

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 979 174**

(51) Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2017 PCT/US2017/027583**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017 WO17180976**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2017 E 17783207 (8)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024 EP 3442600**

(54) Título: **Suministro de vectores de virus adenoasociados de β-sarcoglicano y microrna-29 y tratamiento de la distrofia muscular**

(30) Prioridad:

**15.04.2016 US 201662323333 P
13.12.2016 US 201662433548 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2024

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**RODINO-KLAPAC, LOUISE y
MENDELL, JERRY, R.**

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

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

ES 2 979 174 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 de vectores de virus adenoasociados de β -sarcoglicano y microrna-29 y tratamiento de la distrofia muscular

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

Se describen en la presente vectores terapéuticos tales como vectores AAV (por sus siglas en inglés) que expresan β -sarcoglicano y su uso para reducir y prevenir la fibrosis en sujetos que padecen una distrofia muscular. También se describen métodos de terapia génica combinada que comprenden la administración de un primer vector AAV que expresa β -sarcoglicano y un segundo vector AAV que expresa miR29 (por sus siglas en inglés) para reducir y prevenir la fibrosis en pacientes que padecen una distrofia muscular.

ANTECEDENTES

15 La distrofia muscular de cinturas tipo 2E (LGMD2E, por sus siglas en inglés) es un trastorno autosómico recesivo resultante de mutaciones en el gen que codifica el β -sarcoglicano (*sgcb*, por sus siglas en inglés), que causa la pérdida de proteína funcional (1). La LGMD2E representa una forma relativamente común y grave de LGMD en los Estados Unidos, con informes de incidencia en todo el mundo de 1/200.000-1/350.000 (2). La ausencia de β -sarcoglicano lleva a una distrofia progresiva con pérdida crónica de fibras musculares, inflamación, sustitución de grasa y fibrosis, todo lo cual resulta en un deterioro de la fuerza y la funcionalidad musculares (3, 4). Como complejo, los sarcoglicanos (α -, β -, γ -, δ), cuyo tamaño está en el rango de 35 a 50 kD (5), son todas proteínas transmembranales que proporcionan estabilidad al sarcolema ofreciendo protección contra la tensión mecánica durante la actividad muscular (3). La pérdida del β -sarcoglicano en la LGMD2E usualmente resulta en varios grados de pérdida concomitante de otras proteínas sarcoglicanas que contribuyen a la fragilidad de la membrana muscular y llevan a la pérdida de miofibras (1). Aunque el fenotipo clínico de la LGMD2E varía, el diagnóstico típicamente se produce antes de los 10 años y la pérdida de la deambulación a mediados o finales de la adolescencia (1, 6, 7). Los pacientes presentan un nivel elevado de creatina cinasa (CK, por sus siglas en inglés) en suero, debilidad muscular proximal, dificultad para levantarse del suelo y pérdida progresiva de la deambulación. La afectación cardíaca se da hasta en cincuenta por ciento de los casos

30 El virus adenoasociado (AAV) es un parvovirus de replicación deficiente, cuyo genoma de ADN de hebra única tiene una longitud aproximada de 4,7 kb e incluye dos repeticiones terminales invertidas (ITR, por sus siglas en inglés) de 145 nucleótidos. Hay múltiples serotipos de AAV. Las secuencias de nucleótidos de los genomas de los serotipos de AAV se conocen. Por ejemplo, el genoma completo del AAV-1 se proporciona en GenBank con el No. de acceso NC_002077; el genoma completo del AAV-2 se proporciona en GenBank con el No. de acceso NC_001401 y Srivastava *et al.*, *J. Virol.*, 45: 555-564 (1983); el genoma completo del AAV-3 se proporciona en GenBank con el No. de acceso NC_1829; el genoma completo del AAV-4 se proporciona en GenBank con el No. de acceso NC_001829; el genoma del AAV-5 se proporciona en GenBank con el No. de acceso AF085716; el genoma completo del AAV-6 se proporciona en GenBank con el No. de acceso NC_001862; al menos partes de los genomas del AAV-7 y del AAV-8 se proporcionan en GenBank con los No. de acceso AX753246 y AX753249, respectivamente; el genoma del AAV-9 se proporciona en Gao *et al.*, *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); el genoma del AAV-10 se proporciona en *Mol. Ther.*, 13(1): 67-76 (2006); y se proporciona el genoma de AAV-11 en *Virology*, 330(2): 375-383 (2004). La secuencia del genoma del AAV rh.74 se proporciona en la patente de EE.UU. 9,434,928. Las ITR de los AAV contienen secuencias *cis* que dirigen la replicación (*rep*) del ADN vírico, la encapsidación/empaqueamiento y la integración en el cromosoma de la célula hospedera. Tres promotores de AAV (denominados p5, p19 y p40 por sus ubicaciones relativas en el mapa) dirigen la expresión de los dos marcos de lectura abiertos internos de AAV que codifican los genes *rep* y *cap*. Los dos promotores *rep* (p5 y p19), junto con el corte y empalme diferencial del único intrón del AAV (en los nucleótidos 2107 y 2227), resultan en la producción de cuatro proteínas *rep* (*rep* 78, *rep* 68, *rep* 52 y *rep* 40) a partir del gen *rep*. Las proteínas *rep* poseen múltiples propiedades enzimáticas que son responsables en última instancia de la replicación del genoma viral. El gen *cap* se expresa a partir del promotor p40 y codifica las tres proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. El corte y empalme alternativo y sitios de inicio de la traducción no consenso son responsables de la producción de las tres proteínas de la cápside relacionadas. Un único sitio de poliadenilación consenso está ubicado en la posición 95 del mapa del genoma de AAV. El ciclo de vida y la genética de AAV se revisan en Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

55 El AAV posee características únicas que lo hacen atractivo como vector para suministrar ADN foráneo a células, por ejemplo, en terapia génica. La infección por AAV de células de cultivo no es citopática, y la infección natural de humanos y otros animales es silenciosa y asintomática. Además, los AAV infectan muchas células de mamíferos, lo que les permite dirigirse a muchos tejidos diferentes *in vivo*. Además, el AAV transduce células que se dividen lentamente y que no se dividen, y puede persistir esencialmente durante la vida útil de esas células como un episoma nuclear transcripcionalmente activo (elemento extracromosómico). El genoma proviral AAV se inserta como ADN clonado en plásmidos, lo que hace factible la construcción de genomas recombinantes. Asimismo, dado que las señales que dirigen la replicación del AAV y la encapsidación del genoma están contenidas en las ITR del genoma del AAV, una parte o todo de los internos del genoma de aproximadamente 4,3 kb (que codifican las proteínas de replicación y estructurales de la cápside, *rep-cap*) pueden ser sustituidos por ADN foráneo. Para generar vectores AAV, las proteínas *rep* y *cap* se pueden proporcionar en *trans*. Otra característica significativa del AAV es que es un virus extremadamente estable y abundante. Soporta fácilmente las condiciones usadas para inactivar el adenovirus (56 a 65 °C por varias horas), lo que hace menos crítica la

conservación en frío del AAV. El AAV incluso se puede liofilizar. Finalmente, las células infectadas con AAV no son resistentes a la superinfección.

- 5 Múltiples estudios han demostrado expresión de proteínas mediada por AAV recombinante a largo plazo (> 1,5 años) en el músculo. Ver, Clark *et al.*, *Hum Gene Ther*, 8: 659-669 (1997); Kessler *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 14082-14087 (1996); y Xiao *et al.*, *J Virol*, 70: 8098-8108 (1996). Ver también, Chao *et al.*, *Mol Ther*, 2:619-623 (2000) y Chao *et al.*, *Mol Ther*, 4:217-222 (2001). Además, debido a que el músculo está sumamente vascularizado, la transducción de AAV recombinante ha resultado en la aparición de productos transgénicos en la circulación sistémica después de la inyección intramuscular como se describe en Herzog *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 5804-5809 (1997) y Murphy *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13921-13926 (1997). Además, Lewis *et al.*, *J Virol*, 76: 8769-8775 (2002) demostraron que las miofibras esqueléticas poseen los factores celulares necesarios para una correcta glicosilación, plegamiento y secreción de anticuerpos, lo que indica que el músculo es capaz de una expresión estable de productos terapéuticos proteicos secretados.
- 10 15 Una forma emergente de terapia para LGMD2E es el suministro de genes mediado por virus para restaurar la proteína de tipo silvestre en el músculo afectado, lo que resulta en la restauración de la funcionalidad muscular. Considerando que un subgrupo de pacientes puede desarrollar una cardiomiopatía (8, 9, 10, 13), habría que considerar el cuidado a largo plazo de estos pacientes. En informes anteriores, el ratón *sgcb*-nulo está bien caracterizado. Araishi *et al.* (3) desarrollaron el ratón deficiente de β-sarcoglicano con pérdida acompañante de todos los sarcoglicanos así como sarcospán, con al menos preservación menor de merosina, los distroglicanos y distrofina, reproduciendo el cuadro clínico visto en LGMD2E. Los cambios histológicos en este modelo animal también fueron un prototipo de la contraparte clínica, incluida la prominencia de la fibrosis del músculo esquelético(14). Dressman *et al.* (25) inyectaron el músculo abdominal transverso usando rAAV2.CMV.SGCB (por sus siglas en inglés). La expresión persistió por 21 meses y las fibras musculares quedaron protegidas de la necrosis recurrente. También se ha descrito el uso de AAV autocomplementarios para potenciar la expresión del transgén (16) un promotor específico de músculo para dirigirse mejor al músculo esquelético (20, 26) y la optimización de un gen de β-sarcoglicano humano (hSGCB).
- 20 25

- 30 La mejora funcional de los pacientes que padecen LGMD y otras distrofias musculares requiere tanto la restauración del gen como la reducción de la fibrosis. Se necesitan métodos de reducción de la fibrosis que se puedan combinar con métodos de restauración génica para lograr tratamientos más efectivos de la LGMD y otras distrofias musculares.

BREVE DESCRIPCIÓN

- 35 Se describen en la presente vectores de terapia génica, por ejemplo, AAV, que expresan el gen de β-sarcoglicano y métodos para suministrar β-sarcoglicano al músculo para reducir y/o prevenir la fibrosis; y/o para aumentar la fuerza muscular, y/o para tratar una β-sarcoglicanopatía en un sujeto mamífero que padece una distrofia muscular.

- 40 También se describen en la presente los vectores de terapia génica para su uso al suministrar β-sarcoglicano en terapias combinadas y enfoques para abordar el defecto génico observado en LGMD2E y vectores de terapia génica al suministrar miR29 para suprimir aún más la fibrosis.

- 45 En un aspecto, la invención proporciona un vector AAV recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica β-sarcoglicano, en donde la secuencia polinucleotídica comprende una secuencia nucleotídica al menos 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica que codifica β-sarcoglicano comprende una secuencia, por ejemplo, al menos 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia nucleotídica establecida en SEQ ID NO: 1 y codifica la proteína que conserva la actividad β-sarcoglicano. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica que codifica β-sarcoglicano comprende la secuencia nucleotídica establecida en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica que codifica β-sarcoglicano consiste en la secuencia nucleotídica establecida en SEQ ID NO: 1.

- 50 55 En otro aspecto, la invención proporciona un vector AAV recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica β-sarcoglicano que es al menos 95 % idéntica a SEQ ID NO: 2.

- En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende el vector AAV recombinante de la invención.

- 60 55 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende el vector AAV recombinante de la invención para su uso en la reducción de la fibrosis en un sujeto que lo necesite.

- En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende el vector AAV recombinante de la invención para su uso en el tratamiento de la β-sarcoglicanopatía en un sujeto que lo necesite.

- En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende el vector AAV recombinante de la invención para el tratamiento de la distrofia muscular.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende el vector AAV recombinante de la invención para usar en el tratamiento de una distrofia muscular, opcionalmente en donde la distrofia muscular es distrofia muscular de cinturas (LGMD), y opcionalmente en donde la LGMD es LGMD2E.

5 En otro aspecto, un vector AAV recombinante descrito en la presente comprende una secuencia polinucleotídica que codifica β -sarcoglicano que tiene al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y la proteína conserva la actividad β -sarcoglicano.

10 En otro aspecto, se describe en la presente un vector AAV recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica β -sarcoglicano funcional que comprende una secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, o un complemento del mismo.

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

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

35 En otro aspecto, la secuencia polinucleotídica puede estar enlazada operativamente a un elemento de control específico del músculo. Por ejemplo, el elemento de control específico del músculo es el elemento del gen de la actina esquelética humana, el elemento del gen de la actina cardíaca, el factor de unión potenciador específico del miocito MEF, la creatina cinasa muscular (MCK), la tMCK (MCK truncada), la cadena pesada de miosina (MHC), la MHCK7 (una versión híbrida de MHC y MCK), C5-12 (un promotor sintético), el elemento potenciador de la creatina cinasa murina, el elemento génico de la troponina C esquelética de contracción rápida, el elemento génico de la troponina C cardíaca de contracción lenta, el elemento génico de la troponina I de contracción lenta, factores nucleares inducibles por hipozia, el elemento inducible por esteroides o elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE); (por sus siglas en inglés, respectivamente).

45 En algunas realizaciones, el promotor específico del músculo es MHCK7 (SEQ ID NO: 4). Un rAAV ejemplar descrito en la presente es pAAV.MHCK7.hSCGB (por sus siglas en inglés) que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3; en donde el promotor MCHK7 abarca los nucleótidos 130-921, un intrón químico SV40 abarca los nucleótidos 931-1078, la secuencia β -sarcoglicano abarca los nucleótidos 1091-2047 y la cola de poli-A abarca los nucleótidos 2054-2106.

50 En algunas realizaciones, el promotor específico del músculo es tMCK (SEQ ID NO: 6). Un rAAV ejemplar descrito en la presente es pAAV.tMCK.hSCGB que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5; en donde el promotor tMCK abarca los nucleótidos 141-854, un intrón químico SV40 abarca los nucleótidos 886-1018, la secuencia β -sarcoglicano abarca los nucleótidos 1058-2014 y la cola de poli-A abarca los nucleótidos 2021-2073.

55 El AAV puede ser de cualquier serotipo, por ejemplo, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 y AAV rh.74. Se da a conocer la producción de rAAV pseudotipado, por ejemplo, en WO 01/83692. También se contemplan otros tipos de variantes de rAAV, por ejemplo, rAAV con mutaciones de la cápside. Ver, por ejemplo, Marsic *et al.*, Molecular Therapy, 22(11): 1900-1909 (2014).

60 También se contemplan composiciones que comprenden cualquiera de los vectores rAAV descritos en la presente.

También se describen métodos para producir una partícula de vector AAV recombinante que comprenden cultivar una célula que ha sido transfectada con cualquier vector AAV recombinante descrito en la presente y recuperar las partículas AAV recombinantes a partir del sobrenadante de las células transfectadas. También se contemplan las partículas virales que comprenden cualquiera de los vectores AAV recombinantes descritos en la presente.

- La invención también proporciona las composiciones de la invención para el uso en métodos para reducir la fibrosis en un sujeto mamífero que lo necesite. A este respecto, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un vector de AAV descrito en la presente (o una composición que comprende un vector de AAV descrito en la presente) al sujeto mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto mamífero padece de distrofia muscular. En algunas realizaciones, la administración de un vector AAV descrito en la presente (o composición que comprende un vector AAV descrito en la presente) reduce la fibrosis en el músculo esquelético o en el músculo cardíaco del sujeto. Estos métodos pueden comprender además el paso de administrar un segundo vector AAV recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que comprende miR29c.
- El término "distrofia muscular", como se usa en la presente, se refiere a un trastorno en el que la fuerza y el volumen muscular disminuyen gradualmente. Los ejemplos no limitantes de enfermedades de distrofia muscular pueden incluir distrofia muscular de Becker, distrofia muscular tibial, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular facioescapulohumeral, sarcoglicanopatías, distrofia muscular congénita tal como distrofia muscular congénita debida a deficiencia parcial de LAMA2 (por sus siglas en inglés), distrofia muscular congénita deficiente en merosina, distrofia muscular congénita tipo 1D, distrofia muscular congénita de Fukuyama, distrofia muscular de cinturas tipo 1A, distrofia muscular de cinturas tipo 2A, distrofia muscular de cinturas tipo 2B, distrofia muscular de cinturas tipo 2C, extremidad- distrofia muscular de cinturas tipo 2D, distrofia muscular de cinturas tipo 2E, distrofia muscular de cinturas tipo 2F, distrofia muscular de cinturas tipo 2G, distrofia muscular de cinturas tipo 2H, distrofia muscular de cinturas tipo 2I, distrofia muscular de cinturas tipo 2J, distrofia muscular de cinturas tipo 2K, distrofia muscular de cinturas tipo 1C, distrofia muscular de columna rígida con epidermolisis ampollosa simple, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular congénita de Ullrich y distrofia muscular escleroatónica de Ullrich. En algunas realizaciones, el sujeto padece distrofia muscular de cinturas. En algunas realizaciones, el sujeto padece distrofia muscular de cinturas tipo 2E (LGMD2E).
- El término "fibrosis", como se usa en la presente, se refiere a la deposición excesiva o no regulada de componentes de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) y procesos de reparación anormales en tejidos tras una lesión, incluidos el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el hígado, los pulmones, los riñones y el páncreas. Los componentes de la ECM que se depositan incluyen colágeno, por ejemplo, colágeno 1, colágeno 2 o colágeno 3 y fibronectina.
- Se describe en la presente una cantidad efectiva de un vector AAV descrito en la presente (o una composición que comprende un vector AAV descrito en la presente) para su uso en el aumento de la fuerza muscular/masa muscular en el sujeto mamífero.
- En cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto puede padecer distrofia muscular tal como distrofia muscular de cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina.
- La invención también proporciona composiciones de la invención para su uso en un método para tratar una distrofia muscular en un sujeto mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un vector AAV descrito en la presente (o composición que comprende un vector AAV descrito en la presente) al sujeto mamífero. En algunas realizaciones, la distrofia muscular es distrofia muscular de cinturas. Cualquier de los métodos descritos en la presente puede comprender además el paso de administrar un segundo vector AAV recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que comprende miR29c.
- También se contemplan las terapias combinadas. A este respecto, cualquiera de los métodos anteriores descritos en la presente puede comprender además la administración de un segundo vector AAV recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que comprende miR29c. En algunas realizaciones, el polinucleótido que comprende miR29c está enlazado operativamente a un elemento de control específico del músculo. Por ejemplo, el elemento de control específico del músculo es el elemento del gen de la actina esquelética humana, el elemento del gen de la actina cardíaca, el factor de unión potenciador específico del miocito MEF, la creatina cinasa muscular (MCK), la tMCK (MCK truncada), la cadena pesada de miosina (MHC), la MHCK7 (una versión híbrida de MHC y MCK), C5-12 (un promotor sintético), el elemento enhancer de la creatina cinasa murina, el elemento génico de la troponina C esquelética de contracción rápida, el elemento génico de la troponina C cardíaca de contracción lenta, el elemento génico de la troponina I de contracción lenta, factores nucleares inducibles por hipozia, el elemento inducible por esteroides o el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE). En algunas realizaciones, el segundo vector recombinante comprende una secuencia polinucleotídica establecida en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 8, tal como se describe en la solicitud provisional de EE.UU. No. 62/323,163.
- En los métodos de terapia combinada descritos en la presente en los que tanto un vector rAAV que expresa β-sarcoglicano como un vector rAAV que expresa miR29c se administran al sujeto mamífero, los vectores rAAV se pueden administrar concurrentemente, o administrar consecutivamente con el vector rAAV que expresa β-sarcoglicano administrado inmediatamente antes o después del vector rAAV que expresa miR29c. Alternativamente, el vector AAV que expresa β-sarcoglicano se administra dentro de aproximadamente 1-24 horas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas) después de administrar el rAAV que expresa miR29 o los métodos descritos en la presente se llevan a cabo, en donde el vector AAV que expresa el β-sarcoglicano se administra dentro de aproximadamente 1-24 horas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o

24 horas) antes de administrar el rAAV que expresa miR29. En algunas realizaciones, el vector AAV que expresa β -sarcoglicano se administra dentro de aproximadamente 1-5 horas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 horas) después de administrar el rAAV que expresa miR29 o los métodos descritos en la presente se llevan a cabo, en donde el vector AAV que expresa el β -sarcoglicano se administra en dentro de aproximadamente 1-5 horas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 horas) antes de administrar el rAAV que expresa miR29c.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente, el rAAV se administra por inyección intramuscular o inyección intravenosa. Además, en cualquiera de los métodos descritos en la presente, el rAAV se administra sistémicamente, tal como la administración parental por inyección, infusión o implantación.

Las composiciones de la invención están formuladas para inyección intramuscular o inyección intravenosa. Además, las composiciones de la invención se formulan para administración sistémica, tal como administración parental mediante inyección, infusión o implantación.

Además, cualquiera de las composiciones formuladas para administración a un sujeto que padece distrofia muscular (tal como distrofia muscular de cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina). En algunas realizaciones, la composición puede comprender además un segundo vector AAV recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica establecida en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 8.

En cualquiera de los usos descritos en la presente, el medicamento está formulado para inyección intramuscular o inyección intravenosa. Además, en cualquiera de los usos descritos en la presente, el medicamento se formula para administración sistémica, tal como administración parental mediante inyección, infusión o implantación. Además, cualquiera de los medicamentos se puede preparar para su administración a un sujeto que padece distrofia muscular (tal como distrofia muscular de cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina). En algunas realizaciones, el medicamento puede comprender además un segundo vector AAV recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica establecida en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 8.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A-1D demuestran que la expresión de β -sarcoglicano mediada por el AAV restaura las proteínas asociadas a la distrofina y protege la integridad de la membrana. (A) Un vector AAV autocomplementario que contiene el gen de β -sarcoglicano humano con codones optimizados (hSGCB) impulsado por el promotor tMCK específico del músculo. El casete también contiene un intrón químérico para aumentar el proceso y una señal de poliadenilación para la estabilidad. (B) La tinción de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti- β -SG (por sus siglas en inglés) muestra altos niveles de tinción sarcolemal del transgén *sgcb* en ratones de 5 semanas de edad, tanto 6 como 12 semanas posteriores a la inyección, se muestran imágenes a 20X. El porcentaje de fibras que expresan beta-sarcoglicano por músculo TA (por sus siglas en inglés) fue de un promedio de $88,4 \pm 4,2\%$ después de 6 semanas ($n = 9$, 4 machos, 5 hembras) y de $76,5 \pm 5,8\%$ después de 12 semanas ($n = 6$, 4 machos, 2 hembras). La expresión proteica se confirmó en la inmunotransferencia tipo Western con gammaturbina como control de carga. (C) El suministro de AAV con β -sarcoglicano lleva a la restauración de otros miembros del complejo sarcoglicano; α -sarcoglicano, distrofina, se muestran imágenes a 20X. (D) scAAVrh.74.hSGCB protege las membranas *sgcb*^{-/-} contra daños. La imagen muestra una gran área de fibras positivas al azul de Evans (rojo) yuxtapuestas a un grupo de fibras positivas al β -sarcoglicano que han sido protegidas de la incorporación del tinte azul de Evans, se muestra la imagen a 40X.

Las Figuras 2A-2D muestran el análisis histológico del músculo esquelético tratado con deficiencia de β -SG. El tratamiento con scAAVrh.74.hSGCB normaliza los parámetros histológicos de los ratones *sgcb*^{-/-}. Se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina y de rojo de Picrosirius en el músculo TA de ratones *sgcb*^{-/-} junto con ratones C57/BL6 (por sus siglas en inglés) de control normal y ratones tratados con scAAVrh.74.hSGCB, seguidas de la cuantificación de los parámetros histológicos y el % de tinción de colágeno. (A) La tinción H&E (por sus siglas en inglés) muestra la presencia de fibras nucleadas centralmente, células inflamatorias y una distribución de fibras de gran diámetro en el músculo deficiente en β -SG, así como una mejora de la histopatología después de la transferencia génica. (B) La tinción con rojo de Picrosirius muestra una disminución de la tinción con colágeno rojo en el músculo tratado. (C) La cuantificación de las fibras nucleadas centralmente que muestra una disminución tras el tratamiento ($p < 0,0005$, ANOVA unidireccional) y (D) la representación de la distribución del tamaño de las fibras y aumento del tamaño promedio de las fibras del músculo TA de los ratones C57/BL6 controles y *sgcb*^{-/-} en comparación con los ratones tratados ($p < 0,0001$, ANOVA unidireccional). (E) La cuantificación del % de colágeno en el músculo TA de controles C57/BL6 y ratones *sgcb*^{-/-} en comparación con ratones tratados con *sgcb*^{-/-} ($p < 0,0001$, ANOVA unidireccional). Se muestra una barra de escala de 100 μm para imágenes a 20X. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Las Figuras 3A-3C muestran que el suministro intramuscular de scAAVrh.74.hSGCB corrige la fuerza tetánica y la resistencia a la lesión inducida por contracción. El músculo TA de ratones *sgcb*^{-/-} tratados con 3×10^{10} vg (por sus siglas en inglés) de scAAVrh.74.hSGCB mediante una inyección IM fue cosechado 6 semanas posteriores a la transferencia génica, y sometido a un protocolo para valorar la fuerza tetánica y a un protocolo de contracción excéntrica para valorar la resistencia a la lesión inducida por contracción. (A) Los AT tratados con

AAVrh.74.hSGCB demostraron una mejora significativa tanto en la fuerza tetánica absoluta ($p < 0,01$, prueba t pareada) como (B) en la fuerza específica normalizada ($p < 0,05$, prueba t pareada), que no fue diferente de la fuerza de tipo silvestre (C57/BL6). (C) Los AT tratados con AAVrh.74.hSGCB mostraron una mejora significativa de la resistencia a la lesión inducida por contracción en comparación con los controles *sgcb*^{-/-} sin tratar ($p < 0,01$, ANOVA bidireccional). Se muestra la retención de fuerza tras 10 contracciones. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Las Figuras 4A-4C muestran los resultados del análisis de ratones envejecidos tratados intramuscularmente con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. (A) La tinción de inmunofluorescencia del músculo TA de ratones *sgcb*^{-/-} de 6 meses de edad tratados 12 semanas posteriores a la inyección ($n = 5$, 5 machos) muestra una expresión sarcolemal del transgén *sgcb* a niveles que promedian 80 % en los ratones inyectados en comparación con los sin tratar ($n = 4$, 4 machos), (B) La tinción con rojo de Picosirius del músculo TA tratado y sin tratar. (C) La cuantificación del colágeno presente en el tejido teñido con rojo de Picosirius muestra una reducción significativa de la cantidad de colágeno después del tratamiento con rAAVrh.74.tMCK.hSGCB ($p < 0,0001$, ANOVA unidireccional). Se muestra una barra de escala de 100 μm para imágenes a 20X. **** $p < 0,0001$.

Las Figuras 5A-5C muestran los resultados del suministro vascular de scAAVrh.74.hSGCB. En las semanas cuatro ($n = 5$, 5 machos) y cinco ($n = 4$, 2 machos, 2 hembras) los ratones deficientes en β -SG fueron tratados con el vector a través de la arteria femoral para suministrar el vector a los músculos de las extremidades inferiores. A una dosis de 5×10^{11} vg, la expresión de β -SG fue de $90,6 \pm 2,8$ % en el TA y de $91,8 \pm 4,7$ % en el GAS (por sus siglas en inglés) de los ratones tratados, acompañada de mejoras en la histopatología que resultaron en una mejora significativa de la fuerza específica en comparación con los animales sin tratar, incluso tras un paradigma de lesión, (A) la expresión de la proteína β -SG de tres ratones representativos. El músculo de un ratón β -SG inactivado (KO, por sus siglas en inglés) sin tratar se muestra para la comparación en el recuadro (inferior derecho), se muestran imágenes a 20X. La expresión en músculos tratados se confirmó mediante inmunotransferencia tipo Western y gamma-tubulina mostrada como control de carga. (B) La histopatología mejora significativamente después del tratamiento con dosis altas. Paneles superiores: músculos TA y gastrocnemio tratados. Paneles inferiores: músculo de control deficiente en β -SG sin tratar. Se muestra una barra de escala de 100 μm para imágenes a 20X. (C) El porcentaje de fuerza específica retenida en el músculo EDL (por sus siglas en inglés) después de 10 ciclos de lesión inducida por contracción excéntrica. El tratamiento con 5×10^{11} vg de AAVrh.74.hSGCB produjo una mejora significativa de la fuerza que fue equivalente a la del músculo de control WT (normal) ($p < 0,05$, ANOVA unidireccional). * $p < 0,05$.

Las Figuras 6A-6B muestran la reducción de la fibrosis en ratones β -SG KO tratados con ILP (por sus siglas en inglés). (A) La tinción con rojo de Picosirius muestra una reducción de la fibrosis en los ratones tratados, indicada por una disminución de la deposición de colágeno en comparación con los ratones *sgcb*^{-/-} sin tratar. (B) La cuantificación de los niveles de colágeno en los músculos TA y GAS de ratones BL6 WT, *sgcb*^{-/-} sin tratar y ratones tratados confirma la reducción de los niveles de colágeno en los ratones tratados ($p < 0,001$, ANOVA unidireccional). Se muestra una barra de escala de 100 μm para imágenes a 20X. *** $p < 0,001$.

Las Figuras 7A y 7B muestran la biodistribución del vector y la expresión de proteínas. (A) Histograma de la distribución promedio del vector en los tejidos cosechados de ratones tratados con ILP, expresada en copias de transcripto por microgramo de ADN añadido a la qPCR (por sus siglas en inglés). La extremidad izquierda fue tratada. (B) No se observa expresión de proteínas mediante inmunotransferencia tipo Western en órganos fuera del objetivo.

Las Figuras 8A-8D muestran los déficits histológicos y funcionales en ratones *sgcb*^{-/-} a los 7 meses de edad. La tinción de tricomas en el diafragma (A) y el corazón (C) de ratones *sgcb*^{-/-} muestra fibrosis extensa (rojo). La salida de fuerza del diafragma se reduce significativamente en el diafragma (B) y la fracción de eyeción cardíaca también se reduce en ratones *sgcb*^{-/-} (D).

La Figura 9 muestra un esquema del transgén terapéutico β -sarcoglicano. El vector AAV autocomplementario que contiene el gen del β -sarcoglicano humano con codones optimizados (hSGCB). Un promotor de MHCK7 específico del músculo impulsa la expresión. El casete también contiene un intrón químérico para aumentar el proceso y una señal de poliadenilación para la estabilidad.

La Figura 10 muestra una tinción de inmunofluorescencia para β -sarcoglicano en varios músculos esqueléticos que demuestra una expresión robusta con raras fibras negativas después de 1, 4 o 6 meses de tratamiento (se muestra 1 mes).

La Figura 11 muestra tinciones de inmunofluorescencia para β -sarcoglicano en diafragma y corazón que demuestran una expresión robusta con raras fibras negativas después de 1, 4 o 6 meses de tratamiento (se muestra 1 mes).

Las Figuras 12A-12D muestran la restauración de la expresión de SGCB después del suministro intravenoso de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. (A) El casete de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. (B) Las imágenes de inmunofluorescencia 6 meses posteriores a la inyección de músculos esqueléticos, diafragma y corazón de

ratones *sgcb*^{-/-} inyectados por vía intravenosa con una dosis total de 1e12 vg de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. Las imágenes representativas de músculos esqueléticos muestran un promedio de 98,13 ± 0,31 % de transducción. Se muestran imágenes a 20X. Las imágenes representativas de tejido cardíaco muestran altos niveles de expresión del transgén hSGCB. Se muestran imágenes a 10X. (C) La inmunotransferencia tipo Western de todos los músculos de un ratón *sgcb*^{-/-} tratado confirmó la expresión del transgén hSGCB. (D) La inmunotransferencia tipo Western para la expresión de hSGCB en corazones de cinco ratones tratados con *sgcb*^{-/-} con cuantificación por densitometría que muestra una sobreexpresión de hSGCB de hasta 72,0 % de los niveles de BL6 WT.

Las Figuras 13A-13D muestran el efecto del tratamiento sistémico con scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB sobre la patología muscular, (A) la tinción H&E del diafragma y músculo QUAD (por sus siglas en inglés) de ratones C57/BL6 WT, *sgcb*^{-/-}, y tratados con scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB que muestran una histopatología normalizada. (B) La cuantificación de la reducción de fibras nucleadas centralmente en el músculo tratado con *sgcb*^{-/-} en comparación con el músculo sin tratar con *sgcb*^{-/-} (TA, GAS, GLUT, diafragma, p < 0,0001) (QUAD, PSOAS, TRI, p < 0,05); (por sus siglas en inglés, respectivamente). (C) La normalización de la distribución de fibras en GAS, PSOAS y TRI, y (D) el aumento del tamaño promedio de las fibras en los músculos tratados en comparación con los músculos *sgcb*^{-/-} sin tratar (p < 0,001) (ANOVA unidireccional) (n = 5 por grupo).

Las Figuras 14A-14B muestran la reducción de la deposición de colágeno en ratones β-SG KO tratados por vía intravenosa. (C) La tinción con rojo de Picrosirius mostró una reducción de la fibrosis en los ratones tratados, indicada por una disminución de la deposición de colágeno en comparación con los ratones *sgcb*^{-/-} sin tratar en el diafragma y el GAS. (B) La cuantificación de los niveles de colágeno en el diafragma y los músculos GAS de ratones C57BL/6 WT (n = 4), ratones *sgcb*^{-/-} sin tratar (n = 4) y ratones *sgcb*^{-/-} tratados (n = 5) confirman la reducción de los niveles de colágeno en ambos músculos tratados (p < 0,0001, ANOVA unidireccional). Se muestra una barra de escala de 100 μm para imágenes a 20X.

La Figura 15 demuestra que el suministro de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB a través de la vena de la cola de ratones *sgcb*^{-/-} restaura completamente la fuerza en el diafragma, después de 6 meses de tratamiento (administración IV (1e12 vg)). Se cosecharon tiras de músculo diafragmático de ratones *sgcb*^{-/-} tratados y de control y de ratones WT y se sometieron a mediciones de fuerza, el tratamiento restableció la fuerza a los niveles de WT.

La Figura 16 muestra un esquema del vector rAAV scAACrh.74.CMV.miR29c y la secuencia de nucleótidos de miR29c en una cadena principal de miR30 natural.

La Figura 17 muestra que después de 3 meses de tratamiento con AAVrh.74.CMV.miR29c, se cosecharon músculos TA de ratones *sgcb*^{-/-} y WT tratados y de control y se analizó la fibrosis (niveles de colágeno) (n = 5 por grupo). Usando la tinción con rojo de Sirius y la cuantificación, los niveles de colágeno se redujeron después del tratamiento (ver la Figura 18). Los resultados indicaron que los niveles de transcripción de Col1A, Col3A y Fbn (por sus siglas en inglés, respectivamente) se normalizaron y el tamaño de las fibras musculares aumentó.

La Figura 18 muestra imágenes representativas de secciones completas escaneadas de músculos tibiales anteriores sin tratar y tratados con AAVrh.74.CMV.miR29c teñidas con rojo de Sirius, que tiñe el colágeno 1 y 3. La cuantificación se muestra en la Figura 17.

Las Figuras 19A-19B muestran la corrección de la cifoescoliosis en la columna torácica. (A) La cifoescoliosis en ratones *sgcb*^{-/-} evidenciada por radiografía. (B) El índice cifótico (KI, por sus siglas en inglés) de los ratones *sgcb*^{-/-} (3,69) es bajo en comparación con los C57BL/6 WT (6,01) (p < 0,01), pero aumenta con el tratamiento con scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB (5,39) (p < 0,05 en comparación con *sgcb*^{-/-}) (ANOVA unidireccional) (n = 6 por grupo).

Las Figuras 20A-20D muestran la valoración de la cardiomiopatía en el músculo cardíaco. (A) Las tinciones de H&E y rojo de Picrosirius de corazones BL6 WT, *sgcb*^{-/-} y *sgcb*^{-/-} tratados con AAV.MHCK7.hSGCB de 7 meses de edad, 6 meses posteriores al tratamiento, que indican degeneración miocárdica en el músculo de los *sgcb*^{-/-} sin tratar y mejoría después del tratamiento. (B) El análisis de resonancia magnética cardíaca que muestra una reducción en los corazones *sgcb*^{-/-} del volumen sistólico (p < 0,01), el gasto cardíaco y la fracción de eyeción (p < 0,05) (ANOVA unidireccional) y mejoras 6 meses después del tratamiento (n = 6 por grupo). (C) La inmunotransferencia tipo Western de dos corazones C57BL/6 WT, dos corazones *sgcb*^{-/-} y cinco corazones *sgcb*^{-/-} tratados con AAV.MHCK7.hSGCB que muestran una disminución de los niveles de troponina I cardíaca en los ratones enfermos. (D) La cuantificación por densitometría que muestra una reducción de la troponina I cardíaca (cTrpl, por sus siglas en inglés) hasta 60,38 % de los niveles de BL6 WT y una sobreexpresión de hasta 135,8 % de los niveles de BL6 WT.

Las Figuras 21A-21B demuestran la corrección de la función del diafragma y el aumento de la actividad en jaula de campo abierto. (A) Se cosecharon tiras de músculo del diafragma para medir la fuerza y la resistencia a la fatiga en ratones BL6 WT (n = 5), ratones *sgcb*^{-/-} (n = 4) y ratones *sgcb*^{-/-} tratados con AAV.MHCK7.hSGCB (n =

5) todos ellos a los 7 meses de edad. Seis meses de tratamiento restauraron la fuerza a niveles de WT ($p < 0,01$ en comparación con $sgcb^{-/-}$) y mejoraron la resistencia a la fatiga, (B) La deambulación global en los planos X e Y está significativamente disminuida en los ratones $sgcb^{-/-}$ ($p < 0,0001$) y ligeramente mejorada en los ratones tratados con MCHK7 ($p < 0,05$). La actividad vertical sobre las extremidades traseras también disminuyó en los ratones $sgcb^{-/-}$ ($p < 0,01$) y aumentó significativamente en los ratones tratados con MCHK7 ($p < 0,05$) (ANOVA unidireccional) ($n = 6$ por grupo).

Las Figuras 22A-22B muestran la biodistribución y el análisis inespecífico de la expresión transgénica del suministro sistémico de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. (A) El histograma de distribución del promedio de copias de la transcripción de vg por microgramo de ADN añadido a la reacción qPCR en varios tejidos de dos ratones $sgcb^{-/-}$ después del suministro IV de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB a una dosis total de $1e12$ vg. (B) La biodistribución occidental en músculos y órganos de ratones $sgcb^{-/-}$ inyectados sistémicamente con scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, lo que indica que no hay expresión del transgén hSGCB en ninguna muestra no muscular.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación se basa en el descubrimiento de que la administración de un vector AAV que comprende un polinucleótido que expresa β-sarcoglicano resulta en una reducción o reversión completa de la fibrosis muscular en un modelo animal de distrofia muscular de cinturas. Como se demuestra en los Ejemplos, la administración del vector AAV descrito en la presente resultó en la reversión de los atributos distróficos, incluyendo menos fibras degeneradas, inflamación reducida y recuperación funcional mejorada por la protección contra la contracción excéntrica con mayor generación de fuerza.

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

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

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

AAV

Los genomas de AAV recombinantes comprenden una molécula de ácido nucleico como se define en la invención y una o más ITR de AAV flankeando a la molécula de ácido nucleico. El ADN de AAV en los genomas de rAAV puede ser de cualquier serotipo de AAV para el cual se pueda derivar un virus recombinante, incluidos, pero no limitados a, los serotipos de AAV, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 y AAV rh.74. Se da a conocer la producción de rAAV pseudotipado, por ejemplo, en WO 01/83692. También se contemplan otros tipos de variantes de rAAV, por ejemplo, rAAV con mutaciones de la cápside. Ver, por ejemplo, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Como se indicó en la sección de Antecedentes anterior, las secuencias de nucleótidos de los genomas de varios serotipos de AAV se conocen en la técnica. Para promover la expresión específica del músculo esquelético, se pueden usar AAV-1, AAV-5, AAV-6, AAV-8 o AAV-9.

Los plásmidos de ADN descritos en la presente comprenden genomas de rAAV. Los plásmidos de ADN se transfieren a células permisibles para la infección con un virus auxiliar de AAV (por ejemplo, adenovirus, adenovirus con delección de

E1 o herpesvirus) para el ensamblaje del genoma de rAAV en partículas virales infecciosas. Las técnicas para producir partículas de rAAV, en las que se proporcionan a una célula un genoma de AAV que se va a empaquetar, genes *rep* y *cap*, y funciones de virus auxiliares, son convencionales en la técnica. La producción de rAAV requiere que los siguientes componentes estén presentes en una única célula (denominada en la presente como célula de empaquetamiento): un genoma de rAAV, genes *rep* y *cap* de AAV separados (es decir, no dentro) del genoma de rAAV, y funciones de virus ayudante. Los genes de AAV *rep* y *cap* pueden proceder de cualquier serotipo AAV del que se puedan derivar virus recombinantes y pueden ser de un serotipo AAV diferente de las ITR del genoma rAAV, que incluyen, pero no se limitan a, los serotipos AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 y AAV rh.74. Se da a conocer la producción de rAAV pseudotipado, por ejemplo, en WO 01/83692.

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

Se revisan los principios generales de producción de rAAV en, por ejemplo, Carter, 1992, *Current Opinions in Biotechnology*, 1533-539; y Muzyczka, 1992, *Curr. Topics in Microbial. y Immunol.*, 158:97-129). Se describen varios enfoques en Ratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4:2072 (1984); Hermonat *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466 (1984); Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:3251 (1985); McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62:1963 (1988); y Lebkowski *et al.*, 1988 *Mol. Cell. Biol.*, 7:349 (1988). Samulski *et al.* (1989, *J. Virol.*, 63:3822-3828); patente de EE.UU. No. 5,173,414; WO 95/13365 y la correspondiente patente de EE.UU. No. 5,658,776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin *et al.* (1995) *Vaccine* 13:1244-1250; Paul *et al.* (1993) *Human Gene Therapy* 4:609-615; Clark *et al.* (1996) *Gene Therapy* 3:1124-1132; patente de EE.UU. No. 5,786,211; patente de EE.UU. No. 5,871,982; y patente de EE.UU. No. 6,258,595.

Se describen en la presente células de empaquetamiento que producen rAAV infeccioso. Las células de empaquetamiento pueden ser células cancerosas transformadas de manera estable tales como células HeLa, células 293 y células PerC.6 (una línea afín a 293). Las células de empaquetamiento pueden ser células que no son células cancerosas transformadas, tales como células 293 de bajo número de pases (células de riñón fetal humano transformadas con E1 de adenovirus), células MRC-5 (fibroblastos fetales humanos), células WI-38 (fibroblastos fetales humanos), células Vero (células de riñón de mono) y células FRhL-2 (células de pulmón fetal de rhesus).

Los AAV recombinantes (es decir, las partículas infecciosas encapsuladas de rAAV) de la invención comprenden un genoma de rAAV. Las realizaciones incluyen, pero no se limitan a, el rAAV denominado pAAV.MHCK7.hSCGB que comprende la secuencia polinucleotídica establecida en SEQ ID NO: 3; y pAAV.tMCK.hSCGB que comprende la secuencia polinucleotídica establecida en SEQ ID NO: 5.

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

En otra realización, la invención contempla composiciones que comprenden rAAV de la presente invención. Las composiciones descritas en la presente comprenden rAAV en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también pueden comprender otros componentes tales como diluyentes y adyuvantes. Los vehículos, diluyentes y adyuvantes aceptables no son tóxicos para los receptores y son preferiblemente inertes en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes como el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluidos glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA (por sus siglas en inglés); alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, pluronic o polietilenglicol (PEG, por sus siglas en inglés).

Los títulos de rAAV que se administrarán en los métodos descritos en la presente variarán dependiendo, por ejemplo, del rAAV particular, el modo de administración, el objetivo del tratamiento, el individuo y los tipos de células a los que se dirige, y se pueden determinar por métodos estándar en la técnica. Los títulos de rAAV pueden estar en el rango de aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente

1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} y aproximadamente 1×10^{14} o más partículas resistentes a ADNasa (DRP, por sus siglas en inglés) por mL. Las dosis se pueden expresar también en unidades de genomas virales (vg).

- 5 Los métodos de transducción de una célula objetivo con rAAV, *in vivo* o *in vitro*, están contemplados. Los métodos *in vivo*
comprenden el paso de administrar una dosis efectiva, o múltiples dosis efectivas, de una composición que comprende
un rAAV de la invención a un animal (incluido un humano) que lo necesite. Si la dosis se administra antes del desarrollo
de un trastorno/enfermedad, la administración es profiláctica. Si la dosis se administra después del desarrollo de un
trastorno/enfermedad, la administración es terapéutica. En realizaciones de la invención, una dosis efectiva es una dosis
que alivia (elimina o reduce) al menos un síntoma asociado con el trastorno/estado patológico que está tratándose, que
ralentiza o previene la progresión a un trastorno/estado patológico, que ralentiza o previene la progresión de un
trastorno/estado patológico, que disminuye el grado de la enfermedad, que da como resultado la remisión (parcial o total)
de la enfermedad y/o que prolonga la supervivencia. Un ejemplo de enfermedad que se puede prevenir o tratar con los
métodos descritos en la presente es la distrofia muscular, tal como la distrofia muscular de cinturas.

10 También se contemplan las terapias combinadas. La combinación como se usa en la presente incluye tanto tratamientos
simultáneos como tratamientos secuenciales. Se contemplan específicamente las combinaciones de los métodos
descritos en la presente con tratamientos médicos estándar (por ejemplo, corticosteroides), al igual que las combinaciones
con terapias novedosas.

15 Una cantidad terapéuticamente efectiva del vector rAAV es una dosis de rAAV que está en el rango de aproximadamente
1e13 vg/kg a aproximadamente 5e14 vg/kg, o de aproximadamente 1e13 vg/kg a aproximadamente 2e13 vg/kg, o de
aproximadamente 1e13 vg/kg a aproximadamente 3e13 vg/kg, o de aproximadamente 1e13 vg/kg a aproximadamente
4e13 vg/kg, o de aproximadamente 1e13 vg/kg a aproximadamente 5e13 vg/kg, o de aproximadamente 1e13 vg/kg a
aproximadamente 6e13 vg/kg, o de aproximadamente 1e13 vg/kg a aproximadamente 7e13 vg/kg, o de aproximadamente
1e13 vg/kg a aproximadamente 8e13 vg/kg, o de aproximadamente 1e13 vg/kg a aproximadamente 9e13 vg/kg, o de
aproximadamente 1e13 vg/kg a aproximadamente 1e14 vg/kg, o de aproximadamente 1e13 vg/kg a aproximadamente
2e14 vg/kg, o de aproximadamente 1e13 vg/kg a aproximadamente 3e14 vg/kg, o de aproximadamente 1e13 vg/kg a
aproximadamente 4e14 vg/kg, o de aproximadamente 3e13 vg/kg a aproximadamente 4e13 vg/kg, o de aproximadamente
3e13 vg/kg a aproximadamente 5e13 vg/kg, o de aproximadamente 3e13 vg/kg a aproximadamente 6e13 vg/kg, o de
aproximadamente 3e13 vg/kg a aproximadamente 7e13 vg/kg, o de aproximadamente 3e13 vg/kg a aproximadamente
8e13 vg/kg, o de aproximadamente 3e13 vg/kg a aproximadamente 9e13 vg/kg, o de aproximadamente 3e13 vg/kg a
aproximadamente 1e14 vg/kg, o de aproximadamente 3e13 vg/kg a aproximadamente 2e14 vg/kg, o de aproximadamente
3e13 vg/kg a aproximadamente 3e14 vg/kg, o de aproximadamente 3e13 vg/kg a aproximadamente 4e14 vg/kg, o de
aproximadamente 3e13 vg/kg a aproximadamente 5e14 vg/kg, o de aproximadamente 5e13 vg/kg a aproximadamente
6e13 vg/kg, o de aproximadamente 5e13 vg/kg a aproximadamente 7e13 vg/kg, o de aproximadamente 5e13 vg/kg a
aproximadamente 8e13 vg/kg, o de aproximadamente 5e13 vg/kg a aproximadamente 9e13 vg/kg, o de aproximadamente
5e13 vg/kg a aproximadamente 1e14 vg/kg, o de aproximadamente 5e13 vg/kg a aproximadamente 2e14 vg/kg, o de
aproximadamente 5e13 vg/kg a aproximadamente 3e14 vg/kg, o de aproximadamente 5e13 vg/kg a aproximadamente
4e14 vg/kg, o de aproximadamente 5e13 vg/kg a aproximadamente 5e14 vg/kg, o de aproximadamente 1e14 vg/kg a
aproximadamente 2e14 vg/kg, o de aproximadamente 1e14 vg/kg a aproximadamente 3e14 vg/kg, o de aproximadamente
1e14 vg/kg a aproximadamente 4e14 vg/kg, o de aproximadamente 1e14 vg/kg a aproximadamente 5e14 vg/kg. La
invención también comprende composiciones que comprenden estos rangos de vector rAAV.

20 Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de vector rAAV es una dosis de 1e13 vg/kg, aproximadamente 2e13
vg/kg, aproximadamente 3e13 vg/kg, aproximadamente 4e13 vg/kg, aproximadamente 5e13 vg/kg, aproximadamente
6e13 vg/kg, aproximadamente 7e13 vg/kg, aproximadamente 8e13 vg/kg, aproximadamente 9e13 vg/kg,
aproximadamente 1e14 vg/kg, aproximadamente 2e14 vg/kg, aproximadamente 3e14 vg/kg, aproximadamente 4e14
vg/kg y 5e14 vg/kg. La invención también comprende composiciones que comprenden estas dosis de vector rAAV.

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

30 Se puede administrar una dosis efectiva de rAAV y composiciones de la invención, por ejemplo, por administración local
o administración sistémica. Por ejemplo, la administración sistémica es la administración en el sistema circulatorio de
manera que se ve afectado todo el cuerpo. La administración sistémica incluye administración enteral tal como absorción
a través del tracto gastrointestinal y administración parental mediante inyección, infusión o implantación.

35

40

45

50

55

60

- vehículo útil para la expresión del tejido muscular, y no se conocen restricciones sobre los vehículos u otros componentes que se pueden coadministrar con el rAAV (aunque las composiciones que degradan el ADN se debe evitar de la forma habitual con rAAV). Las proteínas de la cápsida de un rAAV se pueden modificar de modo tal que el rAAV se dirija a un tejido objetivo particular de interés, tal como el músculo. Ver, por ejemplo, WO 02/053703. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar como formulaciones inyectables o como formulaciones tópicas para suministrarse a los músculos por transporte transdérmico. Se han desarrollado previamente numerosas formulaciones tanto para inyección intramuscular como para transporte transdérmico y se pueden usar en la práctica de la invención. El rAAV se puede usar con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable para facilitar la administración y manipulación.
- 5 Para fines de inyección intramuscular, se pueden emplear soluciones en un adyuvante tal como aceite de sésamo o de maní o en propilenglicol acuoso, así como soluciones acuosas estériles. Tales soluciones acuosas se pueden amortiguar, si se desea, y hacer primero que el diluyente líquido sea isotónico con solución salina o glucosa. Se pueden preparar soluciones de rAAV como ácido libre (el ADN contiene grupos fosfato ácidos) o una sal farmacológicamente aceptable en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También se puede preparar una dispersión de rAAV en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. En este sentido, todos los medios acuosos estériles empleados se pueden obtener fácilmente mediante técnicas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.
- 10 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que sea fácil de inyectar. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir por el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- 15 20 Las soluciones inyectables estériles se preparan al incorporar el rAAV en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el principio activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la técnica de liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de la solución del mismo previamente filtrada de forma estéril.
- 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- La transducción con rAAV también se puede realizar *in vitro*. En una realización, las células musculares objetivo deseadas se eliminan del sujeto, se transducen con rAAV y se reintroducen en el sujeto. Alternativamente, se pueden usar células musculares singénicas o xenogénicas cuando esas células no generen una respuesta inmunitaria inapropiada en el sujeto. En la técnica se conocen métodos adecuados para la transducción y reintroducción de células transducidas en un sujeto. En una realización, las células se pueden transducir *in vitro* al combinar el rAAV con células musculares, por ejemplo, en medios apropiados, y al seleccionar aquellas células que alberguen el ADN de interés usando técnicas convencionales tales como trasferencias tipo Southern y/o PCR, o usando marcadores seleccionables. Las células transducidas se pueden posteriormente formular en composiciones farmacéuticas, y la composición se puede introducir en el sujeto por varias técnicas, tales como la inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal, o la inyección en el músculo liso y cardíaco, usando, por ejemplo, un catéter.
- La transducción de células con el rAAV de la invención resulta en una expresión sostenida de β-sarcoglicano. En la presente se describen métodos de administración/suministro de rAAV que expresan β-sarcoglicano a un sujeto mamífero, preferiblemente un humano. Estos métodos incluyen la transducción de tejidos (que incluyen, pero no se limita, tejidos tales como músculo, órganos tales como hígado y cerebro, y glándulas tales como glándulas salivales) con uno o más rAAV de la presente invención. La transducción se puede llevar a cabo con cassetes de genes que comprenden elementos de control específicos de tejido. Por ejemplo, se describen métodos de transducción de células musculares y tejidos musculares dirigidos por elementos de control específicos del músculo, incluidos, pero no limitados, los derivados de las familias de genes de actina y miosina, tales como de la familia de genes *myoD* [Ver Weintraub *et al.*, *Science*, 251: 761-766 (1991)], el factor de unión potenciador específico de miocitos MEF-2 [Cserjesi and Olson, *Mol Cell Biol* 11: 4854-4862 (1991)], elementos de control derivados del gen de actina esquelética humana [Muscat *et al.*, *Mol Cell Biol*, 7: 4089-4099 (1987)], el gen de actina cardíaca, elementos de la secuencia de creatina cinasa muscular [ver Johnson *et al.*, *Mol Cell Biol*, 9:3393-3399 (1989)] y el elemento potenciador de creatina cinasa murina (mCK), control elementos derivados del gen esquelético de la troponina C de contracción rápida, el gen de la troponina C cardíaca de contracción lenta y el gen de la troponina I de contracción lenta: factores nucleares inducibles por hipoxia (Semenza *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*,

- 88: 5680-5684 (1991)), elementos y promotores inducibles por esteroides, incluido el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) (ver Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5603-5607 (1993)), y otros elementos de control.
- 5 El tejido muscular es un objetivo atractivo para el suministro *in vivo* de ADN, porque no es un órgano vital y es de fácil acceso. La invención contempla la expresión sostenida de miARN a partir de miofibras transducidas.
- 10 Por "célula muscular" o "tejido muscular" se entiende una célula o grupo de células derivadas de músculo de cualquier tipo (por ejemplo, músculo esquelético y músculo liso, por ejemplo, del tracto digestivo, vejiga urinaria, vasos sanguíneos o tejido cardíaco). Tales células musculares pueden estar diferenciadas o indiferenciadas, tales como mioblastos, miocitos, miotubos, cardiomiositos y cardiomieloblastos.
- 15 El término "transducción" se usa para referirse a la administración/suministro de un polinucleótido de interés (por ejemplo, una secuencia polinucleotídica que codifica el β-sarcoglicano) a una célula receptora *in vivo* o *in vitro*, por un rAAV de replicación deficiente descrito que resulta en la expresión de β-sarcoglicano por la célula receptora.
- 20 Así, también se describe en la presente una dosis efectiva (o dosis administradas esencialmente de forma simultánea o dosis administradas a intervalos) de rAAV que codifica β-sarcoglicano para su administración a un sujeto mamífero que lo necesite
- 25 La invención se describe con más detalle en los siguientes Ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.
- ### EJEMPLOS
- 25 **Materiales y métodos**
- 30 *Modelos animales.* Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Investigación del Hospital Infantil Nacional [*The Research Institute at Nationwide Children's Hospital Institutional Animal Care and Use Committee*] (protocolo AR12-00040). Los ratones heterocigotos B6.129-Sgcbtm1Kcam1/J se adquirieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE.UU.; No. de cepa 006832). Los ratones sgcb^{-/-} se generaron por la reproducción de ratones heterocigotos. Los ratones KO se reprodujeron y mantuvieron como animales homocigotos en condiciones estandarizadas en Núcleo de Recursos Animales [*Animal Resources Core*] en el Instituto de Investigación del Hospital Infantil Nacional. Los ratones se alimentaron con la dieta global para roedores Teklad (3,825 de fibra, 18,8 % de proteína, 5 % de grasa) con un ciclo de 12:12 h de oscuridad y luz. La identificación de los ratones sgcb^{-/-} se realizó por genotipado usando PCR. Todos los animales se alojaron en jaulas estándar para ratones con comida y agua *ad libitum*.
- 35 *Construcción del gen del beta-sarcoglicano.* El ADNc de longitud completa del beta-sarcoglicano humano (GenBank con No. de acceso NM_0034994.3) fue optimizado con codones y sintetizado por GenScript Inc, Piscataway, NJ, EE.UU. La optimización de codones a través de GenScript usa un algoritmo que tiene en cuenta parámetros que incluyen la transcripción, el procesamiento y la estabilidad del ARNm, la traducción y el plegamiento de proteínas para diseñar una secuencia de ADNc que resulte en la máxima expresión en el tejido muscular (www.genscript.com).
- 40 45 Para el constructo pAAV.tMCK.hSGCB, el ADNc se clonó posteriormente en un plásmido que contenía ITR de AAV-2 y el casete incluía una secuencia consenso de Kozak (CCACC), un intrón quimérico de SV40 y un sitio sintético de poliadenilación (53 pb). El promotor recombinante tMCK fue un regalo del Dr. Xiao Xiao (Universidad de Carolina del Norte). Se trata de una modificación del promotor CK6 previamente descrita (27) e incluye una modificación en el potenciador cadena arriba de la región promotora que contiene sitios de unión a factores de transcripción. El potenciador está compuesto por dos cajas E (derecha e izquierda). La modificación del promotor de tMCK incluye una mutación que convierte la caja E izquierda en una caja E derecha (modificación 2R) y una inserción de 6 pb (modificación S5). El vector pAAV.tMCK.hSGCB se construyó al ligar un fragmento KpnI/XbaI de 1040 pb de pUC57-BSG (Genscript Inc.) en los sitios KpnI/XbaI de pAAV.tMCK.hSGCA (26).
- 50 55 El vector pAAV.MHCK7.hSGCB se construyó al eliminar el promotor tMCK y el intrón quimérico SV40 con sitios NotI/KpnI y al insertar un fragmento amplificado por PCR que contenía el promotor MHCK7 y un intrón quimérico SV40 idéntico con sitios NotI/KpnI. MHCK7 es un promotor basado en MCK que usa un potenciador de 206 pb tomado de ~1,2 kb en el sitio 5' de inicio de la transcripción dentro del gen de la creatina cinasa muscular endógena con un promotor proximal (enh358MCK, 584 pb) (3, 12). El propio promotor MHCK7 contiene este casete CK7 modificado de la familia de genes MCK ligado a un potenciador α-MyHC (cadena pesada de α-miosina) de 188 pb en el 5' de la porción de CK para potenciar la expresión cardíaca (12). La porción del promotor correspondiente a la creatina cinasa (CK) es idéntica en 96 % entre la tMCK y la MHCK7. Por último, el vector pAAV.MHCK7.hSGCB se construyó al ligar el fragmento NotI/KpnI MHCK7+Intron de 960 pb de pAAV.MHCK7.DYSF5'DV44 en los sitios NotI/KpnI de pAAV.tMCK.hSGCB (Pozgai et al., *Gene Ther.* 23: 57-66, 2016)
- 60 65

Producción de rAAV. Un método modificado de empaquetamiento cruzado, descrito anteriormente por Rodino-Klapac *et al.* (*J. Trans. Med.* 5:45, 2007), se usó para producir el vector rAAV. Aquí, un método de transfección triple con precipitación de CaPO₄ en células HEK293 permite empaquetar las ITR de AAV-2 en un serotipo de cápside de AAV diferente (28, 29). Los plásmidos de producción fueron (i) pAAV.tMCK.hSGCB o pAAV.MHCK7.hSGCB, (ii) plásmidos ayudantes AAV rep2-caprh.74 modificados que codifican el serotipo 8 del aislado rh.74 y (iii) un plásmido ayudante de adenovirus tipo 5 (pAdhelper) que expresa los genes de ARN E2A, E4 ORF6 y VA I/II de adenovirus. Se purificaron los vectores y se determinó el título de vg encapsulado (usando un sistema detector Prism 7500 Taqman; PE Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.) como se ha descrito previamente (30). El cebador sentido y la sonda fluorescente tenían como objetivo el promotor tMCK y eran los siguientes: cebador sentido tMCK, 5'-ACC CGA GAT GCC TGG TTA TAA TT-3' (SEQ ID NO: 10); cebador antisentido tMCK, 5'-TCC ATG GTG TAC AGA GCC TAA GAC-3' (SEQ ID NO: 11); y sonda tMCK, 5'-FAM-CTG CTG CCT GAG CCT GAG CGG TTA C-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 12). El cebador y la sonda fluorescente tenían como objetivo el promotor de MHCK7 y eran los siguientes: Cebador sentido MHCK7, 5'-CCA ACA CCT GCT GCC TCT AAA-3' (SEQ ID NO: 16); cebador antisentido MHCK7, 5'-GTC CCC CAC AGC CTT GTT C-3' (SEQ ID NO: 17); y sonda MHCK7, 5'-FAM-TGG ATC CCC-Zen-TGC ATG CGA AGA TC-3IABKFQ-3' (SEQ ID NO: 18).

Suministro intramuscular de genes. Para la inyección intramuscular, los ratones fueron anestesiados y mantenidos bajo 1-4 % de isoflurano (en O₂). El compartimento anterior de la extremidad inferior izquierda de ratones *sgcb*^{-/-} de 4 a 6 semanas de edad se limpió con EtOH al 95 % y posteriormente se inyectó en el músculo transverso abdominal (TA) con 3×10¹¹ vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB diluido en solución salina en un volumen de 30 µL usando una jeringa de insulina ultrafina de calibre 30. El músculo contralateral se dejó sin tratar para que sirviera de control. Se extrajo el músculo TA de ambas extremidades en las semanas 6 (n = 9, 4 machos, 5 hembras) o 12 (n = 6, 4 machos, 2 hembras) posteriores a la inyección para valorar la eficiencia de la transferencia génica. En los experimentos con ratones de 6 meses de edad (n = 5, 5 machos), el tratamiento consistió en la inyección intramuscular en el TA izquierdo con 3×10¹¹ vg de scAAVrh.74.tMCK.hSCGB. Para los experimentos de perfusión de extremidades aisladas, los ratones *sgcb*^{-/-} fueron perfundidos a las semanas 4 (n = 5, 5 machos) y 5 (n = 4, 2 machos, 2 hembras) de edad con 5×10¹¹ vg de scAAVrh.74.tMCK.hSCBB por inyección en la arteria femoral como se ha descrito previamente (19). Se practicó la eutanasia a los animales y se analizaron los músculos 8 semanas después de la transferencia génica.

Suministro sistémico de genes: El suministro sistémico se logró a través de la inyección del vector en la vena de la cola de ratones *sgcb*^{-/-}. Los ratones fueron inyectados con 1×10¹² vg de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB diluido en solución salina en un volumen de 212 µL usando una jeringa de insulina ultrafina de calibre 30. Se sujetó a los ratones en un tubo de sujeción colocando la cola hacia atrás a través de la ranura de la cola para calentarla con el fin de dilatar los vasos sanguíneos para facilitar la inyección. Después de localizar la arteria en la línea central de la cola, la inyección se realizó en una de las venas laterales moradas/azules que discurren junto a la arteria de la cola. Todos los ratones tratados fueron inyectados a las 4-5 semanas de edad y eutanasiados 6 meses después de la inyección.

Generación de fuerza EDL y protección contra contracciones excéntricas. Se realizó un análisis fisiológico de los músculos EDL de ratones tratados por perfusión aislada (ILP). El músculo EDL de ambas extremidades traseras inferiores de los ratones tratados se disecó a nivel de los tendones y se sometió a un protocolo de fisiología para la valoración de la función descrito previamente por nuestro laboratorio y otros (19, 31) con algunas adaptaciones. Durante el protocolo de contracción excéntrica, se ejecutó un procedimiento de estiramiento-realargamiento de 5 % entre 500 y 700 ms (estiramiento del 5 % por 100 ms, seguido de un retorno a la longitud óptima en 100 ms). Después del protocolo de contracción tetánica y excéntrica, se extrajo el músculo, se pesó en húmedo, se montó en pinza usando goma de tragacanto y posteriormente se congeló en metilbutano enfriado en nitrógeno líquido.

Generación de fuerza TA y protección contra contracciones excéntricas. Se realizó un protocolo para valorar los resultados funcionales en el músculo TA en músculos extraídos de ratones tratados por inyección IM. Este procedimiento de TA se describe en varios estudios anteriores (32, 33). Posteriormente, después de las contracciones excéntricas, se practicó la eutanasia a los ratones y se diseccionó el músculo TA, se pesó y se congeló para su análisis. El análisis de los datos se realizó a ciegas pero no aleatoriamente.

Inmunofluorescencia. Las secciones de criostato (12 µm) se incubaron con un anticuerpo primario monoclonal betasarcoglicano humano (Leica Biosystems, New Castle, Reino Unido; No. de catálogo NCL-L-b-SARC) a una dilución de 1:50 en un amortiguador de bloque (1×TBS, por sus siglas en inglés, 10 % de suero de cabra, 0,1 % de Tween) por 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Las secciones se lavaron posteriormente con TBS tres veces, cada una por 20 min, y se volvieron a bloquear por 30 min. Se usó un anticuerpo secundario IgG1 antiratón de cabra conjugado con AlexaFluor 594 (Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.; No. de catálogo A21125) a una dilución de 1:250 por 45 minutos. Las secciones se lavaron en TBS tres veces por 20 min y se montaron con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Se tomaron cuatro imágenes aleatorias a 20X que cubrían los cuatro cuadrantes diferentes de la sección muscular usando una cámara Zeiss AxioCam MRC5. Se determinó el porcentaje de fibras positivas para la tinción de betasarcoglicano (450 % de la intensidad de tinción de la membrana muscular) para cada imagen y se hizo un promedio para cada músculo.

Análisis de inmunotransferencia tipo Western. Se recolectaron secciones de tejido del músculo TA izquierdo tratado y del músculo TA derecho contralateral (20-20 µm de grosor) en una microcentrifuga y se homogeneizaron con 100 µL de amortiguador de homogeneización (125 mM de Tris-HCl, 4 % SDS, 4 M urea) en presencia de 1 comprimido de cóctel

inhibidor de proteasa (Roche, Indianápolis, IN, EE.UU.). Despues de la homogeneización, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. Las proteínas se cuantificaron en NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Las muestras de proteínas (20 µg) se electroforizaron en un gel de poliacrilamida y acetato de Tris al 3-8 % (NuPage, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) por 1 h 5 min a 150 V y posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF (por sus siglas en inglés, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE.UU.) por 1 h 15 min a 35 V. La membrana se bloqueó en leche en polvo descremada al 5 % en TBST por 1 h, y posteriormente se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo contra el beta-sarcoglicano humano (Novus Biologicals, Littleton, CO, EE.UU.; No. de catálogo NBP-1-90300 dilución 1:100 o 1:250) y una dilución 1:5000 de un anticuerpo monoclonal de ratón gamma-tubulina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; No. de catálogo T6557) o una dilución 1:5000 de un anticuerpo monoclonal de ratón α-actinina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.; No. de catálogo A7811). Una dilución 1:500 de un anticuerpo policlonal de conejo contra la troponina I cardíaca de ratón (Abcam, Cambridge, MA; No. de catálogo ab47003) y una dilución 1:1000 de un anticuerpo monoclonal de conejo contra vinculina de ratón (Invitrogen, Frederick, MD; No. de catálogo 70062). Los anticuerpos secundarios para HRP (por sus siglas en inglés) de anti-ratón (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.; No. de catálogo AP308P) y de anti-conejo (Life Technologies; No. de catálogo 656120) se usaron para la inmunodetección ECL.

15 Ensayo EBD. Se administró una dosis de 3×10^{10} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB a ratones *sgcb^{-/-}* de 4 semanas de edad en el TA izquierdo por una inyección intramuscular. Cuatro semanas posteriores a la inyección, se injectó a los ratones en la cavidad intraperitoneal del lado derecho 5 µL/g de peso corporal de un EBD (por sus siglas en inglés) esterilizado por filtro de 10 mg/mL en solución amortiguadora de fosfato 1x. Posteriormente, se sacrificaron los ratones 24 h posteriores a la inyección y se cosecharon y seccionaron los tejidos. Las secciones se fijaron en acetona fría por 10 minutos y posteriormente se usó el protocolo de inmunofluorescencia para tinción de beta-sarcoglicano humano.

20 Análisis morfométrico. Se determinaron los diámetros de las fibras musculares y el porcentaje de miofibras con núcleos localizados centralmente a partir de músculos TA y GAS teñidos con hematoxilina y eosina (H&E). Se tomaron cuatro imágenes aleatorias a 20X por sección y por animal con una cámara Zeiss AxioCam MRC5. Las fibras nucleadas centralmente se cuantificaron usando el software NIH ImageJ (Bethesda, MD, EE.UU.). Los diámetros de las fibras se midieron como el diámetro más corto a través de la fibra muscular usando el software Zeiss Axiovision LE4 (Carl Zeiss Microscopy, Munich, Alemania).

25 Análisis qPCR de biodistribución. Se realizó una PCR cuantitativa Taqman para cuantificar el número de copias del genoma del vector presentes en el músculo contralateral objetivo y no objetivo, así como en los órganos no objetivo, tal y como se ha descrito previamente (18, 30). Se usó un conjunto de sondas cebadoras específicas del vector para amplificar una secuencia de la región intrónica directamente aguas abajo del promotor tMCK que es única y se encuentra dentro del casete del transgén scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. En este estudio se usaron los siguientes cebadores y sondas: Cebador sentidotMCK e intrón MHCK7 5'-GTG AGG CAC TGG GCA GGT AA -3' (SEQ ID NO: 13); cebador antisentido tMCK e intrón MHCK7 5'-ACC TGT GGA GAG AAA GGC AAA G -3' (SEQ ID NO: 14); y sona tMCK e intrón MHCK7 5'-6FAM-ATC AAG GTT ACA AGA CAG-GTT TAA GGA GAC CAA TAG AAA -tamra-3' (IDT) (SEQ ID NO: 15). El número de copias se indica como genomas vectoriales por microgramo de ADN genómico. *Inmunohistoquímica para tinción de células inmunitarias.* Se usó inmunohistoquímica para identificar las células inmunitarias. Se incubaron secciones de tejido congeladas en portaobjetos de microscopio Fisherbrand Superfrost cargados con anticuerpos monoclonales anti-ratón de rata usando un kit de detección HRP de Ig anti-rata (BD Pharmingen, San Jose, CA, EE.UU.; No. de catálogo 551013); CD3 (No. de catálogo 555273), CD4 (No. de catálogo 550280), CD8 (No. de catálogo 550281) y Mac-3 para macrófagos (No. de catálogo 550292). Todos los anticuerpos primarios se diluyeron a 1:20 con solución salina amortiguada con fosfato. La tinción inmunológica positiva se visualizó usando cromágeno DAB (por sus siglas en inglés) diluido en amortiguador DAB con estreptavidina-HRP peroxidasa vectastain ABC Peroxidasa. Se tomaron diez imágenes aleatorias a 40X para cada músculo y cada tinción correspondiente. Se contó el número de células mononucleares y se expresó como número total por mm².

30 Tinción con rojo de Picrosírius y cuantificación del colágeno. Las secciones congeladas colocadas en portaobjetos cargados con Superfrost de Fisherbrand se fijaron en formol amortiguado neutro al 10 % por 5 minutos y posteriormente se enjuagaron en agua destilada. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron en la solución A (ácido fosfomolibíco) del kit de tinción de rojo de Picrosírius (Polysciences Inc., Warrington, PA, EE.UU.; No. de catálogo 24901) por 2 minutos. Despues de un enjuague minucioso en agua destilada, los portaobjetos se colocaron en la solución B (Direct Red 80/2 4 6-Trinitrofenol) por 15 min, seguido de un enjuague adicional en agua destilada y posteriormente se incubaron en la solución C (ácido clorhídrico 0,1 N) por 2 min. Los portaobjetos se contrateñían por 2,5 min con verde Fast al 1 % en ácido acético glacial al 1 % de Poly Scientific (No. de catálogo S2114) usando una dilución 1:10 en agua destilada. Finalmente, los portaobjetos se enjuagaron de nuevo en agua destilada, se deshidrataron en etanol graduado, se aclararon en xileno y se montaron con cubreobjetos usando el medio Cytoseal 60 de Thermo-Scientific (Waltham, MA, EE.UU.; No. de catálogo 8310). Las imágenes se tomaron usando el software AxioVision 4.9.1 (Carl Zeiss Microscopy). Para el análisis de la tinción con rojo de Sirius y la cuantificación del % de colágeno, se potenció el contraste entre los colores rojo y verde usando Adobe Photoshop. Se seleccionó el plugin de deconvolución de color del programa de software ImageJ y se usó la opción de deconvolución de color RGB. La imagen roja incluye todo el tejido conjuntivo de la tinción de rojo de Sirius. La imagen verde incluye todo el músculo de la contratinación verde Fast. Solamente se usaron la imagen roja y la imagen original. Posteriormente se aplicó un umbral a las imágenes para obtener imágenes en blanco y negro con las zonas positivas para el colágeno en negro y las negativas en blanco. Usando la función de medida, se calculó el área de colágeno. Posteriormente se determinó el área total de tejido al convertir la imagen original a "8 bits" y ajustando el umbral

a 254, que estará una unidad por debajo de saturar completamente la imagen. Posteriormente se midió el área total de tejido como se hizo anteriormente y se registró el área total. Posteriormente se calculó el porcentaje de colágeno al dividir el área de colágeno entre el área total de tejido. Posteriormente se calculó el porcentaje medio de cada individuo.

- 5 *Contracción tetánica del diafragma para la valoración funcional:* Se practicó la eutanasia a los ratones y se disecó el diafragma con las uniones costales y el tendón central intactos, y se colocó en amortiguador K-H según lo descrito previamente por Beastrom *et al.* (*Am. J. Pathol.* 179: 2464-74, 2011), Rafael-Forney *et al.* (*Circulation* 124: 582-8, 2011 y Moorwood *et al.* (*J. Visualized Experiments* 71:e50036 [año?]). Se aisló una sección de diafragma de 2-4 mm de ancho. Las tiras de diafragma se ataron firmemente con seda quirúrgica trenzada (6/0; Surgical Specialties, Reading, PA) en el tendón central, y se suturaron a través de una porción de hueso costal fijada al extremo distal de la tira. Cada músculo se transfirió a un baño de agua lleno de solución de K-H oxigenada que se mantuvo a 37 °C. Los músculos se alinearon horizontalmente y se ataron directamente entre un pasador fijo y un transductor de fuerza-servomotor de modo dual (305C; Aurora Scientific, Aurora, Ontario, Canadá). Se colocaron dos electrodos de platino en el baño del órgano para flanquear la longitud del músculo, que se estiró hasta alcanzar la longitud óptima para medir las contracciones y posteriormente se dejó reposar por 10 minutos antes de iniciar el protocolo tetánico. Una vez estabilizado el músculo, se ajusta a una longitud óptima de 1 g y se somete a un calentamiento que consiste en tres sacudidas de 1 Hz cada 30 segundos, seguidas de tres sacudidas de 150 Hz cada minuto. Después de un periodo de reposo de 3 minutos, se estimula el diafragma a 20, 50, 80, 120, 150 y 180 Hz, dejando un periodo de reposo de 2 minutos entre cada estímulo, cada uno con una duración de 250 ms para determinar la fuerza tetánica máxima. Se midió la longitud y el peso de los músculos. La fuerza se normalizó según el peso y la longitud del músculo.

Resonancia magnética cardíaca: La función cardíaca se analizó usando un sistema de imagenología por resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés) de 9,4 T de diámetro horizontal y una bobina de volumen para ratones (Bruker BioSpin, Billerica, MA, EE.UU.). Se anestesió a los ratones con isofluorano al 2,5 % mezclado con carbógeno (1 L/min) por 3 minutos antes de colocarlos en el lecho de imagenología. Una vez colocados los ratones en el aparato de imagenología e iniciada la imagenología, la mezcla de isofluorano/carbógeno se redujo al 1,5 % por el resto del estudio. El electrocardiograma y la respiración se monitorizaron usando un sistema compatible con MRI (Modelo 1025, Small Animal Instruments, Stonybrook, NY, EE.UU.). Se adquirieron imágenes cardíacas ponderadas en T1 con FLASH de eje corto en todo el ventrículo izquierdo (VI) del ratón (TR = 8 ms; TE = 2,8 ms; \square = 18 o; matriz = 256×256; FOV = 3,0×3,0 cm; grosor de corte = 1 mm, número de cortes = 7, hasta 20 fotogramas por ciclo cardíaco). Para el análisis de las imágenes, se identificaron los puntos temporales de fin de diástole y fin de sístole de cada imagen de eje corto y se trazaron manualmente los límites cardíacos endocárdico y epicárdico. Los músculos papilares se excluyeron del límite endocárdico del LV (por sus siglas en inglés). A partir de estas áreas medidas, se calcularon el volumen telediastólico (EDV), el volumen telesistólico (ESV), el volumen sistólico (SV), el gasto cardíaco (CO), la fracción de eyección (EF) y la masa media del LV (por sus siglas en inglés, respectivamente).

Inmunofluorescencia: Las secciones criostáticas (12 μ m) de los músculos tibial anterior (TA), gastrocnemio (GAS), cuádriceps (QUAD), psoas mayor (PSOAS), glúteo (GLUT), tríceps (TRI) y diafragma (por sus siglas en inglés, respectivamente), junto con el corazón, se sometieron a tinción de inmunofluorescencia para el transgén hSGCB mediante nuestro protocolo previamente usado, descrito en Pozgai *et al.*, *Gene Therap.* 23: 57-66, 2016. Las secciones se incubaron con un anticuerpo primario monoclonal de ratón beta-sarcoglicano humano (Leica Biosystems, New Castle, Reino Unido; No. de catálogo NCL-L-b-SARC) a una dilución de 1:100. Se tomaron cuatro imágenes aleatorias a 20X que cubrían los cuatro cuadrantes diferentes de la sección muscular usando una cámara Zeiss AxioCam MRC5. El porcentaje de fibras positivas para la tinción de beta-sarcoglicanos (> 50 % de la tinción de la membrana muscular) se determinó para cada imagen y se promedió para cada músculo.

Análisis morfométrico: Se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) en criosecciones de 12 μ m de grosor de músculo de ratones C57/BL6 WT de 7 meses de edad (n = 5), ratones *sgcb*^{-/-} (n = 5) y ratones *sgcb*^{-/-} tratados con rAAV.MHCK7.hSGCB por 6 meses (n = 5) para su análisis. Se determinó el porcentaje de miofibras con núcleos centrales en los músculos TA, GAS, QUAD, PSOAS, GLUT, TRI y diafragma. Adicionalmente, se midieron los diámetros de las fibras musculares en los músculos GAS, PSOAS y TRI. Se tomaron cuatro imágenes aleatorias de 20X por músculo por animal con una cámara Zeiss AxioCam MRC5. Las fibras nucleadas centralmente se cuantificaron usando el software NIH ImageJ y los diámetros de las fibras se midieron usando el software Zeiss Axiovision LE4.

55 *Imágenes de rayos X:* Se realizaron radiografías de cuerpo entero en ratones C57/BL6 WT anestesiados de 7 meses de edad (n = 6), ratones *sgcb*^{-/-} sin tratar (n = 6) y ratones *sgcb*^{-/-} tratados con rAAV.MHCK7.hSGCB por 6 meses (n = 6) usando el sistema digital de rayos X Faxitron MX-20 a 26kV por 3 segundos (Faxitron X-Ray Corp, Lincolnshire, EE.UU.).

Supervisión láser de la actividad en jaulas de campo abierto: Se usó una cámara de actividad en campo abierto para determinar la actividad general de los ratones experimentales. Los ratones de 7 meses de edad de los grupos de control C57/BL6 WT (n = 6) y *sgcb*^{-/-} sin tratar (n = 6) junto con los ratones *sgcb*^{-/-} tratados con rAAV.MHCK7.hSGCB por 6 meses (n = 6) fueron sometidos a análisis siguiendo un protocolo descrito previamente (Kobayashi *et al.*, *Nature* 456: 511-5, 2008, Beastrom *et al.*, *Am. J. Pathol.* 179: 2464-74, 2011) con varias modificaciones. Todos los ratones fueron sometidos a la prueba a la misma hora del día, a primera hora de la mañana, posteriormente al final del ciclo nocturno, cuando los ratones son más activos. Todos los ratones fueron sometidos a la prueba en una habitación aislada, con luz tenue y con el mismo manipulador cada vez. Para reducir la ansiedad y mantener al mínimo las variables de comportamiento, que

podrían afectar a la actividad normal de los ratones y, en consecuencia, a los resultados del ensayo, los ratones sometidos a prueba no se alojaron individualmente (Voikar *et al.*, *Genes Brain Behav.* 4: 240-52, 2005). Se monitorizó la actividad de los ratones usando el sistema de actividad Photobeam (San Diego Instruments, San Diego, CA). Este sistema usa una rejilla de haces de luz infrarroja invisible que atraviesan la cámara del animal de delante hacia atrás y de izquierda a derecha para controlar la posición y el movimiento del ratón dentro de un plano X-Y-Z. La actividad se registró por ciclos de 1 hora a intervalos de 5 minutos. Los ratones se aclimataron a la sala de pruebas de actividad por una sesión inicial de 1 hora varios días antes de comenzar la adquisición de datos. Los ratones fueron probados en cámaras individuales en grupos de 4. El equipo de pruebas se limpiaba entre cada uso para reducir las variables de comportamiento reactivo de los ratones que pudieran alterar nuestros resultados. Los datos recolectados se convirtieron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel y todos los cálculos se realizaron dentro del programa Excel. Se sumaron las interrupciones individuales de los haces para el movimiento en los planos X e Y de cada ratón para representar la deambulación total, y se sumaron las interrupciones de los haces en el plano Z para obtener la actividad vertical dentro del intervalo de tiempo de 1 hora.

Ejemplo 1

Construcción y potencia del vector scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

Se construyó el casete transgénico que contiene un ADNc de SCGB humano de longitud completa con codones optimizados, tal y como se muestra en la Figura 1A. El casete incluye una secuencia consenso de Kozak (CCACC), un intrón químérico de SV40, un sitio de poliadenilación sintético y el promotor tMCK específico de músculo (20) usado para impulsar la expresión del casete. El casete se empaquetó en un vector AAVrh.74 autocomplementario (sc) que es homólogo en 93 % al AAV-8. Se ha demostrado en ratones y primates no humanos que el AAVrh.74 es seguro y efectivo, particularmente al atravesar la barrera vascular cuando se administra al músculo a través de la circulación (17, 18, 21). La potencia del vector se estableció por inyección intramuscular en el músculo TA izquierdo en el ratón *sgcb*-nulo. El suministro de 3×10^{10} vg transducía $70,5 \pm 2,5$ % de las fibras musculares y 1×10^{11} vg transducía $89,0 \pm 4,0$ % de las fibras musculares, 3 semanas posteriores a la transferencia génica.

Ejemplo 2

Suministro intramuscular de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

Después de la potencia del vector, los estudios se ampliaron para analizar la eficacia de la terapia 6 y 12 semanas posteriores a la transferencia génica. Como resultado de los altos niveles de expresión después del breve estudio de potencia de 3 semanas, se seleccionó una dosis de 3×10^{10} vg totales para los estudios subsecuentes a fin de usar la dosis efectiva más baja. Los ratones *sgcb*^{-/-} de cinco semanas de edad fueron tratados con 3×10^{10} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSCGB intramuscularmente en el transverso abdominal izquierdo (TA) y la expresión de β-sarcoglicano fue demostrada por inmunofluorescencia en $88,4 \pm 4,2$ % de las fibras musculares 6 semanas posteriores a la inyección (*n* = 9), y en $76,5 \pm 5,8$ % de las fibras musculares 12 semanas posteriores a la inyección (*n* = 6), y la expresión fue confirmada por inmunotransferencia tipo Western (Figura 1B). La expresión de β-Sarcoglicano fue acompañada por la restauración de componentes del complejo proteico asociado a la distrofina (α-sarcoglicano y distrofina) (Figura 1C). Usando el tinte azul de Evans (EBD) como marcador de la permeabilidad de la membrana (22, 23) descubrimos que todas las fibras que expresaban β-sarcoglicano exógeno estaban protegidas de la fuga y de la inclusión de EBD (Figura 1D). El músculo de los ratones *sgcb*^{-/-} presenta una distrofia muscular grave con fibras nucleadas centralmente, necrosis frecuente de las fibras musculares, tejido fibrótico y una variabilidad significativa del tamaño de las fibras representada tanto por fibras atróficas como hipertróficas (3, 4). Como se observa en la Figura 2A, la tinción con hematoxilina y eosina muestra una mejora general del fenotipo distrófico del músculo enfermo, incluida una reducción de los núcleos centrales (*sgcb*^{-/-} sin tratar $76,8 \pm 2,3$ % contra AAV.hSCGB tratados $38,86 \pm 3,5$ %; *p* < 0,0001) (Figura 2C). También se observó una normalización de la distribución del tamaño de las fibras, con un aumento del diámetro medio de las fibras después del tratamiento (*sgcb*^{-/-} sin tratar $32,6 \pm 0,31$ μm contra tratado con AAV.hSGCBs $35,56 \pm 0,22$ μm; *p* < 0,0001) (Figura 2D).

El sello histopatológico del ratón *sgcb*^{-/-} es la fibrosis caracterizada por la sustitución generalizada del tejido muscular principalmente por colágeno junto con otros componentes de la matriz extracelular tales como fibronectina, elastina, laminina y decorina (14). Esta sustitución del tejido muscular por tejido conectivo desafía el valor potencial del reemplazo génico y puede limitar el grado de mejora (24). Para probarlo, se evaluó la reducción de la fibrosis en ratones tratados por 12 semanas. El músculo TA se valoró específicamente porque su grado inherente de fibrosis se estableció en el modelo KO y porque representa un objetivo potencial tras el suministro vascular de genes ILP. La tinción con rojo de Picosirius para colágeno, tipos I y III, de los músculos TA mostró una reducción significativa (52,74 %) en la cantidad de colágeno presente en el músculo tratado con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB en comparación con el músculo de ratón *sgcb*^{-/-} sin tratar ($20,7 \pm 0,57$ % contra $43,8 \pm 2,3$ %, tratado con AAV.hSGCBs contra *sgcb*^{-/-} sin tratar, respectivamente; *p* < 0,0001) (Figuras 2B y 2E). El músculo *sgcb*^{-/-} sin tratar de ratones de 5 semanas de edad a la edad de la inyección tenía una deposición de colágeno del $24,05 \pm 1,5$ %, lo que indica que hubo una ligera reducción (14,0 %) de la cantidad de colágeno después de las 12 semanas de tratamiento.

Ejemplo 3

Corrección funcional del músculo esquelético después de la transferencia del gen scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

Para determinar si la transferencia del gen hSGCB puede mejorar la función muscular, evaluamos las propiedades funcionales del músculo TA de ratones *sgcb^{-/-}* tratados con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. Después del suministro intramuscular con 3×10^{10} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB en el TA de ratones *sgcb^{-/-}* de 4 semanas de edad, 6 semanas después del tratamiento los músculos TA fueron sometidos a mediciones de fuerza *in situ* (n = 4). Los músculos tratados se compararon con los contralaterales sin tratar y con los de ratones C57/BL6 WT. Los músculos tratados con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB mostraron una mejora significativa tanto en la fuerza tetánica absoluta como en la fuerza específica normalizada (Figuras 3A y 3B). Los músculos tratados tenían una fuerza absoluta promedio de $1436,9 \pm 199,5$ mN en comparación con $770,9 \pm 118,3$ mN para los controles *sgcb^{-/-}* sin tratar ($p < 0,01$). Del mismo modo, los músculos TA tratados produjeron una fuerza específica promedio de $254,01 \pm 6,9$ mN/mm² y los músculos sin tratar produjeron $124,2 \pm 13,9$ mN/mm² de fuerza ($p < 0,01$). Por último, los músculos tratados con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB mostraron una mayor resistencia a la lesión inducida por contracción en comparación con los músculos de control sin tratar (Figura 3C). Los músculos AT tratados perdieron $34,0 \pm 5,1$ % de fuerza respecto a la producida tras la primera contracción, mientras que el músculo enfermo sin tratar perdió $54,1 \pm 3,8$ % ($p < 0,01$) de fuerza después del protocolo de contracción excéntrica. Estos datos demuestran que la transferencia del gen hSGCB proporciona un beneficio funcional al músculo enfermo deficiente en β-sarcoglicano.

Ejemplo 4

Tratamiento de músculo envejecido con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

Los estudios sobre la progresión de la enfermedad en este modelo de ratón de LGMD2E han demostrado que, aunque la remodelación tisular más grave en el músculo se produce entre las 6 y las 20 semanas, la histopatología del músculo sigue empeorando con la edad, asemejándose a la progresión de la enfermedad en los pacientes (3, 4, 14). Por consiguiente, para imitar un contexto clínico en el que el tratamiento se produciría a una edad más avanzada con un deterioro muscular y una fibrosis endomisio más avanzados, tratamos ratones *sgcb^{-/-}* de 6 meses de edad (n = 5) por vía intramuscular en la TA con 3×10^{10} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. Después de 12 semanas de tratamiento, a los 9 meses de edad, $80,1 \pm 4,8$ % de las fibras musculares estaban transducidas (Figura 4A). La tinción con rojo de Picrosirius para los tipos I y III de colágeno mostró una reducción de 42,2 % en la cantidad de colágeno presente en los ratones tratados en comparación con el músculo de ratón *sgcb^{-/-}* sin tratar (tratado con AAV.hSGCB $20,0 \pm 0,80$ % contra *sgcb^{-/-}* sin tratar $34,6 \pm 1,4$ %, $p < 0,0001$) (Figuras 4B y 4C). A la edad del tratamiento, los ratones *sgcb^{-/-}* de 6 meses tienen $30,8 \pm 2,0$ % de deposición de colágeno (n = 4, 4 machos); así, estos resultados indican que el tratamiento con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB no solamente previene, sino que también tiene el potencial de revertir la fibrosis existente.

Ejemplo 5

ILP de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB en ratones *sgcb^{-/-}*

La capacidad de dirigirse a múltiples músculos de una extremidad permite un método de suministro clínicamente más relevante para su aplicación en pacientes con LGMD2E. Se analizó el suministro de 5×10^{11} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB por ILP en ratones *sgcb^{-/-}* de 4 a 6 semanas de edad (n = 9, 7 machos, 2 hembras) 2 meses después de la transferencia génica. La expresión de β-Sarcoglicano alcanzó $91,8 \pm 4,7$ % de las fibras en el músculo gastrocnemio (GAS) y $90,6 \pm 2,8$ % en el TA (Figura 5A). El suministro ILP de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB resultó en una protección significativa contra la lesión inducida por contracción excéntrica ($p < 0,05$), que no fue diferente de WT, en comparación con los músculos contralaterales sin tratar (Figura 5C). El suministro vascular también restableció los parámetros histopatológicos del músculo (Figura 5B). Los núcleos centrales disminuyeron en el TA (*sgcb^{-/-}* sin tratar $76,9 \pm 2,8$ % contra tratado con AAV.hSGCB $23,2 \pm 5,7$ %, $p < 0,001$) y GAS (*sgcb^{-/-}* sin tratar $78,2 \pm 2,4$ % contra tratado con AAV.hSGCB $16,8 \pm 6,6$ %, $p < 0,001$). La transferencia génica también produjo un aumento del tamaño promedio de las fibras en el TA (*sgcb^{-/-}* sin tratar $30,53 \pm 0,52$ μm contra tratado con AAV.hSGCB $41,9 \pm 0,46$ μm; $p < 0,0001$) y el SGA (*sgcb^{-/-}* sin tratar $38,9 \pm 0,37$ μm contra AAV.hSGCB $33,3 \pm 0,44$ μm; $p < 0,0001$), con normalización de la distribución del diámetro de las fibras, se observó una disminución sustancial (~60 %) del número de células CD3, células CD4 y macrófagos (Tabla 1).

Tabla 1. Respuesta inmunitaria en ratones tratados con ILP scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

Tipo de célula	Células de TA izquierdo tratado / mm ²	Células de TA izquierdo sin tratar / mm ²	Células de TA sin inyectar <i>sgcb^{-/-}</i> / mm ²
CD3	$15,6 \pm 3,2$	$37,85 \pm 6,2$	$29,8 \pm 1,7$
CD4	$20,9 \pm 4,7$	$58,1 \pm 2,9$	$49,0 \pm 0,8$
CD8	$8,2 \pm 1,8$	$12,7 \pm 2,4$	$15,5 \pm 5,8$
Macrófagos	$28,2 \pm 5,0$	$75,2 \pm 5,6$	$100,2 \pm 5,9$

Tabla 1. Respuesta inmunitaria en ratones tratados con ILP scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

Tipo de célula	Células de TA izquierdo tratado / mm ²	Células de TA izquierdo sin tratar / mm ²	Células de TA sin inyectar <i>sgcb</i> ^{-/-} / mm ²
Abreviaturas: ANOVA, análisis de la varianza; ILP, perfusión de extremidad aislada; SGCB, β-sarcoglicano; TA, tibial anterior. Cuantificación de las células inmunitarias presentes en los ratones SGCB ^{-/-} no inyectados, y en el músculo scAAVrh.74.tMCK.hSGCB tratado y sin tratar. Los datos mostrados son posteriores al suministro de virus por ILP y representan el número promedio de células/mm ³ ± SEM, n = 8 por grupo. Se usó un ANOVA unidireccional para comparar los valores de las tres cohortes diferentes. Los niveles de células inmunitarias disminuyeron con una diferencia estadísticamente significativa (p < 0,01) entre el TA izquierdo tratado y el TA derecho sin tratar y/o el TA izquierdo tratado y el TA no inyectado en todas las tinciones excepto para CD8.			

La tinción con rojo de Picrosírius de los músculos TA y GAS también mostró una reducción significativa de la cantidad de colágeno en comparación con el músculo *sgcb*^{-/-} sin tratar tras el suministro vascular (Figura 6A). Los niveles de colágeno en el TA se redujeron a $21,6 \pm 1,3\%$ en el músculo tratado en comparación con $40,2 \pm 1,5\%$ en los ratones *sgcb*^{-/-} sin tratar a la edad del punto final ($p < 0,0001$). Como se indicó anteriormente, los ratones *sgcb*^{-/-} a la edad de la inyección presentaban $24,1 \pm 1,5\%$ de colágeno en el músculo TA, lo que indica de nuevo una ligera reducción (10,0 %) en la deposición de colágeno después de 8 semanas de tratamiento. Del mismo modo, la tinción del músculo GAS mostró que los ratones tratados tenían $22,9 \pm 0,99\%$ de colágeno en comparación con $37,9 \pm 1,3\%$ de los ratones *sgcb*^{-/-} sin tratar en el punto final ($p < 0,0001$). Se realizó una PCR cualitativa para detectar los niveles de transcripción de colágeno en el músculo, que se correlacionan con los resultados de la tinción con rojo de Sirius. En conjunto, estos datos demuestran que el suministro mediado por AAV de β-sarcoglicano humano reduce la fibrosis muscular, mejora la funcionalidad muscular e invierte la patología distrófica del músculo *sgcb*^{-/-} enfermo.

Ejemplo 6

Seguridad y biodistribución de rAAVrh.74.tMCK.hSGCB

Inicialmente, los ratones normales WT inyectados con 3×10^{10} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB intramuscularmente en el TA no mostraron signos de toxicidad por tinción H&E indicando que no había efectos adversos debidos al virus. Después del suministro vascular ILP de una dosis total de 5×10^{11} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB como se describe en la sección anterior, se valoró la seguridad en un pequeño grupo de ratones de esta cohorte ($n = 4$). En primer lugar, se analizaron histológicamente los músculos objetivo con una expresión génica significativa, así como los órganos fuera del objetivo, como el corazón, el pulmón, el hígado, el riñón, el bazo, las gónadas y el diafragma. Las secciones de parafina fueron revisadas formalmente por un patólogo veterinario y no se observaron indicios de toxicidad en ningún órgano (datos no mostrados). La expresión de proteínas y la biodistribución del vector también se valoraron en todos los tejidos y órganos mencionados por inmunotransferencia tipo Western y qPCR, respectivamente. Se detectaron copias del genoma del vector en todos los órganos probados; sin embargo, no se detectó expresión proteica en ninguna muestra, salvo en el músculo tratado (Figura 7). Por último, un análisis de los pesos en húmedo del músculo tratado y sin tratar no muestra diferencias ni tendencias significativas al comparar los pesos promedios de ambas cohortes (datos no mostrados). Estos datos demuestran que el promotor tMCK específico del músculo restringe la expresión al músculo esquelético y que el vector no es tóxico.

Ejemplo 7

Déficits histológicos y funcionales en el corazón y el diafragma de ratones *sgcb*^{-/-}

Los ratones WT y *sgcb*^{-/-} de 7 meses de edad ($n = 6$ por grupo) que no fueron tratados se analizaron por MRI cardíaca y fisiología del diafragma para buscar déficits. Despues de estos análisis, los animales fueron sacrificados y evaluados histopatológicamente (Figura 8). La tinción con tricrómico mostró una fibrosis extensa (tinción roja) tanto en el diafragma (Figura 8A) como en el corazón (Figura 8C). Esto se acompañó de déficits funcionales de fuerza específica en el diafragma ($116,24 \text{ mN/mm}^2$ de *sgcb*^{-/-} contra $236,67 \text{ mN/mm}^2$ de WT, Figura 8B) y déficit significativo en la fracción de eyección medida por MRI (WT, 78 % contra *sgcb*^{-/-} 65 %, Figura 8D).

Ejemplo 8

Construcción y potencia del vector scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB

Se construyó el casete transgénico que contiene un ADNC de SCGB humano de longitud completa con codones optimizados, como se muestra en la Figura 9A. El casete incluye una secuencia Kozak de consenso (CCACC), un intrón quimérico SV40, un sitio de poliadenilación sintético y el MHCK7 específico del músculo usado para impulsar la expresión del casete. Se trata de un promotor basado en MCK que usa un potenciador de 206 pb tomado de ~1,2kb en el 5' del sitio de inicio de la transcripción dentro del gen de la creatina cinasa muscular endógena con un promotor proximal (enh358MCK, 584 pb) (3, 12). El casete se empaquetó en un vector AAVrh.74 autocomplementario (sc) que es homólogo en 93 % al AAV-8. Se ha demostrado en ratones y primates no humanos que el AAVrh.74 es seguro y efectivo,

particularmente al atravesar la barrera vascular cuando se administra al músculo a través de la circulación (17, 18, 21). La potencia del vector se estableció por inyección intramuscular en el músculo TA izquierdo en el ratón *sgcb*-nulo. El suministro de 3×10^{10} vg transducía > 90 % de las fibras musculares 4 semanas posteriores a la transferencia génica.

5 Ejemplo 9

Suministro sistémico de scAAV.MHCK7.hSGCB

10 Administramos el vector a través de una inyección en la vena de la cola a 14 ratones *sgcb*^{-/-} a una dosis de 1×10^{12} vg de dosis total (5×10^{13} vg/kg) para valorar la expresión del transgén y la eficacia de nuestro vector cuando se administra sistémicamente en un punto temporal a largo plazo de 6 meses. Los ratones se inyectaron a las 4 semanas de edad y se les practicó una necropsia completa a los 6 meses tras la inyección (se retiró 1 ratón al mes y 2 ratones a los 4 meses como valoraciones intermedias para la expresión). Se extrajeron para el análisis todos los músculos esqueléticos mencionados anteriormente, junto con el diafragma y el corazón. También se extrajeron órganos para análisis toxicológicos y de biodistribución. Se usó tinción de inmunofluorescencia para beta-sarcoglicano humano para determinar la expresión del transgén hSGCB en 5 músculos de las extremidades, tanto izquierda como derecha, además del diafragma y el corazón de 6 de los ratones KO a los que se administró una inyección sistémica del vector hSGCB. Estos músculos incluían el TA, el gastrocnemio (GAS), el cuádriceps (QUAD), el glúteo (GLUT) (no se muestra), el psoas mayor (PSOAS) y el tríceps (TRI) (Figura 10). También se usó un análisis cualitativo del tejido cardíaco para valorar el nivel 15 relativo de expresión del transgén en el músculo cardíaco tras el suministro.

20

Se tomaron cuatro imágenes a 20X de cada músculo y se determinó el porcentaje de fibras hSGCB positivas para cada imagen, resultando en el porcentaje promedio de transducción para cada músculo de cada ratón. Los resultados mostrados en las Figuras 10 y 11 demuestran una transducción ≥ 98 % en todos los músculos analizados, incluidos el diafragma y el corazón. Los ratones deficientes en β-sarcoglicano carecían por completo de la proteína cuando se analizaron por inmunofluorescencia. La dosis terapéutica de 1×10^{12} vg dosis total resultó en un promedio de $97,96 \pm 0,36$ % (\pm SEM) de transducción vectorial en todos los músculos esqueléticos, incluido el diafragma, y aproximadamente 95 % o más en el músculo cardíaco (datos no mostrados).

30 Ejemplo 10

Suministro sistémico a largo plazo de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB en ratones *sgcb*^{-/-}

35 Para aprovechar los resultados del ensayo de potencia de un mes descrito en el Ejemplo 9, se investigó el suministro sistémico a largo plazo (6 meses de duración) del casete transgénico de β-sarcoglicano a ratones *sgcb*^{-/-}. Los ratones *sgcb*^{-/-} de cuatro a cinco semanas de edad fueron tratados con 1×10^{12} vg de dosis total scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB por vía intravenosa en la vena de la cola ($n = 5$). Se necropsió a los ratones 6 meses después de la inyección y se demostró la expresión del transgén hSGCB por inmunofluorescencia en seis músculos esqueléticos, tanto izquierdo como derecho, además del diafragma y el corazón de todos los ratones tratados. Los músculos esqueléticos analizados fueron el TA, el GAS, el QUAD, el glúteo (GLUT), el PSOAS y el TRI. La expresión promedio de hSGCB resultante del suministro sistémico en ratones tratados fue de $98,13 \pm 0,31$ % (\pm SEM) en todos los músculos esqueléticos, incluido el diafragma, con una expresión en el corazón mayor a 95 %. En la Figura 12B se muestran imágenes representativas. Los niveles de expresión en cada tipo de músculo individual promediados de todos los ratones tratados se muestran en la Tabla 2. La inmunotransferencia tipo Western de la Figura 12C confirma la expresión del transgén en todos los músculos. Los valores 40 de expresión en la Tabla 2 se presentan para varios músculos como el promedio de los músculos izquierdo y derecho de ratones inyectados sistémicamente ($n = 5$). Valores indicados como Promedio \pm SEM. Además, la cuantificación de la expresión del transgén hSGCB en los corazones de los ratones tratados mediante inmunotransferencia tipo Western y densitometría indica una sobreexpresión de hSGCB de hasta 72,0 % por encima de los niveles de expresión de BL6 WT (Figura 12D), en correlación con los altos niveles cuantificados en el músculo esquelético.

45

50

Tabla 2. Expresión de β-sarcoglicano por inmunofluorescencia

Músculo	Vía de administración	Dosis (vg de dosis total)	Punto final (meses)	% Fibras que expresan SGCB
TA	IV	1e12	6	$98,88 \pm 0,55$
GAS	IV	1e12	6	$98,24 \pm 0,82$
QD	IV	1e12	6	$99,32 \pm 0,19$
GLUT	IV	1e12	6	$97,50 \pm 0,39$
PSOAS	IV	1e12	6	$98,75 \pm 0,23$
TRI	IV	1e12	6	$97,21 \pm 1,35$
Diafragma	IV	1e12	6	$97,00 \pm 1,26$

Músculo	Vía de administración	Dosis (vg de dosis total)	Punto final (meses)	% Fibras que expresan SGCB
Corazón	IV	1e12	6	≥ 95 %

Una característica importante del músculo *sgcb*^{-/-} descrita en informes anteriores (Araishi *et al.*, *Hum. Mol. Genet* 8: 1589-98, 1999; Durbeel *et al.*, *Mol. Cell.* 5:141-51, 2000) e ilustrada por la tinción de hematoxilina y eosina del SGA y el diafragma en la Figura 13A es una patología distrófica grave que incluye nucleación central, necrosis, infiltración inflamatoria y fibrosis. La transferencia génica mejoró significativamente esta patología, aliviando muchos de estos atributos distróficos (Figura 13A). La cuantificación de los parámetros histológicos mostró una reducción significativa de la nucleación central en los distintos músculos esqueléticos analizados como resultado de la transferencia génica (Figura 13B). Con los bajos niveles esperados de nucleación central en ratones BL6 WT en todos los músculos con un promedio de $1,89 \pm 0,39\%$, como se observa aquí, teniendo en cuenta todos los músculos analizados, un promedio de $66,85 \pm 1,86\%$ núcleos centrales en ratones *sgcb*^{-/-} sin tratar en comparación con $36,30 \pm 5,16\%$ en el músculo *sgcb*^{-/-} tratado con AAV.MHCK7.hSGCB ($p < 0,0001$). La Tabla 3 a continuación proporciona los recuentos de núcleos centrales y los diámetros de fibra dados para varios músculos como el promedio (\pm SEM) de los músculos izquierdo y derecho de BL6 WT, *sgcb*^{-/-}, y ratones inyectados sistémicamente ($n = 5$ por grupo). Cabe destacar que la oleada más significativa de degeneración/regeneración se produce a las 3 semanas en el músculo *sgcb*^{-/-} indicada por los núcleos situados en el centro. Los animales fueron tratados después de este insulto y por lo tanto no se preveía una reversión completa de los núcleos centralizados. Un análisis más profundo de la histopatología muscular reveló una normalización de la distribución del tamaño de las fibras acompañada de un aumento del diámetro promedio de las fibras en los ratones enfermos tratados con el vector en comparación con los ratones *sgcb*^{-/-} sin tratar en los tres músculos examinados (GAS: *sgcb*^{-/-} sin tratar $28,37 \pm 0,23\mu\text{m}$ contra tratado con AAV.hSGCB $36,04 \pm 0,17\mu\text{m}$; $p < 0,0001$) (PSOAS: *sgcb*^{-/-} sin tratar $24,75 \pm 0,23\mu\text{m}$ contra tratado con AAV.hSGCB $38,43 \pm 0,28\mu\text{m}$; $p < 0,0001$) (TRI: *sgcb*^{-/-} sin tratar $28 \pm 0,31\mu\text{m}$ contra tratado con AAV.hSGCB $35,56 \pm 0,22\mu\text{m}$; $p < 0,0001$) (Figuras 13C, 13D, Tabla 3).

Tabla 3. Análisis del porcentaje de nucleación central

25

Grupo de animales	Dosis (vg de dosis total)	Músculo	% Núcleos centrales	Promedio combinado % NC (\pm SEM)	Diámetro de la fibra (μm) (Promedio \pm SEM)
			(Promedio \pm SEM)		
C57/BL6 WT	N/A	TA	$1,78 \pm 0,86$	$1,89 \pm 0,39$	N/A
		GAS	$0,83 \pm 0,41$		$39,69 \pm 0,18$
		QD	$0,98 \pm 0,31$		N/A
		GLUT	$2,50 \pm 0,68$		N/A
		PSOAS	$1,26 \pm 0,28$		$40,96 \pm 0,22$
		TRI	$2,13 \pm 0,36$		$41,53 \pm 0,24$
		DIA	$3,75 \pm 1,30$		N/A
<i>sgcb</i> ^{-/-}	N/A	TA	$70,45 \pm 3,04$	$66,85 \pm 1,86$	N/A
		GAS	$67,26 \pm 1,81$		$28,37 \pm 0,23$
		QD	$63,57 \pm 2,09$		N/A
		GLUT	$61,34 \pm 2,05$		N/A
		PSOAS	$62,73 \pm 5,20$		$24,75 \pm 0,22$
		TRI	$67,11 \pm 2,83$		$28,74 \pm 0,22$
		DIA	$75,47 \pm 3,79$		N/A
Tratado con AAV.MHCK7.hSGCB	1,00E+12	TA	$43,85 \pm 3,89$	$36,30 \pm 5,16$	N/A
		GAS	$38,71 \pm 3,50$		$36,04 \pm 0,18$
		QD	$46,10 \pm 6,26$		N/A
		GLUT	$42,11 \pm 5,48$		N/A
		PSOAS	$21,00 \pm 4,69$		$38,43 \pm 0,28$
		TRI	$48,39 \pm 6,20$		$39,92 \pm 0,27$

Grupo de animales	Dosis	Músculo	% Núcleos centrales	Promedio combinado % NC (\pm SEM)	Diámetro de la fibra (μm)
	(vg de dosis total)		(Promedio \pm SEM)	(Promedio \pm SEM)	(Promedio \pm SEM)
		DIA	11,59 \pm 2,08		N/A

Debido al importante papel que desempeña la fibrosis en la patogénesis de la LGMD2E y en la efectividad de las terapias, era fundamental demostrar la misma eficacia en la reducción de la fibrosis. Eso se vio con la transferencia localizada del gen β -sarcoglicano, después del suministro sistémico de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. Usando la tinción con rojo de Picosirius para los tipos de colágeno I y III, analizamos los niveles de colágeno en los músculos gastrocnemio y diafragma en ratones BL6 WT de 7 meses de edad ($n = 4$), ratones $sgcb^{-/-}$ sin tratar ($n = 4$) y ratones $sgcb^{-/-}$ tratados ($n = 5$) 6 meses

5 después de la inyección. Los músculos tratados mostraron una deposición de colágeno significativamente menor en comparación con los músculos $sgcb^{-/-}$ sin tratar (Figura 14A). El músculo GAS transducido por vector contenía 17,55 \pm 0,59 % de colágeno en comparación con 43,55 \pm 3,33 % de colágeno en los músculos GAS $sgcb^{-/-}$ sin tratar ($p < 0,0001$).
10 Asimismo, el músculo del diafragma tratado presentaba 21,67 \pm 1,09 % de colágeno en comparación con 44,05 \pm 2,39 % del músculo $sgcb^{-/-}$ sin tratar ($p < 0,0001$) (Figura 14B), lo que demuestra la capacidad de la transferencia génica de hSGCB para mitigar el componente fibrótico del fenotipo LGMD2E.

Ejemplo 11

Restauración de la función del diafragma después de el suministro sistémico

Para determinar si la transferencia del gen hSGCB puede mejorar la función muscular, valoramos las propiedades funcionales del músculo del diafragma de ratones $sgcb^{-/-}$ tratados con scAAVrh.74.MHCK7.hSCGB (ver los métodos en Griffin *et al.*). Primero se estableció un déficit funcional en los diafragmas de los ratones $sgcb^{-/-}$. Los diafragmas KO mostraron una producción de fuerza específica reducida en 50,9 % (116,24 mN/mm²) en comparación con los ratones BL6 WT (116,24 mN/mm² contra 236,67 mN/mm²) y una mayor pérdida de fuerza después de un riguroso protocolo de fatiga (pérdida de 23 % en $sgcb^{-/-}$; pérdida de 7 % en BL6 WT). El suministro en la vena de la cola de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, que resultó en una expresión de casi 100 % de hSGCB en el diafragma, condujo al restablecimiento de la función del diafragma, con una mejora de la producción de fuerza específica hasta 226,07 mN/mm² y una mayor resistencia a la fatiga, con una pérdida de solamente 12 % ($n = 5$) (Figura 15).

Ejemplo 12

El suministro de scAAVrh.74.CMV.miR29c reduce la fibrosis en ratones $sgcb^{-/-}$

La extensa fibrosis que identificamos tanto en el músculo esquelético (Figuras 2, 4 y 6) como en el corazón y el diafragma (Figura 8) demostró la necesidad de tratar la deposición de colágeno (fibrosis) en LGMD2E. Previamente encontramos que miR29c estaba más severamente reducido (de miR29a, b, y c) en la distrofia muscular Duchenne. Se planteó la hipótesis de que miR29c también se reduciría en ratones deficientes en Beta-sarcoglicano (un modelo de ratón para LGMD2E). Demostramos que esto es cierto (Figura 15). Los niveles de miR29c disminuyeron, los niveles de fibrosis (colágeno) aumentaron y tres componentes de la fibrosis (Col1A, Col3A y Fbn) aumentaron a nivel de ARN. Para probar si podríamos prevenir la fibrosis con miR29c, se inyectó el vector de terapia génica scrAAVrh.74.CMV.miR29c (3 \times 10¹¹ vg) en el músculo tibial anterior de ratones $sgcb^{-/-}$ de 4 semanas de edad ($n = 5$). El scrAAVrh.74.CMV.miR29c se muestra en la Figura 16 y se describe en la Solicitud Provisional de EE.UU. No. 62/323,163. Después de 2 meses de tratamiento con AAVrh.74.CMV.miR29c, se cosecharon músculos TA de ratones $sgcb^{-/-}$ tratados y de control y de ratones WT y se analizó la fibrosis (niveles de colágeno) ($n = 5$ por grupo). Usando la tinción con rojo de Sirius y la cuantificación, los niveles de colágeno se redujeron después del tratamiento (ver la Figura 17). Los niveles de transcripción de Col1A, Col3A y Fbn se normalizaron y el tamaño de las fibras musculares aumentó. En la Figura 18 se muestran imágenes representativas de secciones completas escaneadas de músculos tibiales anteriores sin tratar y tratados con AAVrh.74.CMV.miR29c teñidas con rojo de Sirius, que tiñe para colágeno 1 y 3. Esto demuestra la prueba de principio de que scAAVrh.74.CMV.miR29c reduce la fibrosis en ratones $sgcb^{-/-}$ y se podría usar en combinación con el reemplazo génico con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB o scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB.

Ejemplo 13

La transferencia génica intravenosa a ratones $sgcb^{-/-}$ reduce la cifoescoliosis de la columna torácica

La degeneración de los músculos del torso debido al empeoramiento de la histopatología en los pacientes que padecen LGMD2E se puede atribuir a la cifosis. La cifoescoliosis de la columna torácica debida al debilitamiento de los músculos que sostienen la columna vertebral puede resultar en un empuje del diafragma hacia delante, lo que compromete aún más la capacidad pulmonar y la función del diafragma. Como resultado de la gravedad del fenotipo en el ratón $sgcb^{-/-}$ con la apariencia anatómica macroscópica de cifoescoliosis, se usó radiografía de cuerpo entero para determinar el grado de cifosis en ratones BL6 WT de 7 meses de edad ($n = 6$), ratones $sgcb^{-/-}$ ($n = 6$) y ratones $sgcb^{-/-}$ tratados 6 meses posteriores

a la inyección ($n = 6$). El puntaje del índice cifótico (KI) determina un valor cuantitativo para el nivel de cfoescoliosis (Laws *et al.* *J. Appl. Physiol* 97: 1970-7, 2004). Como se representa en el panel WT de la Figura 19A, la puntuación de KI es una relación de la longitud de la extremidad anterior a la posterior en comparación con la longitud de la línea media al vértice de la curvatura en la columna vertebral. Mientras que los ratones *sgcb^{-/-}* presentan una columna vertebral severamente curvada y una puntuación de KI más baja de $3,64 \pm 0,16$ ($n = 6$), los ratones BL6 WT tienen una columna vertebral significativamente más recta que resulta en una puntuación de KI más alta de $6,01 \pm 0,41$ ($n = 6$) ($p < 0,01$) (Figura 19B). Los ratones *sgcb^{-/-}* tratados presentan una reducción significativa del grado de cifosis en la columna vertebral con un aumento de la puntuación de KI a $5,39 \pm 0,58$ ($n = 6$) ($p < 0,05$) (Figura 19B). Estos datos indicaron que el suministro intravenoso de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB es beneficioso para la integridad general de la columna vertebral y puede aliviar la cifosis y las contracturas articulares presentes en la enfermedad. Estos datos demostraron el alivio de la cifosis y el aumento de la actividad física en ratones *sgcb^{-/-}* después del suministro sistémico del vector rAAV de la invención. Estos datos son una prueba adicional de que la terapia génica de la invención mejora la calidad de vida de los pacientes con LGMD2E.

15 Ejemplo 14

Valoración de la miocardiopatía

La destrucción histológica del músculo de las extremidades y del diafragma también se detecta en el miocardio de los ratones *sgcb^{-/-}* de 7 meses de edad, particularmente con la presencia de necrosis miocárdica y fibrosis, como lo evidencian las tinciones de H&E y rojo de Picrosirius (Figura 20A). La alteración de la función cardíaca se presenta a menudo en forma de miocardiopatía dilatada con un gasto cardíaco reducido y una fracción de eyección inferior (Semplicini *et al.*, *Neurology* 84: 1772-81, 2015, Fanin *et al.*, *Neuromuscul Disorder* 13:303-9, 2003). Se usaron imágenes de resonancia magnética cardíaca (MRI) para evaluar varios parámetros funcionales del corazón con el fin de establecer déficits funcionales en el miocardio de los ratones *sgcb^{-/-}* en comparación con los ratones BL6 WT para usarlos como medida de resultado funcional. La imagenología de los ratones de control a los 7 meses de edad mostró una reducción de 29,4 % en el volumen sistólico de $0,041 \pm 0,0019$ mL en los corazones *sgcb^{-/-}* contra $0,029 \pm 0,0024$ mL en los corazones BL6 WT ($p < 0,01$), un gasto cardíaco 31,7 % menor a $14,70 \pm 0,74$ mL/min en los corazones *sgcb^{-/-}* contra $12,72 \pm 0,97$ mL/min en los corazones BL6 WT y, por último, una fracción de eyección 14,3 % menor, $66,21 \pm 3,83$ % en los corazones *sgcb^{-/-}* contra $76,90 \pm 1,67$ % en los corazones BL6 WT ($p < 0,05$) (Figura 20B). Esto indica un modesto declive de la función cardíaca general a esta edad y una tendencia al desarrollo de cardiomiopatía. El restablecimiento de la expresión de hSGCB en corazones de ratones KO por suministro sistémico corrigió parcialmente estos déficits, mejorando el volumen sistólico a $0,032 \pm 0,0027$ mL, el gasto cardíaco a $14,66 \pm 0,75$ mL/min y la fracción de eyección a $68,16 \pm 2,31$ % (Figura 19B). Como correlación de la alteración histológica y funcional del tejido cardíaco descrita en la presente, la inmunotransferencia tipo Western para la expresión de troponina I cardíaca (cTrpl, por sus siglas en inglés), un importante regulador de la función cardíaca y un indicador (biomarcador) de daño cardíaco, se reduce en los corazones *sgcb^{-/-}* enfermos a 60,38 % de los niveles observados en los ratones BL6 WT (Figura 20C). Los niveles de cTrpl se restablecen después de el tratamiento a niveles de 35,80 % de la expresión observada en los corazones WT (Figura 20D).

40 Ejemplo 15

Restauración funcional en el músculo diafragma con el aumento de la actividad física

La importante implicación de la disfunción del diafragma y la insuficiencia respiratoria en la LGMD2E exige un beneficio funcional del diafragma esencial para la validación del tratamiento clínico sistémico. Con el uso de un protocolo experimental *ex vivo* en tiras tomadas del músculo del diafragma, se usó para valorar si la restauración del β-sarcoglicano proporciona un beneficio funcional a este músculo gravemente comprometido. De acuerdo con la significativa histopatología identificada en los diafragmas de 7 meses de edad de los ratones enfermos, los diafragmas *sgcb^{-/-}* ($n = 4$) mostraron un déficit funcional con una reducción significativa (51 %) de la producción de fuerza específica en comparación con los ratones BL6 WT ($n = 5$) ($116,24 \pm 10,49$ mN/mm² contra $236,67 \pm 15,87$ mN/mm², respectivamente, $p < 0,001$), así como una mayor pérdida de fuerza respecto a la producida después de la primera contracción después de un riguroso protocolo de fatiga ($23 \pm 1,0$ % de pérdida en *sgcb^{-/-}*; $7,0 \pm 3,0$ % de pérdida en BL6 WT, $p < 0,05$) (Figura 6A). Seis meses después del suministro en la vena en la cola de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, se observó una mejora espectacular en la producción de fuerza específica. La producción de fuerza específica aumentó a $226,07 \pm 27,12$ mN/mm² ($n = 5$) ($p < 0,05$ en comparación con *sgcb^{-/-}*) y se observó una mejor protección del músculo contra la fatiga repetida con solamente una pérdida de fuerza de $12,0 \pm 4,0$ % ($p < 0,05$ en comparación con *sgcb^{-/-}*) (Figura 21A). En general, estos datos respaldan nuestros hallazgos anteriores en el músculo TA y demuestran que la restauración del β-sarcoglicano proporciona una recuperación funcional en el músculo del diafragma.

60 Los síntomas de aumento de la fatiga y reducción de la actividad general son frecuentes en muchas enfermedades neuromusculares, y se atribuyen en parte a la aparición de cifosis. Como resultado, y teniendo en cuenta el fenotipo de LGMD2E, se planteó la hipótesis de que los ratones KO serían naturalmente menos activos en comparación con los ratones WT sanos, y que, asimismo, el suministro sistémico de rAAV.MHCK7.hSGCB a los ratones *sgcb^{-/-}* resultaría en ratones más activos físicamente. Para probar esta hipótesis y adicionalmente los posibles beneficios funcionales de la transferencia de genes, se usó un protocolo de monitorización por láser de la actividad en jaula en campo abierto similar al descrito en Kobayashi *et al.*, *Nature* 456: 511-5, 2008 y Beaström *et al.*, *Am. J. Pathol.* 179: 2464-74, 2011, se realizó

en todos los grupos de ratones. Las gráficas de la Figura 21B muestran una disminución significativa (55,5 %) en los ratones KO en comparación con los WT, tanto en la deambulación total (movimiento horizontal en los planos X e Y) como en el actividad vertical de las extremidades traseras. El número promedio de interrupciones ambulatorias horizontales del haz láser por un período de 1 hora en ratones WT fue de $7355 \pm 400,8$ (n = 6) en comparación con $3271 \pm 483,8$ (n = 6) en ratones KO ($p < 0,0001$). Asimismo, el promedio de interrupciones verticales del haz registrado en los ratones WT fue de $626,7 \pm 53,76$ contra $264,5 \pm 63,36$ en los ratones KO ($p < 0,01$) (Figura 21B). De acuerdo con la hipótesis inicial, los ratones tratados con rAAV.MHCK7.hSGCB fueron visiblemente más activos en comparación con los KO, lo que se ilustró en la cuantificación de la actividad, en donde la deambulación total aumentó en 22 % hasta $5143 \pm 293,2$ interrupciones de los haces ($p < 0,05$) y el actividad vertical de las extremidades traseras aumentó drásticamente en 77 % hasta $615,3 \pm 95,93$ de interrupciones de los haces ($p < 0,05$) en los ratones tratados (n = 6) (Figura 21B).

Ejemplo 16

Análisis de seguridad y biodistribución de rAAVrh.74.MHCK7.hSGCB

Se valoró la toxicidad potencial o los problemas de seguridad de la terapia génica con hSGCB en ratones *sgcb^{-/-}* a los 6 meses después de la administración sistémica de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB a una dosis total de $1,0 \times 10^{12}$ vg (5 $\times 10^{13}$ vg/kg). La biodistribución del vector y la expresión inespecífica del transgén se analizaron en muestras de tejido (TA, TRI, diafragma, corazón, gónada, pulmones, riñón, hígado y bazo) de animales *sgcb^{-/-}* a los que se les había administrado una dosis del vector por qPCR e inmunotransferencia tipo Western, respectivamente. Usando conjuntos de sondas cebadoras específicas para el vector, se detectaron genomas del vector MHCK7.hSGCB a niveles variables en todos los tejidos recolectados. Como era de esperar, los niveles más altos se observaron en el hígado, así como en el músculo esquelético y el corazón, lo que indica que el artículo de prueba se administró eficientemente en todos los músculos contemplados de los ratones con dosis vectoriales (Figura 22A). Asimismo, la inmunotransferencia tipo Western para detectar la expresión de la proteína hSGCB confirmó la funcionalidad del promotor MHCK7 específico del músculo y la expresión del transgén restringida al músculo cardíaco y esquelético. La expresión de la proteína beta-sarcoglicano se observó en cantidades variables en todas las muestras de músculo esquelético, así como en las muestras de corazón y, lo que es más importante, no se detectó en ningún tejido no muscular (Figura 22B), lo que se apoya en el hecho de que se sabe que el beta-sarcoglicano es una proteína específica del músculo. Por último, se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina en criosecciones de tejido muscular y de todos los órganos externos cosechados de cinco ratones *sgcb^{-/-}* junto con cinco ratones C57/BL6 WT tratados sistémicamente con nuestro vector a la dosis terapéutica usada en este estudio. Estas secciones fueron posteriormente revisadas formalmente por un patólogo veterinario en busca de toxicidad y no se detectaron efectos adversos en ninguna muestra de ninguno de los ratones. En conjunto, estos datos indican que este artículo de prueba fue bien tolerado por los animales de experimentación.

El hecho de que se consiguieran niveles tan altos de transducción en todos los músculos del cuerpo sin efectos adversos usando una dosis relativamente baja (1×10^{12} vg de dosis total; 5×10^{13} vg/kg) es muy prometedor para su aplicación en pacientes con LGMD2E. Desde una perspectiva clínica, la dosis usada en los experimentos descritos en la presente es mucho menor que la dosis usada para el suministro sistémico de una terapia AAV que expresa SMN1 administrada a bebés con SMA (por sus siglas en inglés), que está actualmente en ensayo clínico (Mendell *et al.*, *Mol. Ther.* 24: S 190, 2016). La restauración altamente eficiente de la expresión de β-sarcoglicano usando el promotor MHCK7 acompañada de beneficios funcionales es muy alentadora a niveles de dosis que se podrían aplicar clínicamente, y dada la alta incidencia de afectación cardíaca en la deficiencia de β-sarcoglicano en los pacientes LGMD2E, el suministro sistémico proporciona un gran beneficio a estos pacientes.

Referencias:

1. Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E *et al.* Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet* 1995; 11: 266-273.
2. Moore SA, Shilling CJ, Westra S, Wall C, Wicklund MP, Stolle C *et al.* Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 995-1003.
3. Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E *et al.* Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1589-1598.
4. Durbeej M, Cohn RD, Hrstka RF, Moore SA, Allamand V, Davidson BL *et al.* Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol Cell* 2000; 5: 141-151.
5. Bonnemann CG, Passos-Bueno MR, McNally EM, Vainzof M, de Sa Moreira E, Marie SK *et al.* Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E). *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1953-1961.

6. Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP. The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology* 1999; 52: 176-179.
- 5 7. Sandona D, Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Exp Rev Mol Med* 2009; 11: e28.
- 10 8. Fanin M, Melacini P, Boito C, Pegoraro E, Angelini C. LGMD2E patients risk developing dilated cardiomyopathy. *Neuromusc Disord* 2003; 13: 303-309.
- 15 9. Sveen ML, Thune JJ, Kober L, Vissing J. Cardiac involvement in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2 and Becker muscular dystrophy. *Arch Neurol* 2008; 65: 1196-1201.
- 20 10. Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Berardinelli A, Danieli GA et al. Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve* 1999; 22: 473-479.
- 25 11. Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G et al. Evidence-based guideline summary: diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology and the practice issues review panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology* 2014; 83: 1453-1463.
- 30 12. Wong-Kisiel LC, Kuntz NL. Two siblings with limb-girdle muscular dystrophy type 2E responsive to deflazacort. *Neuromusc Disord* 2010; 20: 122-124.
- 35 13. Barresi R, Di Blasi C, Negri T, Brugnoni R, Vitali A, Felisari G et al. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J Med Genet* 2000; 37: 102-107.
- 40 14. Gibertini S, Zanotti S, Savadori P, Curcio M, Saredi S, Salerno F et al. Fibrosis and inflammation are greater in muscles of beta-sarcoglycan-null mouse than mdx mouse. *Cell Tissue Res* 2014; 356: 427-443.
- 45 15. McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction *in vivo*. *Gene Ther* 2003; 10: 2112-2118.
- 50 16. McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 2001; 8: 1248-1254.
- 55 17. Chicoine LG, Rodino-Klapac LR, Shao G, Xu R, Bremer WG, Camboni M et al. Vascular delivery of rAAVrh74.MCK.GALGT2 to the gastrocnemius muscle of the rhesus macaque stimulates the expression of dystrophin and laminin alpha2 surrogates. *Mol Ther* 2014; 22: 713-724.
- 60 18. Rodino-Klapac LR, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Malik V, Davis N et al. Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Mol Ther* 2010; 18: 109-117.
- 65 19. Rodino-Klapac LR, Janssen PM, Montgomery CL, Coley BD, Chicoine LG, Clark KR et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med* 2007; 5: 45.
- 70 20. Wang B, Li J, Fu FH, Chen C, Zhu X, Zhou L et al. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Ther* 2008; 15: 1489-1499.
- 75 21. Chicoine LG, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Griffin DA, Heller KN et al. Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on micro-dystrophin gene expression following vascular delivery. *Mol Ther* 2014; 22: 338-347.
- 80 22. Matsuda R, Nishikawa A, Tanaka H. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J Biochem* 1995; 118: 959-964.
- 85 23. Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 1997; 139: 375-385.
- 90 24. Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Mol Ther* 2015; 23: 192-201.

25. Dressman D, Araishi K, Imamura M, Sasaoka T, Liu LA, Engvall E *et al.* Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1631-1646.
- 5 26. Rodino-Klapac LR, Lee JS, Mulligan RC, Clark KR, Mendell JR. Lack of toxicity of alpha-sarcoglycan overexpression supports clinical gene transfer trial in LGMD2D. *Neurology* 2008; 71: 240-247.
- 10 27. Shield MA, Haugen HS, Clegg CH, Hauschka SD. E-box sites and a proximal regulatory region of the muscle creatine kinase gene differentially regulate expression in diverse skeletal muscles and cardiac muscle of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5058-5068.
- 15 28. Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X *et al.* Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002; 76: 791-801.
- 20 29. Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc* 2006; 1: 1412-1428.
- 30 30. Clark KR, Liu X, McGrath JP, Johnson PR. Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1031-1039.
- 25 31. Liu M, Yue Y, Harper SQ, Grange RW, Chamberlain JS, Duan D. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* 2005; 11: 245-256.
32. Hakim CH, Grange RW, Duan D. The passive mechanical properties of the extensor digitorum longus muscle are compromised in 2- to 20-mo-old mdx mice. *J Appl Physiol* 2011; 110: 1656-1663.
33. Wein N, Vulin A, Falzarano MS, Szigyarto CA, Maiti B, Findlay A *et al.* Translation from a DMD exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice. *Nat Med* 2014; 20: 992-1000.

REIVINDICACIONES

1. Un vector AAV recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica β -sarcoglicano, en donde la secuencia polinucleotídica comprende una secuencia nucleotídica al menos 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Un vector AAV recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica β -sarcoglicano que es al menos 95 % idéntica a SEQ ID NO: 2.
- 10 3. El vector AAV recombinante de la reivindicación 1 o 2, en donde la secuencia polinucleotídica que codifica β -sarcoglicano comprende la secuencia nucleotídica establecida en SEQ ID NO: 1.
4. El vector AAV recombinante de la reivindicación 2, en donde la secuencia polinucleotídica codifica β -sarcoglicano de SEQ ID NO: 2.
- 15 5. El vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el vector es del serotipo AAV-1, AAV-2, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 o AAV rh.74.
6. El vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la secuencia polinucleotídica está enlazada operativamente a un elemento de control específico del músculo.
- 20 7. El vector AAV recombinante de la reivindicación 6, en donde el elemento de control específico del músculo es el promotor MCK truncado (tMCK).
8. El vector AAV recombinante de la reivindicación 6, en donde el elemento de control específico del músculo es el promotor MHCK7.
- 25 9. El vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3
- 30 10. El vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 5.
11. Una composición que comprende el vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 35 12. Una composición que comprende el vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en la reducción de la fibrosis en un sujeto que lo necesite.
13. Una composición que comprende el vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento de la β -sarcoglicanopatía en un sujeto que lo necesite.
- 40 14. La composición para su uso dac la reivindicación 12 o 13, en donde el sujeto padece distrofia muscular, opcionalmente en donde la distrofia muscular es distrofia muscular de cinturas.
15. Una composición que comprende el vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular.
- 45 16. La composición para su uso dac cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en donde el sujeto es un humano.
17. Una composición que comprende el vector AAV recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento de distrofia muscular, opcionalmente en donde la distrofia muscular es distrofia muscular de cinturas (LGMD), y opcionalmente en donde la LGMD es LGMD2E.
- 50 18. La composición para uso dac cualquiera de las reivindicaciones 12-17, o la composición de la reivindicación 11, comprende además un segundo vector AAV recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos de miR29.
19. La composición para su uso dac la reivindicación 18, o la composición de la reivindicación 11, en donde el segundo vector AAV recombinante comprende la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 9 o la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 8.
- 55 20. La composición para su uso dac cualquiera de las reivindicaciones 12-19, en donde la composición está formulada para inyección intramuscular o inyección intravenosa, y/o formulada para administración sistémica.
21. La composición para su uso dac la reivindicación 20, o la composición de la reivindicación 20, en donde la administración sistémica es la administración parenteral por inyección, infusión o implantación.

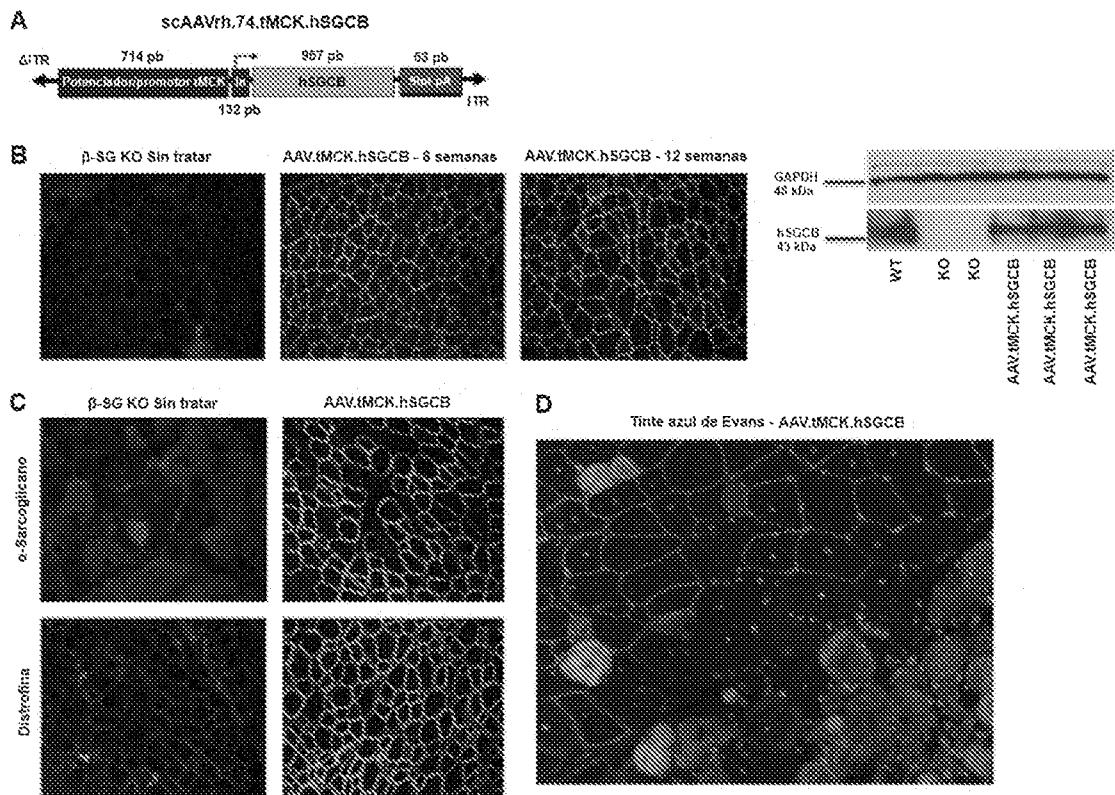


Figura 1. Expresión de β -sarcoglicano mediada por el AAV restaura las proteínas asociadas a la distrofina y protege la integridad de la membrana. (A) Un vector AAV autocomplementario que contiene el gen de β -sarcoglicano humano con codones optimizados (hSGCB) impulsado por el promotor tMCK específico del músculo. El casete también contiene un intrón químerico para aumentar el proceso y una señal de poliadenilación para la estabilidad. (B) La tinción de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti- β -SG muestra altos niveles de tinción sarcolemal del transgén sgcb en ratones de 5 semanas de edad, tanto 6 como 12 semanas posteriores a la inyección, se muestran imágenes a 20X. El porcentaje de fibras que expresan beta-sarcoglicano por músculo TA fue de un promedio de $88,4 \pm 4,2\%$ después de 6 semanas ($n = 9$, 4 machos, 5 hembras) y de $76,5 \pm 5,8\%$ después de 12 semanas ($n = 6$, 4 machos, 2 hembras). La expresión proteica se confirmó en la inmunotransferencia tipo Western con gamma-tubulina como control de carga. (C) El suministro de AAV con β -sarcoglicano lleva a la restauración de otros miembros del complejo sarcoglicano; α -sarcoglicano, distrofina, se muestran imágenes a 20X. (D) scAAVrh.74.hSGCB protege las membranas sgcb^{-/-} contra daños. La imagen muestra una gran área de fibras positivas al azul de Evans (rojo) yuxtapuestas a un grupo de fibras positivas al β -sarcoglicano que han sido protegidas de la incorporación del tinte azul de Evans, se muestra la imagen a 40X.

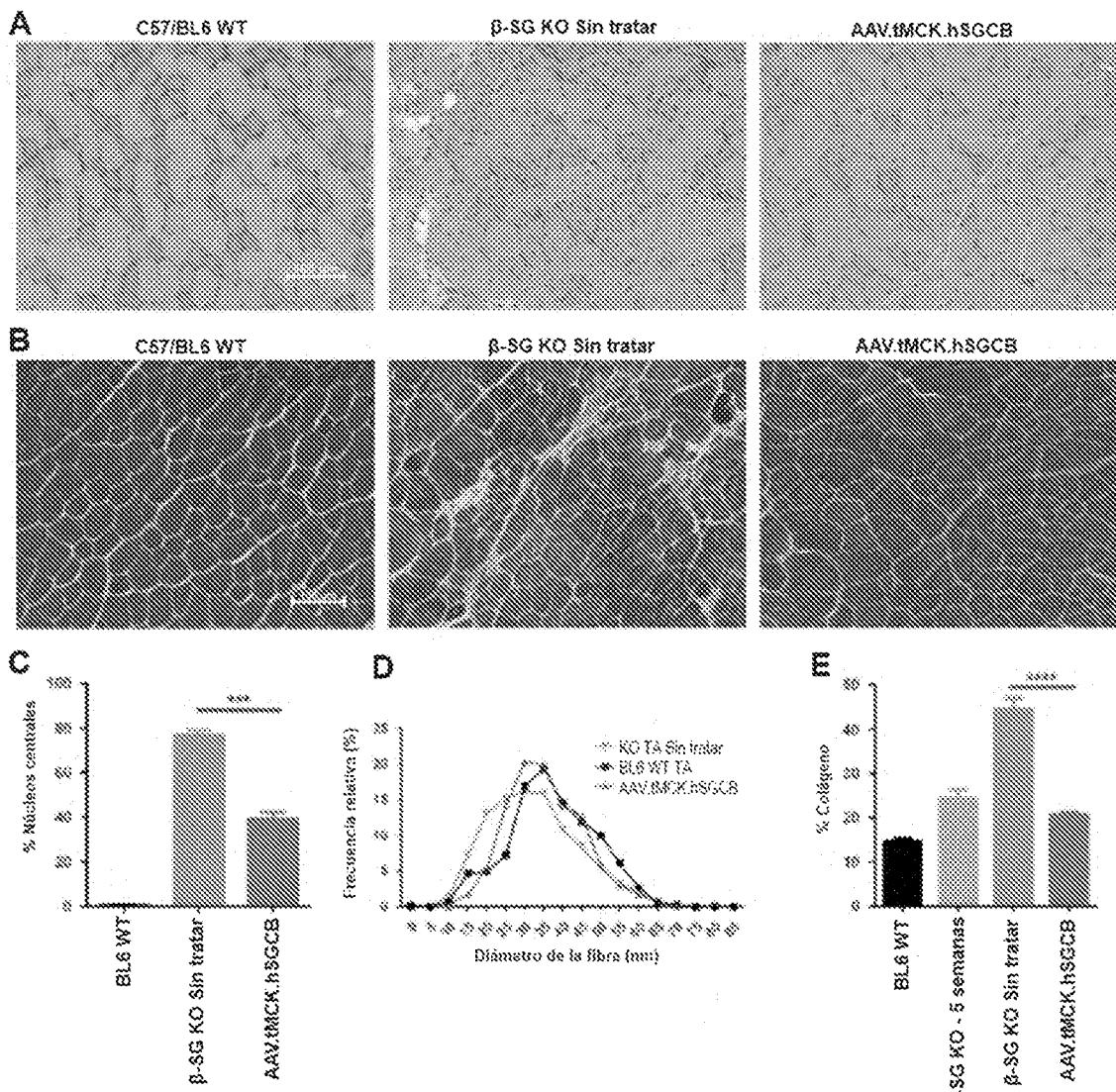


Figura 2. Análisis histológico del músculo esquelético tratado con deficiencia de β -SG. El tratamiento con scAAVrh.74.hSGCB normaliza los parámetros histológicos de los ratones $sgcb^{-/-}$. Se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina y de rojo de Picrosirius en el músculo TA de ratones $sgcb^{-/-}$ junto con ratones C57/BL6 de control normal y ratones tratados con scAAVrh.74.hSGCB, seguidas de la cuantificación de los parámetros histológicos y el % de tinción de colágeno. (A) La tinción H&E muestra la presencia de fibras nucleadas centralmente, células inflamatorias y una distribución de fibras de gran diámetro en el músculo deficiente en β -SG, así como una mejora de la histopatología después de la transferencia génica. (B) La tinción con rojo de Picrosirius muestra una disminución de la tinción con colágeno rojo en el músculo tratado. (C) La cuantificación de las fibras nucleadas centralmente que muestra una disminución tras el tratamiento ($p < 0,0005$, ANOVA unidireccional) y (D) la representación de la distribución del tamaño de las fibras y aumento del tamaño promedio de las fibras del músculo TA de los ratones C57/BL6 controles y $sgcb^{-/-}$ en comparación con los ratones tratados ($p < 0,0001$, ANOVA unidireccional). (E) La cuantificación del % de colágeno en el músculo TA de controles C57/BL6 y ratones $sgcb^{-/-}$ en comparación con ratones tratados con $sgcb^{-/-}$ ($p < 0,0001$, ANOVA unidireccional). Se muestra una barra de escala de 100 μ m para imágenes a 20X. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

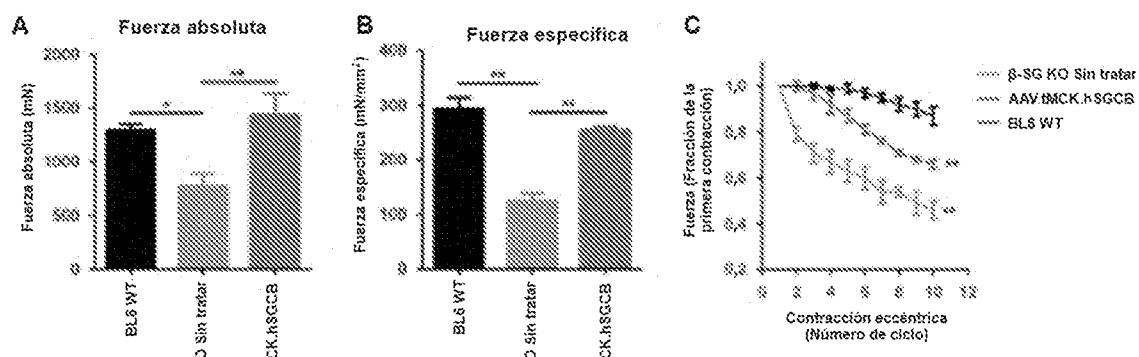


Figura 3. Suministro intramuscular de scAAVrh.74.hSGCB corrige la fuerza tetánica y la resistencia a la lesión inducida por contracción. El músculo TA de ratones *sgcb*^{-/-} tratados con 3×10^{10} vg de scAAVrh.74.hSGCB mediante una inyección IM fue cosechado 6 semanas posteriores a la transferencia génica, y sometido a un protocolo para valorar la fuerza tetánica y a un protocolo de contracción excéntrica para valorar la resistencia a la lesión inducida por contracción. (A) Los AT tratados con AAVrh.74.hSGCB demostraron una mejora significativa tanto en la fuerza tetánica absoluta ($p < 0,01$, prueba t pareada) como (B) en la fuerza específica normalizada ($p < 0,05$, prueba t pareada), que no fue diferente de la fuerza de tipo silvestre (C57/BL6). (C) Los AT tratados con AAVrh.74.hSGCB mostraron una mejora significativa de la resistencia a la lesión inducida por contracción en comparación con los controles *sgcb*^{-/-} no tratados ($p < 0,01$, ANOVA bidireccional). Se muestra la retención de fuerza tras 10 contracciones. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

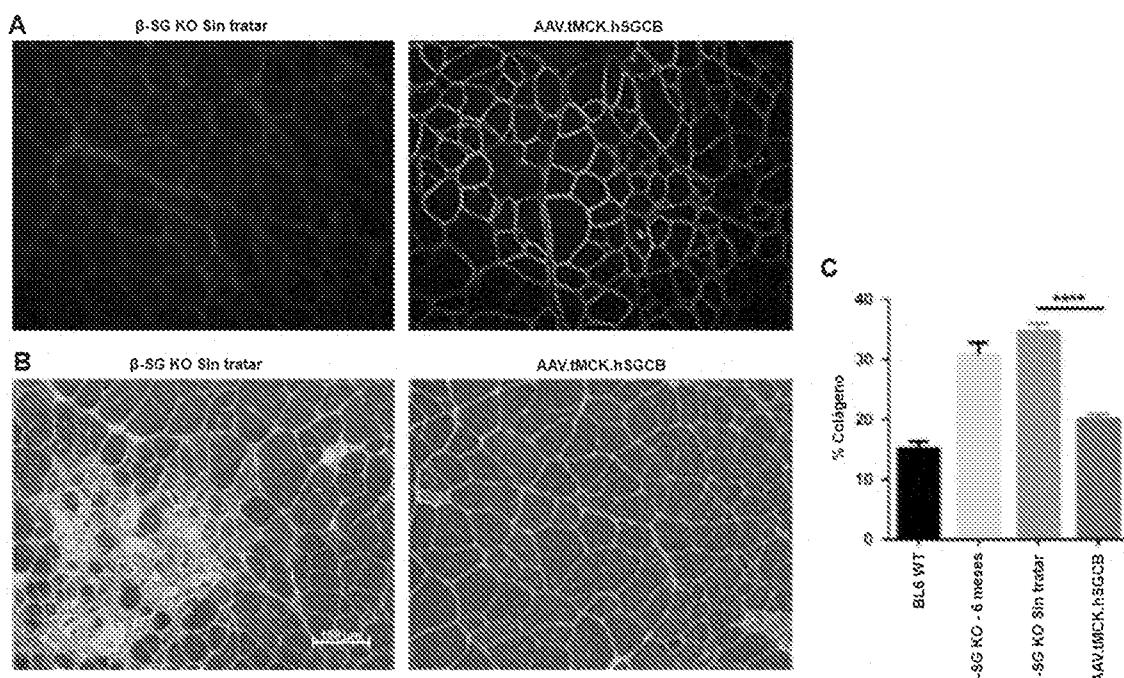


Figura 4. Análisis de ratones envejecidos tratados intramuscularmente con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. (A) La tinción de inmunofluorescencia del músculo TA de ratones *sgcb*^{-/-} de 6 meses de edad tratados 12 semanas posteriores a la inyección ($n = 5$, 5 machos) muestra una expresión sarcolemal del transgén *sgcb* a niveles que promedian 80 % en los ratones inyectados en comparación con los no tratados ($n = 4$, 4 machos), (B) La tinción con rojo Picrosirius del músculo TA tratado y no tratado. (C) La cuantificación del colágeno presente en el tejido teñido con rojo de Picrosirius muestra una reducción significativa de la cantidad de colágeno después del tratamiento con rAAVrh.74.tMCK.hSGCB ($p < 0,0001$, ANOVA unidireccional). Se muestra una barra de escala de 100 μm para imágenes a 20X. **** $p < 0,0001$.

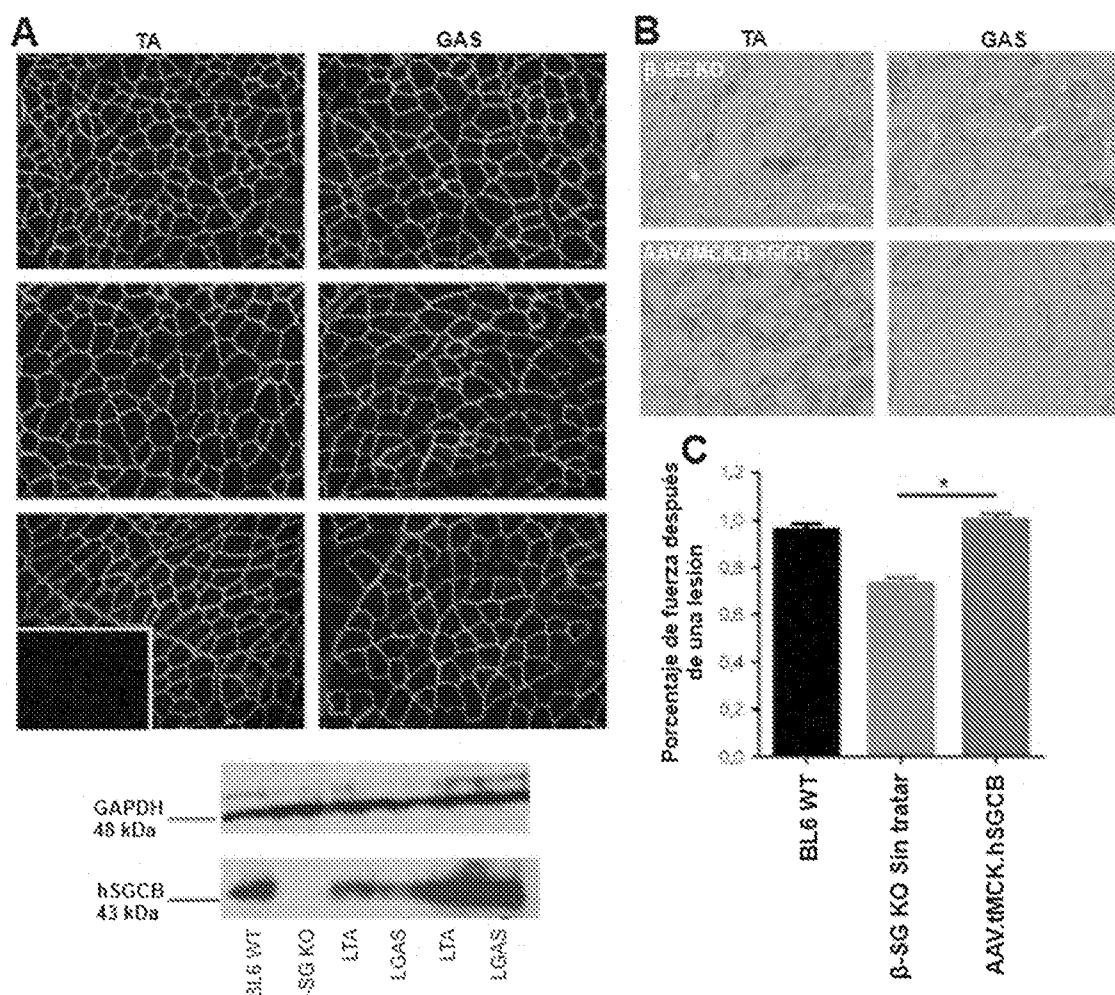


Figura 5. Suministro vascular de scAAVrh.74.hSGCB. En las semanas cuatro ($n = 5$, 5 machos) y cinco ($n = 4$, 2 machos, 2 hembras) los ratones deficientes en β -SG fueron tratados con el vector a través de la arteria femoral para suministrar el vector a los músculos de las extremidades inferiores. A una dosis de 5×10^{11} vg, la expresión de β -SG fue de $90,6 \pm 2,8$ % en el TA y de $91,8 \pm 4,7$ % en el GAS de los ratones tratados, acompañada de mejoras en la histopatología que resultaron en una mejora significativa de la fuerza específica en comparación con los animales no tratados, incluso tras un paradigma de lesión, (A) la expresión de la proteína β -SG de tres ratones representativos. El músculo de un ratón β -SG inactivado (KO) no tratado se muestra para la comparación en el recuadro (inferior derecho), se muestran imágenes a 20X. La expresión en músculos tratados se confirmó mediante inmunotransferencia tipo Western y gamma-tubulina mostrada como control de carga. (B) La histopatología mejora significativamente después del tratamiento con dosis altas. Paneles superiores: músculos TA y gastrocnemio tratados. Paneles inferiores: músculo de control deficiente en β -SG no tratado. Se muestra una barra de escala de 100 μ m para imágenes a 20X. (C) El porcentaje de fuerza específica retenida en el músculo EDL después de 10 ciclos de lesión inducida por contracción excéntrica. El tratamiento con 5×10^{11} vg de AAVrh.74.hSGCB produjo una mejora significativa de la fuerza que fue equivalente a la del músculo de control WT (normal) ($p < 0,05$, ANOVA unidireccional). * $p < 0,05$.

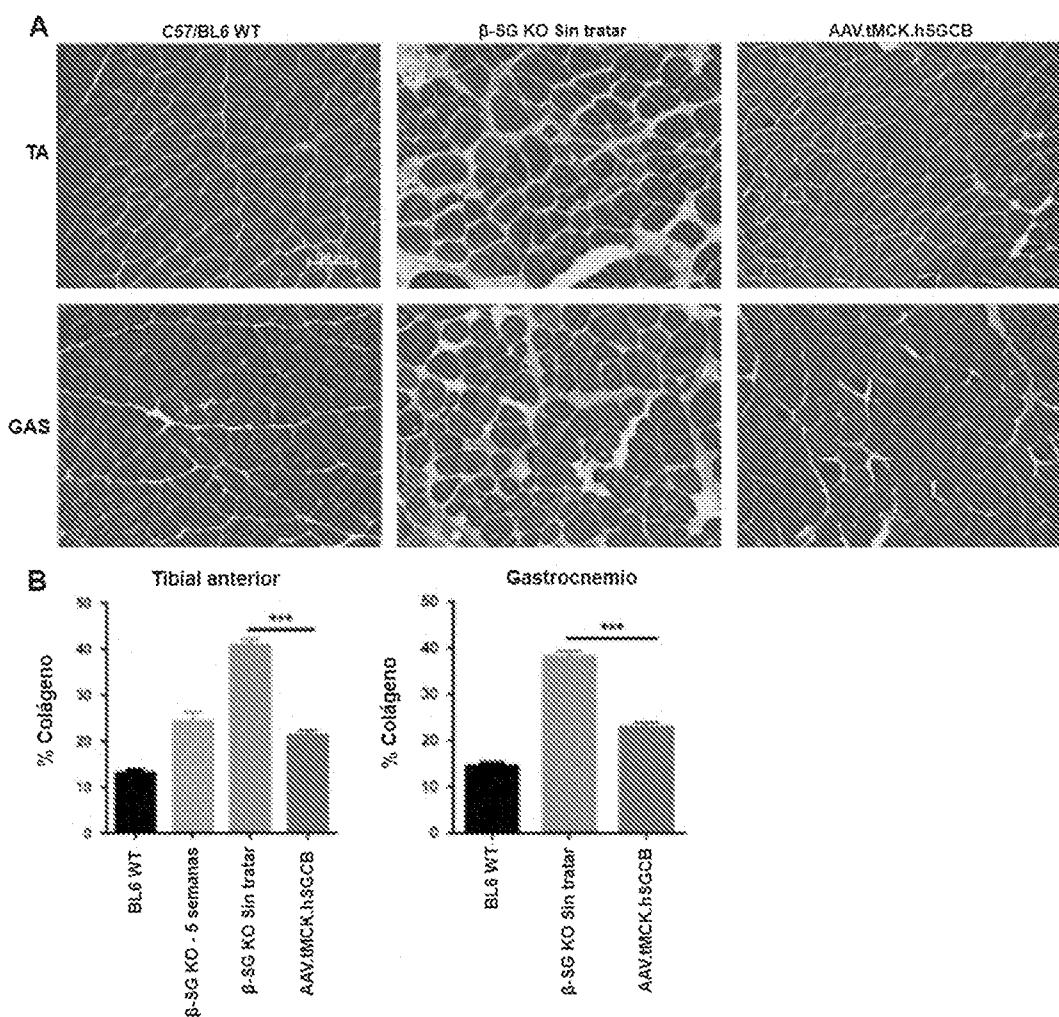


Figura 6. Reducción de la fibrosis en ratones β -SG KO tratados con ILP. (A) La tinción con rojo de Picrosirius muestra una reducción de la fibrosis en los ratones tratados, indicada por una disminución de la deposición de colágeno en comparación con los ratones $sgcb^{-/-}$ no tratados. (B) La cuantificación de los niveles de colágeno en los músculos TA y GAS de ratones BL6 WT, $sgcb^{-/-}$ no tratados y ratones tratados confirma la reducción de los niveles de colágeno en los ratones tratados ($p < 0,001$, ANOVA unidireccional). Se muestra una barra de escala de 100 μm para imágenes a 20X. *** $p < 0,001$.

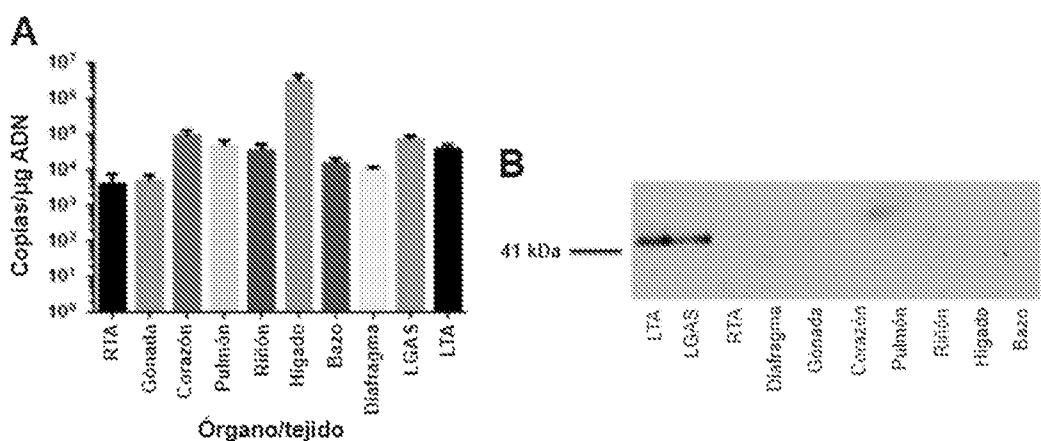


Figura 7. Biodistribución del vector y la expresión de proteínas. (A) Histograma de la distribución promedio del vector en los tejidos cosechados de ratones tratados con ILP, expresada en copias de transcripto por microgramo de ADN añadido a la qPCR. La extremidad izquierda fue tratada. (B) No se observa expresión de proteínas mediante inmunotransferencia tipo Western en órganos fuera del objetivo.

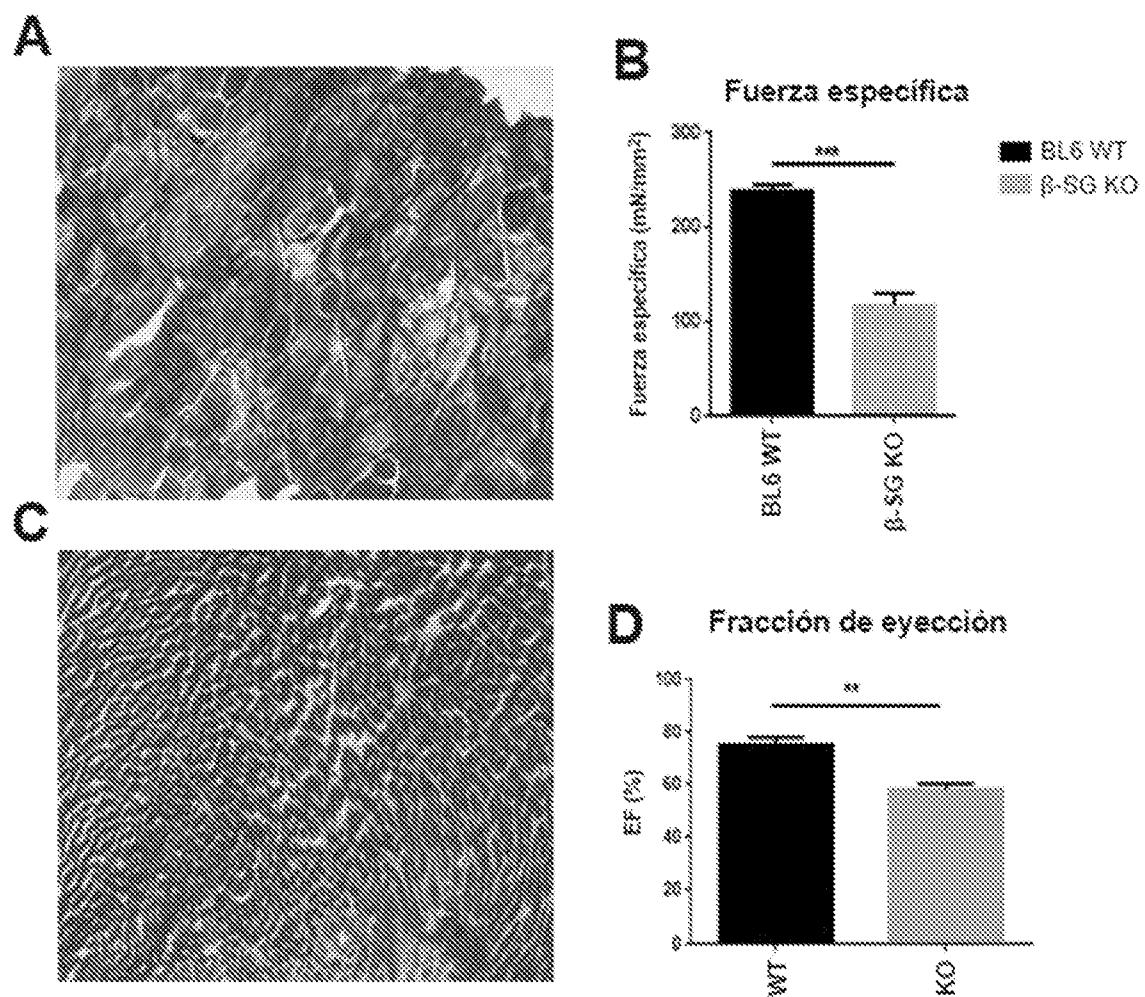


Figura 8.

scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB



Figura 9.

El suministro de scAAVrh.74.MHC κ 7.hSGCB mediante la vena de la coxa de ratones *sgcb*^{-/-} resulta en casi 100 % de la transducción de las fibras musculares en cada músculo.

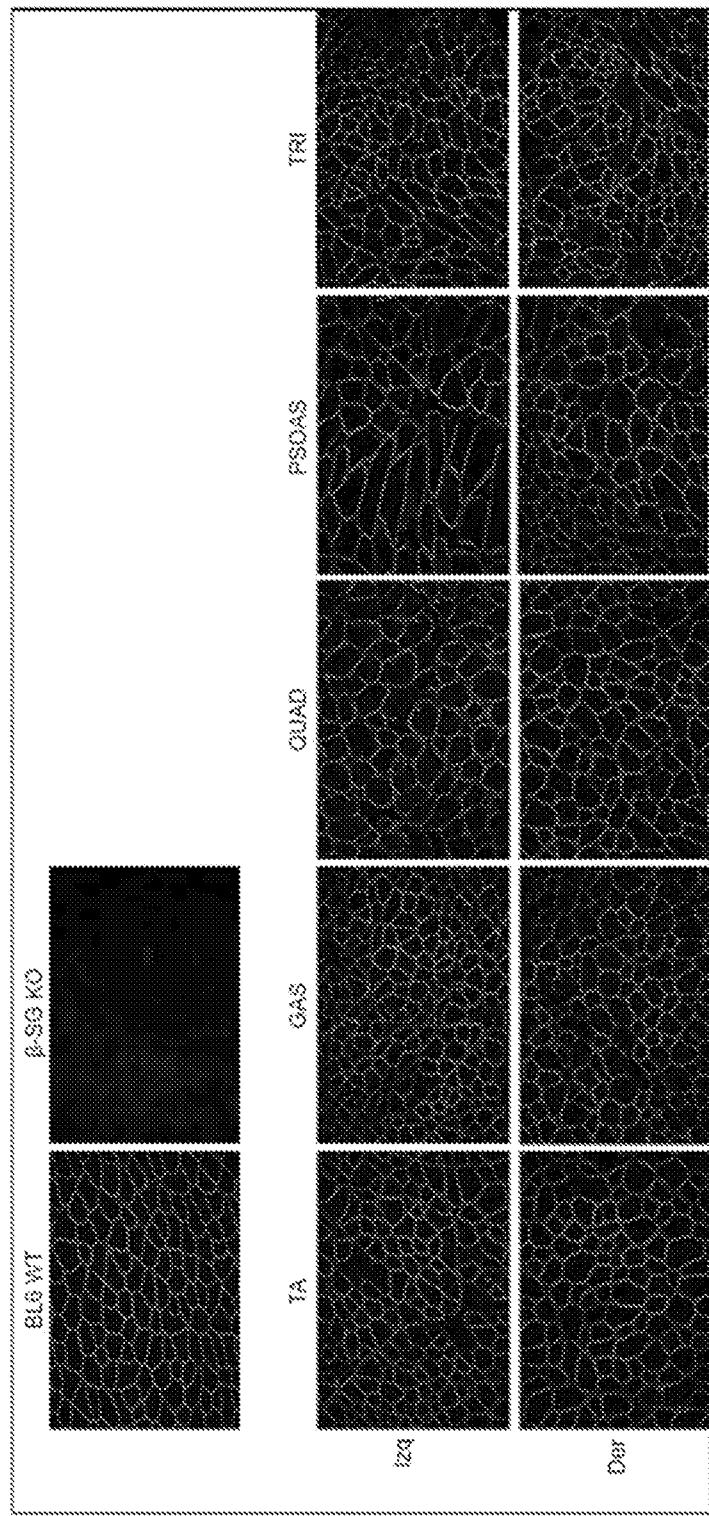


Figura 10.

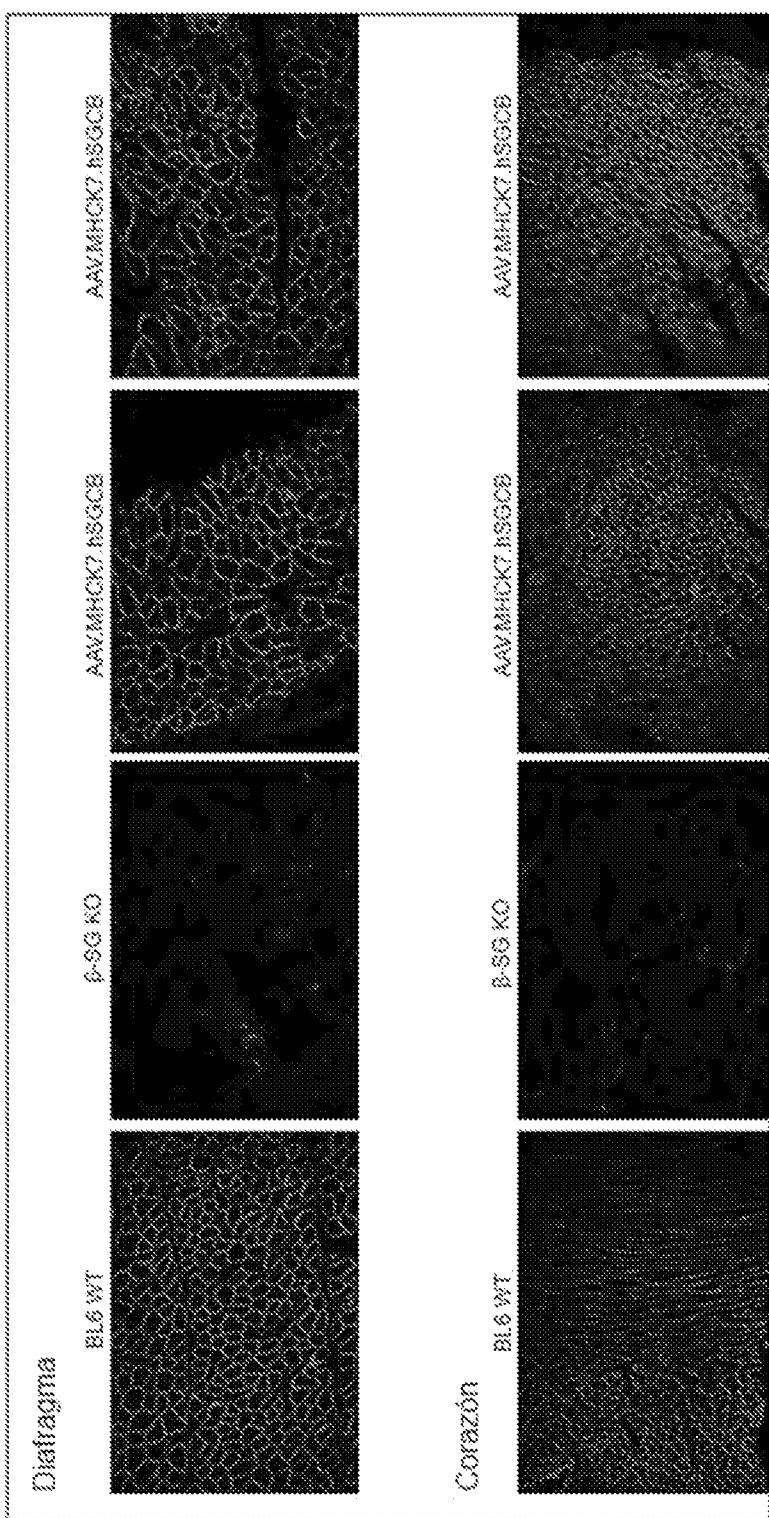


Figura 11.

ES 2 979 174 T3

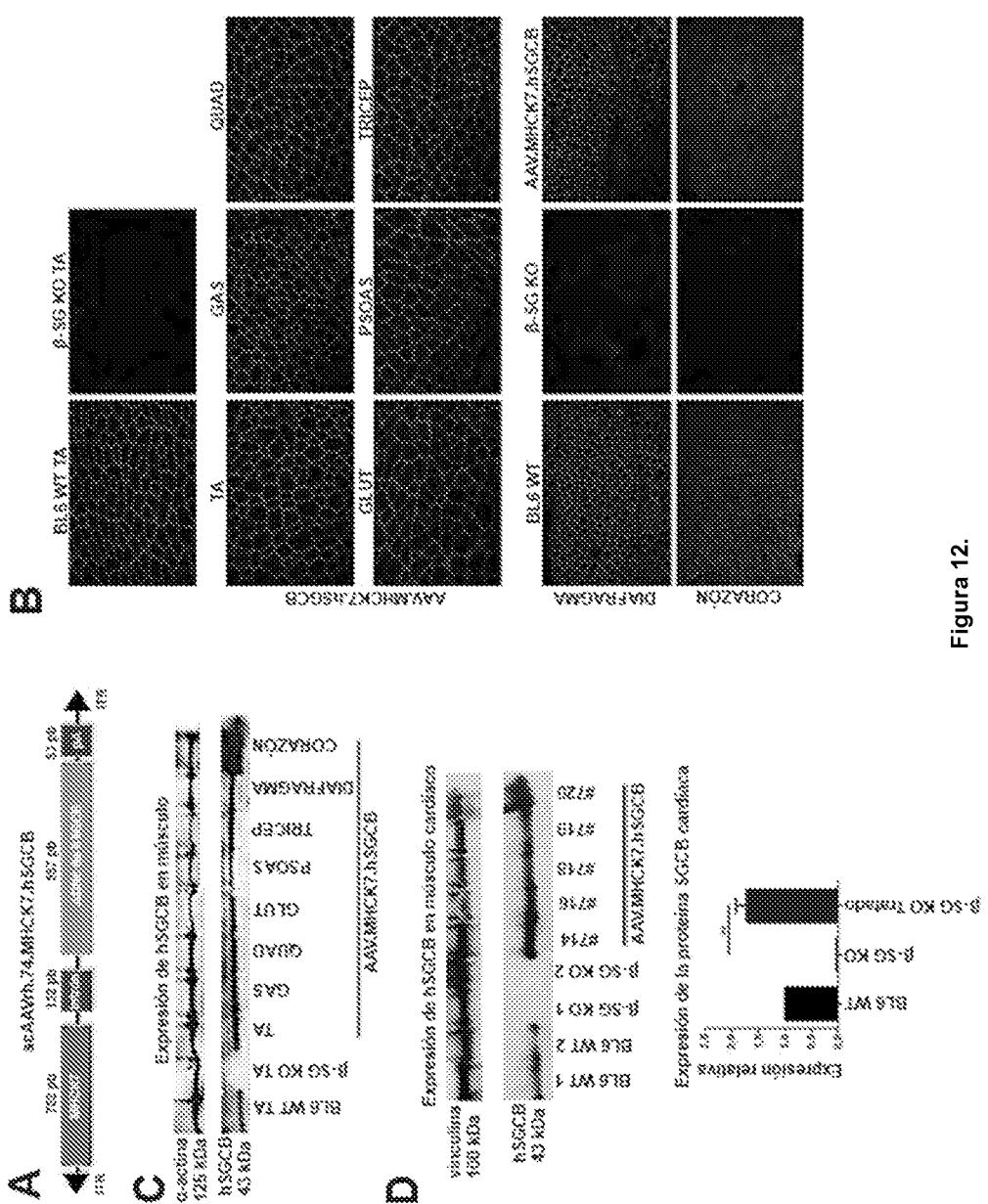
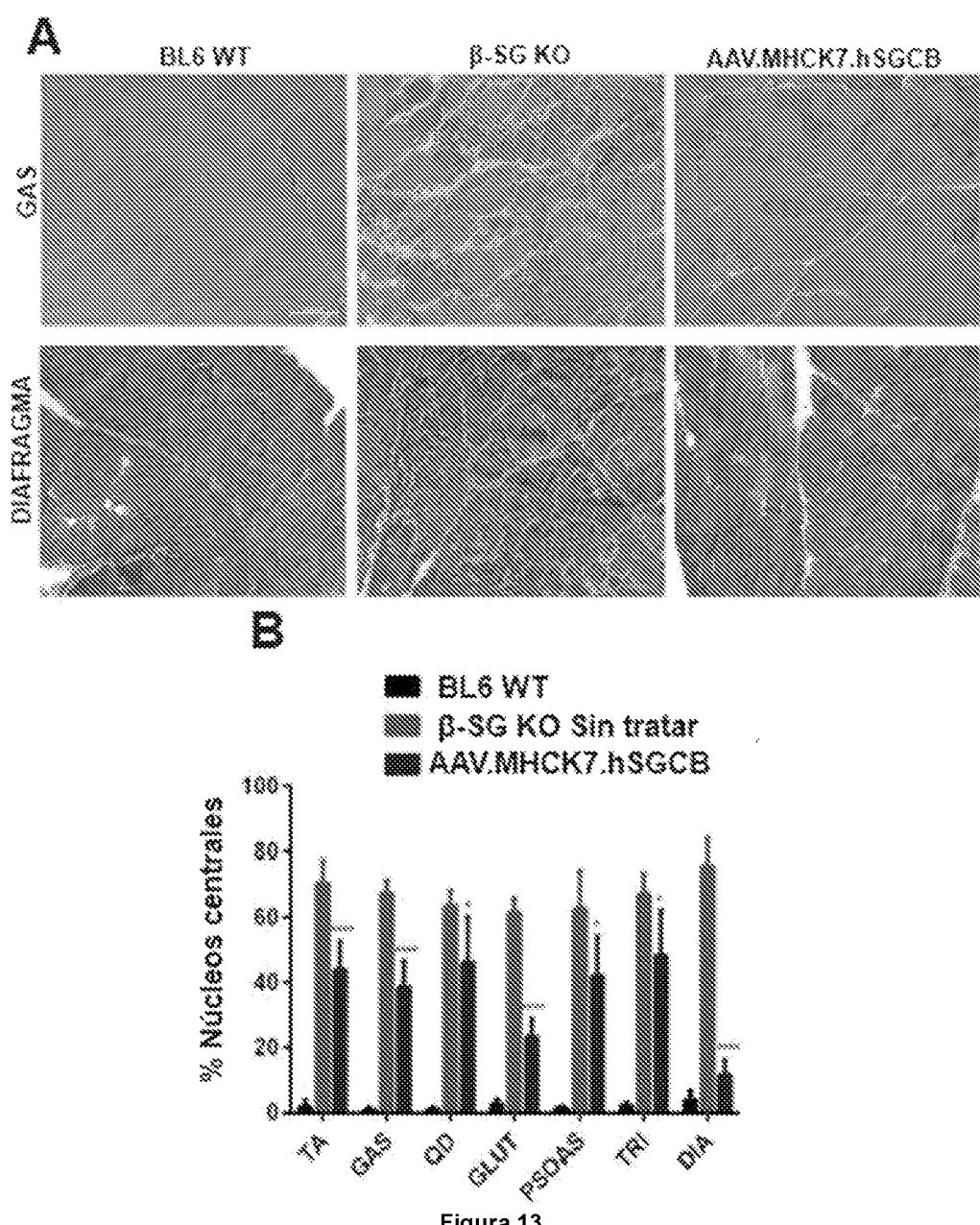


Figura 12.



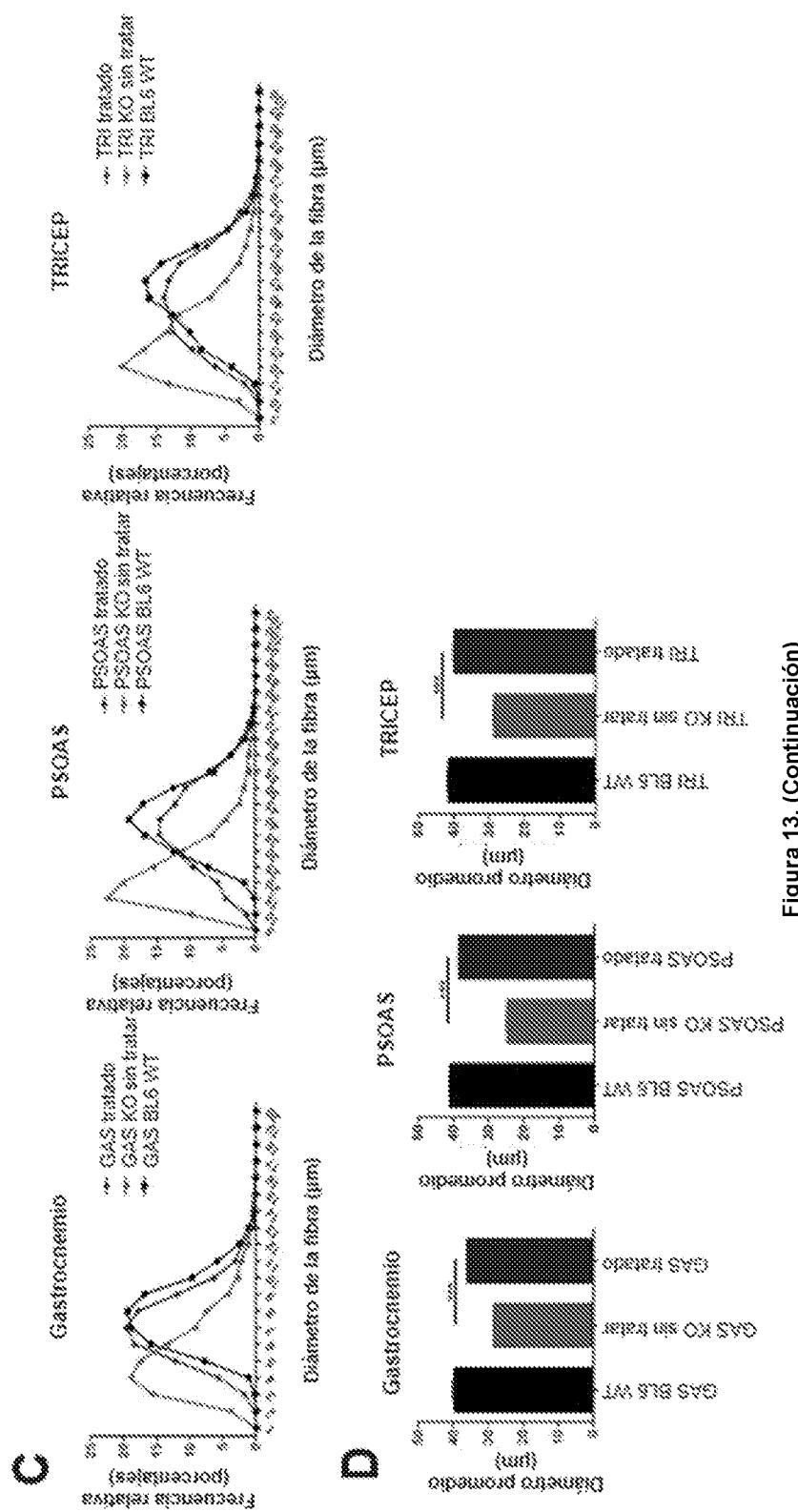
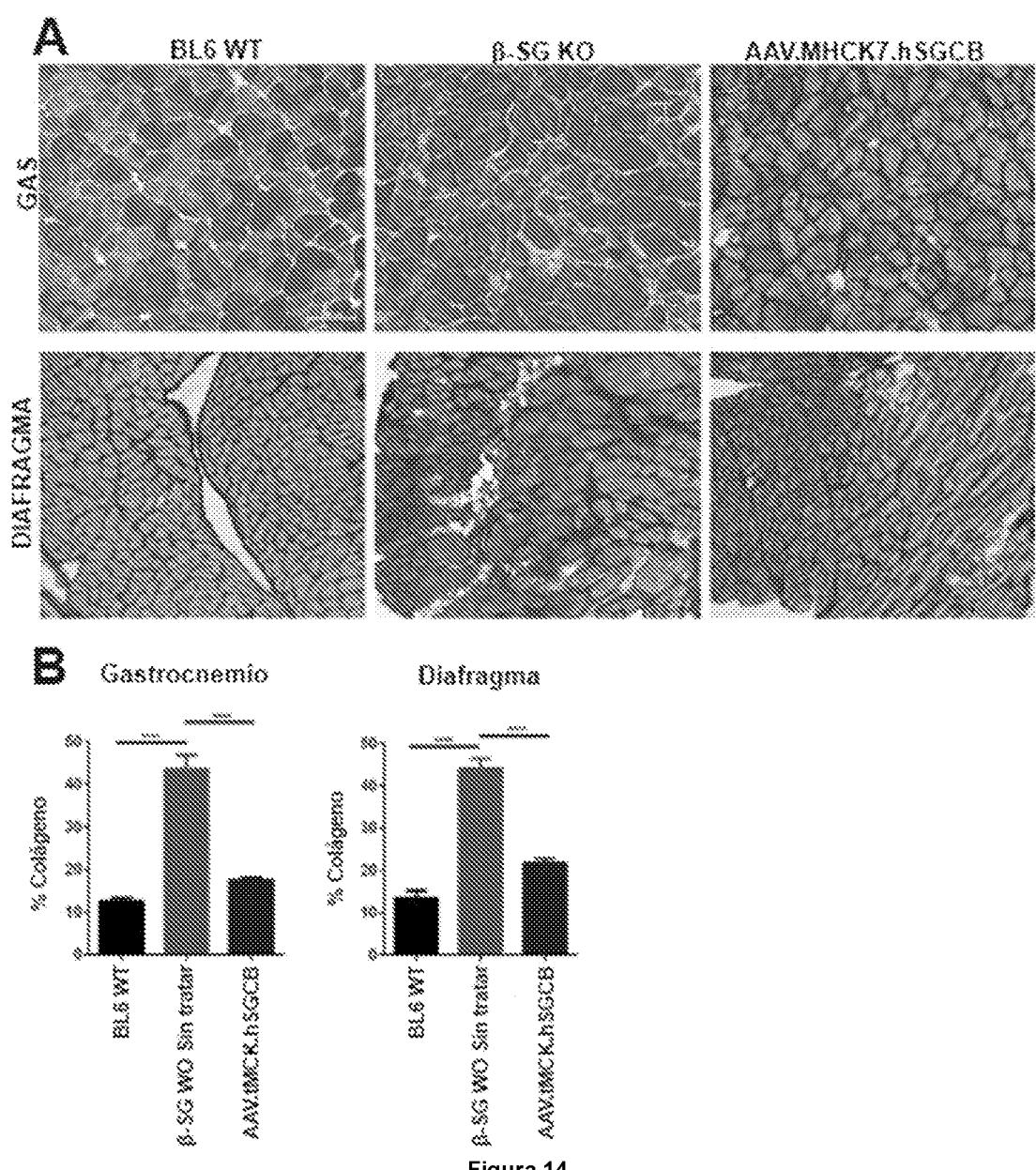


Figura 13. (Continuación)



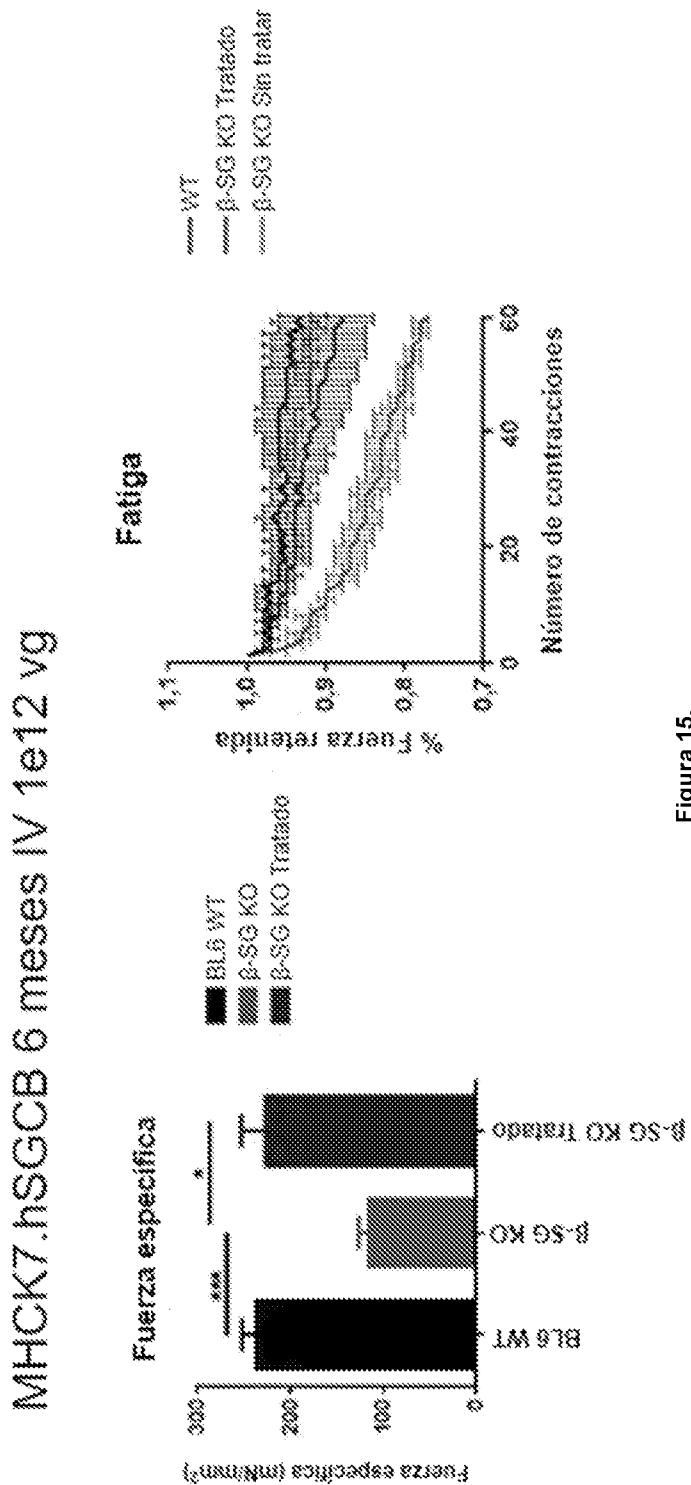
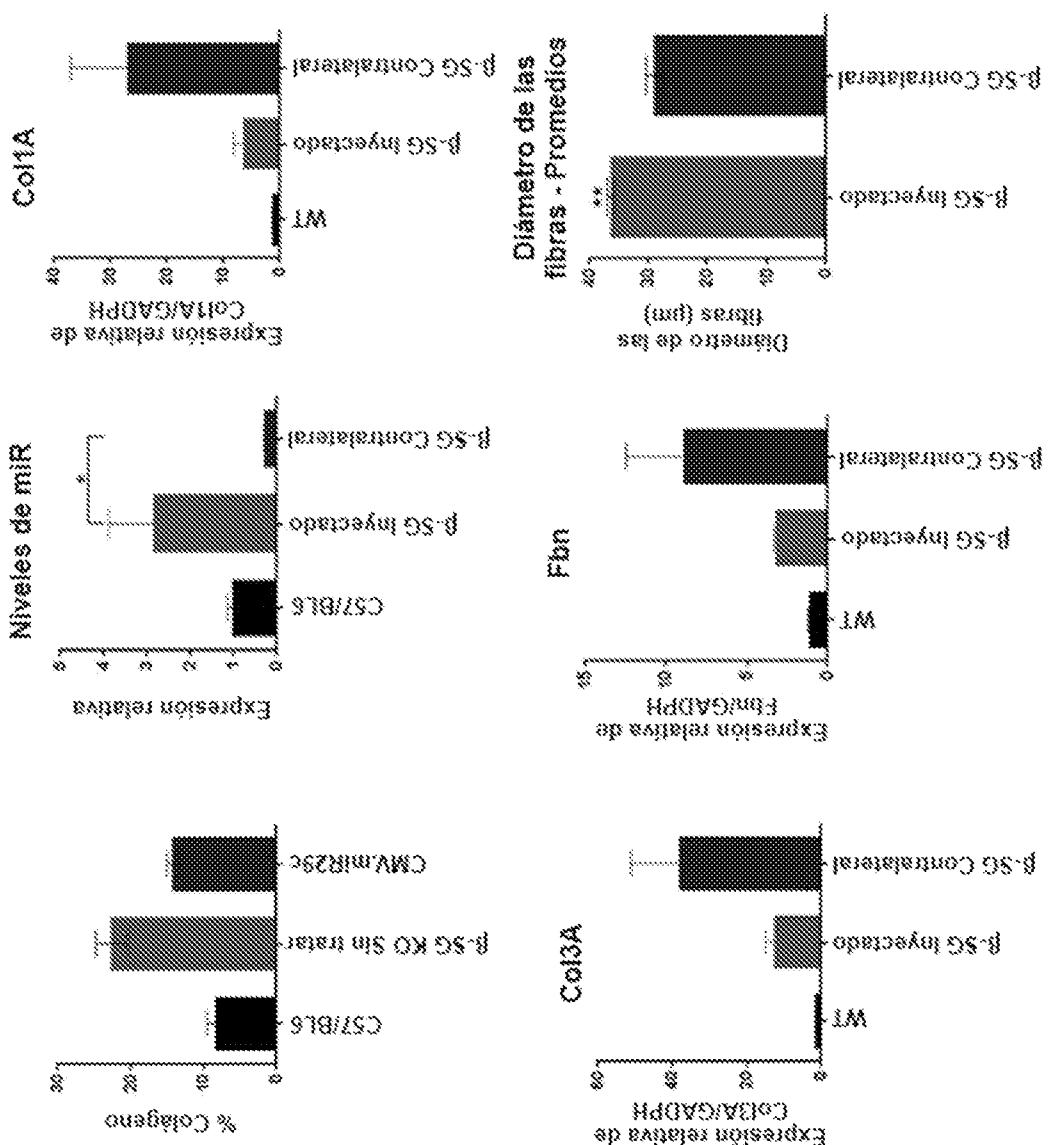


Figura 15.



SEQ ID NO: 9: miR28c en una cadena principal de miR30

Figura 16.



ES 2 979 174 T3

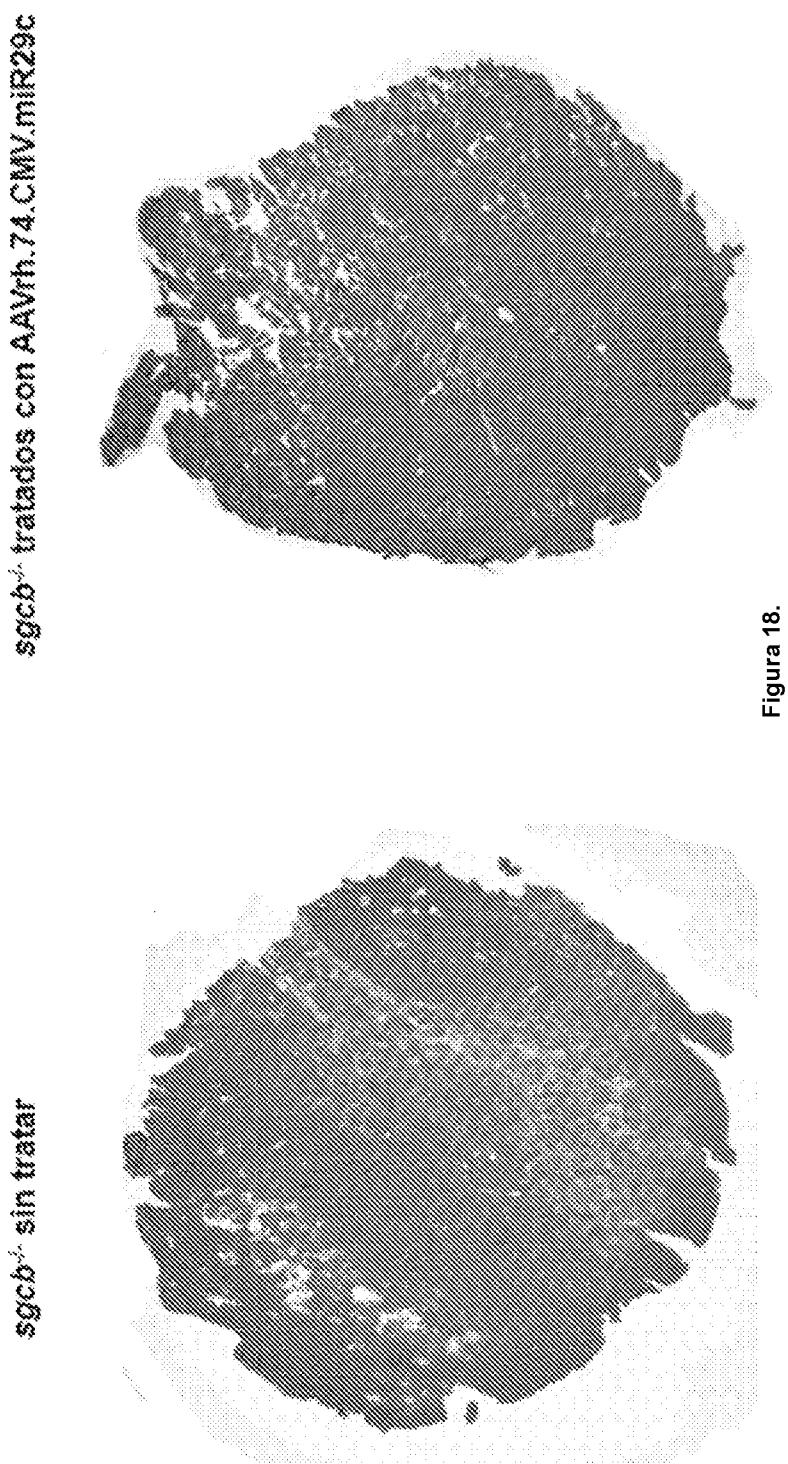


Figura 18.

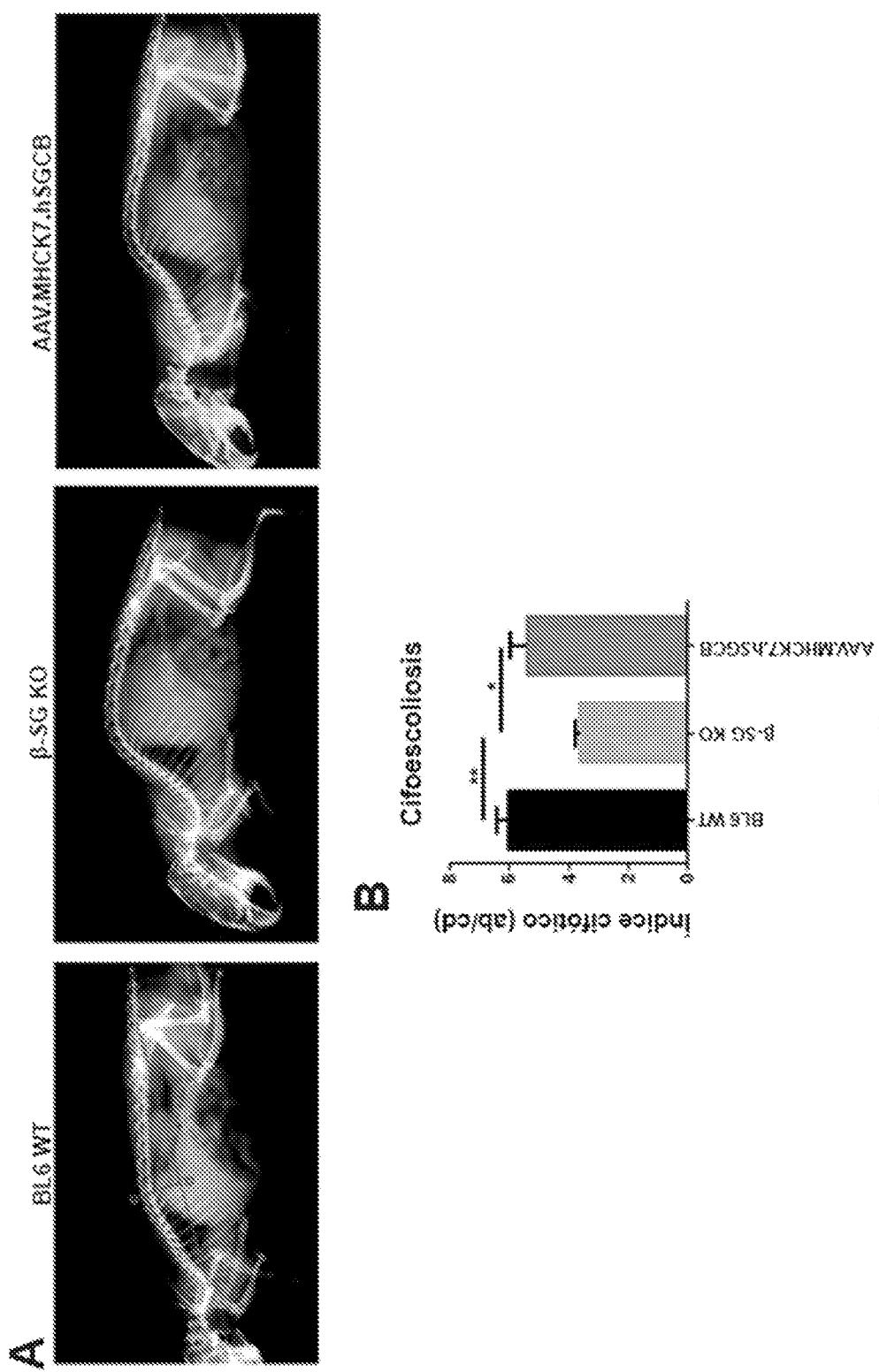


Figura 19.

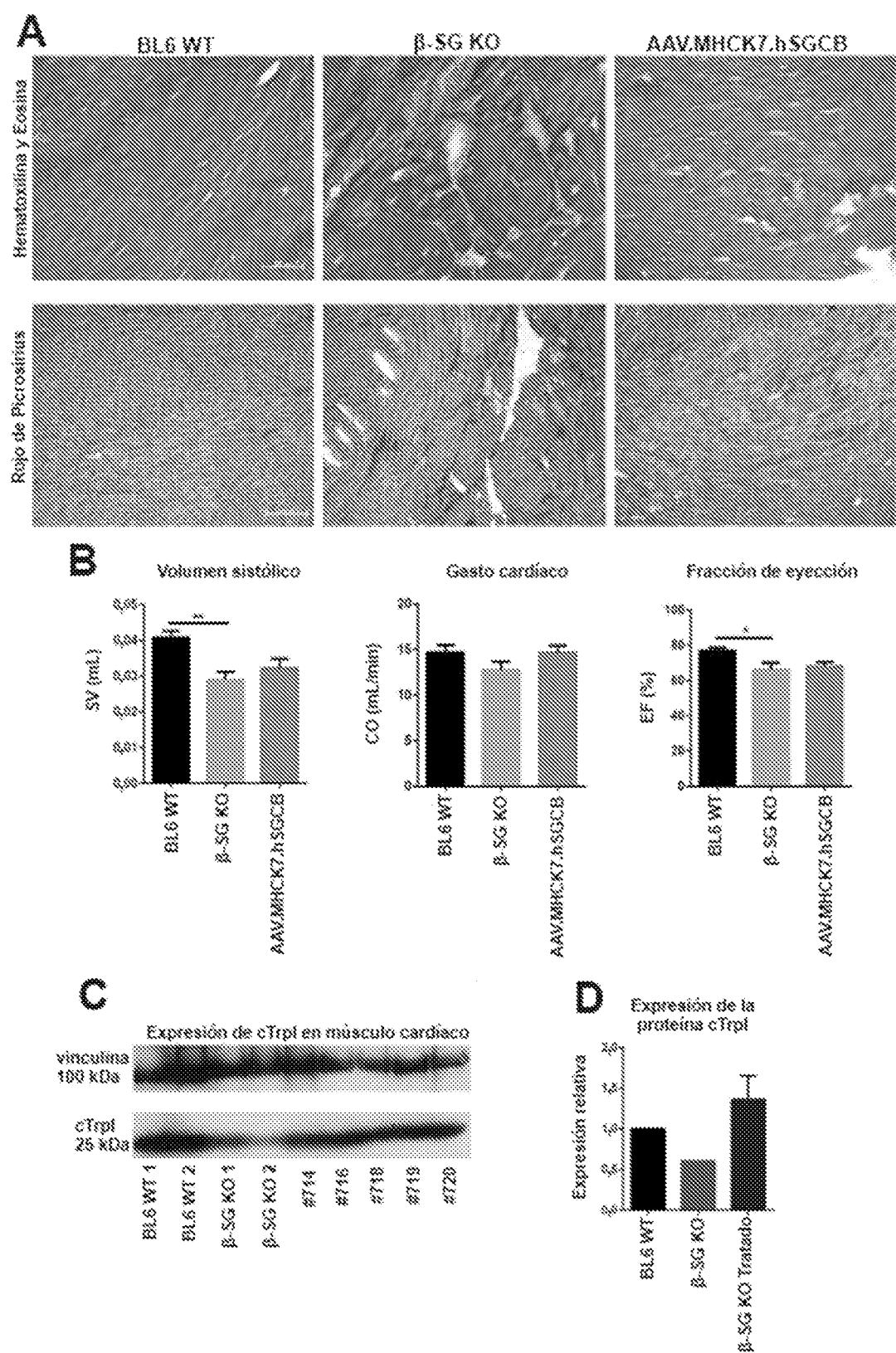


Figura 20.

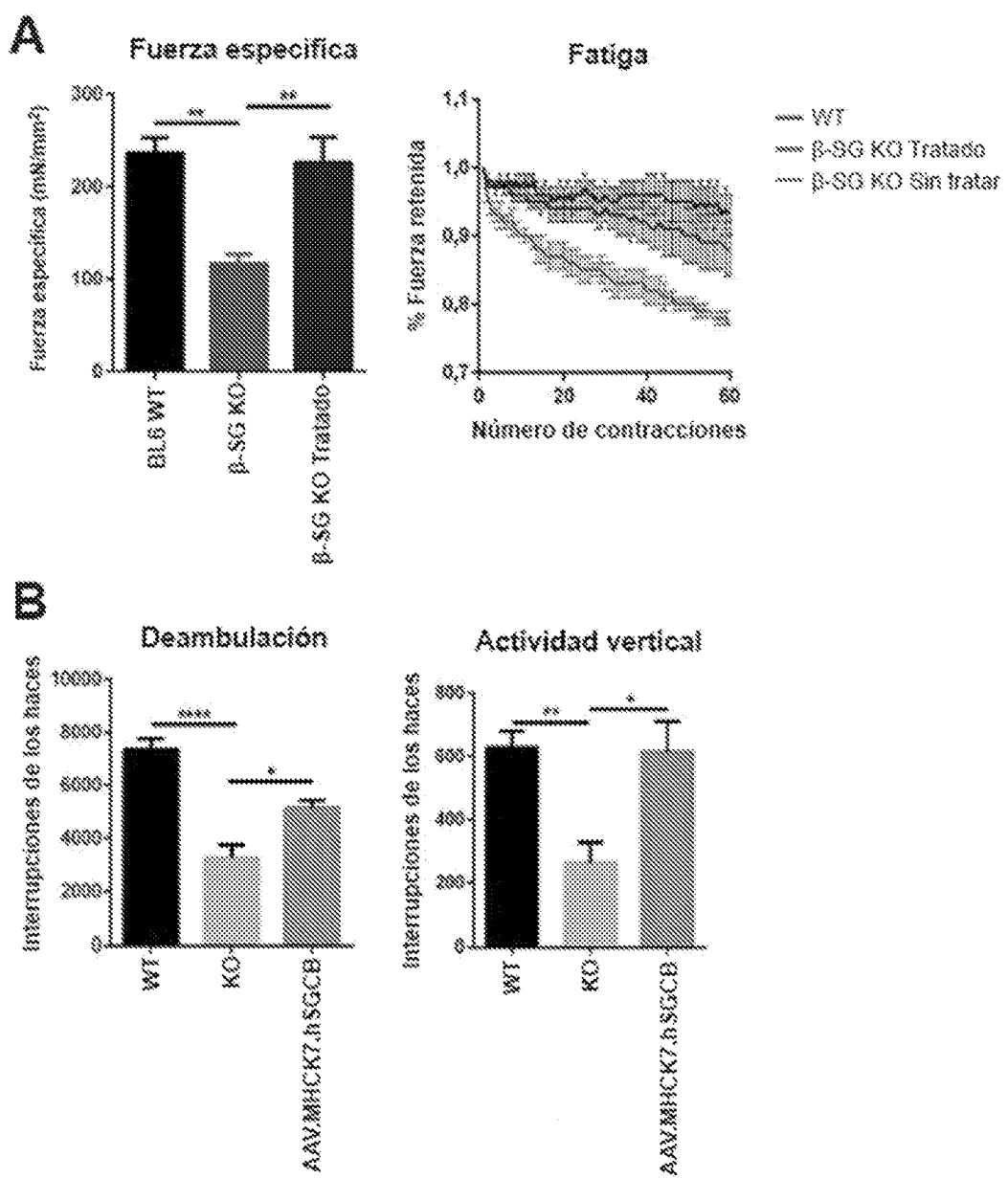


Figura 21.

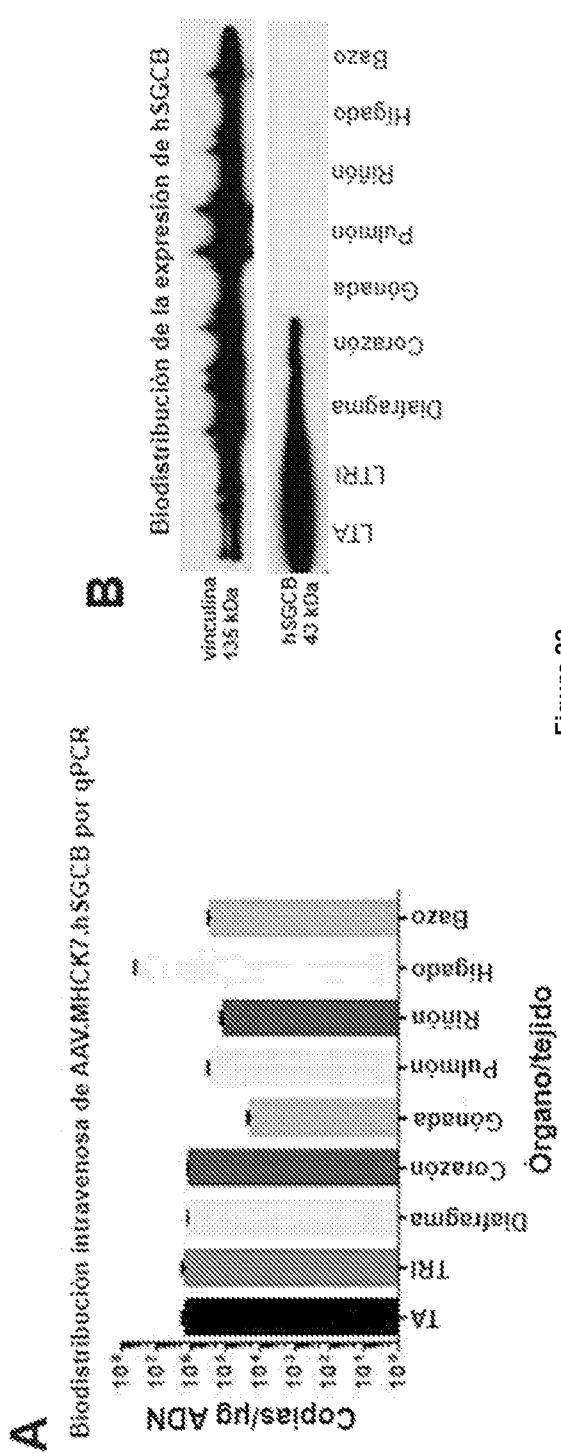


Figura 22.