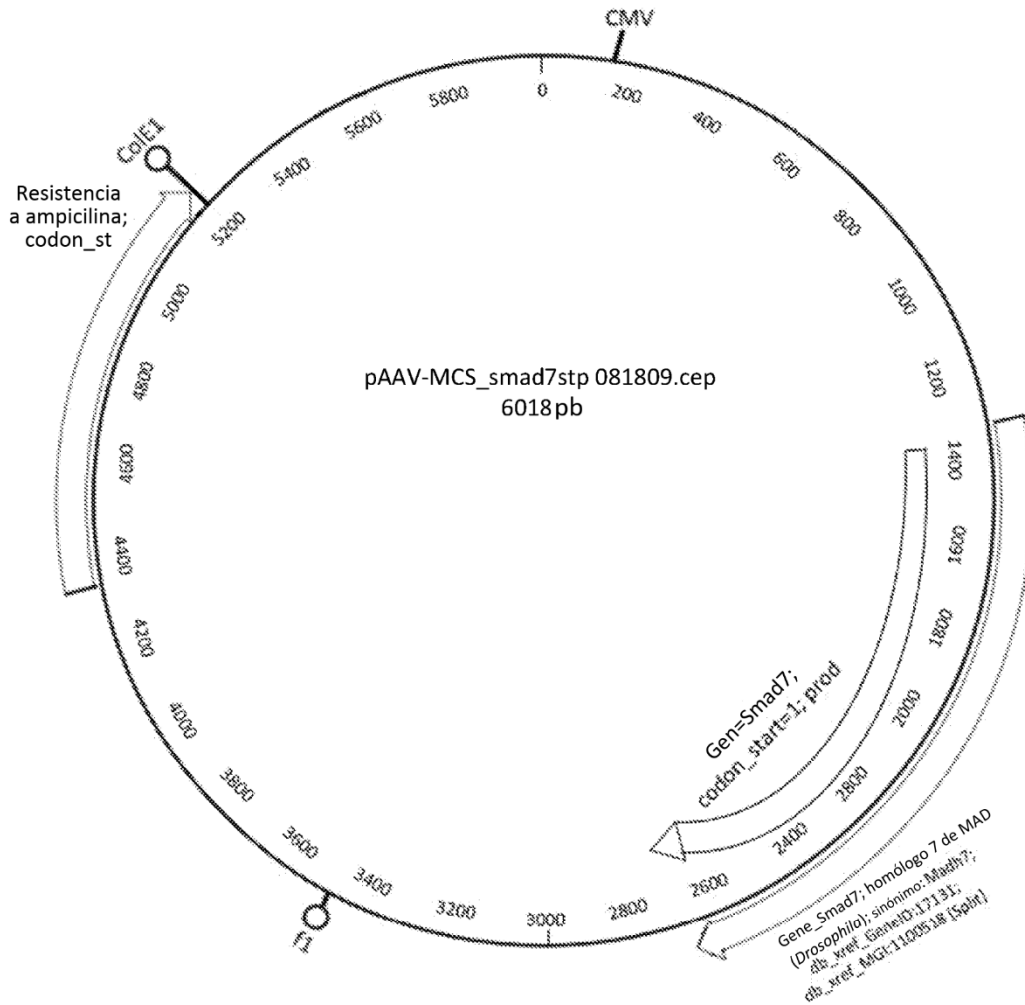


FIG. 12



Sitios de restricción

PstI (6)	SspI (1083)	AccI (1989)	XmaI (2700)	BglIII (2757)	SspI (3934)
PvuII (11)	ClaI (1320)	PstI (2061)	SmaI (2702)	SspI (2893)	ApaI (3956)
XmaI (40)	EcoRI (1326)	SacII (2090)	BamHI (2705)	SphI (3081)	SspI (4320)
SmaI (42)	PvuII (1713)	EcoRV (2247)	XbaI (2711)	NotI (3274)	ApaI (4453)
XmaI (51)	SacI (1746)	PvuII (2316)	Sall (2717)	XmaI (3366)	DraI (4547)
SmaI (53)	PstI (1795)	PvuII (2358)	AccI (2718)	SmaI (3368)	FspI (4902)
NotI (143)	XmaI (1803)	ApaI (2461)	PstI (2727)	XmaI (3377)	DraI (5239)
SacI (727)	ApaI (1804)	PstI (2525)	HindIII (2729)	SmaI (3379)	DraI (5258)
SacII (814)	SmaI (1805)	PvuII (2633)	XhoI (2737)	PvuII (3410)	ApaI (5699)
SspI (1067)	Sall (1988)	EcoRI (2694)	XhoI (2751)	PstI (3419)	