

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 830 256**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/864 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2016** **PCT/US2016/051552**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017** **WO17048732**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2016** **E 16847150 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2020** **EP 3350319**

54 Título: **Productos de virus recombinante y procedimientos de inhibición de expresión de miotilina**

30 Prioridad:

14.09.2015 US 201514853517

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

03.06.2021

73 Titular/es:

NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)
700 Children's Drive, Room W172
Columbus, OH 43205, US

72 Inventor/es:

HARPER, SCOTT QUENTON y
LIU, JIAN

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 830 256 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

Productos de virus recombinante y procedimientos de inhibición de expresión de miotilina

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a procedimientos en base a la interferencia de ARN para la inhibición de la expresión del gen de miotilina. Los virus adenoasociados recombinantes de la invención entregan ADNs que codifican microARNs que disminuyen la expresión de miotilina. Los procedimientos tienen aplicación en el tratamiento de distrofias musculares tales como Distrofia Muscular de cintura tipo 1A.

Antecedentes

- 10 Las distrofias musculares (MDs) son un grupo de enfermedades genéticas. El grupo se caracteriza por la debilidad progresiva y la degeneración de los músculos esqueléticos que controlan el movimiento. Algunas formas de MD se desarrollan en la infancia o niñez, mientras otras pueden no aparecer hasta la edad mediana o posteriormente. los desórdenes difieren en términos de la distribución y extensión de la debilidad de los músculos (algunas formas de MD también afectan el músculo cardíaco), la edad de inicio, la tasa de progreso y el patrón de herencia.
- 15 [0003] Un grupo de MDs es el grupo de cintura (LGMD) de MDs. Las LGMDs son condiciones raras y se presentan de manera diferente en diferentes personas, respecto a la edad de inicio, áreas de debilidad muscular, involucramiento del corazón y respiratorio, tasa de progreso y severidad. Las LGMDs pueden comenzar en la infancia, adolescencia, edad adulta temprana o incluso más tarde. Ambos géneros pueden ser afectados por igual. Las LGMDs causan debilidad en los hombros y cintura pélvica, también con debilitamiento algunas veces a lo largo del tiempo de los músculos cercanos en las piernas superiores y brazos. La debilidad de las piernas aparece
- 20 frecuentemente antes que la de los brazos. Usualmente los músculos faciales no son afectados. A medida que la condición progresa, las personas pueden tener problemas para caminar y con el tiempo pueden requerir el uso de una silla de ruedas. El involucramiento de los músculos de los hombros y los brazos puede conducir a dificultad para levantar los brazos sobre la cabeza y levantar objetos. En algunos tipos de LGMD, pueden involucrarse los músculos del corazón y la respiración.
- 25 Existen por lo menos diez y nueve formas de LGMD, y las formas son clasificadas por sus defectos genéticos asociados.

Tipo	Patrón de herencia	Gen o cromosoma
LGMD1A	Autosómico dominante	Gen de miotilina
LGMD1B	Autosómico dominante	Gen de lamina A/C
LGMD1C	Autosómico dominante	Gen de caveolina
LGMD1D	Autosómico dominante	Cromosoma 7
LGMD1E	Autosómico dominante	Gen de desmina
LGMD1F	Autosómico dominante	Cromosoma 7
LGMD1G	Autosómico dominante	Cromosoma 4
LGMD2A	Autosómico recesivo	Gen de calpaina-3
LGMD2B	Autosómico recesivo	Gen de disferlina
LGMD2C	Autosómico recesivo	Gen de gamma-sarcoglicano
LGMD2D	Autosómico recesivo	Gen de alfa-sarcoglicano
LGMD2E	Autosómico recesivo	Gen de beta-sarcoglicano
LGMD2F	Autosómico recesivo	Gen de delta-sarcoglicano
LGMD2G	Autosómico recesivo	Gen de teletonina
LGMD2H	Autosómico recesivo	TRIM32
LGMD2I	Autosómico recesivo	Gen de FKRP
LGMD2J	Autosómico recesivo	Gen de titina
LGMD2K	Autosómico recesivo	Gen de POMT1
LGMD2L	Autosómico recesivo	Gen de fukutina

Las pruebas especializadas para LGMD están disponibles ahora a través de un esquema nacional para el diagnóstico, el National Commissioning Group (NCG).

La LGMD1A es causada por mutaciones en sentido equivocado de ganancia de función en el gen de miotilina (MYOT) [Hauser et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 71: 1428-1432 (2002); Hauser et al., *Hum. Mol. Genet.*, 9: 2141-2147 (2000); Shalaby et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 68: 701-707 (2009)]. Los pacientes de LGMD1A desarrollan debilidad de piernas y brazos próximos en la edad adulta temprana (25 años es el promedio de edad de inicio), que progresa hasta la musculatura distal de extremidad. A nivel histológico, los pacientes muestran degeneración de la miofibra y variabilidad de tamaño, escisión de la fibra, mionúcleos con localización central, vesículas autofágicas, y reemplazo de miofibras con grasa y tejido fibrótico, que son todos rasgos comunes de la distrofia muscular. Los pacientes con LGMD1A desarrollan también agregados de proteína miofibrilar intramuscular, vacuolas con borde, y severa desorganización de disco Z (llamada ondulación de disco Z), que interrumpe completamente la estructura sarcomérica. Se ha desarrollado un modelo de ratón transgénico, el modelo de ratón T57I, que usa un alelo MYOT humano mutante [Garvey et al., *Hum. Mol. Genet.* 15: 2348-2362 (2006)]. De modo importante, los ratones T57I resumen las anomalías progresivas histológicas y funcionales asociadas con LGMD1A, incluyendo tamaño muscular reducido, debilidad muscular, agregados miofibrilares intramusculares, ondulación de disco Z, y mionúcleos con localización central.

El gen de miotilina codifica una proteína de 57 kDa expresada primariamente en el músculo esquelético y cardíaco. La miotilina parece funcionar como un componente estructural del disco Z, y por ello puede contribuir al ensamble del sarcómero, la estabilización del filamento de actina, y forzar la transmisión en músculo estriado. Sin embargo, la miotilina no es requerida para el desarrollo o funcionamiento normal del músculo, dado que los ratones nulos en miotilina son expresa e histológicamente normales. Específicamente, los músculos de ratón que carecen de miotilina son indistinguibles de los de tipo silvestre en masa muscular, tamaño de la miofibra, fuerza de contracción (fuerza específica), e integridad sarcolémica. Además, los ratones nulos en MYOT se desarrollan normalmente, viven un intervalo de vida normal y no muestran evidencia histológica de distrofia muscular o malformaciones del disco Z. Las transcripciones de miotilina de ratón y humana son expresadas en los mismos tejidos, tienen las mismas estructuras genómicas y las secuencias de proteína están altamente conservadas (90% de identidad; 94% de similitud), lo cual indica una funcionalidad conservada.

La interferencia de ARN (ARNi) es un mecanismo de regulación genética en células eucariotas, que ha sido considerado para el tratamiento de diferentes enfermedades. ARNi se refiere al control postranscripcional de la expresión genética mediada por microARNs (ARNmis). Los ARNmis son ARNs pequeños (21-25 nucleótidos), que no codifican, que comparten homología de secuencia y par de bases con mensajeros ARNs relacionados (mARNs). La interacción entre los ARNmis y mARNs dirige la maquinaria de silenciamiento genético celular para evitar la traducción de los mARNs. La ruta de ARNi es sumariada en Duan (Ed.), sección 7.3 del capítulo 7 en *Muscle Gene Therapy*, Springer Science+Business Media, LLC (2010). La sección 7.4 menciona la terapia ARNi MYOT de LGMD1A en ratones, para demostrar la prueba de principio para terapia por ARNi de desórdenes dominantes del músculo.

A medida que se ha desarrollado el entendimiento de las rutas de ARNi natural, los investigadores han diseñado ARNmis artificiales para uso en la expresión reguladora de genes objetivo, para el tratamiento de enfermedades. Como se describe en la sección de 7.4 de Duan, pueden transcribirse ARNmis supraartificiales desde cintas de expresión de ADN. La secuencia de ARNmi específica para un gen objetivo es transcrita junto con secuencias requeridas para dirigir el procesamiento del ARNmi en una célula. Los vectores virales tales como un virus adenoasociado han sido usados para entregar ARNmis al músculo [Fechner et al., *J. Mol. Med.*, 86: 987-997 (2008)].

El virus adenoasociado (AAV) es un parvovirus con déficit de replicación, cuyo genoma de ADN de hebra simple tiene una longitud de aproximadamente 4.7 kb, incluyendo 145 repeticiones terminales invertidas de nucleótido (ITRs). Existen múltiples serotipos de AAV. Las secuencias de nucleótidos de los genomas de los serotipos de AAV son conocidas. Por ejemplo, el genoma completo de AAV-1 es suministrado en GenBank Accession No. NC_002077; el genoma completo de AAV-2 es suministrado en GenBank Accession No. NC_001401 y Srivastava et al., *J. Virol.*, 45: 555-564 (1983); el genoma completo de AAV-3 es suministrado en GenBank Accession No. NC_1829; el genoma completo de AAV-4 es suministrado en GenBank Accession No. NC_001829; el genoma de AAV-5 es suministrado en GenBank Accession No. AF085716; el genoma completo de AAV-6 es suministrado en GenBank Accession No. NC_001862; por lo menos porciones de los genomas de AAV-7 y AAV-8 son suministradas en GenBank Accession Nos. AX753246 y AX753249, respectivamente; el genoma de AAV -9 es suministrado en Gao et al., *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); el genoma de AAV-10 es suministrado en *Mol. Ther.*, 13(1): 67-76 (2006); y el genoma de AAV-11 es suministrado en *Virology*, 330(2): 375-383 (2004). Las secuencias que actúan en cis que dirigen la replicación de ADN viral (rep), encapsidación/empaque e integración de cromosoma de célula anfitrión, están contenidas dentro de las ITRs de AAV. Tres promotores de AAV (llamados p5, p19, y p40 por sus ubicaciones relativas en el mapa) manejan la expresión de los dos marcos de lectura abierta interna de AAV que codifican los genes rep y cap. Los dos promotores rep (p5 y p19), acoplados con la escisión diferencial del intrón de AAV individual (en los nucleótidos 2107 y 2227), dan como resultado la producción de cuatro proteínas rep (rep 78, rep 68, rep 52, y rep 40) del gen rep. Las proteínas rep poseen múltiples propiedades enzimáticas que son finalmente responsables por la replicación del genoma viral. El gen cap es expresado del promotor p40 y codifica las tres proteínas VP1, VP2, y VP3 de cápside. Los sitios de inicio traslacional de escisión alternativa y de no consenso son responsables por la producción de las tres proteínas relacionadas de cápside. En la posición 95 del mapa del genoma de AAV se localiza un sitio de poliadenilación de consenso individual. En Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992) se revisan el ciclo de vida y la genética de AAV.

El AAV posee rasgos únicos que lo hacen atractivo como un vector para el suministro de ADN extraño a las células, por ejemplo, en terapia de genes. La infección de células en cultivo con AAV es no citopática, y la infección natural de humanos y otros animales es silenciosa y asintomática. Además, el AAV infecta muchas células de mamíferos, permitiendo la posibilidad de focalizar muchos tejidos diferentes *in vivo*. Además, el AAV transduce lentamente células que se dividen y que no se dividen, y puede persistir esencialmente por el periodo de vida de aquellas células, como un episoma nuclear transcripcionalmente activo (elemento extracromosómico). El genoma proviral de AAV es infeccioso como el ADN clonado en plásmidos, lo cual hace viable la construcción de genomas recombinantes. Además, dado que las señales que dirigen la replicación, encapsidación de genoma e integración de AAV están contenidas dentro de las ITRs del genoma de AAV, algunos o todos los aproximadamente 4.3 kb internos del genoma (proteínas de replicación que codifica y de cápside estructural, rep-cap) pueden ser reemplazados por ADN extraño. Las proteínas rep y cap pueden ser suministradas *in trans*. Otro rasgo significativo de AAV es que es un virus extremadamente estable y robusto. Resiste fácilmente las condiciones usadas para inactivar adenovirus (56o a 65oC por varias horas), haciendo menos crítica la preservación en frío de AAV. El AAV puede incluso ser liofilizado. Finalmente, las células infectadas con AAV no son resistentes a la superinfección.

La técnica previa incluye el documento US2014/0045925, el cual divulga el suministro de ARNm mediado por AAV que tiene como objetivo el gen de miotilina.

Persiste una necesidad en la técnica por un tratamiento para LGMD1A.

Sumario

La invención a la cual atañe esta memoria descriptiva está definida por las reivindicaciones anexas a esta descripción.

La presente invención suministra productos para prevenir o inhibir la expresión del gen MYOT. La divulgación utiliza ARNi para prevenir o inhibir la expresión del gen MYOT. Los procedimientos involucran el suministro de ARNs inhibidores específicos para el gen MYOT a células del músculo. Los ARNs inhibidores de MYOT contemplados incluyen, pero no están limitados a, ARNs antisentido, ARNs inhibidores pequeños (siARNs), ARNs de horquilla corta (shARNs) o microARNs artificiales (ARNmis de MYOT) que inhiben la expresión de MYOT. El uso de los procedimientos y productos está implicado, por ejemplo, en la prevención o tratamiento de LGMD1A. Algunas realizaciones de la invención sacan provecho de las propiedades únicas de AAV para entregar ADN que codifican ARNs inhibidores de MYOT, a células del músculo. Otros aspectos de la divulgación utilizan otros vectores (por ejemplo otros vectores virales tales como adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus asociados con equinos, alfavirus, virus de sífilis, virus de herpes, virus de polio, virus sindbis y virus vacuna) para entregar polinucleótidos que codifican ARNs inhibidores de MYOT.

En un aspecto, la invención suministra ARNm de MYOT. En otro aspecto, la invención suministra rAAV que codifica los ARNm de MYOT, en los que el rAAV carece de genes rep y cap. En algunos aspectos de la divulgación, el ARNm de MYOT comprende una hebra guía de ARNm antisentido, seleccionada de aquellas expuestas en SEQ ID NO: 7 hasta SEQ ID NO: 11266. Estas secuencias comprenden secuencias "guía" antisentido de la invención, de tamaños variables. La hebra guía antisentido es la hebra del ARNm dúplex maduro que se convierte en el componente de ARN del complejo de silenciamiento inducido de ARN, finalmente responsable del silenciamiento de genes específicos de secuencia. Véase la sección 7.3 de Duan, arriba. Por ejemplo, la primera hebra guía antisentido en SEQ ID NO: 7 corresponde a (es el complemento inverso de) el extremo 3' de la secuencia de miotilina expuesta en la figura 1. La segunda hebra guía antisentido (SEQ ID NO: 8) es desplazado un nucleótido de la primera y así sucesivamente. En algunas realizaciones, el contenido de GC de la hebra guía antisentido es 60% o menos, y/o el extremo 5' de la hebra guía antisentido es más rico en AU mientras el extremo 3' es más rico en GC. Los ARNm de MYOT ejemplares son codificados por los ADN expuestos en SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 11286, 11287 y 11288. En algunas realizaciones, los rAAV son AAV autocomplementarios (sc). En algunas realizaciones, los ARNm de MYOT que codifican secuencias están bajo el control de un promotor tMCK o CK6 específico del músculo.

En otro aspecto, la invención suministra una composición que comprende el rAAV que codifica el ARNm de MYOT.

La divulgación suministra un procedimiento para la prevención o inhibición de la expresión del gen MYOT en una célula, que comprende el contacto de la célula con rAAV que codifica un ARNm de MYOT, en el que el ARNm es codificado por el ADN expuesto en SEQ ID NO: 11286, 11287 o 11288, y en el que el rAAV carece de los genes rep y cap. La expresión de MYOT es inhibida en al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99 por ciento.

En todavía otro aspecto, la divulgación suministra un procedimiento para el suministro de ADN que codifica el ARNm de MYOT expuesto en SEQ ID NO: 11286, 11287 o 11288 a un animal que lo requiere, que comprende respectivamente la administración al animal de un rAAV que codifica el ARNm de MYOT, en el que el rAAV carece de los genes rep y cap.

En todavía otro aspecto, la divulgación suministra un procedimiento para la prevención o tratamiento de una distrofia muscular (incluyendo, pero sin limitarse a, LGMD1A) que comprende la administración de un rAAV que codifica un ARNm de MYOT, en el que el ARNm es codificado por el ADN expuesto en SEQ ID NO: 11286, 11287 o 11288 y

en el que el rAAV carece de los genes rep y cap. "Tratamiento" puede incluir la mejora de uno o más síntomas de la distrofia muscular (tal como LGMD1A). Los puntos finales molecular, bioquímico, histológico y funcional demuestran la eficacia terapéutica de ARNm de MYOT. Los puntos finales contemplados por la invención incluyen uno o más de: la reducción o eliminación de la proteína mutante de MYOT en músculos afectados, disminución del gen MYOT, reducción o eliminación de agregados de proteína patógena (por ejemplo, asociada con LGMD1A) en músculo, incremento en los diámetros de miofibra, y mejora en la fuerza del músculo.

Descripción detallada

Los genomas de AAV recombinante de la invención comprenden una o más ITRs de AAV que flanquean un polinucleótido que codifica, por ejemplo, uno o más ARNm de MYOT. El polinucleótido está unido de modo operacional con ADN de control transcripcional, específicamente promotor ADN que es funcional en el objetivo. Los proveedores comerciales tales como Ambion Inc. (Austin, TX), Dharmacon Inc. (Lafayette, CO), InvivoGen (San Diego, CA), y Molecular Research Laboratories, LLC (Herndon, VA) generan moléculas inhibidoras ARN habituales. Adicionalmente, están disponibles kits comerciales para producir moléculas habituales de siARN, tales como Kit de Construcción de siRNA SILENCER^{MR} (Ambion Inc., Austin, TX) o psiRNA System (InvivoGen, San Diego, CA). Aspectos de la divulgación incluyen un genoma de rAAV que comprende: el ADN expuesto en SEQ ID NO: 1 que codifica el ARNm de MYOT llamado "miMyoT-1291," el ADN expuesto en SEQ ID NO: 2 que codifica el ARNm de MYOT llamado "miMyoT-1321," el ADN expuesto en SEQ ID NO: 3 que codifica el ARNm de MYOT llamado "miMyoT-1366" o el ADN expuesto en SEQ ID NO: 4 que codifica el ARNm de MYOT llamado "miMyoT-1490." En cuanto se refiere a la invención, un genoma de rAAV comprende el ADN expuesto en SEQ ID NO: 11286 que codifica el ARNm de MYOT llamado "miMyoT-1043," el ADN expuesto en SEQ ID NO: 11287 que codifica el ARNm de MYOT llamado "miMyoT-1044," y el ADN expuesto en SEQ ID NO: 11288 que codifica el ARNm de MYOT llamado "miMyoT-1634."

Los genomas de rAAV carecen de ADN rep y cap de AAV. El ADN de AAV en los genomas de rAAV puede ser de cualquier serotipo de AAV para el cual un virus recombinante puede derivarse incluyendo, pero sin limitarse a, serotipos de AAV, que son AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 y AAV-11. Como se anotó en la sección de antecedentes anteriormente, las secuencias de nucleótido de los genomas de diferentes serotipos de AAV son conocidas en la técnica.

Los plásmidos de ADN de la invención comprenden genomas rAAV de la invención. Los plásmidos de ADN son transferidos a células a las que se permite infectarse con un virus asistente de AAV (por ejemplo, adenovirus, adenovirus con eliminación de E1 o virus de herpes) para el ensamble del genoma rAAV dentro de partículas virales infecciosas. Las técnicas para producir partículas de rAAV, en las cuales se suministran a una célula el genoma AAV que va a ser empacado, los genes rep y cap, y funciones de virus auxiliar, son estándares en la técnica. La producción de rAAV requiere que los siguientes componentes estén presentes dentro de una célula individual (denotada aquí como una célula de empaque): un genoma de rAAV, genes rep y cap de AAV separados del (es decir no dentro) genoma de rAAV, y funciones de virus asistente. Los genes rep y cap de AAV pueden ser de cualquier serotipo de AAV para el cual pueda derivarse virus recombinante y pueden ser de un serotipo AAV diferente al de la ITRs del genoma de rAAV, incluyendo pero sin limitarse a los serotipos de AAV que son AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 y AAV-11. Por ejemplo, en el documento WO 01/83692, el cual es incorporado en esta memoria como referencia en su totalidad, se divulga la producción de pseudotipos de rAAV.

Un procedimiento para la generación de una célula de empaque es crear una línea de células 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 rAAV y un marcador seleccionable tal como un gen de resistencia a la neomicina, están integrados dentro del genoma de una célula. Los genomas de AAV han sido introducidos dentro de plásmidos bacterianos mediante procedimientos tales como relave de GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2077-2081), adición de agentes sintéticos de enlace que contienen sitios de ruptura de endonucleasa con restricción (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73) o mediante ligadura directa de extremo romo (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). Luego, la línea de células de empaque es infectada con un virus asistente tal como adenovirus. Las ventajas de este procedimiento son que las células son seleccionables y son adecuadas para la producción de rAAV a gran escala. Otros ejemplos de procedimientos adecuados emplean adenovirus o baculovirus, más que plásmidos, para introducir genomas de rAAV y/o genes rep y cap dentro de las células de empaque.

Los principios generales de producción de rAAV son revisados, por ejemplo, en Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; y Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. e Immunol., 158:97-129). en Ratschin et al. se describen diferentes aproximaciones, Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU, 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 EEUU No. 5,173,414; WO 95/13365 y correspondiente patente de EEUU 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 EEUU no. 5,786,211; patente de EEUU No. 5,871,982; patente de EEUU. No. 6,258,595; y McCarty, Mol. Ther., 16(10): 1648-1656 (2008). están contemplados específicamente la producción y uso de sc rAAV.

5 La invención suministra así células de empaque que producen rAAV infeccioso. En una realización, las células de empaque pueden ser células de cáncer transformadas de manera estable, tales como células HeLa, células 293 y células PerC.6 (una línea 293 relacionada). En otra realización, las células de empaque son células que no son células de cáncer transformadas, tales como células 293 de paso bajo (células de riñón fetal humano transformadas con E1 de adenovirus), células MRC-5 (fibroblastos fetales humanos), células WI-38 (fibroblastos fetales humanos),
10 células Vero (células del riñón de mono) y células FRhL-2 (células de pulmón fetal de rhesus).

El AAV recombinante (es decir partículas de rAAV infeccioso encapsidadas) de la invención comprende un genoma de rAAV. Los aspectos de la divulgación incluyen, pero no están limitados a, el rAAV que incluye un genoma que codifica el ARNm de MYOT expuesto en SEQ ID NO: 1 (llamado "AAV-U6-miMyoT-1291"), el rAAV que incluye un genoma que codifica el ARNm de MYOT expuesto en SEQ ID NO: 2 (llamado "AAV-U6-miMyoT-1321"), el rAAV que
15 incluye un genoma que codifica el ARNm de MYOT expuesto en SEQ ID NO: 3 (llamado "AAV-U6-miMyoT-1366") y el rAAV que incluye un genoma que codifica el ARNm de MYOT expuesto en SEQ ID NO: 4 (llamado "AAV-U6-miMyoT-1490"). En cuanto se refiere a la invención, el rAAV incluye un genoma que codifica el ARNm de MYOT expuesto en SEQ ID NO: 11286 (llamado "scAAV-tMCK-miMyoT-1043"), un genoma que codifica el ARNm de MYOT expuesto en SEQ ID NO: 11287 (llamado "AAV-tMCK-iMyoT-1044") y un genoma que codifica el ARNm de
20 MYOT expuesto en SEQ ID NO: 11288 (llamado "AAV-tMCK-miMyoT-1634"). Los genomas del rAAV carecen de ADN de AAV rep y cap, esto es, no hay ADN de AAV rep o cap entre las ITRs de los genomas.

El rAAV puede ser purificado mediante procedimientos estándar en la técnica, tales como cromatografía en columna o gradientes de cloruro de cesio. los procedimientos para la purificación de vectores de rAAV de virus asistentes son conocidos en la técnica e incluyen procedimientos divulgados, por ejemplo, en Clark et al., Hum. Gene Ther., 10(6):
25 1031-1039 (1999); Schenpp y Clark, Methods Mol. Med., 69 427-443 (2002); patente de EEUU No. 6,566,118 y WO 98/09657.

En otra realización, la invención contempla composiciones que comprenden rAAV de la presente invención. Las composiciones de la invención comprenden rAAV en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden comprender también otros ingredientes tales como diluyentes y adyuvantes. Los vehículos, diluyentes y
30 adyuvantes aceptables son no tóxicos para los receptores y preferiblemente son inertes en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato, u otros ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo
35 glucosa, manosa, o dextrinas; agentes que forman quelatos tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; iones contrarios que forman sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, plurónicos o polietilen glicol (PEG).

Los títulos de rAAV que van a ser administrados en la invención variarán dependiendo, por ejemplo, del rAAV particular, el modo de administración, el objetivo del tratamiento, el individuo, y el(los) tipo(s) de célula que son
40 objetivo, y pueden ser determinados mediante procedimientos estándar en la técnica. Los títulos de rAAV pueden variar desde 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} a aproximadamente 1×10^{14} o más partículas resistentes a la DNasa (DRP) por ml. Las dosificaciones pueden ser expresadas también en unidades de genomas virales (vg).

45 La divulgación contempla los procedimientos para la transducción *in vivo* o *in vitro* de una célula objetivo con rAAV. Los procedimientos *in vivo* comprenden el paso de administración de una dosificación efectiva, o múltiples dosificaciones efectivas, de una composición que comprende un rAAV de la invención a un animal (incluyendo un ser humano) que lo necesita. Si la dosificación es administrada antes del desarrollo de un desorden/enfermedad, la administración es profiláctica. Si la dosificación es administrada después del desarrollo de un desorden/enfermedad,
50 la administración es terapéutica. En realizaciones de la invención, una dosificación efectiva es una dosificación que alivia (elimina o reduce) por lo menos un síntoma asociado con el estado de desorden/enfermedad que se está tratando, que ralentiza o previene el progreso hasta un estado de desorden/enfermedad, que ralentiza o previene el progreso de un estado de desorden/enfermedad, que disminuye la extensión de la enfermedad, que da como resultado la remisión (parcial o total) de una enfermedad, y/o que prolonga la supervivencia. Un ejemplo de una
55 enfermedad contemplada para la prevención o tratamiento con procedimientos de la invención, es LGMD1A.

La invención también contempla terapias de combinación. Como se usa en esta memoria, la combinación incluye el tratamiento simultáneo o tratamientos secuenciales. Específicamente se contemplan combinaciones de la invención con tratamientos médicos estándar (por ejemplo, corticoesteroides), como son las combinaciones con terapias novedosas.

La administración de una dosificación efectiva de las composiciones puede ser por vías estándar en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, intramuscular, parenteral, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, intracraneal, intraósea, intraocular, rectal, o vaginal. La(s) ruta(s) de administración y serotipo(s) de componentes de AAV del rAAV (en particular, las ITRs de AAV y proteína de cápside) de la invención pueden ser elegidos y/o igualados por aquellos expertos en la técnica, tomando en cuenta el estado de infección y/o enfermedad que están bajo tratamiento y la(s) célula(s)/tejido(s) objetivo que van a expresar los ARNm de MYOT.

En particular, la administración real de rAAV de la presente invención puede ser lograda usando cualquier procedimiento físico que transportará el vector recombinante de rAAV hacia el interior del tejido objetivo de un animal. La administración de acuerdo con la invención incluye, pero no está limitada a, inyección dentro del músculo, la corriente sanguínea, y/o directamente dentro del hígado. La simple resuspensión de un rAAV en solución salina amortiguada con fosfato, ha demostrado ser suficiente para suministrar un vehículo útil para la expresión en tejido muscular, y no se conocen restricciones sobre los vehículos u otros componentes que puedan ser coadministrados con el rAAV (aunque deberían evitarse composiciones que degraden el ADN de la manera normal con rAAV). Las proteínas de cápside de un rAAV pueden ser modificadas de manera que el rAAV es focalizado a un tejido objetivo particular de interés, tal como un músculo. Véase por ejemplo el documento WO 02/053703. Las composiciones farmacéuticas pueden ser preparadas como formulaciones inyectables o como formulaciones tópicas para ser entregadas a los músculos mediante transporte transdérmico. Previamente se han desarrollado numerosas formulaciones para inyección intramuscular y transporte transdérmico y pueden ser usadas en la práctica de la invención. El rAAV puede ser usado con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable, por facilidad de administración y manipulación.

Para los propósitos de inyección intramuscular pueden emplearse soluciones en un adyuvante tal como aceite de sésamo o de maní o en propilen glicol acuoso, así como en soluciones acuosas estériles. Si se desea, tales soluciones acuosas pueden estar amortiguadas, y primero el diluyente líquido puede haber sido convertido en isotónico con solución salina o glucosa. Las soluciones de rAAV como un ácido libre (el ADN contiene grupos fosfato ácidos) o una sal farmacológicamente aceptable pueden ser preparadas en agua mezclada de manera adecuada con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. Puede prepararse también una dispersión de rAAV en glicerol, polietilen glicoles líquidos y mezclas de ellos y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. En conexión con ello, los medios acuosos estériles empleados son todos fácilmente obtenibles mediante técnicas estándar bien conocida por aquellos expertos en la técnica.

Las formas farmacéuticas aceptables 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 tiene que ser estéril y tiene que ser fluida en la extensión de exista facilidad para ser inyectada. Tiene que ser estable bajo las condiciones de manufactura y almacenamiento, y tiene que estar preservada contra las acciones contaminantes de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un solvente o dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, polietilen glicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de una dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser proporcionada por diferentes 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 puede ser proporcionada por el uso de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles son preparadas mediante la incorporación de rAAV en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguida por la esterilización con filtro. Generalmente, las dispersiones son preparadas mediante la incorporación del ingrediente activo esterilizado dentro de un vehículo estéril, el cual contiene el medio básico de dispersión y los otros ingredientes requeridos de entre aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y la técnica de secado por congelación, que da como resultado un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente adicional deseado de la solución de ellos, previamente filtrada hasta esterilidad.

La transducción con rAAV puede ser llevada a cabo también *in vitro*. En una realización, se retiran del sujeto las células objetivo del músculo deseadas, son transducidas con rAAV e introducidas nuevamente en el sujeto. De manera alternativa, las células, singeneicas o xenogeneicas del músculo pueden ser usadas cuando aquellas células no generarán en el sujeto una respuesta inmune inapropiada.

Los procedimientos adecuados para la transducción y reintroducción dentro de un sujeto de células transducidas son conocidos en la técnica. En una realización, las células pueden ser transducidas *in vitro* mediante combinación de rAAV con células del músculo, por ejemplo, en medios apropiados, y tamizaje para aquellas células que albergan el ADN de interés, usando técnicas convencionales, tales como las inmunotransferencia South y/o PCR, o usando marcadores seleccionables. Las células transducidas pueden ser luego formuladas dentro de composiciones farmacéuticas, y la composición puede ser introducida dentro del sujeto mediante diferentes técnicas, tales como por

inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal, o por inyección dentro del músculo cardíaco y suave, usando por ejemplo, un catéter.

La transducción de células con rAAV de la invención da como resultado la expresión sostenida de ARNm de MYOT. La presente invención suministra así procedimientos para la administración/entrega de rAAV que expresa ARNm de MYOT, a un animal, preferiblemente a un ser humano. Estos procedimientos incluyen tejidos de transducción (incluyendo, pero sin limitarse a, tejidos tales como músculo, órganos tales como hígado y cerebro, y glándulas tales como glándulas salivares) con uno o más rAAV de la presente invención. La transducción puede ser llevada a cabo con casetes de genes que comprenden elementos de control específicos para el tejido. Por ejemplo, una realización de la invención suministra procedimientos para la transducción de células de músculo y tejidos de músculo, dirigida por elementos de control específicos de músculo, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos derivados de las familias de genes de actina y miosina, tales como de la familia de genes myoD [véase Weintraub et al., Science, 251: 761-766 (1991)], el factor de enlace mejorador específico de miocito MEF-2 [Cserjesi y Olson, Mol Cell Biol 11: 4854-4862 (1991)], elementos de control derivados del gen de actina del esqueleto humano [Muscat et al., Mol Cell Biol, 7: 4089-4099 (1987)], el gen de actina cardíaca, elementos de secuencia de quinasa de creatina de músculo [véase Johnson et al., Mol Cell Biol, 9:3393-3399 (1989)] y el elemento (mCK) mejorador de quinasa de creatina de murina, elementos de control derivados del gen de troponina C de retorcida esquelética rápida, el gen de troponina C cardíaco de retorcida lenta y el gen de troponina I de retorcida lenta: factores nucleares inducibles por hipoxia [Semenza et al., Proc Natl Acad Sci USA, 88: 5680-5684 (1991)], elementos y promotores inducibles por esteroide incluyendo el elemento de respuesta de glucocorticoide (GRE) [véase Mader y White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5603-5607 (1993)], el promotor tMCK [véase Wang et al., Gene Therapy, 15: 1489-1499 (2008)], el promotor CK6 [véase Wang et al., arriba] y otros elementos de control.

El tejido muscular es un objetivo atractivo para suministro *in vivo* de ADN, porque no es un órgano vital tiene fácil acceso. La invención contempla expresión sostenida de ARNm de miofibras transducidas.

Se entiende por "célula de músculo" o "tejido de músculo", una célula o grupo de células derivados de músculo de cualquier clase (por ejemplo, músculo esquelético y músculo suave, por ejemplo del tracto digestivo, vejiga urinaria, vasos sanguíneos o tejido cardíaco). Tales células de músculo pueden ser diferenciadas o no diferenciadas, tales como mioblastos, miocitos, miotubos, cardiomiocitos y cardiomioblastos.

El término "transducción" es usado para denominar la administración/entrega de ARNm de MYOT a una célula recipiente, *in vivo* o *in vitro*, vía un rAAV con replicación deficiente de la invención, que da como resultado la expresión de un ARNm de MYOT por la célula recipiente.

La divulgación suministra procedimientos para la administración de dosificación efectiva (o dosificaciones, administradas de manera esencialmente simultánea o dosificaciones dadas en intervalos) de rAAV que codifica ARNm de MYOT, a un paciente que lo necesita.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra sitios objetivo en la secuencia de miotilina (SEQ ID NO: 11266) para ARNm ejemplares.

La figura 2 expone secuencias de dos ARNm que tienen como objetivo MYOT. en cada panel, las secuencias superiores indican el patrón de ADN desde el cual se transcribe cada ARNm respectivo. En el panel superior, el patrón de ADN miMYOT.1321 es SEQ ID NO: 2. En el panel de fondo, el patrón de ADN miMYOT.1366 es SEQ ID NO: 3. Las transcripciones plegadas de ARNm son mostradas como estructuras de horquilla. El ARNm plegado de miMYOT.1321 es SEQ ID NO: 11268. El ARNm plegado de miMYOT.1366 es SEQ ID NO: 11271. Las secuencias miMYO.1321 maduras (SEQ ID NO: 11270 que hace par con SEQ ID NO: 11269 en la figura) y miDUX4.1366 (SEQ ID NO: 11273 que hace par con SEQ ID NO: 11272 en la figura) surgen siguiendo el procesamiento en células objetivo mediante maquinaria de procesamiento de ARNm anfitrión (incluyendo Drosha, DGCR8, Dicer, y Exportin-5). Las secuencias sombreadas en gris indican sitios usados para la clonación de cada ARNm dentro del vector U6T6. Los nucleótidos correspondientes a la hebra guía antisentido de ARNm maduro que finalmente ayuda a catalizar la escisión del MYOT objetivo de mRNA están subrayados en las porciones de horquilla de ARNm de este diagrama. Las puntas de flecha gris y negra indican sitios de escisión catalizados por Drosha y Dicer, respectivamente. Los números 13, 35, 53, y 75 son suministrados para orientación. Las secuencias entre (e incluyendo) las posiciones 35-53 se derivan de la secuencia mir-30a natural humana, excepto la A en posición 39, la cual es una G en la secuencia mir-30a normal. Esta fue cambiada a una A para facilitar el pliegue del bucle de ARNm en base a modelos de pliegue *in silico* ARN. La base del tronco (5' de posición 13 y 3' de posición 75) se deriva también de la estructura y secuencia mir-30a con algunas modificaciones, dependiendo de la secuencia primaria de la hebra guía. Específicamente, el nucleótido en la posición 13 puede variar para ayudar a facilitar una disparidad requerida entre los nucleótidos de las posiciones 13 y 75. Se tiene como hipótesis que esta estructura con protuberancia facilita la apropiada escisión de Drosha.

La figura 3 muestra el efecto de ARNm que tienen como objetivo MYOT en ratones con LGMD1A que expresan miotilina mutante (MYOT). La figura 3A es una inmunotransferencia Western que muestra la disminución de expresión de miotilina mutante en extractos de músculos de los ratones con LGMD1A de tres meses de edad,

donde Izquierda (L) = lado del tratamiento con miMYOT y Derecha (R) = lado del tratado con control miGFP. La figura 3B muestra resultados de PCR en tiempo real, que confirman los datos de la Occidental.

La figura 4 muestra que AAV.miMYO.1321 (etiquetado como miMYOT en la figura) mejora la histopatología y peso del músculo en ratones TgT57I con tres meses de edad. La figura muestra vectores de 4A. AAV usados en estudios de 3 meses. Los ARNs de miMYOT y miGFP de control son expresados del promotor U6 de ratón. Ambos vectores contienen un casete de gen que reporta CMV.hrGFP. Los rectángulos rojos indicaron repeticiones terminales invertidas de AAV (ITRs). Figura 4B. Secciones en serie representativas de ratones T57I inyectados con AAV.miMYOT (panel superiores) o controles de AAV.miGFP (paneles de fondo) muestran reducciones en los agregados de proteína inoculados con MYOT. Las manchas rojas son agregados de proteína teñidos mediante inmunofluorescencia con anticuerpos de MYOT. Los paneles centrales muestran revestimiento con secciones en serie teñidas con H&E. Las flechas indican fibras que contienen mionúcleos con ubicación central. Los agregados de los paneles derechos son visibles como manchas azules oscuras dentro de la miofibra en las secciones en serie teñidas con tricromo de Gomori, mientras los núcleos son púrpura. Escala de la barra, 50 μ m. las imágenes mostradas son representativas de 8 animales inyectados independientemente, por virus. Figura 4C. La cuantificación de la tinción del agregado 3 meses después de inyectar músculos GAS de TgT57I con disminución de AAV.miMYOT o AAV.miGFP. MYOT redujo de manera significativa el promedio de área de agregados positivos de MYOT en 69% (N=5 músculos por grupo; 5 campos muestreados aleatoriamente por músculo; prueba t pareada, $p = 0,0069$; los errores de las barras representan s.e.m.) Figura 4D. Las gráficas muestran la distribución y promedio de tamaño de músculos TgT57I y tipo silvestre (WT) tratados con AAV.miMYOT o con controles AAV.miGFP, 3 meses después de la inyección. La disminución de MYOT en músculos TgT57I mejoró significativamente el diámetro de la miofibra en 4,9 micrones (54,8 μ m versus 49,9 μ m en ratones TgT57I tratados con control; prueba t, $p = 0,047$). Los diámetros de fibra de WT fueron 57 y 57,7 micrones, en animales tratados con miMYOT y con miGFP, respectivamente. N=5 músculos por grupo; 5 campos seleccionados aleatoriamente por músculo; un promedio de 1.205 fibras contadas por animales de tipo silvestre y 1.433 fibras por animal TgT57I). (e) AAV.miMYOT mejoró significativamente el peso del músculo GAS en 9,5 mg en ratones TgT57I de 3 meses de edad (prueba t, $p < 0,001$; N = 12 músculos por grupo). Los músculos tratados con AAV.miMYOT dieron como promedio 134,4 mg en peso versus 124,9 mg en animales tratados con AAV.miGFP; controles de WT: miMYOT, 136,0 mg; miGFP, 140,8 mg). (f) los efectos de degeneración-regeneración suave en músculos TgT57I, como se indica por la presencia de miofibras con núcleos que tienen ubicación central, fueron mejorados significativamente 2,1 veces con tratamiento por AAV.miMYOT, comparado con los controles (prueba t, $p = 0,0004$). Ambos grupos de ratones TgT57I fueron todavía significativamente diferentes de los respectivos controles de WT (prueba t, $p < 0,006$). *, indica diferencia significativa entre animales TgT57I tratados con miMYOT y con miGFP. Los animales tipo silvestre no fueron significativamente diferentes uno de otro en todas las mediciones, independientemente del tratamiento.

La figura 5 muestra que AAV.miMYO. 1321 (etiquetado en la figura como miMYOT) mejora la histopatología y peso del músculo en ratones TgT57I de 9 meses de edad. La Figura 5A. Vectores de AAV usados en estudios de 9 meses. Los ARNs de miMYOT y miLacZ de control son expresados del promotor de ratón U6. Ambos vectores contienen un casete de gen de reporte CMV.eGFP. Los rectángulos rojos indican repeticiones terminales invertidas de AAV (ITRs). Figura 5B. secciones en serie representativas de ratones T57I inyectados con AAV.miMYOT (paneles superiores) o controles de AAV.miLacZ (paneles de fondo) muestran reducciones en agregados de proteína inoculados con MYOT. las manchas rojas son agregados de proteína teñidos mediante inmunofluorescencia con anticuerpos MYOT. los paneles centrales muestran cobertura con secciones en serie teñidas con H&E. las flechas indican fibras que contienen mionúcleos con ubicación central. los agregados de los paneles derechos son visibles como manchas azul oscuro dentro de la miofibra en secciones en serie teñidas con tricromo de Gomori, mientras los núcleos son púrpura. Escala de barra, 50 μ m. Las imágenes mostradas son representativas de 8 animales inyectados independientemente por virus. Figura 5C. Cuantificación de tinción de agregado 9 meses después de la inyección de músculos GAS de TgT57I con AAV.miMYOT o AAV.miLacZ. La disminución de MYOT redujo significativamente el promedio de área de agregados positivos en MYOT en 52% (N=5 músculos por grupo; 5 campos muestreados aleatoriamente por músculo; prueba t pareada, $p = 0,0085$; los errores de las barras representan s.e.m.) Figura 5D. Las gráficas muestran la distribución y promedio de tamaño de músculos TgT57I y tipo silvestre (WT) tratados con AAV.miMYOT o controles de AAV.miLacZ, 9 meses después de la inyección. La disminución de MYOT en músculos TgT57I mejoró significativamente el diámetro de la miofibra en 9,1 micrones (54 μ m versus 44,9 μ m en ratones TgT57I tratados con el control; prueba t, $p = 0,0006$). los diámetros de las fibras WT fueron 62,5 y 62,2 micrones, en animales tratados con miMYOT y miLacZ, respectivamente. Estos valores fueron significativamente mayores que el grupo TgT57I ($p < 0,001$, prueba t). N=5 músculos por grupo; 5 campos seleccionados aleatoriamente por músculo; un promedio de 993 fibras contadas por animal de tipo silvestre y 1.554 fibras por animal TgT57I). (e) AAV.miMYOT mejoró significativamente el peso muscular de GAS en 15 mg en ratones TgT57I de 9 meses de edad (prueba t, $p = 0,002$; N = 8 músculos por grupo). Los músculos tratados con AAV.miMYOT tuvieron un promedio de 116 mg en peso versus 101 mg en los animales tratados con AAV.miLacZ; controles de WT: miMYOT, 148 mg; miGFP, 154 mg). (f) Los efectos de degeneración-regeneración suave en músculos TgT57I, como se indicó por la presencia de miofibras con núcleos con ubicación central, mejoraron significativamente 2,1 veces con tratamiento por AAV.miMYOT comparado con los controles (prueba t, $p = 0,0004$). Ambos grupos de ratones TgT57I fueron todavía significativamente diferentes de los respectivos controles WT (prueba t, $p < 0,0001$). *, indica diferencia

significativa entre animales TgT57I tratados con miMYOT y con miLacZ. Los animales tipo silvestre no fueron significativamente diferentes uno de otro en todas las mediciones, independientemente del tratamiento.

La figura 6 muestra que AAV.miMYO.1321 (etiquetado miMYOT en la figura) mejora significativamente la fuerza muscular total en ratones TgT57I de 9 meses después del tratamiento. Los músculos GAS de TgT57I tratados con AAV.miMYOT mostraron de manera estadísticamente significativa mejoras de 38% y 25% en la fuerza absoluta (figura 6A) y fuerza específica (figura 6B) comparadas con controles tratados con AAV.miLacZ (N=6-8 piernas; $p=0,02$ para (a) y $p=0,0009$ para (b), prueba t). Ambos grupos TgT57I fueron significativamente más débiles que sus contrapartes WT ($p<0,0001$, prueba t), mientras los grupos de tipo silvestre no fueron significativamente diferentes uno de otro.

La figura 7 muestra las formas precursora y madura de ARNm de miMYOT-1043 (SEQ ID NO: 11286), miMYOT-1044 (SEQ ID NO: 11287), miMYOT-1634 (SEQ ID NO: 11288) y miMYOT-1321 (SEQ ID NO: 2), así como una inmunotransferencia Western que muestra que cada ARNm reduce la proteína de MyoT *in vitro* a niveles similares al ARNm de miMYOT-1321.

Ejemplos

El Ejemplo 1 describe ARNm específicos para el gen MYOT. El Ejemplo 2 describe el efecto de los ARNm en la expresión de MYOT, según se mide mediante PCR en tiempo real. El Ejemplo 3 describe rAAV que codifica los ARNm. El Ejemplo 4 describe el efecto del U6T6 expresando los ARNm, sobre la expresión de MYOT según se mide mediante la inmunotransferencia Western. El Ejemplo 5 describe el suministro de ARNm de MYOT a ratones recién nacidos. El Ejemplo 6 describe el suministro de ARNm de MYOT a ratones adultos. El Ejemplo 7 describe el incremento en escala en la dosificación y vectores AAV (scAAV) autocomplementarios. El Ejemplo 8 describe ARNm con discordancias de pares de base.

Ejemplo 1

MicroARNs específicos para el gen MYOT

Mediante PCR se generaron seis ADN que codifican ARNm específicos para el gen MYOT. Los cebadores de PCR usados tenían las siguientes secuencias .

Cebador 775 (miMyoT-592-adelante) (SEQ ID NO: 11274):
AAAAC TCGAGT GAGCGACCTGATTACAATAGCAGTAACTGTAAAGCCACAGATGGG

Cebador 776 (miMyoT-592-inverso) (SEQ ID NO: 11275):
TTTTACTAGTAGGCAGCCTGATTACAATAGCAGTAAACCCATCTGTGGCTTTACAG

Cebador 777 (miMyoT-1291-adelante) (SEQ ID NO: 11276):
AAAAC TCGAGT GAGCGACTGGATGTCCTTGCAAAAGAACTGTAAAGCCACAGATGGG

Cebador 778 (miMyoT-1291-inverso) (SEQ ID NO: 11277):
TTTTACTAGTAGGCAGCTGGATGTCCTTGCAAAAGAACTGTAAAGCCACAGATGGG

Cebador 779 (miMyoT-1321-adelante) (SEQ ID NO: 11278):
AAAAC TCGAGT GAGCGCGCACCAATGTTTATCTACAACTGTAAAGCCACAGATGGG

Cebador 780 (miMyoT-1321-inverso) (SEQ ID NO: 11279):
TTTTACTAGTAGGCAAGCACCAATGTTTATCTACAAACCCATCTGTGGCTTTACAG

Cebador 781 (miMyoT-1366-adelante) (SEQ ID NO: 11280):
AAAAC TCGAGT GAGCGAGGAGATTCAGTGAACTAGAACTGTAAAGCCACAGATGGG

Cebador 782 (miMyoT-1366-inverso) (SEQ ID NO: 11281):
TTTTACTAGTAGGCAGGGAGATTCAGTGAACTAGAACTGTAAAGCCACAGATGGG

Cebador 783 (miMyoT-1490-adelante) (SEQ ID NO: 11282):
AAAAC TCGAGT GAGCGCGAAGAGTTACTTTACTGATAACTGTAAAGCCACAGATGGG

Cebador 784 (miMyoT-1490-inverso) (SEQ ID NO: 11283):
TTTTACTAGTAGGCAGGAAGAGTTACTTTACTGATAACCCATCTGTGGCTTTACAG

Cebador 785 (miMyoT-1603-adelante) (SEQ ID NO: 11284):
AAAAC TCGAGT GAGCGGAGCACGTCCAAACCAAACTCTTCTGTAAAGCCACAGATGGG

Cebador 786 (miMyoT-1603-inverso) (SEQ ID NO: 11285):
TTTTACTAGTAGGCAGGCACGTCCAAACCAAACTCTTCCCATCTGTGGCTTTACAG

Se generó ADN que codifica un ARNm designado miMyoT-592 usando cebadores 775 y 776. Se generó ADN que

codifica ARNmi designado miMyoT-1291 usando cebadores 777 y 778. Se generó ADN que codifica ARNmi designado miMyoT-1321 usando cebadores 779 y 780. Se generó ADN que codifica ARNmi designado miMyoT-1366 usando cebadores 781 y 782. Se generó ADN que codifica ARNmi designado miMyoT-1490 usando cebadores 783 y 784. Se generó ADN que codifica ARNmi designado miMyoT-1603 usando cebadores 785 y 786. Abajo se exponen los ADN, en los que el número en los nombres indica el nucleótido focalizado en 5' en la secuencia de miotilina (SEQ ID NO: 11267). Véase la figura 1 en la que están subrayadas las secuencias objetivo para los ARNm en la secuencia de miotilina.

miMyoT-592

CTCGAGTGAGCGACCTGATTACAATAGCAGTAACTGTAAAGCCACAGATGGGTTTACTGCT

ATTGTAATCAGGCTGCCTACTAGA (SEQ ID NO: 5)

miMyoT-1291

CTCGAGTGAGCGACTGGATGTCCTTGCAAAGAAGTGTAAAGCCACAGATGGGTTATTTTGC

AAGGACATCCAGCTGCCTACTAGA (SEQ ID NO: 1)

miMyoT-1321

CTCGAGTGAGCGCGCACCAATGTTTATCTACAACTGTAAAGCCACAGATGGGTTTGTAGAT

AAACATTGGTGCTTGCCTACTAGA (SEQ ID NO: 2)

miMyoT-1366

CTCGAGTGAGCGAGGAGATTGAGTAACTAGAACTGTAAAGCCACAGATGGGTTCTAGTTT

CACTGAATCTCCCTGCCTACTAGA (SEQ ID NO: 3)

miMyoT-1490

CTCGAGTGAGCGCGAAGAGTTACTTTACTGATAACTGTAAAGCCACAGATGGGTTATCAGTA

AAGTAACTCTTCTGCCTACTAGA (SEQ ID NO: 4)

miMyoT-1603

CTCGAGTGAGCGAGCAGTCCAAACCAAACCTTCTGTAAAGCCACAGATGGGAAGAGTTTG

GTTTACGTGCCTGCCTACTAGA (SEQ ID NO: 6)

La figura 2 muestra los patrones de ADN miMyoT.1321 y miMyoT.1366 y sus correspondientes ARNm plegados y maduros.

Se añadió un µg de cada cebador a 1 ciclo de reacción de extensión de cebador: 95°C por 5 min.; 94° C por 2 min.; 52° C por 1 min.; 72° C por 15 min.; y luego retención a 4°C. Se limpiaron los productos de PCR con el kit Qiagen QIAquick PCR Purification, antes de ser sometidos a digestión durante la noche con enzimas de restricción XhoI y SpeI. Luego el producto de digestión fue aplicado sobre un gel TBE 1.5% y se extirpó la banda y se purificó usando el Qiagen QIAquick Gel Extraction.

Los productos de PCR fueron ligados durante la noche a un vector de U6T6 (vía XhoI y XbaI). Este vector contiene un promotor U6 de ratón y una señal de terminación de polimerasa III de ARN (nucleótidos de 6 timidina). Se clonan los ARNm en sitios de restricción XhoI + XbaI localizados entre el extremo 3' del promotor U6 y la señal de terminación (en el extremo 3' del patrón de ADN para cada ARNmi, SpeI tiene extremos cohesivos complementarios con el sitio XbaI). El producto de ligación fue transformado dentro de células químicamente competentes de E-coli con un choque de calor de 42°C y se incubaron a 37°C agitando por 1 hora antes de ser aplicadas sobre placas de selección de canamicina. Se permitió que las colonias crecieran durante la noche a 37°. Al siguiente día se realizó minipreparación y determinación de la secuencia, para exactitud.

Ejemplo 2

Reacción de PCR en tiempo real para efecto de expresión de ARNm de MYOT

Se ensayó la expresión de la secuencia objetivo MYOT, en presencia de los ARNm de MYOT. Se ejecutó una transfección de lipofectamina 2000 en células C2C12 en una placa de ensayo con pared blanca de 12 pozos. Se transfectaron 52.000 células con 100 ng de AAV-CMV-mutMyoT y 1.500 ng de uno de los vectores U6T6 descritos en el Ejemplo 1 que contienen ADN que codifica ARNmi. El ensayo fue ejecutado 48 horas más tarde.

El medio de las células fue retirado y se añadió 1 µl de Trizol por pozo. Luego se resuspendieron las células y se transfirieron los lisados a tubos EP de 1,5 ml. Se incubaron muestras a temperatura ambiente por 5 min y se añadieron 200 µl de cloroformo. Se agitaron vigorosamente los tubos por 15 seg, se incubaron a temperatura ambiente por 3 min y se sometieron a centrifugación a 12.000 g por 15 min a 4 °C. Luego se transfirió la fase acuosa

a un tubo fresco y se añadió 0,5 ml de isopropil alcohol. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 min y se sometieron a centrifugación a 12.000 g por 10 min a 4°C. Se lavó una vez la pella de ARN con 1 ml de etanol al 75% y se secó al aire. Se añadieron 20 µl de agua libre de ARNs, para disolver la pella y se midieron la concentración/purificación mediante Nano-drop. Se añadieron un total de 1,5 µg de ARN a la reacción de generación de cADN: 5°C por 10 min.; 37°C por 120 min.; 85°C por 5 seg y luego retención a 4°C. Se diluyeron los productos de cADN a 1:10 y se añadieron 4,5 µl a la reacción de PCR en tiempo real. Se usó miotilina humana para revisar la expresión del MYOT y se normalizó a la expresión relativa a la expresión de GAPDH de ratón.

U6T6-miMyoT-592 (SEQ ID NO: 5) mostró expresión más alta de MYOT que el control de U6T6-miGFP. U6T6-miMyoT-1291 (SEQ ID NO: 1) redujo la expresión de MYOT a un 60%, U6T6-miMyoT-1321 (SEQ ID NO: 2) redujo la expresión de MYOT a 19%, U6T6-miMyoT-1366 (SEQ ID NO: 3) redujo la expresión de MYOT a 41.7%, U6T6-miMyoT-1490 (SEQ ID NO: 4) redujo la expresión de MYOT a 55.3%, U6T6-miMyoT-1603 (SEQ ID NO: 6) redujo la expresión de MYOT a 34.9%, cuando se comparan con el control U6T6-miGFP.

Ejemplo 3

Producción de rAAV que codifica microARNs de MYOT

Se cortaron los ADNs de U6-miMYOT de fragmentos de U6T6-miMYOT en sitios EcoRI y luego se clonaron respectivamente dentro de AAV6-hrGFPs para generar vectores rAAV-U6-miMyoT. Estos vectores rAAV expresan ARNm y hrGFP

Ejemplo 4

Ensayo de inmunotransferencia Western para el efecto de

Expresión de ARNm de MYOT de vectores U6T6 y rAAV

Mediante la inmunotransferencia Western se probó el efecto de expresión de ARNm de MYOT de los vectores U6T6 descritos en el Ejemplo 1 y el rAAV descrito en el Ejemplo 3.

Un día antes de la transfección, se aplicaron 293 células en una placa de 24 pozos a $1,5 \times 10^5$ células/pozo. Luego las células fueron transfectadas con U6T6-miMyoT (592, 1291, 1321, 1366, 1490 o 1603) usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Cat. No. 11668-019).

Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recolectaron las células y se lavaron una vez con PBS frío. Se añadieron luego setenta µl de amortiguador de lisis (NaCl 137 mM, Tris 10mM pH=7.4, NP401%). Se resuspendieron completamente las células y se incubaron sobre hielo por 30 min. Se sometieron las muestras a centrifugación por 20 min a 13.000 rpm a 4°C y se recolectó el sobrenadante. Se diluyó el lisado celular 5 veces para el ensayo de concentración de proteína de Lowry (reactivo Bio-Rad Dc Protein Assay A, B, S; Cat. No. 500-0113, 500-0114, 500-115). Se tomaron veinte µg de cada muestra y se añadió amortiguador 2x de la muestra (Tris 100 mM pH=6.8, DTT 100 mM, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.006%). Se sometieron a ebullición las muestras por 10 min y luego se colocaron sobre hielo.

Se cargaron las muestras sobre un gel 10% de poliacrilamida (sobre la base de la relación 37,5:1 acrilamida:bis acrilamida, Bio-Rad, Cat. No. 161-0158), 15 µg sobre un gel para cada muestra. Se transfirieron las proteínas a membranas PVDF a 15 V por 1 h usando transferencia semiseca (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, Cat. No. 170-3940). Se colocaron las manchas sobre amortiguador de bloqueo (5% de leche seca sin grasa, Tris 30mM pH=7.5, NaCl 150mM, Tween-20 0,05%) y se agitó por 1 h a temperatura ambiente. Se decantó el amortiguador de bloqueo y se añadió solución de anticuerpo primario de antimiotilina (policlonal de conejo generado por Betil Laboratories usando un péptido correspondiente a residuos 473-488 de miotilina) y se incubaron con agitación durante la noche a 4°C. Luego se lavaron las membranas por 30 min, cambiando el amortiguador de lavado (NaCl 150 mM, Tris 30mM pH=7.5, Tween-20 0,05%) cada 10 min. Se añadió anticuerpo antirratón de cabra, conjugado de peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Cat. No. 115-035-146, 1:100,000) y se incubó a temperatura ambiente por 2 h. Luego se lavaron las membranas por 30 min, cambiando el amortiguador de lavado cada 10 min. Se colocaron las manchas en solución quimioluminiscente de trabajo (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, Cat. No. WBKLS0500), se incubaron con agitación por 5 min a temperatura ambiente, y luego se expusieron a película de rayo X.

Se lavaron las membranas por 20 min, cambiando el amortiguador de lavado cada 10 min. A continuación se añadió amortiguador de arrastre (SDS 2%, Tris 62.5 mM pH=6.7, b-ME 100mM) a las manchas y se incubó a 50°C por 30 min. Se lavaron nuevamente las membranas por 30 min, cambiando el amortiguador de lavado cada 10 min. Luego, se bloquearon nuevamente las membranas y se probó nuevamente con solución de anticuerpo primario Anti-GAPDH (Chemicon, Cat. No. MAB374, 1:200) y se usó como anticuerpo secundario Anticuerpo Antirratón de cabra conjugado de peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Cat. No. 115-035-146, 1:100,000).

Se realizó barrido a la película y se calculó la relación de densidad de MYOT a GAPDH. Comparada con el control U6T6-miGFP, la expresión de MYOT fue mayor (1,08) en muestras de U6T6-miMyoT-592 (SEQ ID NO: 5) y la

expresión de MYOT fue reducida a 78,9% por U6T6-miMyoT-1291 (SEQ ID NO: 1), 50,2% por U6T6-miMyoT-1321 (SEQ ID NO: 2), 60,2% por U6T6-miMyoT-1366 (SEQ ID NO: 3), 76,2% por U6T6-miMyoT-1490 (SEQ ID NO: 4), 87% por U6T6-miMyoT-1603 (SEQ ID NO: 6).

- 5 U6T6-miMYOT-1321 presentó la disminución de máxima efectividad de expresión de miotilina, tanto en los experimentos de PCR de tiempo real como de inmunotransferencia Western. Mediante el experimento de inmunotransferencia Western se confirmó también el efecto de disminución por AAV-miMyoT-1321.

Ejemplo 5

Entrega a ratones recién nacidos

- 10 Se determinó el genotipo de PCR de crías recién nacidas para identificar ratones hembra WT o T57I MYOT (usando cebadores MYOT humanos y cebadores de cromosoma Y). Para saturar la musculatura de extremidad inferior fueron suficientes inyecciones intramusculares bilaterales de 5×10^{10} partículas de AAV6.miMYOT-1321 o control AAV6.miGFP por pierna en ratones de 1-2 días de edad.

- 15 Se determinó luego la corrección fenotípica, inicialmente mediante análisis histológicos. Específicamente, se cosecharon músculos y preservaron en frío, 3 meses después del suministro viral. Se cortaron crio secciones en serie de diez micrones y se tiñeron con anticuerpos para detectar agregados de proteína positivos para miotilina en miofibras T57I. Los músculos AAV6.miMYOT-1321 tuvieron números significativamente reducidos de agregados por sección, comparados con controles AAV6.miGFP o no tratados. adicionalmente, cuando los músculos tratados con AAV6.miMYOT-132 mostraron agregados ocasionales, fueron significativamente más pequeños que aquellos vistos en animales T57I tratados con control o no tratados. El tratamiento con AAV6.miMYOT-132 también mejoró los déficit de tamaño de músculo, respecto al tratamiento de control.

La disminución de MYOT fue confirmada mediante inmunotransferencia Western y PCR de tiempo real como se muestra en la figura 3. El AAV entregó miMYOT-1321 proteína MYOT mutante (figura 3A) y mRNA (figura 3B) en los músculos significativamente reducidos.

- 25 Estos resultados soportan la eficacia terapéutica. La continuación de los experimentos incluye la determinación de los efectos funcionales de disminución de MYOT en la totalidad de los músculos, midiendo la fuerza específica EDL.

Ejemplo 6

Entrega a ratones adultos

- 30 Se determina el genotipo PCR de animales recién destetados, y para el tratamiento se eligen ratones con 3 meses de edad o 9 meses de edad que tienen patología preexistente significativa asociada con LGMD1A. Se entregan 5×10^{10} vectores AAV6 a la musculatura de extremidad inferior, mediante perfusión de pierna aislada. Se miden luego la corrección fenotípica (incluyendo fuerza de agarre de pata trasera, parámetros de músculo bruto y fuerza específica EDL, usando diferentes procedimientos, a lo largo de los siguientes meses.

- 35 Se inyectaron ratones macho P1 o P2 en las extremidades inferiores con 5×10^{10} partículas AAV6.miMYOT. 1321 resistentes a ADNsa o partículas AAV6.miGFP de control por pierna. Se cosecharon los músculos para análisis a los 3 meses y 9 meses de edad. Todos los protocolos para ratones fueron aprobados por el Institutional Animal Care y Use Committee (IACUC) en el The Research Institute of Nationwide Children's Hospital.

- 40 *Formación de imágenes e histología.* La transducción *in vivo* de AAV fue determinada por epifluorescencia GFP usando un microscopio de disección fluorescente (MZ16FA, Leica, Wetzlar, Alemania). Los músculos disecados fueron colocados en Compuesto O.C.T. (Tissue-Tek, Torrance, CA) y congelados en 2-metilbutano enfriado con nitrógeno líquido. Se cortaron los bloques en tajadas como crio secciones de 10 μ m, y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E; siguiendo protocolos estándar), o anticuerpos policlonales anti-MYOT. Para inmunohistoquímica de MYOT, se fijaron en metanol crio secciones y se bloquearon en amortiguador de GFTP+ (suero de cabra normal 5%, gelatina de cerdo 0,1%, BSA 1%, Triton X-100 0,2%, en solución salina amortiguada con fosfato). Se incubaron tajadas durante la noche a 4 °C con anticuerpo primario de MYOT (1:400), y luego con anticuerpos secundarios anticonejo de cabra conjugados AlexaFluor-594 (1:500; 1 hora a temperatura ambiente; Molecular Probes, Carlsbad, CA). Se tomaron imágenes de tejido del ratón cosechadas de ratones macho de 3 y 9 meses de edad. Se determinaron los diámetros de fibra de corte transversal de músculo y porcentaje de miofibras con núcleo que tiene ubicación central, como se describió anteriormente, de cinco diferentes animales por grupo (cinco campos por pierna).

- 50 *Mediciones de capacidad de contracción del músculo gastrocnemius.* Se anestesiaron ratones con inyección intraperitoneal de Avertin (250 mg/kg) con inyecciones suplementarias dadas para mantener un nivel adecuado de anestesia durante la totalidad del procedimiento. Se expuso el músculo gastrocnemius y se aisló y cortó el tendón distal. Se mantuvieron húmedos el músculo y tendón expuestos, mediante aplicaciones periódicas de solución salina isotónica. Se ató un nudo en el extremo proximal del tendón y se colocó el ratón sobre una plataforma calentada, mantenida a 37° C. Se ató con firmeza el tendón al brazo de palanca de un servomotor (6650LR, Cambridge

Technology) vía los extremos de sutura. Se estimuló el músculo con pulsos de 0,2 ms vía el nervio peroneal, usando electrodos de platino. Se ajustaron el voltaje de estímulo y longitud del músculo, para máxima fuerza (Pt) de retorcadura isométrica. Se estimuló el músculo a frecuencias crecientes hasta que se alcanzó una fuerza (Po) máxima, a longitud (Lo) óptima del músculo. Se determinó la longitud (Lf) óptima de fibra, multiplicando Lo por la relación Lf/Lo de gastrocnemius de 0,45. Se calculó la fibra total CSA dividiendo la masa muscular (mg) por el producto de la longitud de fibra de músculo (mm) y la densidad del músculo esquelético de mamífero, 1,06 g/cm². Se calculó el Po (N/cm²) específico, dividiendo Po por la fibra total CSA, para cada músculo. Inmediatamente después de la medición de la masa muscular, se cortaron los músculos en medio de congelación de tejido (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC), congelado en isopentano enfriado mediante hielo seco, y almacenado a - 80°C hasta que se necesitara.

Mediciones de capacidad de contracción de músculo EDL (datos suplementarios). Se retiró del animal completamente el músculo EDL y se ataron con sutura los tendones proximal y distal del músculo. Se sumergió el músculo en un baño que contenía solución de Ringer de mamífero de Krebs, con cloruro de tubocurarina 0,25 mM. Se mantuvo la solución 25°C y se le hizo burbujear 95% de O₂ y 5% de CO₂. Se unió el tendón distal a un servomotor (modelo 305B, Aurora Scientific, Aurora, ON). Se unió el tendón proximal a un transductor de fuerza (modelo BG-50, Kulite Semiconductor Products, Leonia, NJ). Se estimuló el músculo mediante pulsos de onda cuadrada entregados por dos electrodos de platino conectados a un estimulador de corriente bifásica de alta potencia (modelo 701B, Aurora Scientific, Aurora, ON). Se incrementó el voltaje de los pulsos, y a continuación se ajustó la longitud (L_o) óptima del músculo, para producir la fuerza máxima de retorcadura. Se mantuvieron los músculos a L_o y se incrementó la frecuencia del estímulo hasta que se alcanzó la P_o. Se determinó la sP_o dividiendo P_o por el área de corte transversal (CSA). Se usaron las relaciones L_r-a-L_o de 0,44 para músculos EDL, para calcular L_r. Se determinó la CSA fisiológica de músculos, dividiendo la masa del músculo por el producto de L_r y 1,06 g/cm³, la densidad de músculo esquelético de mamífero.

Análisis estadístico. Todos los datos están expresados como promedio $\pm$ SEM. Los análisis estadísticos fueron ejecutados usando el paquete de software GraphPad Prism. Las pruebas estadísticas usadas para cada experimento, y los N's acompañantes, están indicadas en las leyendas de las figuras.

La disminución de MYOT mejoró la histopatología y peso muscular en ratones TgT57I de 3 meses (3-mo) de edad.

Los ratones TgT57I recapitulan los defectos de agregación progresiva de proteína MYOT que caracterizan LGMD1A. En ratones TgT57I de 3 meses de edad, los agregados están asociados con patología adicional generalizada de músculo, incluyendo déficit en el tamaño de la miofibra y peso del músculo gastrocnemius, así como ligero pero significativo incremento en miofibras con núcleos con localización central, el cual es un indicador histológico de que los músculos soportaron degeneración y a continuación fueron reparados. De modo importante, estos fenotipos son salidas útiles de medición para terapia de ARNi. Por ello se examinaron los efectos de silenciamiento del gen MYOT mediado por miMYOT, sobre la formación de agregados, diámetro de la miofibra, peso muscular, y defectos de núcleos centrales asociados con LGMD1A en ratones TgT57I jóvenes adultos.

Se examinó la acumulación de agregados mediante tinción de criosecciones de músculo gastrocnemius TgT57I tratado con AAV6.miMYOT y con control AAV6, con anticuerpos inmunorreactivos MYOT, tricromo, y hematoxilina y eosina (H&E) (figuras 4A y B). El análisis de imágenes de microscopio mostró que la disminución de MYOT redujo de manera significativa la abundancia de agregados de proteína, en 69% en músculos gastrocnemius TgT57I de 3 meses de edad (figuras 4B y C).

A continuación, se determinó el impacto de inhibición de MYOT sobre el tamaño de corte transversal de miofibra, usando criosecciones de músculo obtenidas con H&E. Las miofibras de músculos TgT57I tratados con control AAV fueron significativamente más pequeñas (promedio de diámetro 49,9 μ m; p<0,05) que aquellas de tipo silvestre (57,0 μ m y 57,7 μ m en ratones tipo silvestre que recibieron miMYOT o miGFP, respectivamente; Figura 4D). En contraste, la disminución de MYOT mediante los vectores terapéuticos AAV6.miMYOT mejoró el promedio de diámetro de miofibra en ratones TgT57I en 4,9 μ m (una mejora de 9,8%), a niveles no significativamente diferentes del tipo silvestre (54,8 μ m en ratones TgT57I tratados con AAV6.miMYOT; Figura 4D). Esta mejora en defectos de tamaño de miofibra es evidente a nivel celular traducida a todo el músculo también. En verdad, los pesos de músculos gastrocnemius TgT57I tratados con AAV6.miMYOT no fueron significativamente diferentes de aquellos medidos en controles tratados del tipo silvestre, mientras los músculos TgT57I que recibieron el vector de control AAV6.miGFP tuvieron un peso promedio de 15,9 mg menor (decrecimiento de 11%) que sus contrapartes de tipo silvestre (p<0,001; Figura 4E). Finalmente, la comparación de los animales TgT57I tratados con AAV6.miMYOT y con AAV6.miGFP, mostró que la disminución de MYOT mejoró el peso del músculo gastrocnemius TgT57I en un promedio de 9,5 mg, representando una mejora significativa de 7,1% (p<0,001).

Como una medida final de los efectos de la disminución de MYOT sobre histopatología asociada con LGMD1A en ratones TgT57I de 3 meses de edad, se cuantificó el porcentaje de miofibras que contienen núcleos con localización central. Típicamente, 98-99% de mionúcleos en músculos de tipo silvestre no lesionados está localizado en la periferia celular. Consistente con esto, los músculos gastrocnemius de los animales tipo silvestre tratados con AAV6.miMYOT y con AAV6.miGFP mostró 1,1% y 1,9% de núcleos centrales, respectivamente. En contraste, 7,7% de miofibras TgT57I de 3 meses de edad de músculos gastrocnemius tratados con control de AAV6.miGFP

contenían núcleos centrales. Este valor es consistente con la degeneración suave y regeneración en animales distróficos. De manera importante, la disminución de MYOT por AAV6.miMYOT redujo el porcentaje de miofibras con núcleos centrales a 3,6% en ratones TgT57I, representando una disminución significativa de 2,1 veces ($p < 0,001$; Figura 4F).

- 5 La disminución de MYOT mejora también la histopatología, peso muscular y fuerza específica en ratones TgT57I de 9 meses de edad

El gastrocnemius está entre los músculos más severamente involucrados en ratones TgT57I y pacientes con LGMD1A. Considerando esto, idealmente los prospectos de terapias focalizadas en LGMD1A deberían tratar la debilidad del músculo gastrocnemius relacionada con la acumulación del mutante MYOT. Aunque los músculos de los ratones TgT57I con 3 meses de edad despliegan cambios asociados con LGMD1A en histología y peso, los estudios piloto mostraron que no se manifestó debilidad significativa del músculo, hasta posteriormente en la edad adulta (9 meses de edad; datos no mostrados). por ello, se trató por 9 meses una segunda cohorte de animales con vectores AAV6.miMYOT.1321 o AAV6.miLacZ de control, con el objetivo de corregir déficit funcional total del músculo en músculos TgT57I gastrocnemius envejecidos.

- 10 Antes de la medición de la fuerza específica, se confirmó que la supresión de MYOT por AAV6.miMYOT (79% mRNA; 63% de proteína; Fig 1c) presentaba todavía beneficio para animales TgT57I a los 9 meses de edad, usando las mediciones de salida establecidas en la cohorte más joven, de 3 meses de edad. Los animales TgT57I tratados con AAV6.miMYOT mostraron corrección significativa para todas las mediciones comparadas con las contrapartes tratadas con AAV6.miLacZ de control. Específicamente, en animales TgT57I tratados con AAV6.miMYOT de 9 meses de edad, los agregados se redujeron en 52% ($p < 0,01$); las miofibras fueron 9,1 μm (20%) más grandes (promedio de 54 μm versus promedio de 44,9 μm en TgT57I tratados con AAV6.miLacZ; $p < 0$); los músculos gastrocnemius pesaron 12% más (promedio de 116 mg versus promedio de 101 mg en TgT57I tratados con AAV6.miLacZ; $p > 0,002$); y los núcleos centrales se redujeron en 1,5 veces (10,6% en los TgT57I tratados con AAV6.miMYOT versus 15,5% en tratados con AAV6.miLacZ; $p < 0,04$). Las mejoras alcanzadas por AAV6.miMYOT fueran parciales, dado que los animales TgT57I tratados con este vector terapéutico fueron todavía significativamente diferentes de los grupos de tipo silvestre, usando todas las mediciones de salida a los 9 meses (figura 5).

De manera importante, la disminución de MYOT por AAV6.miMYOT causó mejora funcional significativa en músculos gastrocnemius Tg57I, según se determinó mediante pruebas totales de fisiología del músculo. Específicamente, la disminución de MYOT mejoró la fuerza absoluta y específica en músculos gastrocnemius TgT57I de 9 meses, en 38% y 25%, respectivamente (figura 5). Como con las otras mediciones de salida descritas anteriormente, esto representó una recuperación funcional parcial, dado que ambos grupos de animales TgT57I fueron significativamente diferentes de sus contrapartes tratadas del tipo silvestre (figura 6).

Ejemplo 7

- 35 Aumento de escala de la dosificación y vectores autocomplementarios AAV (scAAV)

Se insertó el fragmento U6.miMYOT.1321 en un vector scAAV-6 [McCarty et al., Gene Therapy, 8(16): 1248-1254 (2001)]. La secuencia de U6.mi1321 fue amplificada con PCR a partir del esqueleto original de AAV de hebra simple usando cebadores PCR, diseñados con sitios SpeI en cada extremo. Esta secuencia U6.miMYOT.1321 flanqueada por sitios SpeI fue luego ligada al esqueleto de scAAV-6 en los sitios SpeI.

- 40 Se ejecutó entonces un aumento de escala de dosificación IM (3×10^9 , 3×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} DRP) de scAAV.miMYOT.1321, en músculo de ratón de tipo silvestre, para definir un umbral tóxico preliminar. Los animales que recibieron dosificaciones menores que 1×10^{12} (esto es, 1×10^{11} , 3×10^{10} , 3×10^9) no mostraron o mostraron muy pequeña evidencia de respuesta inflamatoria o daño evidente de músculo, indicando que las dosificaciones por debajo de 1×10^{12} son seguras, usando esta ruta de entrega.
- 45 A continuación, se administraron 1×10^{11} DRP de ss- y scAAV.miMYOT a piernas contralaterales de ratones T57I adultos, y se comparó la expresión de proteína MYOT mediante inmunotransferencia Western, 4 semanas después. Los ratones adultos fueron inyectados dentro del músculo izquierdo TA con 1×10^{11} DRP de AAV6.miMYOT de hebra individual o autocompatibles. La pierna contralateral funcionó como un control no inyectado. Dosificaciones idénticas de vectores scAAV.miMYOT duplicaron el silenciamiento de MYOT, comparado con los vectores ssAAV, soportando
- 50 que el aumento de escala de la dosificación puede incrementar de manera segura la disminución y puede a continuación mejorar la corrección en ratones T57I.

Ejemplo 8

AAV recombinante que codifica ARNm con disparidades de pares de base.

- 55 Se hicieron tres miMYOT ARNm de los que se predecía tendrían menos puntos de enlace en las transcripciones, tanto en genomas de ratón como de humano, comparados con la secuencia miMYOT-1321. Cada ARNm incluye una disparidad individual de par de base, como se muestra en el lado derecho de la Figura 7, mediante una línea

amarilla entre los nucleótidos que tienen disparidad.

miMYOT-1043 (SEQ ID NO: 11286)

CTCGAGTGAGCGATGCCAGAGAACATGTCGATTGCCGTAAAGCCACAGATGGGT
AATCGACATGTTCTCTGGCACCGCCTACTAGA

miMYOT-1044 (SEQ ID NO: 11287)

CTCGAGTGAGCGCGCCAGAGAACATGTCGATTGACCGTAAAGCCACAGATGGGT
TAATCGACATGTTCTCTGGCACCGCCTACTAGA

miMYOT-1634 (SEQ ID NO: 11288)

CTCGAGTGAGCGCAGCAGTTACGGGTTCGACTAACTGTAAAGCCACAGATGGGT
TGGTCGAACCCGTAACTGCTTCGCCTACTAGA

Los ARNmis fueron generados mediante PCR por los procedimientos similares a aquellos descritos en el Ejemplo 1. Los cebadores de PCR usados tenían las siguientes secuencias.

Cebador 904 (miMYOT-1043-adelante) (SEQ ID NO: 11289)

AAAACCTCGAGTGAGCGATGCCAGAGAACATGTCGATTGCCGTAAAGCCACAGAT
GGG

Cebador 905 (miMYOT-1044-inverso) (SEQ ID NO: 11290)

AAAAACTAGTAGGCGGTGCCAGAGAACATGTCGATTACCCATCTGTGGCTTTACG
G

Cebador 906 (miMYOT-1044-adelante) (SEQ ID NO: 11291)

AAAACCTCGAGTGAGCGCGCCAGAGAACATGTCGATTGACCGTAAAGCCACAGAT
GGG

Cebador 907 (miMYOT-1044-inverso) (SEQ ID NO: 11292)

AAAAACTAGTAGGCGGTGCCAGAGAACATGTCGATTAAACCCATCTGTGGCTTTACG
G

Cebador 902 (miMYOT-1634-adelante) (SEQ ID NO: 11293)

AAAACCTCGAGTGAGCGCAGCAGTTACGGGTTCGACTAACTGTAAAGCCACAGAT
GGG

Cebador 903 (miMYOT-1634-inverso) (SEQ ID NO: 11294)

AAAAACTAGTAGGCGAAGCAGTTACGGGTTCGACCAACCCATCTGTGGCTTTAC
AG

Luego se hicieron los scAAV que codifican los ARNmis. Se sometió a digestión el vector scAAV.miMYOT.1321 descrito en el Ejemplo 7, con SpeI y NotI para retirar la secuencia U6.miMYOT.1321. Se añadieron los sitios de restricción SpeI y NotI al promotor tMCK mediante PCR con cebadores que contenían los sitios. El producto de PCR promotor tMCK fue entonces unido a los mismos sitios en el vector U6.miMYOT.1321 sometido a digestión, dando como resultado un vector scAAV que contenía el promotor tMCK pero sin secuencias ARNmi (scAAV.tMCK). Para añadir ARNmis, con sitios XhoI y EcoRI se diseñaron oligonucleótidos de ADN de doble hebra que contenían secuencias de ARNmi, y se realizó subclonación en los sitios XhoI y EcoRI del vector pSM2/CMV (www.addgene.org/17389/). Este paso de subclonación añadió 30 secuencias de flanco pri-mir a los respectivos ARNmis. Se amplificó luego con PCR los ARNmis en pSM2/CMV, usando cebadores que contenían sitios NotI y SacII, y se realizó subclonación en los mismos sitios localizados después del promotor tMCK en el vector scAAV.tMCK. El scAAV que incluye un genoma que codifica el ARNmi de MYOT expuesto en SEQ ID NO: 11286

fue nombrado "scAAV-tMCK-miMyoT-1043", el rAAV que incluye un genoma que codifica el ARNmi de MYOT expuesto en SEQ ID NO: 11287 fue nombrado "scAAV-tMCK-iMyoT-1044") y el rAAV que incluye un genoma que codifica el ARNmi de MYOT expuesto en SEQ ID NO: 11288 fue nombrado "AAV-tMCK-miMyoT -1634."

5 Se examinó el efecto de los tres ARNm sobre la expresión de MyoT. Se cotransfectaron células HEK293 con plásmidos que expresan miotilina humana y las secuencias U6.miMYOT usando Lipofectamina-2000. El día siguiente se cosechó la proteína de las células usando amortiguador M-PER, se cuantificó mediante el ensayo de Lowry, y luego se resolvió con electroforesis SDS-PAGE. Se transfirió la proteína a membrana PVDF y se incubaron las manchas con anticuerpos anti-MYOT y anti-GAPDH (control de carga), seguido por anticuerpos secundarios acoplados a HRP y desarrollo sobre película usando quimioluminiscencia. La figura 7 incluye una
10 inmunotransferencia Western que muestra que cada ARNmi reduce la proteína MyoT a niveles similares a los de ARNmi miMYOT-1321.

Mientras la presente invención ha sido descrita en términos de realizaciones específicas, se entiende que para aquellos expertos en la técnica, ocurrirán variaciones y modificaciones. De acuerdo con ello, sólo tales limitaciones, como aparecen en las reivindicaciones, deberían ser colocadas en la invención.

15

REIVINDICACIONES

1. Un virus recombinante adenoasociado que comprende un ADN que codifica ARNmi de MYOT, expuesto en la SEQ ID NO: 11286, 11287 o 11288, en el que el virus recombinante adenoasociado carece de genes rep y cap.
- 5 2. El virus recombinante adenoasociado de la reivindicación 1 en el que la expresión del ADN que codifica ARNmi está bajo el control de un promotor CMV, un promotor de creatina quinasa de músculo (MCK), un promotor (MHCK7) -mejorador MCK/mejorador de cadena pesada de alfa-miosina o un promotor de desmina.
3. El virus recombinante adenoasociado de la reivindicación 1 o 2 que es un AAV-6 recombinante.
4. El virus recombinante adenoasociado de la reivindicación 3 que es un AAV-6 autocomplementario.
- 10 5. Una composición que comprende el virus recombinante adenoasociado de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
6. El virus recombinante adenoasociado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en un procedimiento de inhibición de expresión del gen MYOT en una célula, que comprende poner en contacto la célula con el virus adenoasociado recombinante.
- 15 7. El virus recombinante adenoasociado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en un procedimiento de suministro de un ADN que codifica ARNmi de MYOT, a un animal que lo necesita, que comprende la administración al animal del virus adenoasociado recombinante.
8. El virus recombinante adenoasociado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en terapia.
9. El virus recombinante adenoasociado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un procedimiento de tratamiento de distrofia muscular de la cintura de tipo 1A, que comprende la administración del virus adenoasociado recombinante.
- 20

Figura 1

Secuencia de miotilina C450T humana (los sitios objetivo están subrayados y resaltados)

GGGAAGGAGATGCCTCTTCCTTCCCTTCAATAGTGGGTTAAACCCAGCTGGCA
 CCCTCTGGAAC TACGGGAACAATATTCTTCAAGAGAAGGTC ACTCTACCAAAG
 CCAGGAGCACAGTATTCTCAGGATCTCAACAAGGAAGAGCAGACCAAGGTGC
 TTCTGATTCCCTTACAACCTTCCGTAATTCAGGCTTGTGGCCCCAAATTCAGG
 GCCCCACCCTTCCAGGAACAAATCATTATAGTAATAATTTGCCTTCATCTTCC
 ATATACCAACTAAGCATGTTTAACTACGAACGTCCAAAACACTTCATCCAGTC
 CCAAAACCCATGTGGCTCCAGATTGCAGCCTCCTGGACCAGAAACCTCCAGCT
 TCTCTAGCCAGACCAACAGTCTTCCATTATCATCCAGCCCCGCCAGTGTACA
 GAGCAAAGATTTTCTGCCTCCTCAATACTGAGCTCTCACATCACCATGTCCTC
 CTCTGCTTTCCCTGCTTCTCCCAAGCAGCATGCTGGCTCCAACCCAGGCCAAA
 GGGTTACAACACCTATAACCAGTCCCCAGCCAGCTTCCTCAGCTCCATATTA
 CCATCACA592GCCTGATTACAATAGCAGTAAAATCCCTTCCGCTATGGATT
 CAACTATCAACAGTCCTCAGCTGGCCAACCTATAAATGCAAAGCCATCCCAA
 CTGCAAATGCTAAGCCCATACCAAGAACTCCTGATCATGAAATACAAGGATCA
 AAAGAAGCTTTGATTCAAGATTTGGAAAGAAAGCTGAAATGCAAGGACACCCT
 TCTTCATAATGGAAATCAACGTCTAACATATGAAGAGAAGATGGCTCGCAGAT
 TGCTAGGACCACAGAATGCAGCTGCTGTGTTTCAAGCTCAGGATGACAGTGGT
 GCACAAGACTCGCAGCAACACAACCTCAGAACATGCGCGACTGCAAGTTCTTAC
 ATCACAAGTAAGAAGTAGATCAACCTCAAGGGGAGATGTGAATGATCAGGATG
 CAATCCAGGAGAAATTTTACCCACCACGTTTCATTCAAGTGCCAGAGAACATG
 TCGATTGATGAAGGAAGATTCTGCAGAATGGACTTCAAAGTGAGTGGACTGCC
 AGCTCCTGATGTGTATGTTATCTAAATGGAAGAACAGTTCAATCAGATGATT
 TGCACAAAATGATAGTGTCTGAGAAGGGTCTTCATTCACTCATCTTTGAAGTA
 GTCAGAGCTTCAGATGCAGGGGCTTATGCATGTGTTGCCAAGAATAGAGCAGG
 AGAAGCCACCTTCACTGTGCA1291GCTGGATGTCCTTGCAAAAGAACATAAA
 AG1321AGCACCAATGTTTATCTACAAACCCACAGAGCAAAAAGTTTTAGA13
 66GGGAGATTCACTGAACTAGAAATGCCAGATCTCGGCTATACCTCCACCAA
 GCTTTTCTGGAAAAGAAATAATGAAATGGTACAATTCAACACTGACCGAATAA
 GCTTATATCAAGATAACACT1490GGAAGAGTTACTTTACTGATAAAAGATGT
 AAACAAGAAAGATGCTGGGTGGTATACTGTGTGTCAGCAGTTAATGAAGCTGGAG
 TGACTACATGTAACACAAGATTAGACGTTAC1603GGCACGTCCAAACCAAAC
 TCTTCCAGCTCCTAAGCAGTTACGGGTTCGACCAACATTACAGCAAATATTTAG
 CACTTAATGGGAAAGGTTTGAATGTAAACAAGCTTTTAACCCAGAAGGAGAA
 TTTACAGCGTTTGGCAGCTCAATCTGGACTCTATGAAAGTGAAGAACTTTAATA
 ACTTTACCAACATTGGAAAACAGCCAACTACACCATTAGTAATATATTTGATT
 ACATTTTTTTGAAATTAATCCATAGCTGTATTAACAGATTATGGTTTTAATTA
 GGTAATATAGTTAATATATATTTATAATATTATTTATCCTTTGACTCTTGCAC
 ATTCTATGTACCCCTCCGATTTGTGAAGCCTACAGGAAATCTGGGTATATGGA
 TTTGTAACTGCAGAAGACTATCTTAAAATACAGGATTTTAAACATTTAAGTCAT
 GCACATTTAACAATTACAGGTTATAAATTAGTATCAACTTTTTAAACACATCT
 AATGCTTGTAATAACGTTTACTGGTACTGCTTTCTAAATACTGTTTTACCCGT
 TTTCTCTTGTAGGAATACTAACATGGTATAGATTATCTGAGTGTTCACAGTT
 GTATGTCAAAGAAAATAAAATTCAAATATTTAAACGGA

Figura 2

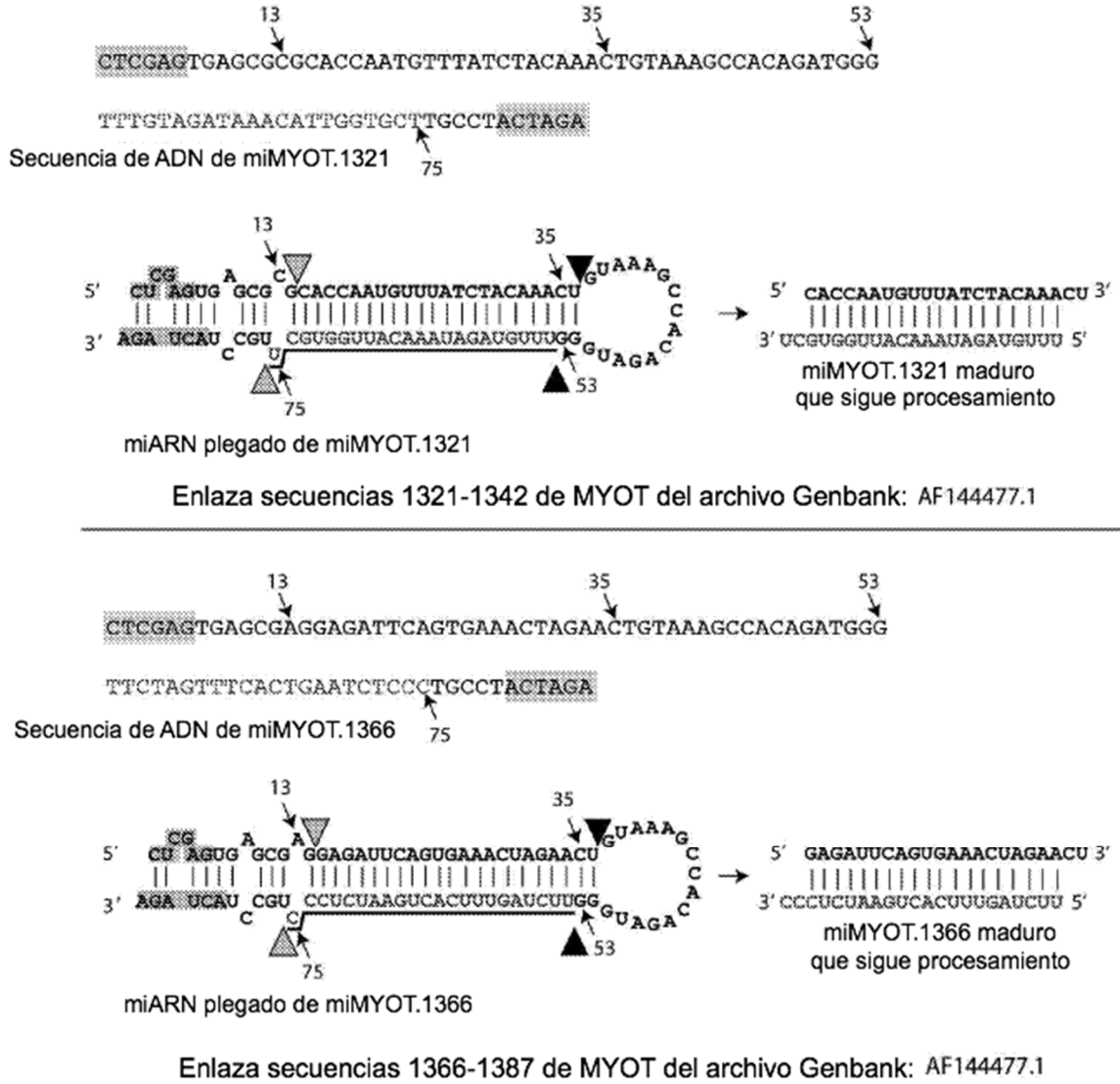


Figura 3

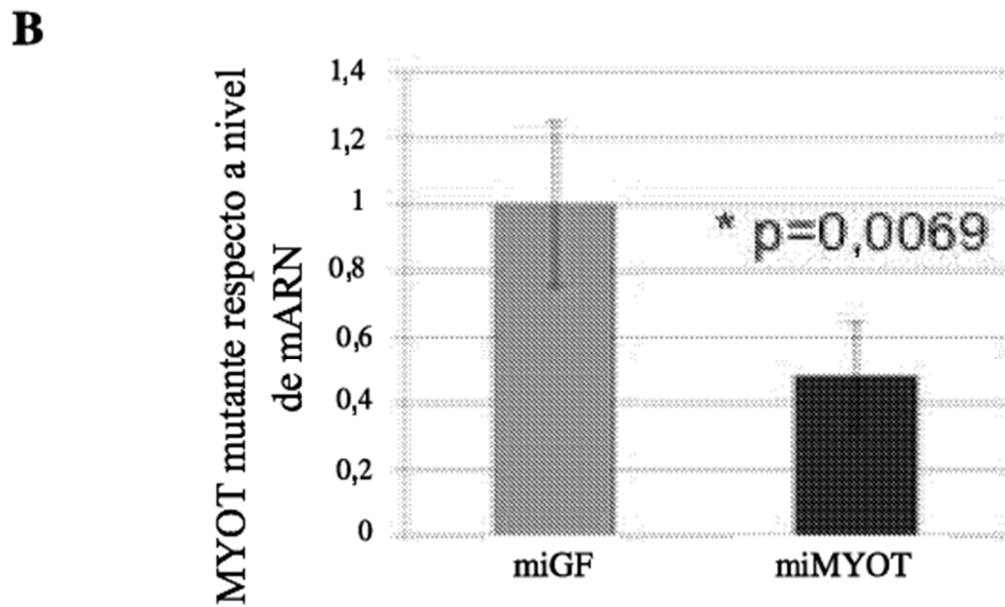
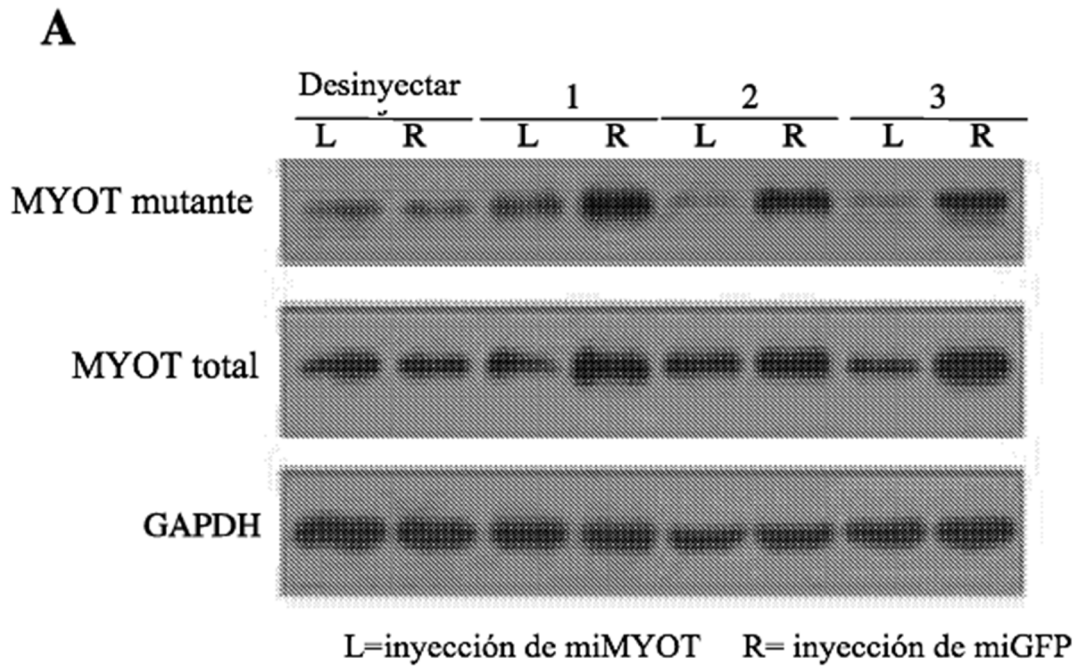


Figura 4

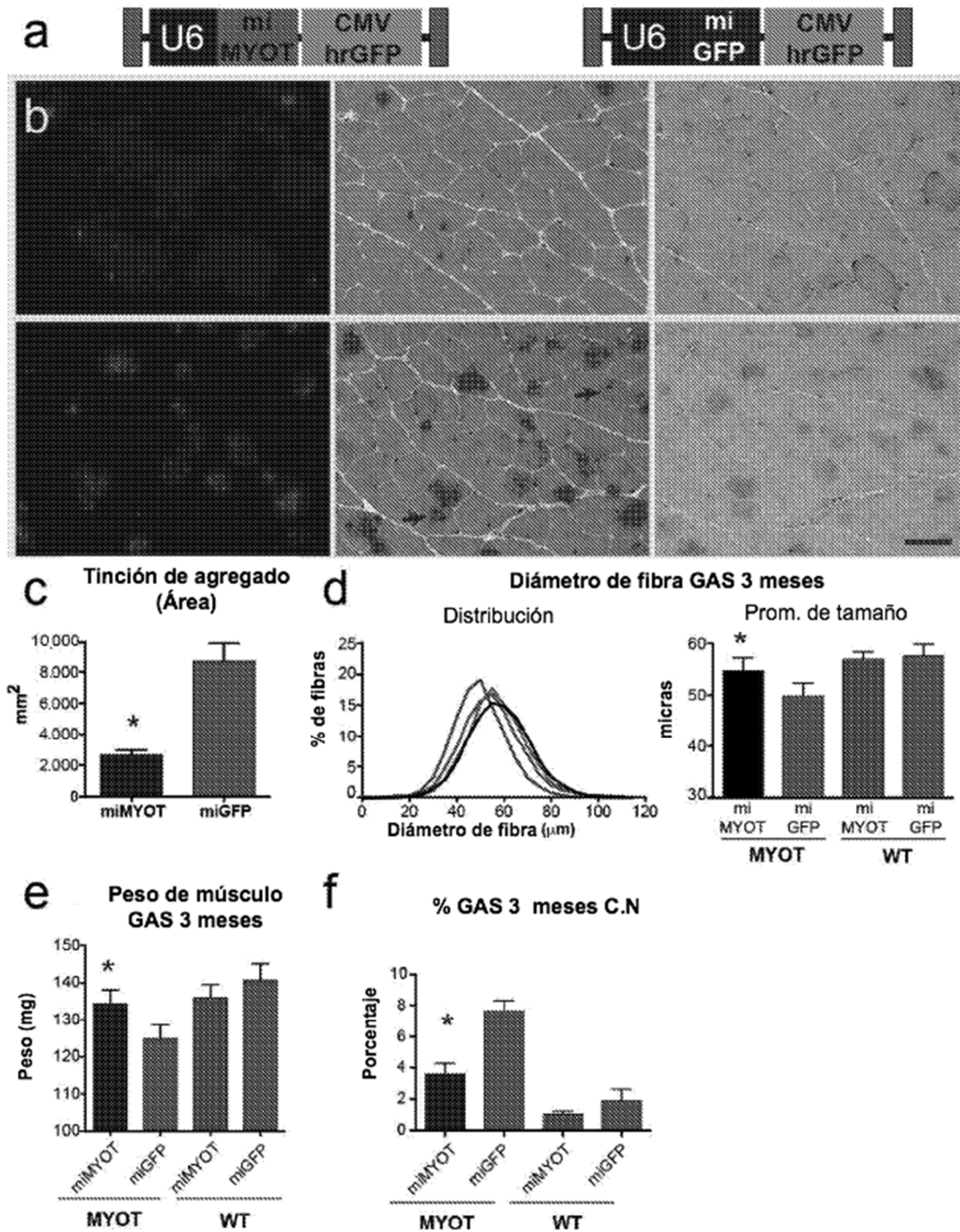


Figura 5

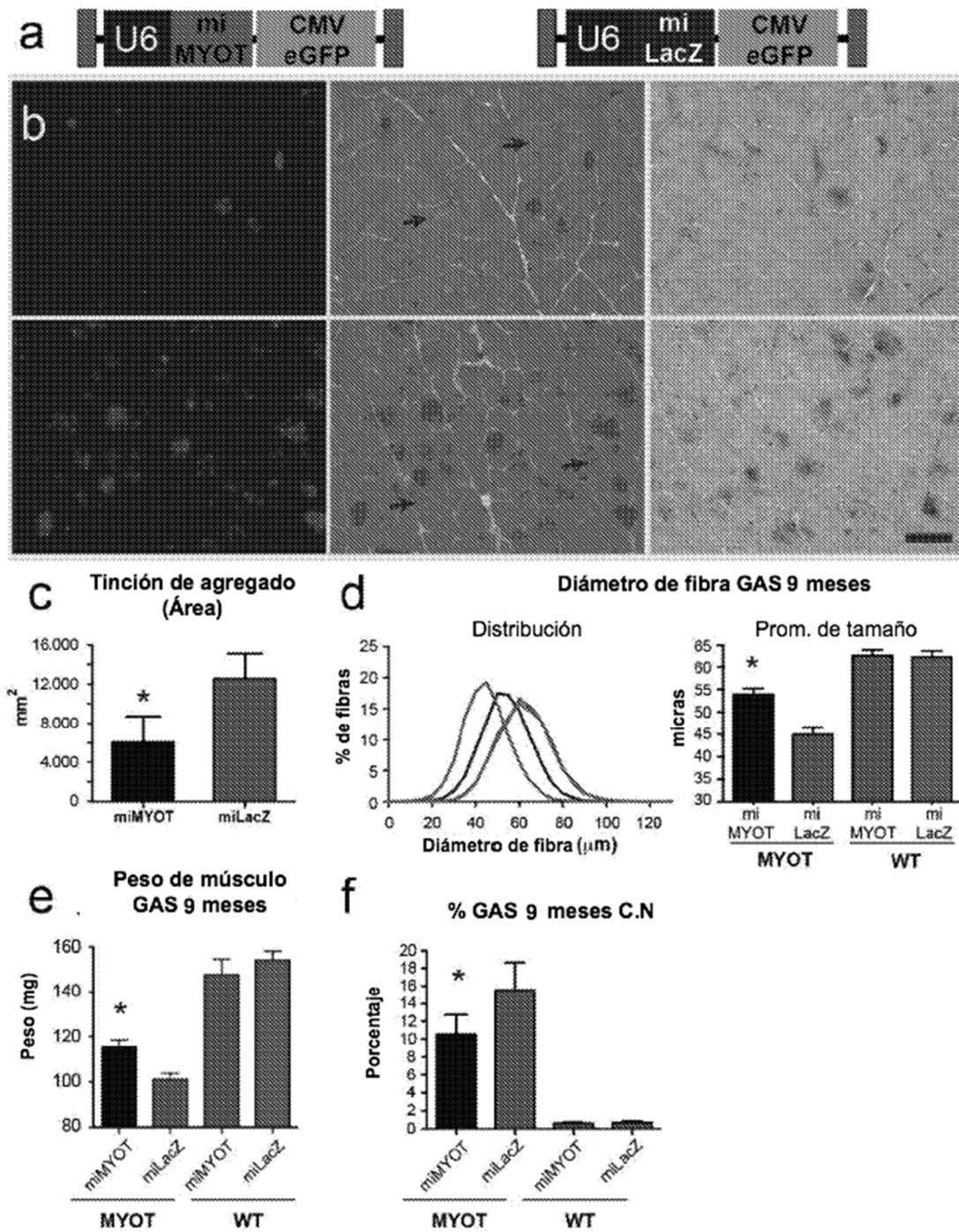


Figura 6

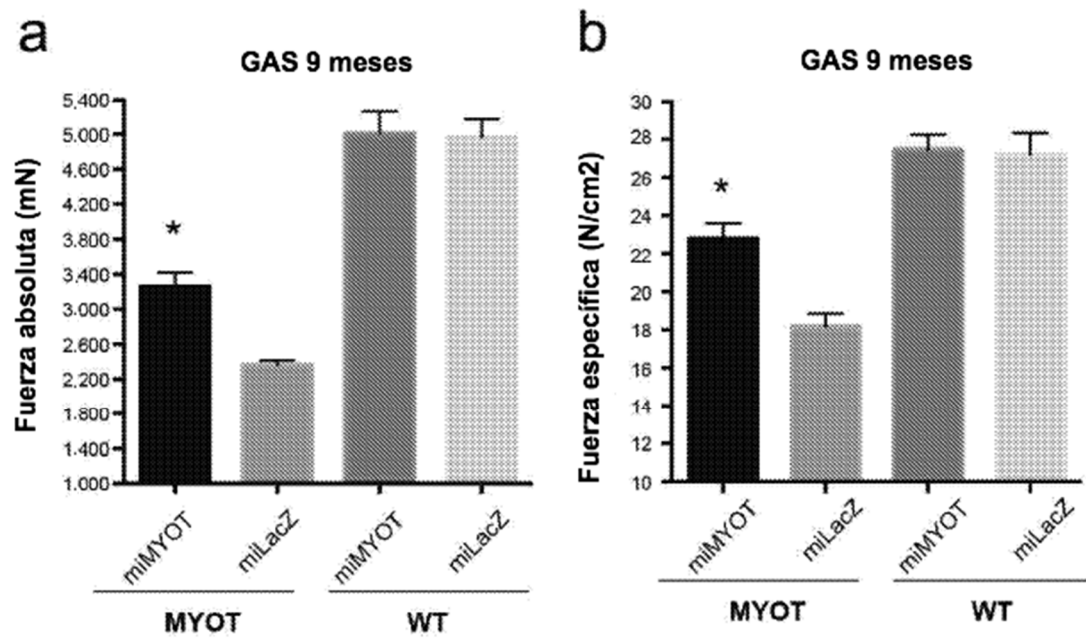


Figura 7

