

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 730**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2017 PCT/US2017/027635**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017 WO17181014**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2017 E 17783235 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2024 EP 3442561**

54 Título: **Administración de microARN-29 y micro-distrofina por virus adenoasociado para tratar la distrofia muscular**

30 Prioridad:

15.04.2016 US 201662323163 P
17.03.2017 US 201762473253 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.08.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

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

ES 2 977 730 T3

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

DESCRIPCIÓN

Administración de microARN-29 y micro-distrofina por virus adenoasociado para tratar la distrofia muscular

5 Campo de la invención

La invención proporciona composiciones para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular o distrofinopatía, y para su uso en la reducción o prevención de la fibrosis, o el aumento de la fuerza muscular o la masa muscular en sujetos que padecen distrofinopatía o distrofia muscular.

10

Antecedentes de la invención

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

20

Esta aplicación incluye dos enfoques traslacionales para desarrollar el tratamiento de la DMD. La infiltración fibrótica es profunda en la DMD y es un impedimento significativo para cualquier terapia potencial. También es importante considerar que el reemplazo genético solo se ve obstaculizado por la gravedad de la fibrosis, ya presente en niños muy pequeños con DMD. De hecho, las biopsias musculares a la edad habitual de diagnóstico, entre los 4 y 5 años, muestran niveles muy significativos de fibrosis.

25

La DMD es causada por mutaciones en el gen DMD que conducen a reducciones en el ARNm y la ausencia de distrofina, una proteína sarcolemal de 427 kD asociada con el complejo proteico asociado a distrofina (DAPC) (Hoffman et al., Cell 51(6):919-28, 1987). El DAPC se compone de múltiples proteínas en el sarcolema muscular que forman un enlace estructural entre la matriz extracelular (ECM) y el citoesqueleto a través de la distrofina, una proteína de unión a actina, y el alfa-distroglicano, una proteína de unión a laminina. Estos enlaces estructurales actúan para estabilizar la membrana celular muscular durante la contracción y proteger contra el daño inducido por la contracción. Con la pérdida de distrofina, la fragilidad de la membrana produce desgarramientos sarcolemáticos y una afluencia de calcio, lo que desencadena proteasas activadas por calcio y necrosis segmentaria de la fibra (Straub et al., Curr Opin. Neurol. 10(2): 168-75, 1997). Este ciclo incontrolado de degeneración y regeneración muscular agota en última instancia la población de células madre musculares (Sacco et al., Cell, 2010. 143(7): p. 1059-71; Wallace et al., Annu Rev Physiol, 2009. 71: p. 37-57), lo que resulta en debilidad muscular progresiva, inflamación endomisial y cicatrización fibrótica.

30

Sin la estabilización de la membrana de la distrofina o una micro-distrofina, la DMD manifestará ciclos incontrolados de lesión y reparación tisular y, en última instancia, reemplazará las fibras musculares perdidas con tejido cicatricial fibrótico a través de la proliferación del tejido conectivo. La fibrosis se caracteriza por los depósitos excesivos de proteínas de la matriz de la ECM, incluidos el colágeno y la elastina. Las proteínas ECM se producen principalmente a partir de citocinas como el TGFβ que es liberado por fibroblastos activados que responden al estrés y la inflamación. Aunque la principal característica patológica de la DMD es la degeneración y necrosis de las miofibras, la fibrosis como consecuencia patológica tiene las mismas repercusiones. La sobreproducción de tejido fibrótico restringe la regeneración muscular y contribuye a la debilidad muscular progresiva en el paciente con DMD. En un estudio, la presencia de fibrosis en las biopsias musculares iniciales de DMD se correlacionó altamente con un resultado motor deficiente en un seguimiento de 10 años (Desguerre et al., J Neuropathol Exp Neurol, 2009. 68(7): p. 762-7). Estos resultados apuntan a la fibrosis como un importante contribuyente a la disfunción muscular de DMD y resaltan la necesidad de desarrollar terapias que reduzcan el tejido fibrótico. La mayoría de las terapias antifibróticas que se han probado en ratones mdx actúan para bloquear la señalización de citocinas fibróticas a través de la inhibición de la vía de TGFβ. Los microARN (miARN) son ARN monocatenarios de ~22 nucleótidos que median el silenciamiento génico a nivel postranscripcional emparejándose con bases dentro de la 3' UTR del ARNm, inhibiendo la traducción o promoviendo la degradación del ARNm. Una secuencia semilla de 7 pb en el extremo 5' del miARN se dirige al miARN; el resto de la secuencia dirigida proporciona reconocimiento adicional, así como su estructura secundaria. Los miARN desempeñan un papel importante en la patología de la enfermedad muscular y presentan perfiles de expresión que dependen únicamente del tipo de distrofia muscular en cuestión (Eisenberg et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2007. 104(43): p. 17016-21). Un creciente cuerpo de evidencia sugiere que los miARN están involucrados en el proceso fibrótico en muchos órganos, incluidos el corazón, el hígado, el riñón y el pulmón (Jiang et al., Proc Natl Acad Sci usa, 2007. 104(43): p. 17016-21). Recientemente, se demostró que la regulación negativa de miR-29 contribuye a la fibrosis cardíaca (Cacchiarelli et al., Cell Metab, 2010. 12(4): p. 341-51) y la expresión reducida de miR-29 se relacionó genéticamente con los músculos humanos de los pacientes con DMD (Eisenberg et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2007. 104(43): p. 17016-2). La familia miR-29 consiste en tres miembros de la familia expresados a partir de dos grupos de miARN bicistrónicos. MiR-29a se coexpresa con miR-29b (miR-29b-1); miR-29c se coexpresa con una segunda copia de miR-29b (miR-29b-2). La familia miR-29 comparte una secuencia semilla conservada y miR-29a y miR-29b difieren cada uno en solo una base de miR-29c. Además, la electroporación del plásmido miR-29 (un grupo de miR-29a y miR-29b-1) en el músculo de ratón mdx redujo los niveles de expresión de los componentes de ECM,

60

65

colágeno y elastina, y disminuyó fuertemente la deposición de colágeno en las secciones musculares dentro de los 25 días posteriores al tratamiento (Cacchiarelli et al., Cell Metab, 2010. 12(4): p. 341-51).

El virus adenoasociado (AAV) es un parvovirus de replicación deficiente, cuyo genoma de ADN monocatenario tiene aproximadamente 4,7 kb de longitud, incluyendo 145 repeticiones terminales invertidas (ITR) de nucleótidos. Existen múltiples serotipos de AAV. Se conocen las secuencias de nucleótidos de los genomas de los serotipos de AAV. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del genoma del serotipo 2 de AAV (AAV2) se presenta en Srivastava et al., J Virol, 45: 555-564 (1983) según lo corregido por Ruffing et al., J Gen Virol, 75: 3385-3392 (1994). Como otros ejemplos, el genoma completo de AAV-1 se proporciona en GenBank No. de acceso NC_002077; el genoma completo de AAV-3 se proporciona en GenBank No. de acceso NC_1829; el genoma completo de AAV-4 se proporciona en GenBank No. de acceso NC_001829; el genoma de AAV-5 se proporciona en GenBank No. de acceso AF085716; el genoma completo de AAV-6 se proporciona en GenBank No. de acceso NC_001862; al menos partes de los genomas de AAV-7 y AAV-8 se proporcionan en los números de acceso de GenBank AX753246 y AX753249, respectivamente (véanse también las patentes estadounidenses Nos. 7,282,199 y 7,790,449 relacionadas con AAV-8); el genoma de AAV-9 se proporciona en Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004); el genoma de AAV-10 se proporciona en Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006); y el genoma de AAV-11 se proporciona en Virology, 330(2): 375-383 (2004). El serotipo AAVrh74 se describe en Rodino-Klapac et al. J. Trans. Med. 5: 45 (2007). Las secuencias que actúan en cis que dirigen la replicación del ADN viral (rep), la encapsidación/empaquetamiento y la integración del cromosoma de la célula huésped están contenidas dentro de las ITR. Tres promotores de AAV (denominados p5, p19 y p40 por sus ubicaciones relativas en el mapa) impulsan 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 empalme diferencial del único intrón de AAV (por ejemplo, en los nucleótidos 2107 y 2227 de AAV2), dan como resultado 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 en última instancia responsables 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. Los sitios de inicio de traducción no consensuados y de empalme alternativo son responsables de la producción de las tres proteínas de la cápside relacionadas. Un único sitio de poliadenilación consenso se encuentra en la posición del mapa 95 del genoma de AAV. El ciclo de vida y la genética del AAV se revisan en Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992).

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

Múltiples estudios han demostrado la expresión de proteínas recombinantes mediadas por AAV a largo plazo (> 1,5 años) en el músculo. Véase, Clark et al., Hum Gene Ther, 8: 659-669 (1997); Kessler et al., Proc Nat. Acad Sc. USA, 93: 14082-14087 (1996); y Xiao et al., J Virol, 70: 8098-8108 (1996). Véase 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 altamente vascularizado, la transducción de AAV recombinante ha dado como resultado 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 la correcta glicosilación, plegamiento y secreción de anticuerpos, lo que indica que el músculo es capaz de una expresión estable de las proteínas terapéuticas secretadas.

Heller et al., 2016, Molecular Therapy, 24(1):S151 se refiere a la administración conjunta de miR-29c y micro-distrofina por inyección intramuscular en un modelo de ratón con DMD.

WO 2015/197232 A1 se refiere a composiciones que comprenden un producto de terapia génica para su uso en el tratamiento de una enfermedad distrófica en un sujeto.

La mejora funcional en pacientes que sufren DMD y otras distrofias musculares requiere tanto la restauración genética como la reducción de la fibrosis. Existe la necesidad de métodos para reducir la fibrosis que puedan combinarse con métodos de restauración génica para tratamientos más efectivos de la DMD y otras distrofias musculares. MiR29 es un posible regulador génico y un candidato ideal para reducir la fibrosis muscular.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de distrofia muscular o distrofinopatía que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa miR-29c, en donde la composición se administra con una segunda composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina comprende un elemento de control específico del músculo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

La presente invención también proporciona una composición para su uso en la reducción o prevención de la fibrosis en un sujeto que padece distrofia muscular o distrofinopatía que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa miR-29c, en donde la composición se administra con una segunda composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina comprende un elemento de control específico del músculo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

La presente invención también proporciona una composición para su uso en el aumento de la fuerza muscular o la masa muscular en un sujeto que padece distrofia muscular o distrofinopatía que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa miR-29c, en donde la composición se administra con una segunda composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina comprende un elemento de control específico del músculo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

La presente invención también proporciona una composición para su uso en el tratamiento de distrofia muscular o distrofinopatía que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina, en donde la composición se administra con una segunda composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa miR-29c, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina comprende un elemento de control específico del músculo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

La presente invención también proporciona una composición para su uso en la reducción o prevención de la fibrosis en un sujeto que padece distrofia muscular o distrofinopatía que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina, en donde la composición se administra con una segunda composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa miR-29c, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina comprende un elemento de control específico del músculo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

La presente invención también proporciona una composición para su uso en el aumento de la fuerza muscular o la masa muscular en un sujeto que padece distrofia muscular o distrofinopatía que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina, en donde la composición se administra con una segunda composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa miR-29c, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina comprende un elemento de control específico del músculo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

Los métodos de terapia génica pueden reducir directamente los tres componentes principales del tejido conectivo (colágeno 1, colágeno 3 y fibronectina) mediante la administración del microARN miR29. En este sistema, el miR29 se une a la 3' UTR del gen de colágeno y fibronectina para regular negativamente la expresión.

Las terapias y enfoques combinados para reducir y prevenir la fibrosis mediante el uso de vectores de terapia génica pueden administrar miR-29 para suprimir la fibrosis junto con micro-distrofina para abordar el defecto génico observado en la DMD. Como se muestra en los Ejemplos 5-7, el tratamiento combinado dio como resultado una mayor reducción en la fibrosis, aumento del tamaño muscular y aumento de la fuerza muscular.

El vector de rAAV que expresa miR29 puede comprender una secuencia de polinucleótidos que expresa la cadena guía diana de miR-29c de la SEQ ID NO: 3, la cadena guía de miR-29c de la SEQ ID NO: 4 y el asa natural de espina dorsal y tallo de miR-30 (SEQ ID NO: 5). Una secuencia de polinucleótidos de ejemplo que comprende el ADNc de miR-29c en una estructura principal de miR-30 se establece como SEQ ID NO: 2 (Figura 1).

Un rAAV ejemplar es el pAAV.CMV.Mir29C que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1; donde el

promotor de CMV abarca los nucleótidos 120-526, un intrón EF1a abarca los nucleótidos 927-1087 y los nucleótidos 1380-1854, el soporte guía de miR-29c abarca el nucleótido 1257-1284 y el ARNhc-miR29-c con la secuencia semilla primaria abarca los nucleótidos 1088-1375, y la secuencia poli A abarca los nucleótidos 1896-2091. En un aspecto, los vectores de rAAV son AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh.74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 o AAV13.

Otro rAAV ejemplar es el pAAV.MHC.Mir29C que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 12; en donde el potenciador de MCK abarca los nucleótidos 190-395, el promotor de MHC abarca los nucleótidos 396-753, un intrón EF1a abarca los nucleótidos 1155-1315 y los nucleótidos 1609-2083, el soporte guía de miR-29c abarca el nucleótido 1487-1512 y el ARNhc-miR29-c con la secuencia semilla primaria abarca los nucleótidos 1316-1608, y la secuencia poli A abarca los nucleótidos 2094-2146. En un aspecto, los vectores de rAAV son AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh.74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 o AAV13.

Los vectores de rAAV que expresan miR29 pueden estar unidos operativamente a un elemento de control específico del músculo o un promotor ubicuo, tal como el promotor de citomegalovirus (CMV). Por ejemplo, el elemento de control específico del músculo es el elemento del gen de la actina esquelética humana, el elemento del gen de la actina cardíaca, el factor de unión al potenciador específico de miocitos MEF, la creatina cinasa muscular (MCK), tMCK (MCK truncada), la cadena pesada de la miosina (MHC), MHCK7 (una versión híbrida de MHC y MCK), C5-12 (promotor sintético), el elemento potenciador de la creatina cinasa murina, el elemento del gen de la troponina C esquelética de contracción rápida, el elemento del gen de la troponina C cardíaca de contracción lenta, el elemento del gen de la troponina I de contracción lenta, los factores nucleares inducibles por hipoxia, el elemento inducible por esteroides o el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE).

Por ejemplo, los vectores de rAAV que expresan miR-29 pueden estar unidos operativamente al elemento de control específico del músculo que comprende la secuencia de nucleótidos potenciadora de MCK de la SEQ ID NO: 10 y/o la secuencia promotora de MCK de la SEQ ID NO: 11. Además, los vectores de rAAV pueden estar unidos operativamente al elemento de control específico del músculo que comprende la secuencia de nucleótidos potenciadora de MHCK7 de la SEQ ID NO: 13.

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

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

El sujeto puede sufrir distrofinopatía o distrofia muscular como DMD, distrofia muscular de Becker o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina.

Un rAAV ejemplar que expresa micro-distrofina es la pAAV.mck.micro-distrofina que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9 y se muestra en la Figura 10 y 11. Este vector rAAV comprende el promotor MCK, una secuencia de intrón quimérico, la secuencia codificante para el gen de la micro-distrofina, poli A, resistencia a la ampicilina y la estructura principal del plásmido pGEX con origen o replicación en pBR322. En un aspecto, los vectores de AAV recombinantes son AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 o AAV 13.

La proteína micro-distrofina proporciona estabilidad a la membrana muscular durante la contracción muscular, por ejemplo, la micro-distrofina actúa como un amortiguador durante la contracción muscular.

El término "riguroso" se utiliza para referirse a condiciones que se entienden comúnmente en la técnica como rigurosas. La rigurosidad de la hibridación está determinada principalmente por la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturizantes como la 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. Véase Sambrook et al., Clonación molecular: 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 desnaturizante), sin embargo, la tasa de hibridación se verá afectada. En los casos en los que se refiere a la hibridación de desoxiligonucleótidos, las condiciones de hibridación rigurosas ejemplares adicionales incluyen el lavado en 6x SSC 0,05 % de pirofosfato de sodio a 37 °C (para oligos de 14 bases), 48 °C (para oligos de 17 bases), 55 °C (para oligos de 20 bases) y 60 °C (para oligos de 23 bases).

Se pueden incluir otros agentes en los amortiguadores de hibridación y lavado con el fin de reducir la hibridación no específica y/o de fondo. Los ejemplos son albúmina de suero bovino al 0,1 %, polivinilpirrolidona al 0,1 %, pirofosfato de sodio al 0,1 %, dodecilsulfato de sodio al 0,1 %, NaDodSO₄, (SDS), ficoll, solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicated (u otro ADN no complementario) y sulfato de dextrano, aunque también se pueden utilizar otros agentes adecuados. La concentración y los tipos de estos aditivos se pueden cambiar sin afectar sustancialmente la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los experimentos de hibridación generalmente se llevan a cabo a pH 6,8-7,4, sin

embargo, en condiciones típicas de fuerza iónica, la tasa de hibridación es casi independiente del pH. Véase Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England). Un experto en la técnica puede ajustar las condiciones de hibridación para acomodar estas variables y permitir que los ADN de diferente relación de secuencia formen híbridos.

Los vectores de rAAV que expresan micro-distrofina comprenden la secuencia codificante del gen de micro-distrofina unido 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 al potenciador específico de miocitos MEF, la creatina cinasa muscular (MCK), tMCK (MCK truncada), la cadena pesada de la miosina (MHC), C5-12 (promotor sintético), el elemento potenciador de la creatina cinasa murina, el elemento del gen de la troponina C de contracción rápida esquelética, el elemento del gen de la troponina C cardíaca de contracción lenta, el elemento del gen de la troponina I de contracción lenta, los factores nucleares inducibles por hipoxia, el elemento inducible por esteroides o el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE).

En la administración de un vector de rAAV que expresa miR-29 y un vector de rAAV que expresa micro-distrofina, estos vectores de rAAV pueden administrarse simultáneamente, o administrarse consecutivamente con el vector de rAAV que expresa miR29 administrado inmediatamente antes de que el rAAV que expresa micro-distrofina, o administrarse consecutivamente con el vector de rAAV que expresa miR29 se administre inmediatamente después de que el rAAV que expresa micro-distrofina. Alternativamente, el vector de AAV que expresa micro-distrofina se puede administrar dentro de alrededor de 1-5 horas o 5-12 horas o 12 a 15 horas o 15 a 24 horas después de administrar el rAAV que expresa miR-29 o el vector de AAV que expresa micro-distrofina se puede administrar dentro de alrededor de 1-5 horas o 5-12 horas o 12 a 15 horas o 15 a 24 horas antes de administrar el rAAV que expresa miR-29. Alternativamente, el vector de AAV que expresa micro-distrofina puede administrarse dentro de alrededor de 1 o 6 o 12 o 24 horas después de administrar el rAAV que expresa miR-29 o el vector de AAV que expresa micro-distrofina puede administrarse dentro de alrededor de 1 o 6 o 12 o 24 horas antes de administrar el rAAV que expresa miR-29.

Los vectores AAV pueden administrarse a pacientes diagnosticados con distrofinopatía o distrofia muscular, tales como DMD o distrofia muscular de Becker antes de que se observe fibrosis en el sujeto o antes de que se haya reducido la fuerza muscular en el sujeto o antes de que se haya reducido la masa muscular en el sujeto.

El rAAV puede administrarse a un sujeto que padece distrofinopatía o distrofia muscular, como DMD o distrofia muscular de Becker, que ya ha desarrollado fibrosis, con el fin de prevenir una nueva fibrosis en estos sujetos. El rAAV puede administrarse al paciente que padece distrofinopatía o distrofia muscular, como DMD o distrofia muscular de Becker, que ya tiene una fuerza muscular reducida o una masa muscular reducida para proteger el músculo de una lesión mayor.

El vector rAAV puede administrarse mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa.

El vector o composición de rAAV se puede administrar sistémicamente. Por ejemplo, el vector o composición de rAAV se administra por vía parenteral mediante inyección, infusión o implantación.

Las composiciones de la invención se formulan para inyección intramuscular o inyección intravenosa. La composición de la invención también se formula para administración sistémica, tal como administración parenteral por inyección, infusión o implantación. Además, cualquiera de las composiciones se formula para la administración a un sujeto que padece distrofinopatía o distrofia muscular tal como DMD, distrofia muscular de Becker o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina.

En cualquiera de los usos, el medicamento puede formularse para inyección intramuscular. Además, cualquiera de los medicamentos se puede preparar para la administración a un sujeto que padece distrofia muscular tal como DMD o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina.

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

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona un esquema del vector de rAAV scAAV_{Crh.74.CMV.miR29c} y la secuencia de nucleótidos del miR-29c en una estructura principal de miR-30 natural y la secuencia de nucleótidos de la estructura de horquilla predicha.

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

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

- 5 La Figura 4A-4C muestra la cantidad de micro-distrofina de expresión de fibras musculares para medir la eficacia de la administración de transgén.

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

10

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

- 15 La Figura 7A-7C demuestra que la inyección intramuscular de miR-29c aumentó la fuerza absoluta (panel A), la fuerza específica normalizada (panel B) y la protección adicional contra el daño inducido por la contracción (panel C) en el músculo.

- 20 La Figura 8 ilustra que la combinación de miR-29c/ μ -dys aumenta el tamaño muscular en ratones tratados a los 3 meses de edad. Se muestran secciones de mdx/utrn^{+/-} músculos gastrocnemios tratados y no tratados teñidos con Rojo picosirio para teñir para colágeno. Las áreas fibróticas son rosadas y el músculo intacto está en verde. A nivel macroscópico, la combinación miR-29c/ μ -dys disminuye la fibrosis y aumenta el área transversal total.

- 25 La Figura 9A-F demuestra que el tratamiento con miR-29c administrado conjuntamente con micro-distrofina aumentó la hipertrofia muscular y la hiperplasia como se muestra por un aumento en el peso total del gastrocnémico inyectado en comparación con uno inyectado solo (panel A), un aumento en el aumento en el tamaño promedio de la fibra (panel B), un aumento en el área transversal del músculo (panel D; no inyectado: 24,6 frente a miR-29c: 26,3 frente a micro-dys: 26,6 frente a micro-dys/miR-29c: 33,1) y un aumento en el número de fibras musculares (panel E), pero el número de fibras musculares por unidad de área no se vio afectado (panel F). El panel C compara los controles mdx/utrn^{+/-} con mdx/utrn^{+/-} tratado con miR-29c/ μ -dys, el diámetro promedio aumentó de 25,96 a 30,97 μ m

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

- 45 La Figura 11 demuestra que la terapia de combinación temprana restaura la fuerza y protege contra el daño inducido por la contracción. La medición de la fuerza específica absoluta (panel A) y normalizada (panel b) después de la contracción tetánica en los tres músculos GAS inyectados con tratamiento aumentó significativamente en comparación con el músculo mdx/utrn^{+/-} no tratado (panel C). Luego se evaluaron los músculos para determinar la pérdida de fuerza después de contracciones excéntricas repetitivas. Solo los ratones cotratados con miR-29c/micro-distrofina y micro-distrofina sola mostraron una protección contra la pérdida de fuerza en comparación con los músculos mdx/utrn^{+/-} no tratados (azul). El análisis bidireccional de la varianza demuestra la importancia en las curvas de decaimiento Barras de error, SEM para n=5 (rAAVrh.74.CMV.miR-29c), n=6 (rAAVrh.74.CMV.miR-29c/rAAVrh.74.MCK.micro-distrofina), n=5 (rAAVrh.74.MCK.micro-distrofina), n=15 (mdx/utrn^{+/-} ratones). ANOVA de 1 vía (*p<0,05, **p<0,01, ** * p<0,001, ****p<0,0001).

55

La Figura 12 ilustra que el tratamiento de combinación de miR-29c/micro-distrofina aumenta el tamaño muscular en ratones tratados a 1 mes de edad. Los músculos GAS mdx/utrn^{+/-} tratados y no tratados se seccionaron y se tiñeron con Rojo picosirio para teñir el colágeno. Las áreas fibróticas son rosadas y el músculo intacto está en verde. A nivel macroscópico, la combinación de miR-29c/micro-distrofina disminuye la fibrosis y aumenta el área transversal total.

60

La Figura 13A - 13G demuestra que el tratamiento temprano (a las 4-5 semanas) de la terapia de combinación AAV.MCK.miR-29c/micro-distrofina es más eficaz para reducir la fibrosis y la expresión de ECM. El panel A proporciona tinción con rojo picosirio de AAV.MCK.miR-29c/AAV.MCK.micro-distrofina no inyectada de ratones inyectados a las 4-5 semanas de edad extraídos doce semanas después de la inyección. Aumento original, x20 El panel B proporciona la cuantificación de la tinción con rojo picosirio que demuestra que el músculo cotratado tuvo una reducción del 50,9 % en el colágeno en comparación con el músculo GAS no tratado. El panel C proporciona qRT-PCR que confirma un aumento

65

en los niveles de transcripción de miR-29c en la cohorte tratada. La qRT-PCR semicuantitativa muestra una reducción significativa en los niveles de colágeno 1A (Col1A; panel D) y colágeno 3A (Col3A; panel E), fibronectina (Fbn; panel F) y Tgfβ1 (panel G) en el músculo tratado con AAV.MCK.miR-29c/AAV.micro-distrofina en comparación con las terapias contralaterales de las extremidades. (*p<0,05, ****p<0,0001).

La Figura 14A - 14G demuestra que el tratamiento tardío (tratamiento a las 12 semanas) con la terapia de combinación AAV.MCK.miR-29c/micro-distrofina es eficaz para reducir la fibrosis y la expresión de ECM. El panel A proporciona tinción con rojo picosirio de AAV.MCK.miR-29c y AAV.MCK.miR-29c/AAV.micro-distrofina no tratados doce semanas después de la inyección. Aumento original, x20. El panel B proporciona la cuantificación de la tinción con rojo picosirio, lo que demuestra que el músculo cotratado tuvo una reducción del 30,3 % en el colágeno en comparación con el músculo GAS no tratado. El panel C proporciona qRT-PCR que confirma un aumento en los niveles de transcripción de miR-29c en las cohortes tratadas. La qRT-PCR semicuantitativa demostró una reducción significativa en los niveles de colágeno 1A (Col1A; panel D), colágeno 3A (Col3A; panel E), fibronectina (Fbn; panel F) y Tgfβ1 (panel G) en el músculo tratado con AAV.miR-29c/AAV.micro-distrofina en comparación con la extremidad contralateral. ANOVA unidireccional. Todos los datos representan la media ± SEM. (** p<0,01, ****p<0,0001).

La Figura 15A-15C demuestra que la terapia de combinación temprana (tratamiento a las 4-5 semanas) restauró la fuerza y protegió contra el daño inducido por la contracción. La medición de la fuerza específica absoluta (panel A) y normalizada (panel B) después de la contracción tetánica MCK.miR-29c/micro-distrofina inyectó músculos GAS que aumentaron significativamente en comparación con el músculo mdx/utrn^{+/-} no tratado. (C) Luego se evaluaron los músculos para determinar la pérdida de fuerza después de contracciones excéntricas repetitivas. Los ratones cotratados con miR-29c/micro-distrofina y micro-distrofina sola mostraron protección contra la pérdida de fuerza en comparación con los músculos mdx/utrn^{+/-} no tratados (rojo). ANOVA bidireccional. Todos los datos representan la media ± SEM (**p<0,0001).

La Figura 16A - 16C demuestra que la terapia de combinación tardía restauró la fuerza y protegió contra el daño inducido por la contracción. La medición de la fuerza específica absoluta (panel A) y normalizada (panel B) después de la contracción tetánica rAAV.MCK.miR-29c y los músculos GAS inyectados con micro-distrofina que expresan rAAV aumentaron significativamente en comparación con el músculo mdx/utrn^{+/-} no tratado. En el Panel C, se evaluó la pérdida de fuerza de los músculos después de contracciones excéntricas repetitivas. Los ratones co-tratados con rAAV.MCK.miR-29c/rAAV que expresan micro-distrofina mostraron una protección contra la pérdida de fuerza en comparación con los músculos mdx/utrn^{+/-} no tratados (rojo). ANOVA bidireccional. Todos los datos representan la media ± SEM (**p<0,01, **p<0,0001).

La Figura 17A-17D demuestra que el tratamiento combinado aumenta la hipertrofia muscular 3 meses después de la inyección. El panel A demuestra que rAAV.MCK.miR-29c coadministrado con rAAV que expresa micro-distrofina no logró aumentar el peso total del GAS inyectado. El panel B demuestra que rAAV.MCK.miR-29c/rAAV que expresa el tratamiento de combinación de micro-distrofina indujo un aumento en el tamaño promedio de la fibra. Al comparar los controles mdx/utrn^{+/-} con los mdx/utrn^{+/-} tratados con miR-29c/micro-distrofina, el diámetro promedio aumentó de 28,96 a 36,03μm. El panel C muestra que la entrega conjunta produjo un cambio hacia la distribución de tamaño de fibra de tipo salvaje. El panel D proporcionó que el número de fibras musculares por mm² en el tratamiento de combinación de miR-29c/micro-distrofina fue significativamente menor que en los ratones no tratados y de tipo salvaje (**p<0,01, ***p<0,0001).

La Figura 18A-18B proporciona la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1 pAAV.CMV.Mir29C) de un vector de rAAV de ejemplo que comprende la cadena guía madura de miR-29c (nucleótidos 1257-1284) y la estructura principal de mi-30 natural (nucleótidos 1088-1375). El constructo también comprende el promotor de CMV (nucleótidos 120-526), dos intrones EF1a en los nucleótidos 927-1087 y 1380-1854 y un polA en los nucleótidos 1896-2091.

La Figura 19 proporciona un esquema del vector rAAV pAAV.MCK.micro-distrofina.

La Figura 20A-D proporciona la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 9; pAAV.MCK.micro-distrofina) de un vector de rAAV ejemplar que expresa micro-distrofina.

La Figura 21A-D proporciona la secuencia de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de micro-distrofina humana (SEQ ID NO: 7)

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

Descripción detallada de la invención

Las biopsias musculares tomadas a la edad más temprana del diagnóstico de DMD revelan una proliferación prominente del tejido conectivo. La fibrosis muscular es perjudicial de múltiples maneras. Reduce el tránsito normal de nutrientes

endomisiales a través de las barreras del tejido conectivo, reduce el flujo sanguíneo y priva al músculo de los constituyentes nutricionales derivados vasculares, y contribuye funcionalmente a la pérdida temprana de la deambulación a través de las contracturas de las extremidades. Con el tiempo, los desafíos del tratamiento se multiplican como resultado de una fibrosis muscular marcada. Esto se puede observar en biopsias musculares que comparan la proliferación de tejido conectivo en puntos de tiempo sucesivos. El proceso continúa exacerbándose, lo que lleva a la pérdida de la deambulación y la aceleración fuera de control, especialmente en pacientes dependientes de sillas de ruedas.

Sin un enfoque paralelo para reducir la fibrosis, es poco probable que los beneficios de la omisión de exones, la lectura de codones de detención o las terapias de reemplazo génico se puedan lograr por completo. Es probable que incluso las moléculas pequeñas o las estrategias de reemplazo de proteínas fracasen sin un enfoque para reducir la fibrosis muscular. El trabajo previo en ratones *mdx* envejecidos con fibrosis existente tratados con AAV-micro-distrofina demostró que no pudimos lograr una restauración funcional completa (Human molecular genetics 22, 4929-4937 (2013)). También se sabe que la progresión de la cardiomiopatía DMD se acompaña de cicatrices y fibrosis en la pared ventricular. La administración de micro-ARN es particularmente innovadora debido a la falta de barreras inmunitarias y a la relativa facilidad de administración. Los microARN son pequeños (~200 pb) y, por lo tanto, se pueden envasar en AAV junto con un casete terapéutico para corregir o evitar el defecto genético.

Tal como se usa en la presente, el término "AAV" es una abreviatura estándar para virus adenoasociado. El virus adenoasociado es un parvovirus de ADN monocatenario que crece solo en células en las que ciertas funciones son proporcionadas por un virus auxiliar coinfectante. Actualmente hay trece serotipos de AAV que se han caracterizado. La información general y las revisiones de AAV se pueden encontrar, por ejemplo, en Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, págs. 169-228, y Berns, 1990, Virology, págs. 1743-1764, Raven Press, (Nueva York). Sin embargo, se espera que estos mismos principios sean aplicables a serotipos de AAV adicionales, ya que es bien sabido que los diversos serotipos están bastante estrechamente relacionados, tanto estructural como funcionalmente, incluso a nivel genético. (Véase, 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 exhiben propiedades de replicación muy similares mediadas por genes rep homólogos; y todos portan tres proteínas de la cápside relacionadas, como las expresadas en AAV2. El grado de relación se sugiere además por el análisis de heterodúplex que revela una amplia hibridación cruzada entre serotipos a lo largo de la longitud del genoma; y la presencia de segmentos de autohibridación análogos en los extremos que corresponden a "secuencias de repetición terminal 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 flanqueados por secuencias de repetición terminal (ITR) de AAV. Dichos 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 productos génicos 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 de al menos una proteína de la cápside de AAV y un vector de AAV polinucleotídico encapsidado. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido distinto de un genoma de AAV de tipo salvaje, tal como un transgén que se va a administrar a una célula de mamífero), normalmente se denomina "partícula de vector de AAV" o simplemente "vector de AAV". Por lo tanto, la producción de la partícula de vector de AAV incluye necesariamente la producción del vector de AAV, ya que dicho vector está contenido dentro de una partícula de vector de AAV.

AAV

Los genomas de AAV recombinantes pueden comprender una molécula de ácido nucleico y una o más ITR de AAV que flanquean una molécula de ácido nucleico. El ADN de AAV en los genomas de rAAV puede ser de cualquier serotipo de AAV para el cual se puede derivar un virus recombinante que incluye, de modo no limitativo, 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 y AAV-13. La producción de rAAV pseudotipado se describe, por ejemplo, en WO 01/83692. También se contemplan otros tipos de variantes de rAAV, por ejemplo, rAAV con mutaciones en la cápside. Véase, por ejemplo, Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11): 1900-1909 (2014). Como se señaló en la sección de Antecedentes anterior, las secuencias de nucleótidos de los genomas de varios serotipos de AAV son conocidas en la técnica. Para promover la expresión específica del músculo esquelético, se pueden utilizar AAV1, AAV6, AAV8 o AAVrh.74.

Los plásmidos de ADN pueden comprender 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 E1 eliminado o virus del herpes) para el ensamblaje del genoma de rAAV en partículas virales infecciosas. Las técnicas para producir partículas de rAAV, en las que se proporciona un genoma de AAV a empaquetar, genes rep y cap, y funciones de virus auxiliar a una célula, son estándar en la técnica. La producción de rAAV requiere que los siguientes componentes estén presentes dentro de una sola célula (indicada en la presente como una célula de empaquetamiento): un genoma de rAAV, genes rep y cap de AAV separados de (es decir, no en) el genoma de rAAV y funciones del virus auxiliar. Los genes rep y cap de AAV pueden ser de cualquier serotipo de AAV para el cual se puede derivar el virus recombinante y pueden ser de un serotipo de AAV diferente a las ITR del genoma de rAAV, que incluyen, de modo no limitativo, los serotipos de AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3,

AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAVrh.74, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 y AAV-13. La producción de rAAV pseudotipado se describe, por ejemplo, en WO 01/83692.

Un método para generar una célula de empaquetamiento es crear una línea celular que exprese de forma 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 mediante procedimientos tales como GC tailing (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. S6. USA, 79:2077-2081), la adición de enlazadores sintéticos que contienen sitios de escisión de endonucleasas de restricción (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73) o mediante ligación directa de extremos romos (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). La línea celular de empaquetamiento se infecta luego con un virus auxiliar como el adenovirus. Las ventajas de este método son 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.

Los principios generales de la producción de rAAV se revisan, por ejemplo, en Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; y Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). Se describen diversos 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 estadounidense No. 5,173,414; WO 95/13365 y patente estadounidense correspondiente 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 estadounidense No. 5.786.211; patente estadounidense No. 5.871.982; y patente estadounidense No. 6,258,595. Se describen células de empaquetamiento que producen rAAV infeccioso. En una realización, las células de empaquetamiento pueden ser células cancerosas transformadas de forma estable, tales como células HeLa, células 293 y células PerC.6 (una línea 293 afín). En otra realización, las células de empaquetamiento son células que no son células cancerosas transformadas, tales como células 293 de bajo pase (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).

El AAV recombinante (es decir, partículas de rAAV encapsuladas infecciosas) puede comprender un genoma de rAAV. En realizaciones de ejemplo, los genomas de ambos rAAV carecen de ADN rep y cap de AAV, es decir, no hay ADN rep o cap de AAV entre las ITR de los genomas. Los ejemplos de rAAV que se pueden construir para comprender las moléculas de ácido nucleico descritas se exponen en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2012/047999 (WO 2013/016352).

El rAAV se puede purificar mediante métodos estándar en la técnica, tales como mediante cromatografía en columna o gradientes de cloruro de cesio. Los métodos para purificar vectores de rAAV del virus auxiliar son conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos en, por ejemplo, Clark et al., Hum. Gene Ther., 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp y Clark, Methods Mol. Med., 69 427-443 (2002); patente estadounidense No. 6,566,118 y WO 98/09657.

En otra realización, la invención contempla composiciones que comprenden rAAV. Las composiciones de la invención comprenden rAAV y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también pueden comprender otros ingredientes tales como diluyentes y adyuvantes. Los portadores, diluyentes y adyuvantes aceptables no son tóxicos para los receptores y son preferentemente inertes a las dosis 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 sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, pluronics o polietilenglicol (PEG).

Los títulos de rAAV que se administrarán variarán dependiendo, por ejemplo, del rAAV particular, el modo de administración, el objetivo del tratamiento, el individuo y el tipo o tipos de células a los que se dirige, y pueden determinarse mediante métodos estándar en la técnica. Los títulos de rAAV pueden variar de alrededor de 1×10^6 , alrededor de 1×10^7 , alrededor de 1×10^8 , alrededor de 1×10^9 , alrededor de 1×10^{10} , alrededor de 1×10^{11} , alrededor de 1×10^{12} , alrededor de 1×10^{13} a alrededor de 1×10^{14} o más partículas resistentes a DNasa (DRP) por ml. Las dosis también se pueden expresar en unidades de genomas virales (vg).

Se describen métodos para transducir una célula diana con rAAV, *in vivo* o *in vitro*. Los métodos *in vivo* comprenden el paso de administrar una dosis eficaz, o múltiples dosis eficaces, de una composición que comprende un rAAV de la invención a un animal (incluido un ser 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 eficaz es una dosis que alivia (elimina o reduce) al menos un síntoma asociado con el trastorno/estado de enfermedad que se está tratando, que ralentiza o previene la progresión a un trastorno/estado de enfermedad, que ralentiza o previene la progresión de un trastorno/estado de enfermedad, que disminuye la extensión de la enfermedad, que da como resultado la remisión (parcial o total) de la enfermedad y/o que prolonga la supervivencia. Un ejemplo de una enfermedad contemplada para la prevención o el tratamiento con los métodos descritos es FSHD.

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

La administración de una dosis eficaz de las composiciones puede ser por vías estándar en la técnica que incluyen, de modo no limitativo, intramuscular, parenteral, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, intracraneal, intraósea, intraocular, rectal o vaginal. Las vías de administración y los serotipos de los componentes de AAV del rAAV (en particular, las ITR de AAV y la proteína de la cápside) pueden ser elegidos y/o emparejados por los expertos en la técnica teniendo en cuenta la infección y/o el estado de la enfermedad que se está tratando y las células/tejidos objetivo que expresarán el miARN y/o la micro-distrofina de miR-29.

Una dosis eficaz de rAAV y composiciones de la invención puede administrarse mediante administración local o administración sistémica, que incluye terapia de combinación. Por ejemplo, la administración sistémica es la administración en el sistema circulatorio para que todo el cuerpo se vea afectado. La administración sistémica incluye la administración enteral, como la absorción a través del tracto gastrointestinal y la administración parenteral mediante inyección, infusión o implantación.

En particular, la administración real de rAAV se puede lograr mediante el uso de cualquier método físico que transporte el vector recombinante de rAAV en el tejido objetivo de un animal. La administración de acuerdo con la invención incluye, de modo no taxativo, inyección en el músculo, el torrente sanguíneo y/o directamente en el hígado. Se ha demostrado que simplemente volver a suspender un rAAV en solución salina amortiguada con fosfato es suficiente para proporcionar un vehículo útil para la expresión del tejido muscular, y no hay restricciones conocidas sobre los portadores u otros componentes que se pueden administrar conjuntamente con el rAAV (aunque las composiciones que degradan el ADN deben evitarse de la manera normal con rAAV). Las proteínas de la cápside de un rAAV pueden modificarse de modo que el rAAV se dirija a un tejido objetivo particular de interés, tal como el músculo. Véase, por ejemplo, WO 02/053703. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar como formulaciones inyectables o como formulaciones tópicas para ser administradas a los músculos mediante 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 utilizar con cualquier portador farmacéuticamente aceptable para facilitar la administración y manipulación.

La dosis de rAAV que se administrará en los métodos descritos en la presente variará 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 puede determinarse mediante métodos estándar en la técnica. Los títulos de cada rAAV administrado pueden variar de alrededor de 1×10^6 , alrededor de 1×10^7 , alrededor de 1×10^8 , alrededor de 1×10^9 , alrededor de 1×10^{10} , alrededor de 1×10^{11} , alrededor de 1×10^{12} , alrededor de 1×10^{13} , alrededor de 1×10^{14} o alrededor de 1×10^{15} o más partículas resistentes a DNasa (DRP) por ml. Las dosis también se pueden expresar en unidades de genomas virales (vg) (es decir, 1×10^7 vg, 1×10^8 vg, 1×10^9 vg, 1×10^{10} vg, 1×10^{11} vg, 1×10^{12} vg, 1×10^{13} vg, 1×10^{14} vg, 1×10^{15} vg respectivamente). Las dosis también se pueden expresar en unidades de genomas virales (vg) por kilogramo (kg) de peso corporal (es decir, 1×10^{10} vg/kg, 1×10^{11} vg/kg, 1×10^{12} vg/kg, 1×10^{13} vg/kg, 1×10^{14} vg/kg, 1×10^{15} vg/kg respectivamente). Los métodos para titular AAV se describen en Clark et al., Hum. Gene Ther., 10: 1031-1039 (1999).

En particular, la administración real de rAAV se puede lograr mediante el uso de cualquier método físico que transporte el vector recombinante de rAAV en el tejido objetivo de un animal. La administración de acuerdo con la invención incluye, de modo no taxativo, inyección en el músculo, el torrente sanguíneo y/o directamente en el hígado. Se ha demostrado que simplemente resuspender un rAAV en solución salina amortiguada con fosfato es suficiente para proporcionar un vehículo útil para la expresión del tejido muscular, y no hay restricciones conocidas sobre los portadores u otros componentes que se pueden administrar conjuntamente con el rAAV (aunque las composiciones que degradan el ADN deben evitarse de la manera normal con rAAV). Las proteínas de la cápside de un rAAV pueden modificarse de modo que el rAAV se dirija a un tejido objetivo particular de interés, tal como el músculo. Véase, por ejemplo, WO 02/053703. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar como formulaciones inyectables o como formulaciones tópicas para ser administradas a los músculos mediante 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 utilizar con cualquier portador farmacéuticamente aceptable para facilitar la administración y manipulación.

Para fines de inyección intramuscular, se pueden emplear soluciones en un adyuvante tal como aceite de sésamo o de maní o en propilenglicol acuoso, así como soluciones acuosas estériles. Dichas soluciones acuosas se pueden amortiguar, si se desea, y el diluyente líquido primero se vuelve 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 se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente 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 evitar el crecimiento de microorganismos.

5 En este sentido, los medios acuosos estériles empleados se pueden obtener fácilmente mediante métodos estándar bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticos adecuados para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles.

10 En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra las acciones contaminantes de microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, 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, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser provocada por diversos 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 lograr mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

20

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando rAAV en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtro. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el ingrediente 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 previamente esterilizada por filtración del mismo.

25

La transducción con rAAV también se puede llevar a cabo *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 donde esas células no generarán una respuesta inmune inapropiada en el sujeto.

30

Los métodos adecuados para la transducción y reintroducción de células transducidas en un sujeto son conocidos en la técnica. En una realización, las células se pueden transducir *in vitro* mediante la combinación de rAAV con células musculares, *por ejemplo*, en medios apropiados, y el cribado de aquellas células que albergan el ADN de interés mediante el uso de técnicas convencionales tales como transferencias Southern y/o PCR, o mediante el uso de marcadores seleccionables. Las células transducidas se pueden formular en composiciones farmacéuticas, y la composición se puede introducir en el sujeto mediante diversas técnicas, tales como mediante inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal, o mediante inyección en músculo liso y cardíaco, usando, *por ejemplo*, un catéter.

35

40

La transducción de células con rAAV puede dar como resultado la expresión sostenida de miR-29 o micro-distrofina. Se describen métodos para administrar/administrar rAAV que expresan miR-29 y/o micro-distrofina a un animal, preferentemente un ser humano. Estos métodos incluyen transducir tejidos (que incluyen, de modo no limitativo, tejidos tales como músculo, órganos tales como hígado y cerebro, y glándulas tales como glándulas salivales) con uno o más rAAV. La transducción se puede llevar a cabo con casetes de genes que comprenden elementos de control específicos de tejido. Por ejemplo, una realización proporciona métodos para transducir células musculares y tejidos musculares dirigidos por elementos de control específicos del músculo, que incluyen, de modo no limitativo, 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 unión del potenciador específico de miocitos MEF-2 [Cserjesi y Olson, Mol Cell Biol 11: 4854-4862 (1991)], elementos de control derivados del gen de la actina esquelética humana [Muscat et al., Mol Cell Biol, 7: 4089-4099 (1987)], el gen de la actina cardíaca, elementos de la secuencia de la creatina quinasa muscular [Véase Johnson et al., Mol Cell Biol, 9: 3393-3399 (1989)] y el elemento potenciador de la creatina quinasa murina (mCK), elementos de control derivados del gen de la troponina C de contracción rápida esquelética, 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 inducibles por esteroides y promotores que incluyen el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) (véase Mader y White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5603-5607 (1993)), y otros elementos de control.

45

50

55

60

El tejido muscular es un objetivo atractivo para la administración de ADN *in vivo*, porque no es un órgano vital y es de fácil acceso. La invención contempla la expresión sostenida de miARN a partir de miofibras transducidas.

Por "célula muscular" o "tejido muscular" se entiende una célula o grupo de células derivadas de músculo de cualquier tipo (por ejemplo, músculo esquelético y músculo liso, por ejemplo, del tracto digestivo, vejiga urinaria, vasos sanguíneos o tejido cardíaco). Dichas células musculares pueden ser diferenciadas o indiferenciadas, tales como mioblastos, miocitos,

65

miotubos, cardiomiocitos y cardiomioblastos.

El término "transducción" se utiliza para hacer referencia a la administración/suministro de la cadena guía de miR29 o la región codificante de la micro-distrofina a una célula receptora ya sea *in vivo* o *in vitro*, a través de un rAAV de replicación deficiente que da como resultado la expresión de un miR29 o micro-distrofina por la célula receptora.

Por lo tanto, se describen métodos para administrar una dosis eficaz (o dosis, administradas esencialmente de forma simultánea o dosis administradas a intervalos) de rAAV que codifican miR29 y/o micro-distrofina a un paciente que lo necesite.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Confirmación de los modelos de distrofia muscular de Duchenne

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

Ejemplo 2

La administración de miR29 a ratones con DMD reduce la fibrosis

Los estudios preliminares han demostrado que hay un aumento significativo en la tinción con Rojo Sirio para el colágeno y una disminución en los niveles de miR-29c en pacientes humanos con DMD y el ratón *mdx/utrn^{+/-}*. La administración génica de miR-29 utilizando vectores AAV específicos del músculo es potencialmente segura y eficiente. Para generar el vector rAAV, denominado en la presente rAAVrh.74.CMV.miR29c, la secuencia de miR29c de 22 nucleótidos (cadena objetivo SEQ ID NO: 3 y la cadena guía SEQ ID NO: 4) se clonó en un andamio de miR-30 impulsado por un promotor de CMV. El casete de expresión (SEQ ID NO: 2) se clonó en un plásmido de AAV autocomplementario y se empaquetó usando AAVrh.74, un serotipo conocido por expresarse bien en el músculo. El ADNc de miR-29c se sintetizó usando un cebador personalizado que contenía la cadena objetivo (sentido) de miR-29c, el tallo bucle de miR-30 y la cadena guía (antisentido) de miR-29c en la estructura principal de miR-30. Se modificaron tres bases de la secuencia de miR-29c. Esta secuencia se clonó luego en una ITR de AAV autocomplementaria que contenía un plásmido dirigido por el promotor de CMV y la secuencia de políA.

Como se muestra en la Figura 1, el plásmido pAAV.CMV.miR29C contiene el ADNc de mir29c en una estructura principal de bucle de tallo de miR-30 flanqueada por secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV2. Es esta secuencia la que se encapsidó en viriones AAVrh.74. Además, se cambiaron algunos nucleótidos en la secuencia objetivo de miR-29c para imitar el emparejamiento de Watson-crick en este sitio como en shARN-miR(luc). Según el diseño de ShARN-luc, la horquilla debe ser perfectamente complementaria en toda su longitud. Además, cuantos más cambios haya en la cadena pasajera, más probable será la eliminación de cualquier mecanismo endógeno que regule el procesamiento de miR-29 que pueda reconocer el miARN a través del STEM. La base 19th de la cadena guía se modificó a una citosina para imitar el nucleótido que precede al sitio de escisión en la secuencia mi-29c natural y la base correspondiente en la otra cadena se cambió para preservar el emparejamiento.

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

con rojo de Sirius en el músculo cuádriceps de ratones mdx/utrn^{+/-} de 6 meses de edad (3 meses después de la inyección). Hubo una reducción en los niveles de colágeno y elastina en los músculos tratados cuando se evaluó mediante RT-PCR.

La demostración de aumento de la fibrosis y disminución de la expresión de miR29 en ratones mdx/utrn^{+/-} y pacientes con deficiencia de distrofina valida el modelo de ratón como representativo de la enfermedad humana. Los resultados iniciales que utilizan miR29 administrado con AAV como terapia antifibrótica sugieren que existe un efecto beneficioso significativo con la reducción de la tinción con Rojo Sirio y los niveles de colágeno y elastina, que son contribuyentes clave en la fibrosis.

Ejemplo 3

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

Para determinar si rAAVrh.74.CMV.MiR-29c podría reducir la fibrosis, los ratones mdx/utrn^{+/-} de 12 semanas de edad recibieron una inyección intramuscular de rAAVrh.74.CMV.MiR-29c a 5×10^{11} vgs en el músculo gastrocnemio izquierdo (GAS). Los ratones se analizaron a las 12 semanas después de la inyección. La tinción con rojo picrosirio reveló una disminución significativa en la tinción de colágeno en todos los músculos GAS (Fig. 2a) en comparación con el músculo GAS contralateral mdx/utrn^{+/-} no tratado. La cuantificación de la tinción con rojo picrosirio muestra que el músculo tratado tuvo una reducción del colágeno del 18,3 % en comparación con el músculo no tratado (tratado: $23,3 \pm 1,3$ frente a $29,5 \pm 0,7$ sin tratar) (Fig. 2b). Para confirmar la sobreexpresión de miR-29c en el músculo tratado, se extrajo ARN total del músculo GAS de ratones WT, tratados con miR-29c y mdx/utrn^{+/-} de 24 semanas de edad y se sometió a análisis cuantitativo de PCR de transcripción inversa (qRT-PCR) para la expresión de miR-29c. Los resultados mostraron que miR-29c aumentó significativamente en el músculo GAS de los ratones tratados en comparación con los ratones no tratados (Fig. 2d).

Ejemplo 4

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

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

El procedimiento de GAS sigue el protocolo enumerado en Hakim et al., (Methods Mol Biol. 709: 75-89, 2011) para analizar la fisiología del músculo abdominal transversal pero adaptado para el GAS. En síntesis, los ratones se anestesiaron usando una mezcla de ketamina/xilazina. Se extirpó la piel de la extremidad posterior para exponer el músculo GAS y el tendón de Aquiles. Se diseccionó el tendón distal y se ató un nudo cuadrado doble alrededor del tendón con sutura 4-0 lo más cerca posible del músculo, se ató otro segundo nudo cuadrado doble justo al lado del primer nudo y luego se cortó el tendón. El músculo expuesto se humedeció constantemente con solución salina. Luego, los ratones se transfirieron a una plataforma controlada térmicamente y se mantuvieron a 37°. La rodilla se aseguró a la plataforma con una aguja a través del tendón de la rótula, la sutura del tendón al brazo nivelado del transductor de fuerza (Aurora Scientific, Aurora, ON, Canadá) y el pie se aseguró con cinta adhesiva. Las contracciones musculares GAS se provocaron mediante la estimulación del nervio ciático a través de electrodos bipolares de platino. Una vez que se estabilizó el músculo, se determinó la longitud óptima mediante el estiramiento incremental del músculo hasta alcanzar la fuerza máxima de contracción. Después de un período de descanso de 3 minutos, el GAS se estimuló a 50, 100, 150 y 200 Hz, lo que permitió un período de descanso de 1 minuto entre cada estímulo para determinar la fuerza tetánica máxima. Se midió la longitud muscular. Después de un descanso de 5 minutos, se evaluó la susceptibilidad del músculo GAS al daño inducido por la contracción. Después de 500 ms de estimulación, el músculo se alargó en un 10 % de la longitud óptima. Esto consistió en estimular el músculo a 150Hz durante 700ms. Después de la estimulación, el músculo volvió a la longitud óptima. El ciclo se repitió cada minuto durante un total de 5 ciclos. La fuerza específica se calculó dividiendo la fuerza tetánica máxima por el área de la sección transversal del músculo GAS. Después de las contracciones excéntricas, los ratones se sacrificaron y el músculo GAS se diseccionó, se pesó y se congeló para su análisis.

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

el músculo GAS tratado con rAAVrh.74.MiR-29c mostró una mejora significativa en la fuerza absoluta en comparación con el músculo GAS tratado con mdx/utrn⁺ no tratado (rAAV.miR-29c- $2277 \pm 161,7$ frente a mdx/utrn^{+/-} no tratado- $1722 \pm 145,7$; Fig. 3a), y también una fuerza específica normalizada en la mejora específica del músculo GAS tratado con rAAVrh.74.miR-29c en comparación con el músculo GAS no tratado (rAAV.miR-29c- $204,7 \pm 11,7$ frente a mdx/utrn^{+/-} no

tratado- $151,6 \pm 14,5$; Fig. 3b). La fuerza aún se redujo significativamente en comparación con los controles de tipo salvaje (rAAV.miR-29c- $204,7 \pm 11,7$ vs tipo salvaje- $312,0 \pm 34,1$).

Ejemplo 5

La administración conjunta con micro-distrofina reduce aún más la fibrosis

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

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

Los ratones se analizaron a las 12 y 24 semanas después de la inyección. En primer lugar, se utilizó el número de fibras musculares que expresan micro-distrofina para evaluar la eficacia de la administración de transgén y para asegurarnos de que teníamos niveles similares de micro-distrofina expresada en cada grupo. Encontramos que la micro-distrofina no fue diferente entre las cohortes tratadas con micro-distrofina sola ($71,85 \pm 2,25$ %) en comparación con la terapia de combinación miR-29c/micro-distrofina ($75,03 \pm 1,91$ %) (Fig. 4).

El músculo GAS se analizó 12 meses después de la inyección para evaluar la acumulación de colágeno mediante tinción con Rojo Sirio y la posterior cuantificación con ImageJ. Los resultados adicionales incluyeron miR-29c y niveles de transcripción de colágeno, mediciones de fuerza en el músculo GAS, mediciones del diámetro de la fibra y análisis de transferencia Western para proteínas involucradas en la regeneración muscular (MyoD, Miogenina). La cantidad de fibrosis se analizó mediante tinción con rojo picosirio, lo que reveló una disminución significativa en la tinción con colágeno en todos los músculos GAS en todos los grupos tratados (Fig. 5a) en comparación con el músculo GAS mdx/utrn^{+/-} no tratado o la micro-distrofina sola. La cuantificación de la tinción con rojo picosirio muestra que el músculo cotratado tuvo una reducción del 40,8 % en el colágeno en comparación con el músculo no tratado (tratado - $17,47 \pm 0,75$ frente a no tratado - $29,5 \pm 0,7$) (Fig. 5b). Para confirmar la expresión de miR-29c, se realizó qRT-PCR en el músculo GAS y todos los grupos de tratamiento tuvieron un aumento en miR-29c en comparación con el músculo no tratado (Fig. 5c).

De manera análoga al tejido DMD, se observó una reducción significativa en los niveles de miR-29c en el músculo mdx/utrn^{+/-} que se correlacionó con el aumento de la fibrosis medido por la tinción con rojo picosirio. Después de 3 meses de tratamiento con scAAV.miR-29c solo, hubo una reducción significativa en la fibrosis (tratada- $23,5 \pm 1,3$ frente a no tratada- $27,8 \pm 0,6$) en el músculo GAS. Cuando se administró conjuntamente con micro-distrofina, se observó una mayor reducción en el colágeno (41 %) mediante tinción con rojo picosirio (tratamiento combinado: $17,47 \pm 0,75$ frente a No tratado: $29,5 \pm 0,7$) ($p < 0,0001$) (Fig. 5b). Para confirmar la expresión de miR-29c, se realizó qRT-PCR en el músculo GAS y todos los grupos de tratamiento tuvieron un aumento en miR-29c en comparación con el músculo no tratado (Fig. 5b).

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

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

Se ha demostrado previamente que el TGF-β1 está regulado positivamente en el músculo distrófico, probablemente desempeñando un papel en el inicio de la cascada fibrótica. TGF-β1 es una citocina profibrótica conocida que regula a la

baja miR-29c y es responsable de la conversión de mioblastos en miofibroblastos con un aumento en el colágeno y la fibrogénesis muscular. El análisis de qRT-PCR muestra que el músculo cotratado tenía niveles significativamente más bajos de TGF- β 1 en comparación con el músculo no inyectado y cualquiera de los tratamientos solos (Fig. 6d). A los 6 meses después de la inyección, el músculo cotratado continuó mostrando niveles reducidos de Col1A, Col3A, Fbn y TGF- β 1, mientras que solo se observaron ligeras reducciones en los niveles de ARNm de Col1A en los grupos miR-29 y micro-distrofina solamente

Se observó un aumento en la fuerza específica y absoluta en el músculo tratado con miR-29c solo en comparación con la extremidad no tratada, que cuando se combinó con micro-distrofina condujo a una fuerza absoluta y específica que no fue significativamente diferente de la de tipo salvaje. También observamos un aumento significativo en el peso gástrico en aquellos músculos que fueron tratados conjuntamente.

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

Ejemplo 6

Aumento adicional de la fuerza absoluta y protección adicional contra el daño inducido por la contracción

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

El rAAVrh.74.MiR-29c cotratado y el músculo GAS tratado con Micro-Dys que expresa rAAV mostraron una mejora significativa en la fuerza absoluta en comparación con el músculo GAS mdx/utrn^{+/-}mdx^{ut} no tratado (cotratado - 3582,4 \pm 79,4 nM frente a mdx/utrn^{+/-} no tratado - 1722 \pm 145,7 nM frente a tipo salvaje - 3005 \pm 167,3 nM) (Fig. 7), y también una fuerza específica normalizada en la mejora específica del músculo GAS tratado con rAAVrh.74.MiR-29c/micro-dys en comparación con el músculo GAS no tratado (ratones cotratados - 244,2 \pm 6,6 nM/mm² frente a mdx/utrn^{+/-} no tratados - 151,6 \pm 14,5 nM/mm² frente a 312,0 \pm 34,1 nM/mm²) (Fig. 7). Tanto la fuerza absoluta como la específica no fueron significativamente diferentes de los controles de tipo salvaje.

Cada GAS se sometió a una serie de contracciones excéntricas repetidas. Al comparar la proporción de fuerza de cada contracción frente a la primera contracción, se reveló que después de la quinta contracción, el músculo no tratado disminuyó a 0,54 \pm 0,06 frente a 0,66 \pm 0,04 ($p \leq 0,0001$) cotratado, lo que puede contribuir a la micro-distrofina, ya que la micro-distrofina sola también disminuyó a 0,66 \pm 0,04. El grupo tratado todavía era significativamente menor que el tipo salvaje que decaía a 0,92 \pm 0,02 (Fig. 7c). Se observaron hallazgos similares a las 24 semanas posteriores a la inyección. Estos datos muestran que la reducción de la fibrosis y el reemplazo génico conduce a un aumento tanto en la fuerza absoluta como en la específica y protege significativamente al músculo de las lesiones inducidas por la contracción.

Ejemplo 7

El tratamiento combinado aumenta la hipertrofia muscular y la hiperplasia

MiR-29c administrado conjuntamente con micro-distrofina aumentó el peso total del gastroc inyectado en comparación con cualquiera de los inyectados solos a los tres meses de edad (Fig. 8, Fig. 9a). Para investigar la fuente del aumento de la masa muscular, se miden los diámetros de las miofibras. El tratamiento combinado de miR-29c/ μ -dys demostró un aumento en el tamaño promedio de las fibras. Al comparar los controles mdx/utrn^{+/-} con mdx/utrn^{+/-} tratado con 29c/ μ -dys, el diámetro promedio aumentó de 25,96 a 30,97 μ m (Fig. 9b). La entrega conjunta produjo un cambio hacia la distribución de tamaño de fibra de tipo salvaje (Fig. 9c). Aunque el tamaño promedio de la fibra aumentó, no explica el aumento de ~30 % en el peso muscular bruto. También se midió el área transversal total del músculo. Se escanearon los músculos gastrointestinales de todos los grupos y se midió el área total. Los músculos cotratados con micro-dys/miR-29c tuvieron un aumento significativo en el área de la sección transversal en comparación con los no tratados y con cualquiera de los tratamientos solos (no inyectados: 24,6 frente a miR-29c: 26,3 frente a micro-dys: 26,6 frente a micro-dys/miR-29c: 33,1) (Fig. 8, Fig. 9d).

Se ha informado que miR-29c desempeña un papel en la vía myoD/Pax7/miogenina y se planteó la hipótesis de que miR-29c puede estar afectando la regeneración y activación de células satélite (células madre musculares) para diferenciarse en el linaje miogénico. Para probar esto, se contó el número total de fibras musculares de las imágenes escaneadas de diapositivas completas. Un mayor número de fibras musculares después del tratamiento de combinación de miR-29c/ μ -dys (Fig. 9e). Finalmente, dado que los diámetros de las fibras musculares en ratones mdx/utrn^{+/-} son heterogéneos con muchas fibras pequeñas y algunas fibras hipertróficas, se determinó si el número de fibras por unidad de área (células/mm²) se vio afectado con el tratamiento. el tratamiento de combinación miR-29c/ μ -dys no fue diferente al tipo salvaje (Fig. 9f).

Ejemplo 8

El tratamiento temprano con una combinación previene la fibrosis

5 En vista de la importancia potencial de miR-29c combinatorio y micro-distrofina como terapia profiláctica para DMD, se trató a una cohorte de ratones mdx/utrn^{+/-} más jóvenes a las 4 semanas de edad. Usando el mismo paradigma que para otros grupos como se describe en la presente, se comparó la eficacia de los siguientes tratamientos para la prevención de la fibrosis mediante inyección intramuscular de GAS: scAAVrh.74.CMV.miR-29c solo, ssAAVrh74.MCK.micro-distrofina + scAAVrh.74.CMV.miR-29c terapia de combinación, o ssAAVrh74.MCK.micro-distrofina sola a la misma dosis. Los
10 ratones se sometieron a necropsia 12 semanas después de la inyección. Se observó una disminución significativa en la tinción de colágeno en todos los músculos GAS en todos los grupos tratados en comparación con el músculo GAS contralateral mdx/utrn^{+/-} no tratado (Fig. 10A). La cuantificación de la tinción con rojo picosirius mostró que el músculo cotratado con micro-distrofina/miR-29c tuvo una reducción del 51 % en el colágeno en comparación con el músculo no tratado (tratado- 11,32 %± 1,18 frente a no tratado-23, 15% ±0,90) (p<0,0001) (Fig. 10) y la reducción de Col1A, Col3A, Fbn y TGF-β1 confirmada por qRT-PCR después de la terapia combinatoria (Fig. 10D y E).

Ejemplo 9

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

La medición de la fuerza *in vivo* se llevó a cabo en el GAS de los ratones tratados temprano con la terapia de combinación como se describe en el Ejemplo 8. En ratones mdx/utrn^{+/-} de 4 semanas de edad, el cotratamiento con miR-29c/micro-distrofina mostró una mejora significativa en la fuerza absoluta en comparación con los ratones mdx/utrn^{+/-} no tratados y no hubo diferencias con respecto al tipo salvaje (cotratado: 2908± 129,5 mN frente a no tratado: 1639,4± 116,9 mN frente al tipo salvaje: 3369,73± 154,1 mN). La fuerza específica también se normalizó a los niveles de tipo salvaje después de la terapia combinatoria (cotratado 338,9 ± 22,34 mN/mm² frente a no tratado 184,3 ± 13,42 mN/mm² frente a WT 364,3 ± 7,79 mN/mm²) (Fig. 11A y B y 12).

30 A continuación, cada GAS se sometió a una serie de contracciones excéntricas repetidas. Al comparar la proporción de fuerza de cada contracción por la quinta contracción, el músculo no tratado decayó a 0,53± 0,04 frente a 0,82± 0,04 (p ≤ 0,0001) cotratado. El grupo de tratamiento combinatorio fue ligeramente menor que el tipo salvaje, pero no significativamente diferente, que disminuyó a 0,93 ± 0,01 (Fig. 11C). Estos datos muestran que la reducción de la fibrosis y el reemplazo génico conducen a un aumento de la fuerza tanto absoluta como específica y protegen significativamente al músculo de las lesiones inducidas por la contracción.

Estos experimentos sugieren que el reemplazo génico debe iniciarse en el período neonatal. Los esfuerzos se están moviendo claramente en la dirección de identificar la DMD y otras distrofias musculares en el período neonatal. El estudio de selección de Ohio Newborn ilustra el potencial de identificación de DMD en recién nacidos utilizando CK 7 Neurol. como biomarcador (>2000 U/L) con confirmación de ADN en la misma mancha de sangre seca (Mendell et al., Ann. Neurol. 71: 304-313, 2012). Esta metodología ahora se está extendiendo a otros estados de los EE. UU. (PPMD 16 de mayo de 2016: Próximos pasos con la detección de recién nacidos) y en otros países, particularmente en el Reino Unido (Comité Nacional de Detección del Reino Unido) y China (Perkin Elmer™ lanza la detección en China).

45 miR-29 también se ha mostrado prometedor como una realización de tratamiento para la fibrosis cardíaca, pulmonar y hepática. El infarto de miocardio en ratones y humanos se asocia con la regulación negativa de miR-29. Rooij et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105: 13027-13032, 2008) demostraron que la exposición de fibroblastos a un miR-29b imita la disminución de los transcritos de colágeno que proporcionan una vía para la traducción clínica para la fibrosis cardíaca. Estudios posteriores mostraron que, en un modelo de ratón con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, la atenuación de la fibrosis podría lograrse utilizando la administración basada en el sistema de transposones Bella Durmiente (SB) de miR-29b.14. Actualmente, un imitador de miR-29b se encuentra en un ensayo clínico intradérmico local de Fase 1 de tolerancia a la seguridad en voluntarios sanos (miRagen Therapeutics™ MRG-201). En comparación con la administración de oligonucleótidos miR-29 que requeriría la administración repetida relacionada con la semivida de los oligonucleótidos, la terapia génica con AAV podría proporcionar potencialmente una vía para la transferencia génica de administración
50 única.

Ejemplo 10

60 Tratamiento con expresión específica muscular de miR-29 y fibrosis reducida por micro-distrofina y expresión de ECM

También se generaron vectores de AAV que comprenden la secuencia de miR29c y un promotor específico de músculo MCK y se probaron como una terapia de combinación con vectores de AAV que expresan micro-distrofina. Para generar el vector rAAV, denominado en la presente rAAV.MCK.miR29c, la secuencia de miR29c de 22 nucleótidos (cadena objetivo SEQ ID NO: 3 y la cadena guía SEQ ID NO: 4) se clonó en un andamio de miR-30 impulsado por un promotor de MCK (SEQ ID NO: 11). El casete de expresión (SEQ ID NO: 12) se clonó en un plásmido de AAV monocatenario y se empaquetó usando AAVrh74, un serotipo conocido por expresarse bien en el músculo. El ADNc de miR-29c se sintetizó usando un

cebador personalizado que contenía la cadena objetivo (sentido) de miR-29c, el tallo bucle de miR-30 y la cadena guía (antisentido) de miR-29c en la estructura principal de miR-30. Se modificaron tres bases de la secuencia de miR-29c. Esta secuencia se clonó luego en un plásmido que contenía ITR de AAV monocatenario dirigido por el promotor MCK y la secuencia polIA.

El plásmido pAAV.MCK.miR29C contiene el ADNc de mir29c en una estructura principal de bucle de tallo de miR-30 flanqueada por secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV2. Es esta secuencia la que se encapsidó en viriones AAVrh74. Además, se cambiaron algunos nucleótidos en la secuencia objetivo de miR-29c para imitar el emparejamiento de Watson-crick en este sitio como en shARN-miR(luc). Según el diseño de ShARN-luc, la horquilla debe ser perfectamente complementaria en toda su longitud. Además, cuantos más cambios haya en la cadena pasajera, más probable será la eliminación de cualquier mecanismo endógeno que regule el procesamiento de miR-29 que pueda reconocer el miARN a través del STEM. La base 19ª de la cadena guía se modificó a una citosina para imitar el nucleótido que precede al sitio de escisión en la secuencia mi-29c natural y la base correspondiente en la otra cadena se cambió para preservar el emparejamiento.

El tratamiento temprano de la terapia de combinación AAV.MCK.miR-29c/micro-distrofina fue más eficaz para reducir la fibrosis y la expresión de ECM. Los ratones *mdx/utrn*^{+/-} de 4-5 semanas de edad recibieron una inyección intramuscular de rAAVrh.74.MCK.MiR-29c y rAAVrh74.MCK.micro-distrofina a 5×10^{11} vgs en el músculo gastrocnemio izquierdo como se describe en el Ejemplo 5. Los músculos se recolectaron doce semanas después de la inyección. La tinción con rojo picosirio del músculo extraído de ratones no inyectados e inyectados con terapia de combinación de rAAV.MCK.miR-29c/rAAV.MCK.micro-distrofina mostró que el músculo cotratado tenía una reducción del 50,9 % en el colágeno en comparación con el músculo GAS no tratado (ver Fig. 13a y 13b). La qRT-PCR confirmó un aumento en los niveles de transcripción de miR-29c en la cohorte tratada (Fig. 13C). La qRT-PCR semicuantitativa mostró una reducción significativa en los niveles de colágeno A1 y colágeno 3A (Fig. 13D, e), fibronectina (Fig. 13F) y Tgfβ1 (Fig. 13G) en el músculo tratado con AAV.MCK.miR-29c/AAV.micro-distrofina en comparación con las terapias contralaterales de las extremidades. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$). El tratamiento tardío de la terapia de combinación AAV.MCK.miR-29c/micro-distrofina es eficaz para reducir la fibrosis y la expresión de ECM. Los ratones *mdx/utrn*^{+/-} de tres meses de edad recibieron una inyección intramuscular de rAAVrh.74.MCK.MiR-29c y rAAVrh.74.MCK.micro-distrofina a 5×10^{11} vgs en el músculo gastrocnemio izquierdo como se describe en el Ejemplo 5. Los músculos se recolectaron doce semanas después de la inyección. La tinción con rojo picosirio del músculo tratado con AAV.MCK.miR-29c y AAV.MCK.miR-29c/AAV.micro-distrofina no tratado mostró que el músculo cotratado tenía una reducción del 30,3 % en el colágeno en comparación con el músculo GAS no tratado (ver Fig. 14a y 14b). La qRT-PCR confirmó un aumento en los niveles de transcripción de miR-29c en las cohortes tratadas (Fig. 14C). La qRT-PCR semicuantitativa muestra una reducción significativa en los niveles de colágeno 1A y colágeno 3A (Fig. 14D, e), fibronectina (Fig. 14F) y Tgfβ1 (Fig. 14G) en el músculo tratado con AAV.miR-29c/AAV.micro-distrofina en comparación con la extremidad contralateral. ANOVA unidireccional. Todos los datos representan la media \pm SEM. (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

Ejemplo 11

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

La medición de la fuerza *in vivo* se llevó a cabo en el GAS de los ratones tratados temprano con la expresión específica del músculo de miR-29 y micro-distrofina, como se describe en los Ejemplos 8 y 9. En ratones *mdx/utrn*^{+/-} de 4 semanas de edad, el cotratamiento con rAAV rAAV.MCK.miR-29c/and que expresa micro-distrofina mostró una mejora significativa en la fuerza absoluta en comparación con los ratones *mdx/utrn*^{+/-} no tratados y no hubo diferencia con respecto al tipo salvaje (Fig. 15a). La fuerza específica también se normalizó a los niveles de tipo salvaje después de la terapia de combinación (Fig. 15b).

Luego se evaluaron los músculos para determinar la pérdida de fuerza después de contracciones excéntricas repetitivas como se describe en el Ejemplo 9. Los ratones cotratados con rAAV.MCK.miR-29c/rAAV.MCK.micro-distrofina y rAAV.MCK.micro-distrofina solos mostraron una protección contra la pérdida de fuerza en comparación con los músculos *mdx/utrn*^{+/-} no tratados (Fig. 15C).

En ratones *mdx/utrn*^{+/-} de 12 semanas de edad, el cotratamiento con rAAV.MCK.miR-29c/and rAAV que expresa micro-distrofina restauró la fuerza y protegió contra el daño inducido por la contracción. La medición de la fuerza específica absoluta (Fig. 16a) y normalizada (Fig. 16b) después de la contracción tetánica rAAV.MCK.miR-29c y rAAV que expresa los músculos GAS inyectados con micro-distrofina aumentó significativamente en comparación con el músculo *mdx/utrn*^{+/-} no tratado. Posteriormente, se evaluó la pérdida de fuerza de los músculos después de contracciones excéntricas repetitivas como se describe en el Ejemplo 9. Los ratones cotratados con MCK.miR-29c/micro-dystrophin mostraron una protección contra la pérdida de fuerza en comparación con los músculos *mdx/utrn*^{+/-} no tratados (Fig. 16C). Estos datos muestran que la reducción de la fibrosis y el reemplazo génico conducen a un aumento de la fuerza tanto absoluta como específica y protegen significativamente al músculo de las lesiones inducidas por la contracción.

Ejemplo 12

El tratamiento combinado temprano aumenta la hipertrofia muscular y la hiperplasia

La administración conjunta de rAAV.MCK.miR-29 con rAAV que expresa micro-distrofina no aumentó el peso total del gastroc inyectado en comparación con cualquiera de los inyectados solos a los tres meses posteriores a la inyección (Fig. 17a). También se midieron los diámetros de las miofibras. El tratamiento de combinación de miR-29c/micro-distrofina demostró un aumento en el tamaño promedio de las fibras. Al comparar los controles mdx/utrn^{+/+} con los mdx/utrn^{-/-} tratados con miR-29c/micro-distrofina, el diámetro promedio aumentó de 28,96 a 36,03 μm (Fig. 17b). La entrega conjunta produjo un cambio hacia la distribución de tamaño de fibra de tipo salvaje (Fig. 17c). El número de fibras musculares por mm² en el tratamiento de combinación de miR-29c/micro-distrofina fue significativamente menor que en ratones no tratados y de tipo salvaje (Fig. 17D; ** *p<0,01, *** *p<0,0001).

REFERENCIAS

1. Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr. & Kunkel, L.M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919-928 (1987).
2. Straub, V. & Campbell, K.P. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* 10, 168-175 (1997).
3. Sacco, A., et al. Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* 143, 1059-1071 (2010).
4. Wallace, G.Q. & McNally, E.M. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* 71, 37-57 (2009).
5. Zhou, L. & Lu, H. Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 771-776 (2010).
6. Desguerre, I., et al. Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 762-773 (2009).
7. Kim, J., et al. microRNA-directed cleavage of ATHB 15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence stems. *Plant J* 42, 84-94 (2005).
8. Ambros, V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* 113, 673-676 (2003).
9. Eisenberg, I., et al. Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 17016-17021 (2007).
10. Jiang, X., Tsitsiou, E., Herrick, S.E. & Lindsay, M.A. MicroRNAs and the regulation of fibrosis. *FEBS J* 277, 2015-2021 (2010).
11. van Rooij, E., et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 13027-13032 (2008).
12. Cacchiarelli, D., et al. MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the Duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin/nNOS pathway. *Cell Metab* 12, 341-351 (2010).
13. DiPrimio, N., McPhee, S.W. & Samulski, R.J. Adeno-associated virus for the treatment of muscle diseases: toward clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* 12, 553-560 (2010).
14. Mendell, J.R., et al. Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann Neurol* 68, 629-638 (2010).
15. Mendell, J.R., et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol* 66, 290-297 (2009).
16. Mendell, J.R., et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 23, 192-201 (2015).
17. Carnwath, J.W. & Shotton, D.M. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci* 80, 39-54 (1987).
18. Coulton, G.R., Morgan, J.E., Partridge, T.A. & Sloper, J.C. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14, 53-70 (1988).
19. Cullen, M.J. & Jaros, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 77, 69-81 (1988).
20. Dupont-Versteegden, E.E. & McCarter, R.J. Differential expression of muscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* 15, 1105-1110 (1992).
21. Stedman, H.H., et al. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352, 536-539 (1991).
22. Deconinck, A.E., et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 717-727 (1997).
23. Grady, R.M., et al. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 729-738 (1997).
24. Love, D.R., et al. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339, 55-58 (1989).
25. Tinsley, J.M., et al. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* 360, 591-593 (1992).
26. Tinsley, J., et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 4, 1441-1444 (1998).
27. Squire, S., et al. Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. *Hum Mol Genet* 11, 3333-3344 (2002).
28. Rafael, J.A., Tinsley, J.M., Potter, A.C., Deconinck, A.E. & Davies, K.E. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet* 19, 79-82 (1998).
29. Zhou, L., et al. Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. *J*

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

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de distrofia muscular o distrofinopatía que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa miR-29c, en donde la composición se administra con una segunda composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina comprende un elemento de control específico del músculo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.
2. Una composición para su uso en la reducción o prevención de la fibrosis en un sujeto que padece distrofia muscular o distrofinopatía que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa miR-29c, en donde la composición se administra con una segunda composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina comprende un elemento de control específico del músculo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.
3. Una composición para su uso en el aumento de la fuerza muscular o la masa muscular en un sujeto que padece distrofia muscular o distrofinopatía que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa miR-29c, en donde la composición se administra con una segunda composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina comprende un elemento de control específico del músculo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.
4. Una composición para su uso en el tratamiento de distrofia muscular o distrofinopatía que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina, en donde la composición se administra con una segunda composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa miR-29c, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina comprende un elemento de control específico del músculo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.
5. Una composición para su uso en la reducción o prevención de la fibrosis en un sujeto que padece distrofia muscular o distrofinopatía que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina, en donde la composición se administra con una segunda composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa miR-29c, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina comprende un elemento de control específico del músculo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.
6. Una composición para su uso en el aumento de la fuerza muscular o la masa muscular en un sujeto que padece distrofia muscular o distrofinopatía que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina, en donde la composición se administra con una segunda composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de vector de AAV recombinante que expresa miR-29c, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c comprende las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina comprende un elemento de control específico del músculo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.
7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la distrofia muscular es distrofia muscular de Duchenne.
8. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c comprende
 - a) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2,
 - b) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o
 - c) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 12.
9. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9.
10. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el vector de AAV recombinante que expresa miR-29c o el vector de AAV recombinante que expresa micro-distrofina es el serotipo AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 o AAV13.

- 5 11. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el miR-29c está unida operativamente a un elemento de control específico del músculo o un promotor ubicuo.
12. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el elemento de control específico del músculo comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10, o la SEQ ID NO: 11.
- 10 13. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 formulada para administración intramuscular, inyección intravenosa, administración parenteral o administración sistémica.
14. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la composición se administra antes de que se observe fibrosis en el sujeto o antes de que se reduzca la fuerza muscular en el sujeto o antes de que se reduzca la masa muscular en el sujeto.
- 15 15. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la segunda composición se formula para inyección intramuscular, inyección intravenosa, administración parenteral o administración sistémica.
- 20 16. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde la segunda composición se administra antes de que se observe fibrosis en el sujeto o antes de que se reduzca la fuerza muscular en el sujeto o antes de que se reduzca la masa muscular en el sujeto.

~~SECRET~~



SSO ID NO: m8-298C ON USA structure printed m8-30

CGTTGCTGGCACATCTTGGAAACACTTGGCTGGGATTACT
TCTTCAGGTTAACCCACAGAAAGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTGACAGTGAGCGCAACCGA
TTTCAAATGGTGTGACAGTGAAGGCCACAGATGCTAGCACCAATTTAAATCGGGATAGCTTACTG
CCTCGCAATTCAGAGGGCTACTTCTTAGGAGCAATTATCTTGTTTACTAATACTGAATACCTTGCTA
TCTCTTGATACATTGGCTGGCT

Estado de corte 2014 Estado de resultados

Structure of the model

Book of toll mat-30 (GT642C7AC876-9D) © NO. 5

Hebra (sentido) objetivo miR 29c (ACCGATTCAATGGTGGCTAGA; SEQ ID NO:3)

Hefra (antibiotic) gene mR-29: (CTAGCACCATTTCAAATCGGTA: SEQ ID NO: 4)

Estructura horizontal preferida (SE0 10 40 60)

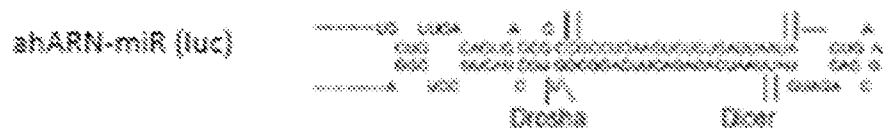
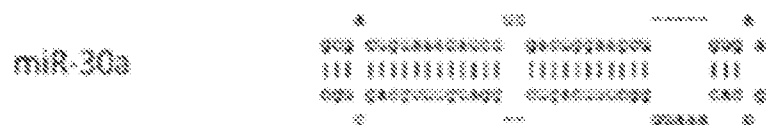
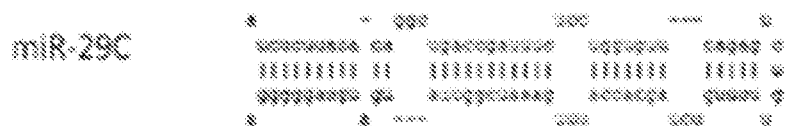
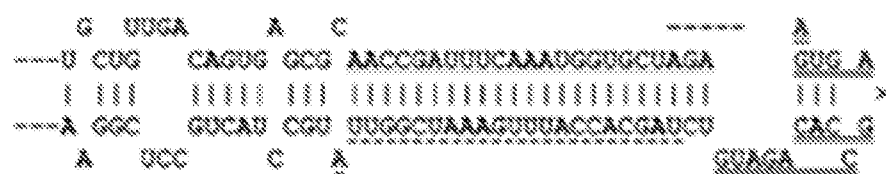


Figura 2A

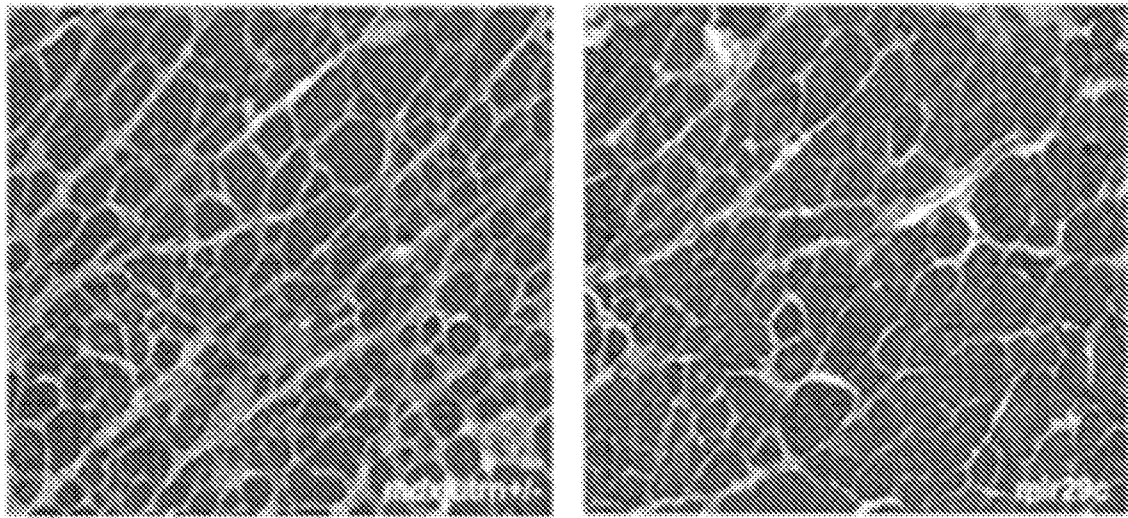


Figura 2B

Rojo sirio

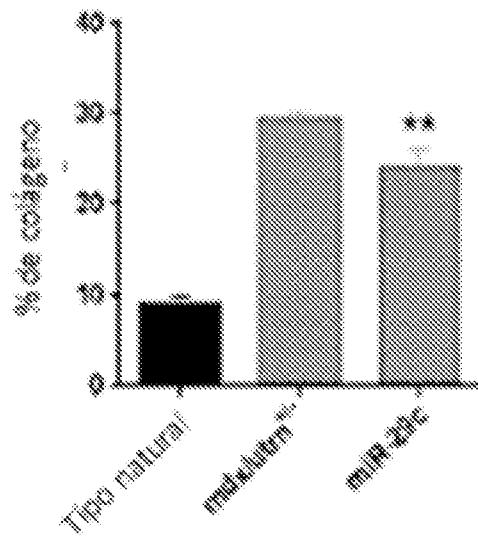
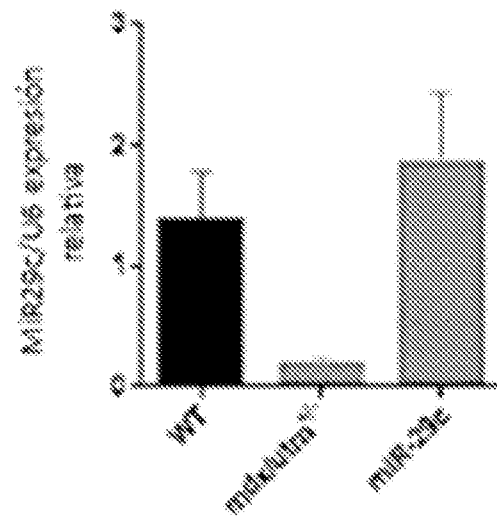


Figura 2C

miR-29c



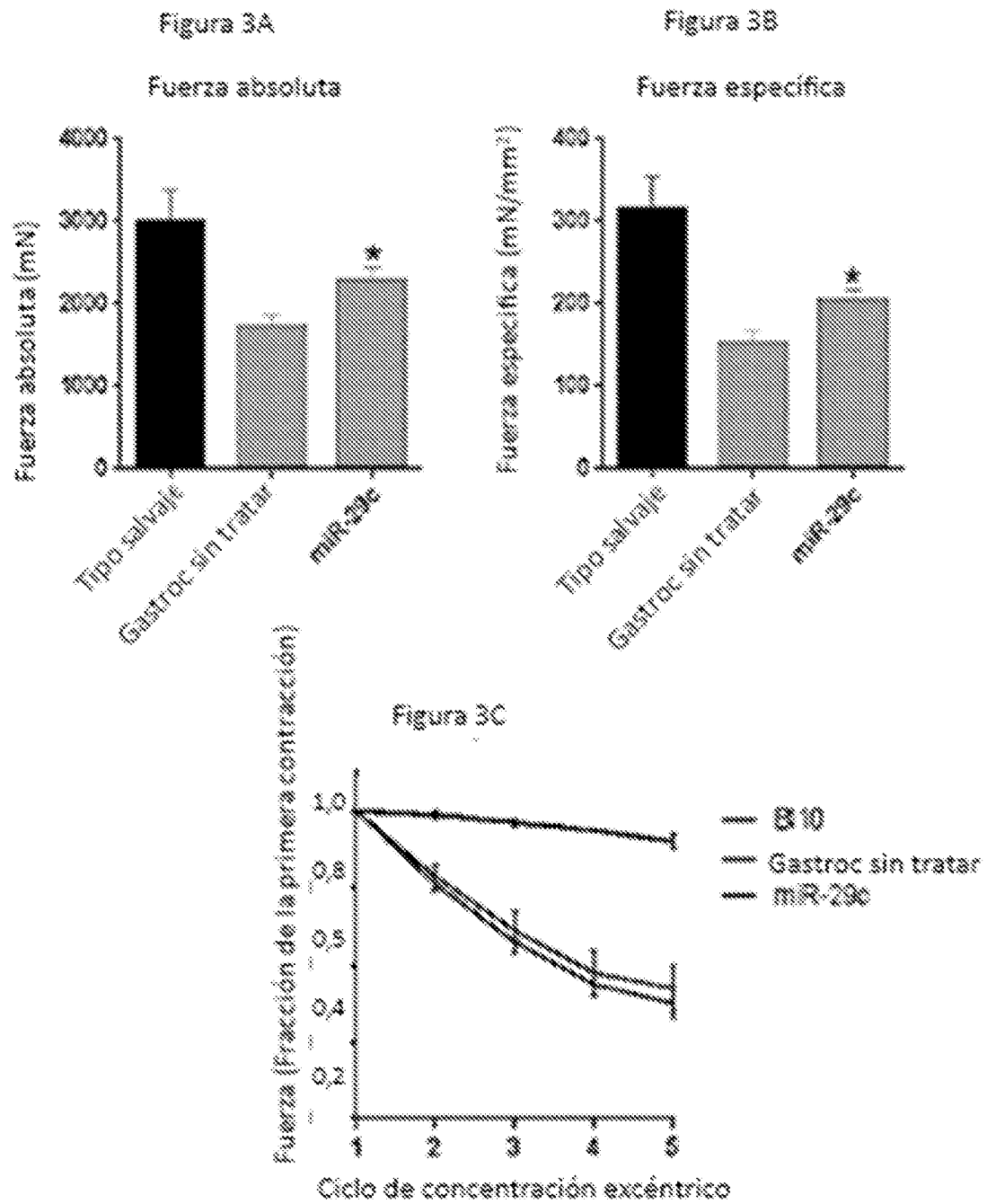


Figura 4C

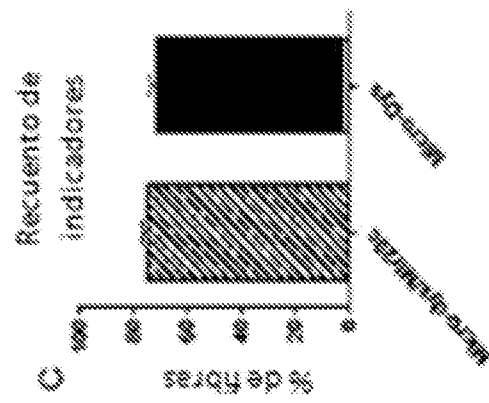


Figura 4B

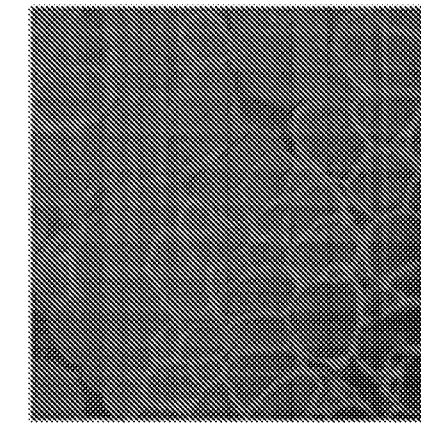
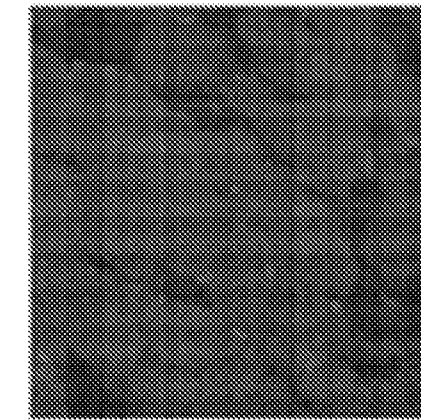
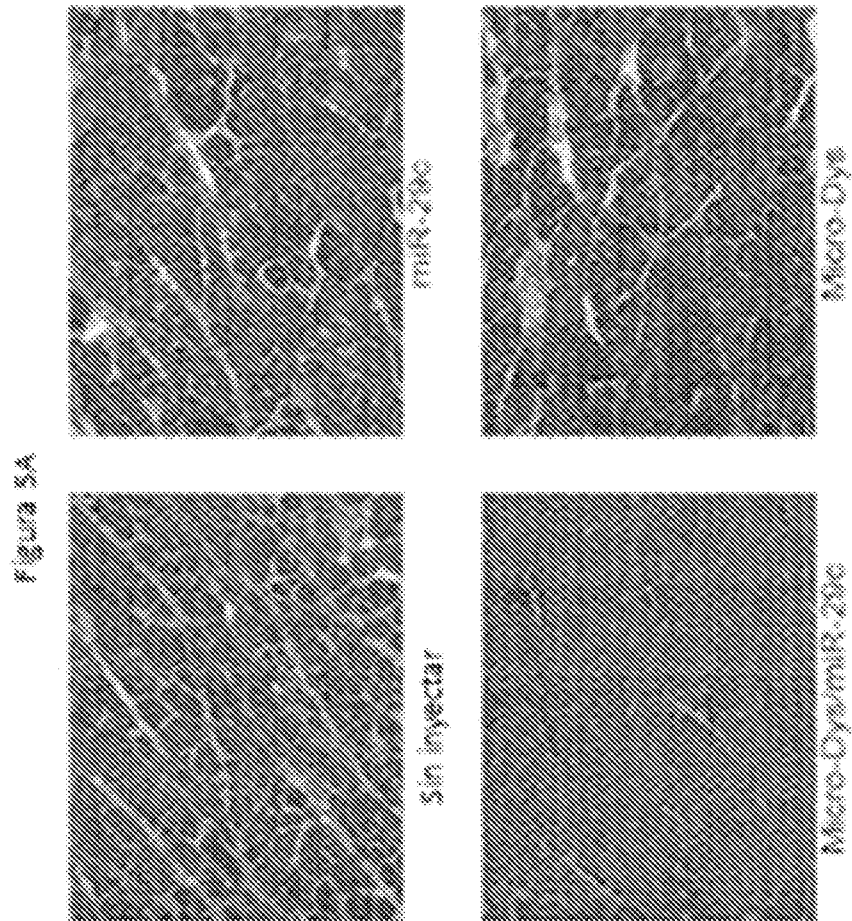
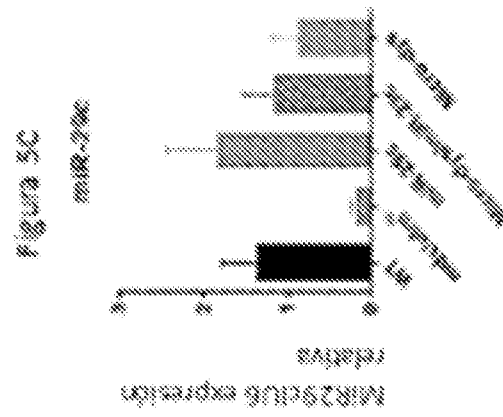
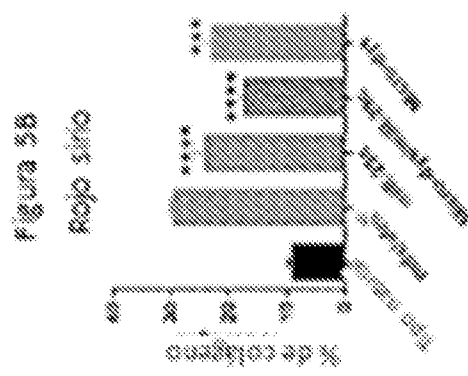
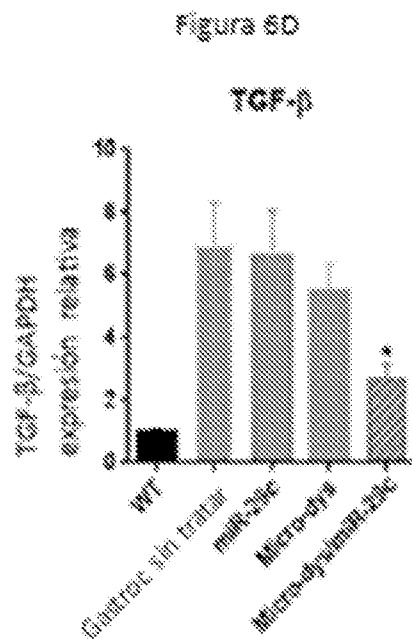
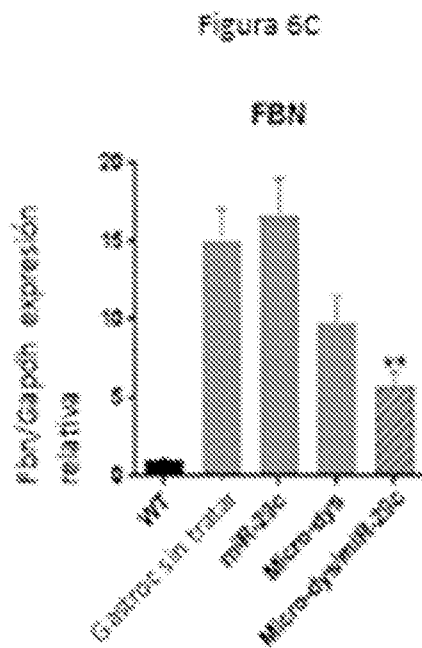
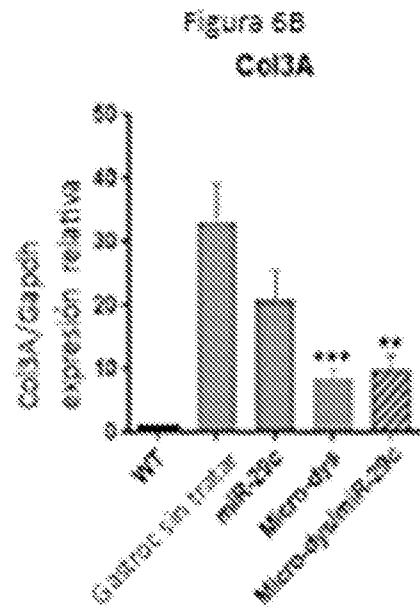
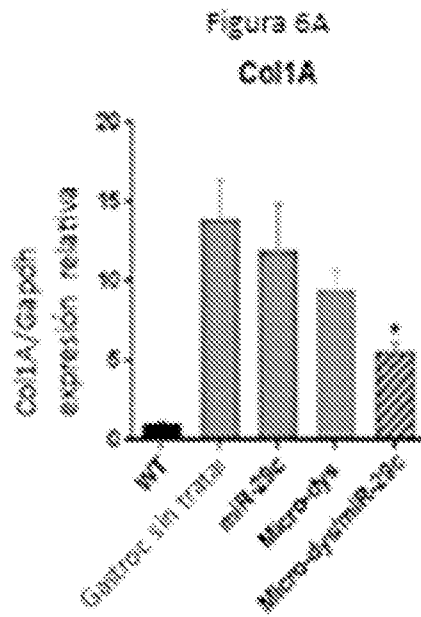


Figura 4A







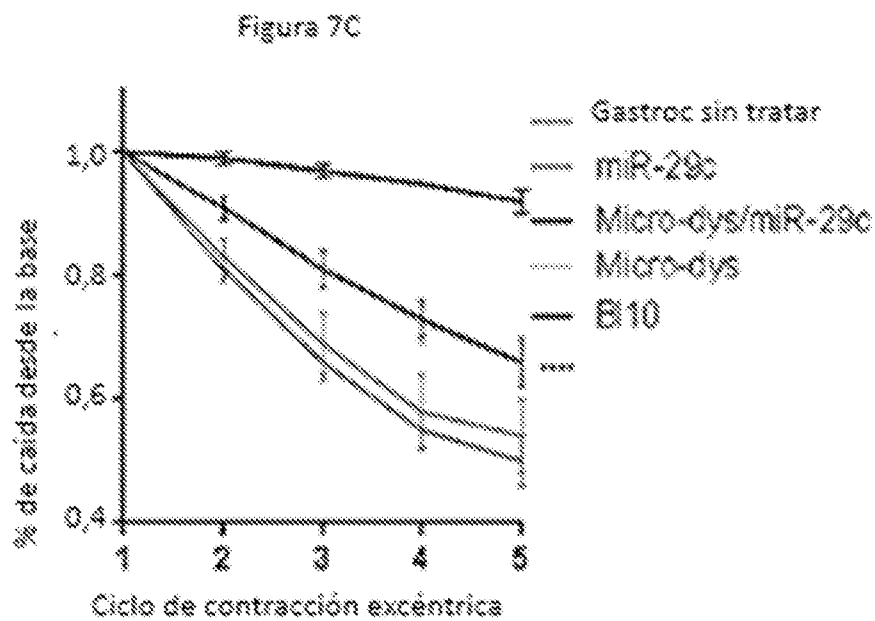
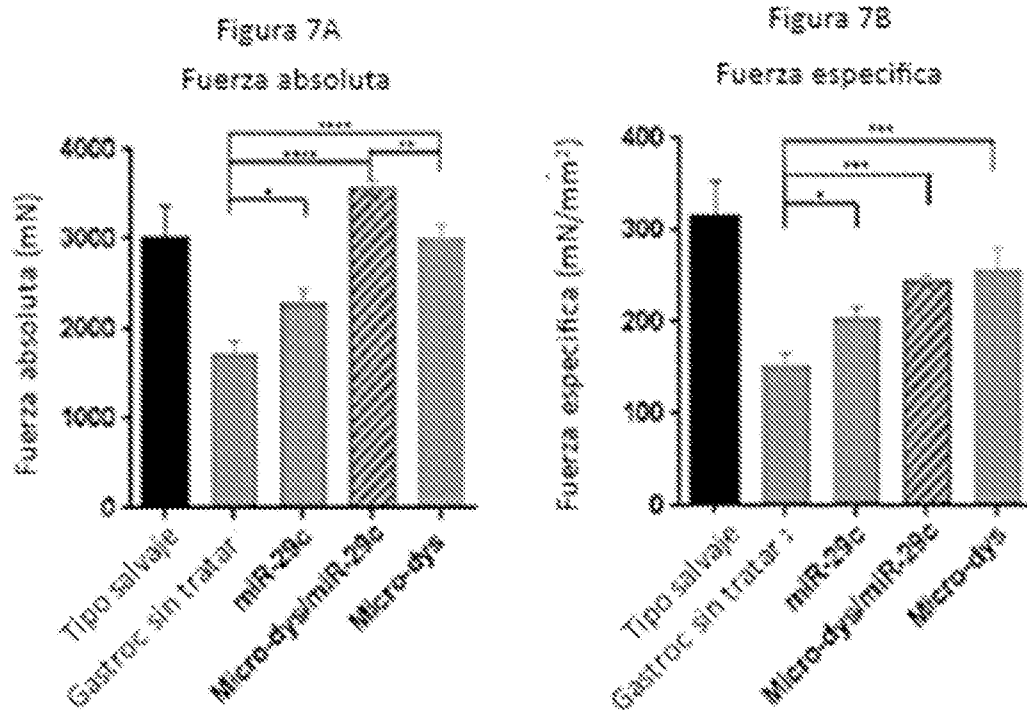
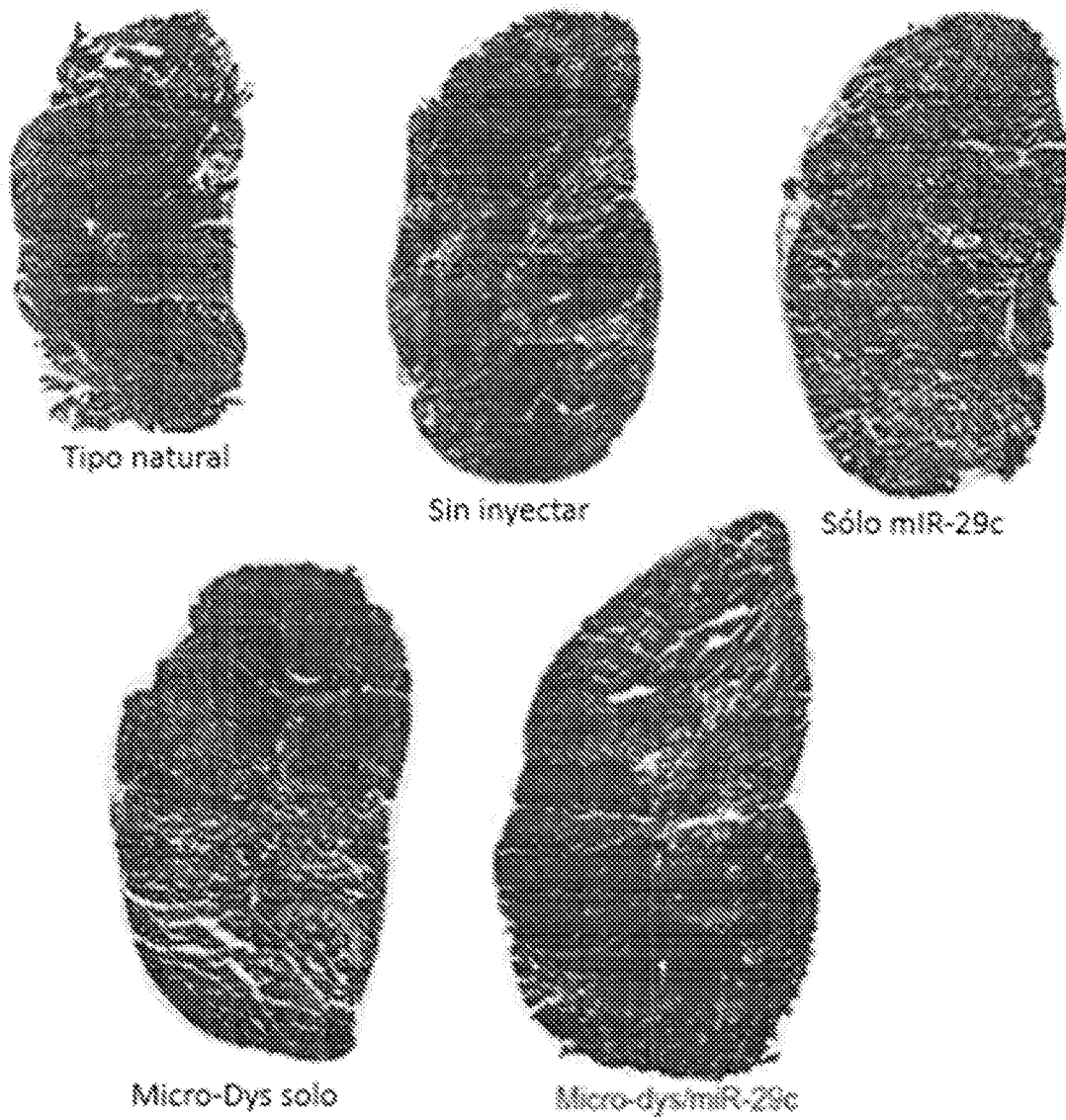


Figura 8



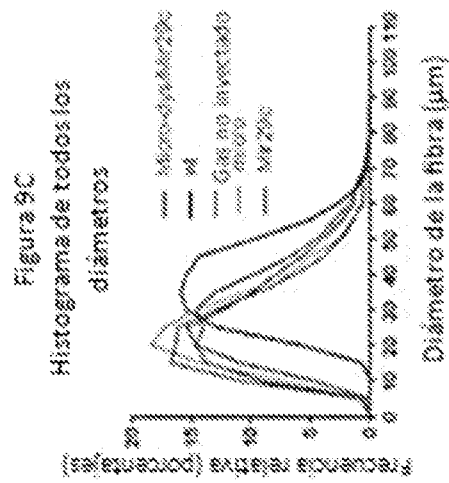


Figura 9F
Fibras musculares/ mm^2

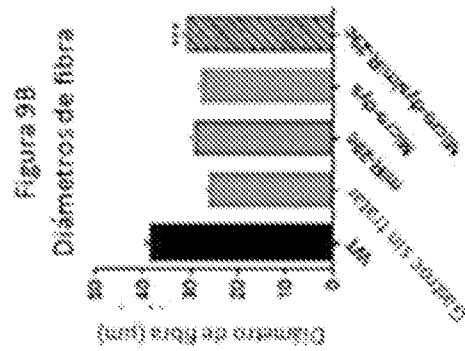
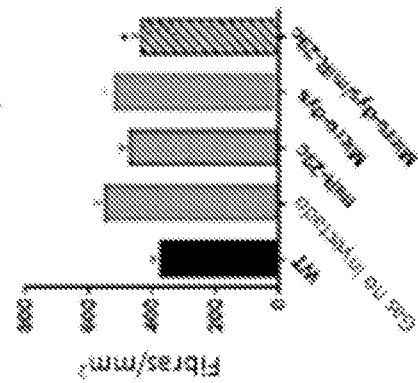


Figura 9E
Número total de fibras

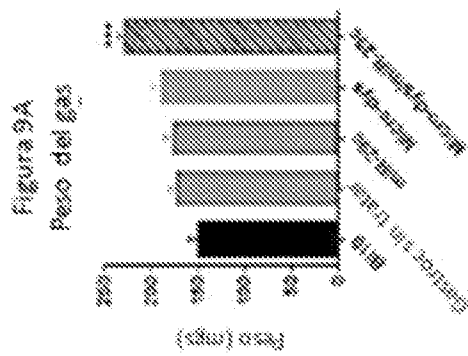
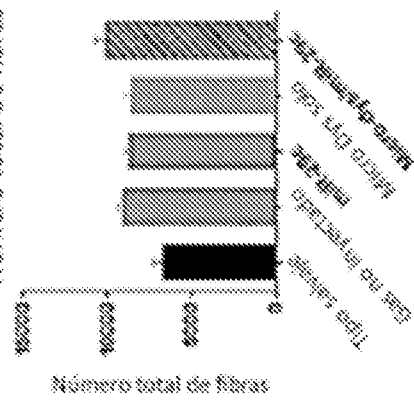


Figura 9D
Área total

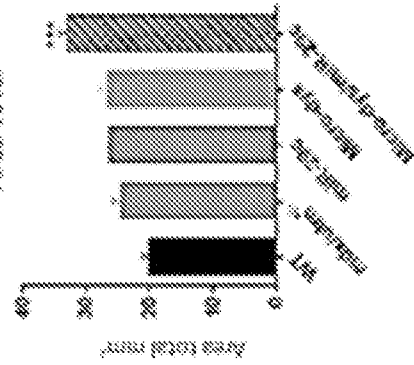
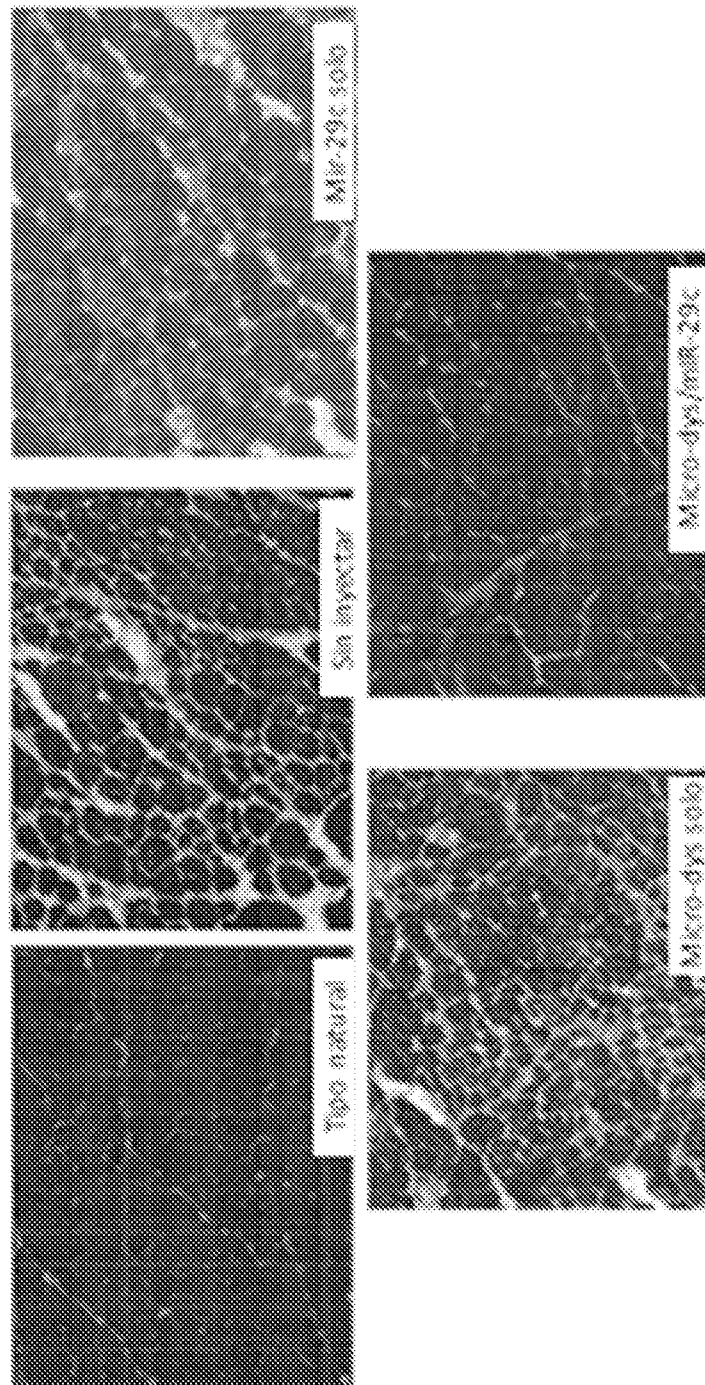
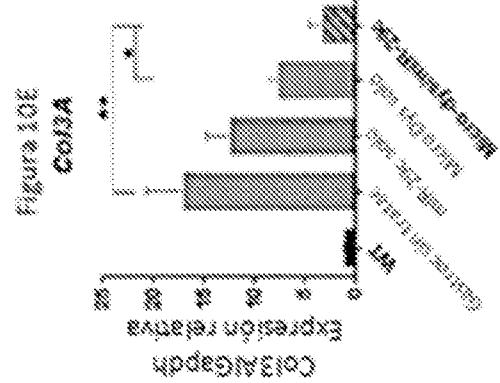
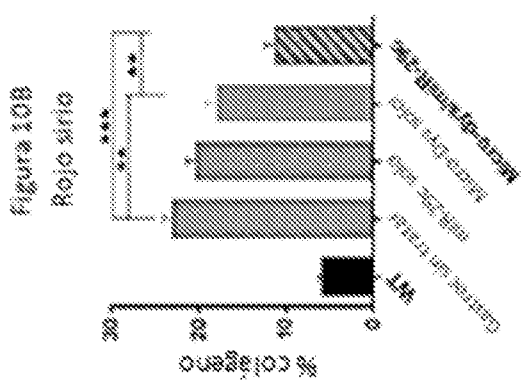
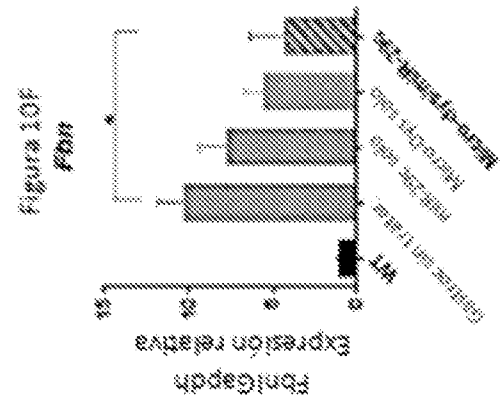
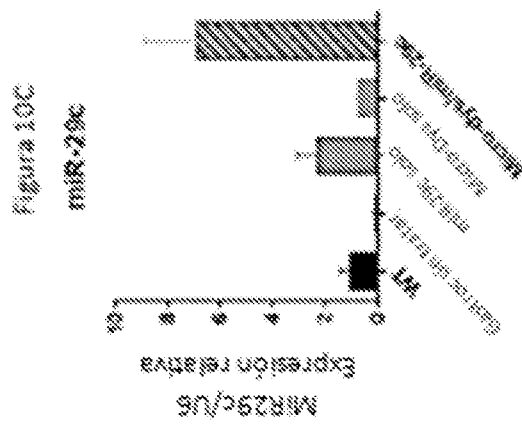
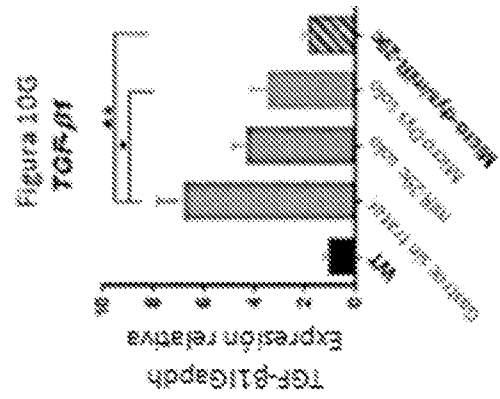
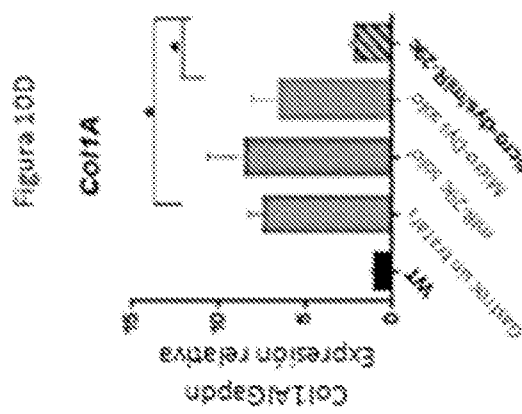


Figura 10A





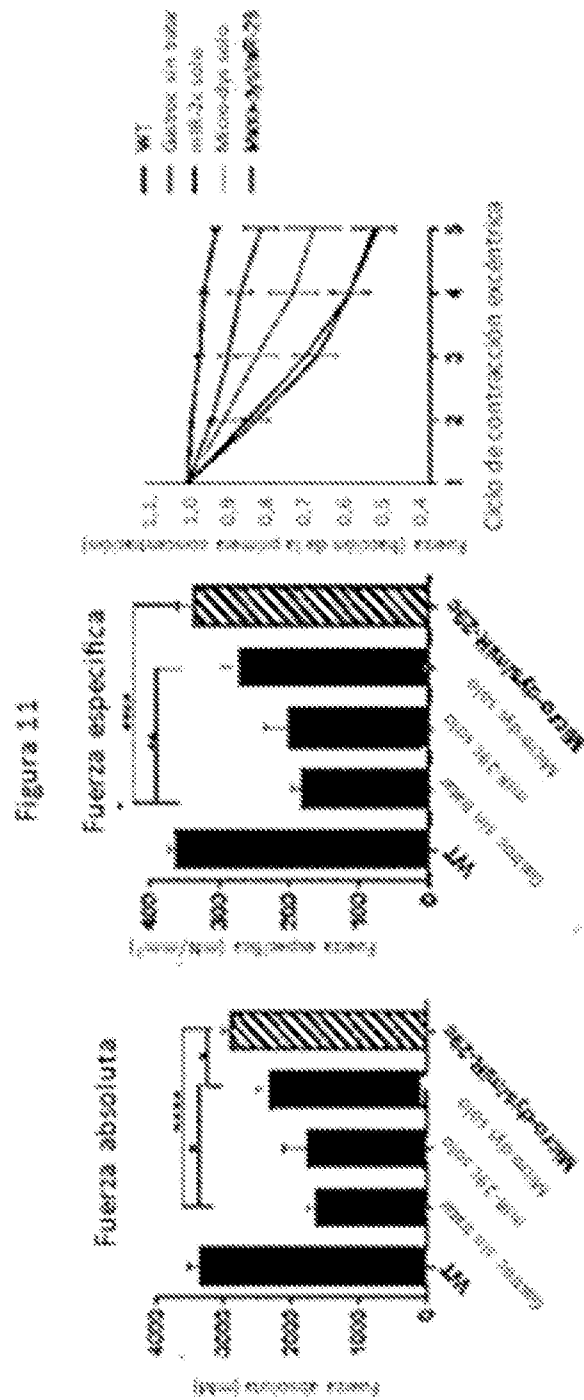


Figura 12

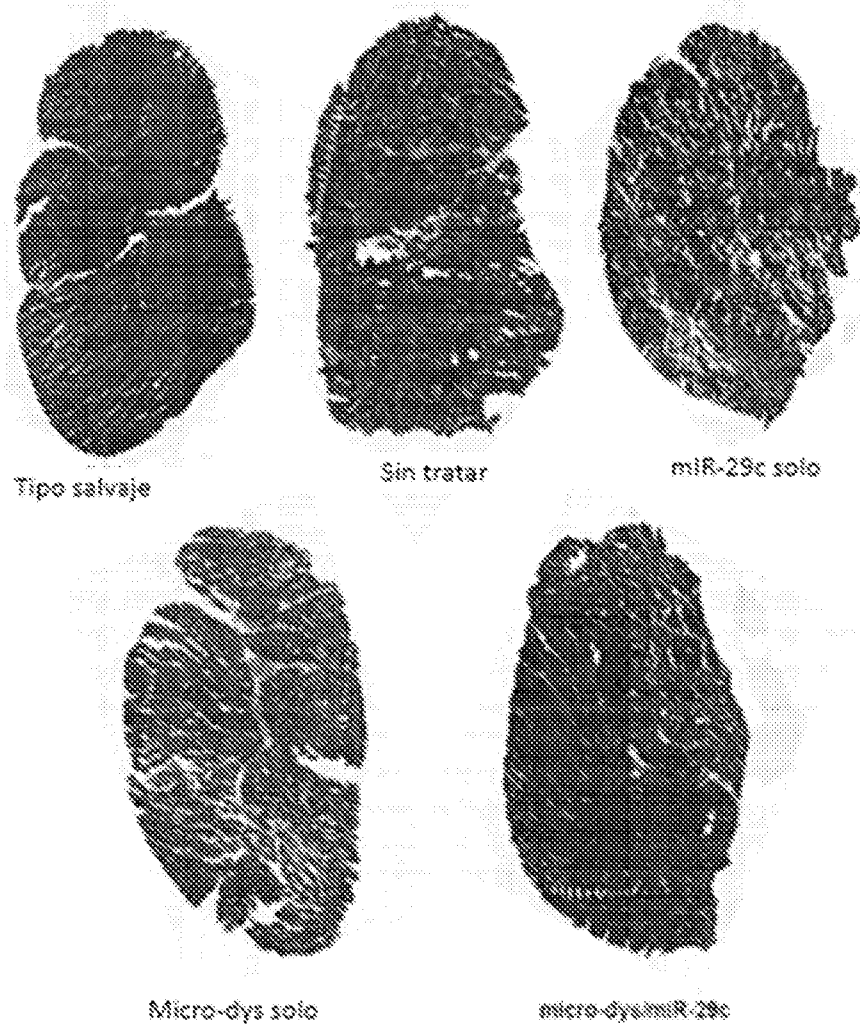
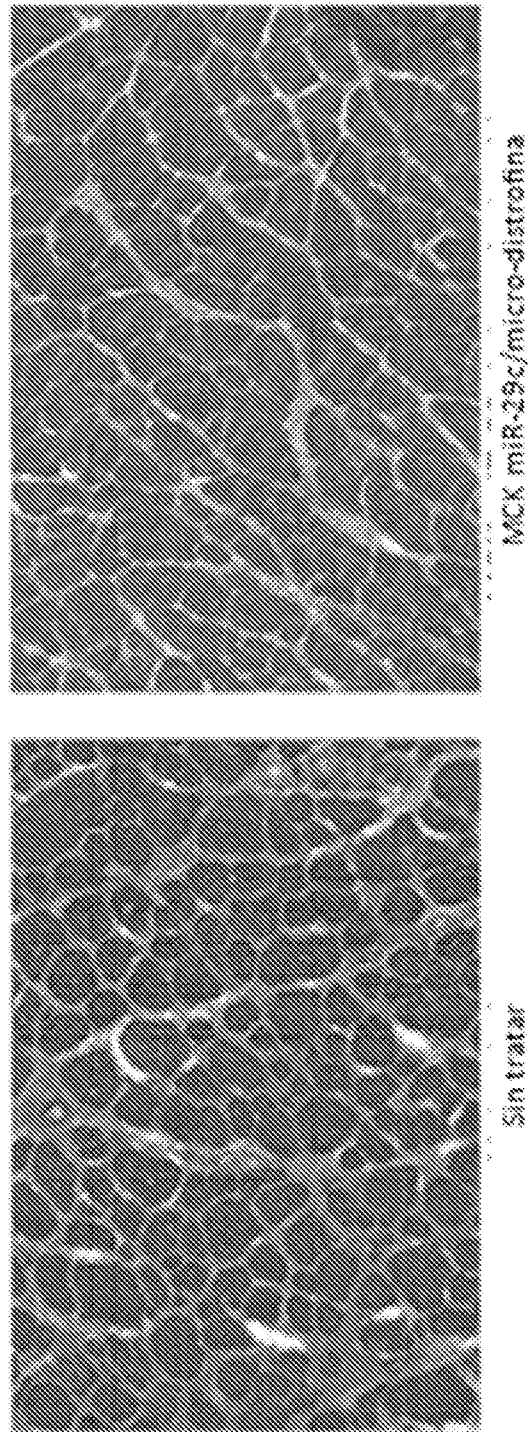
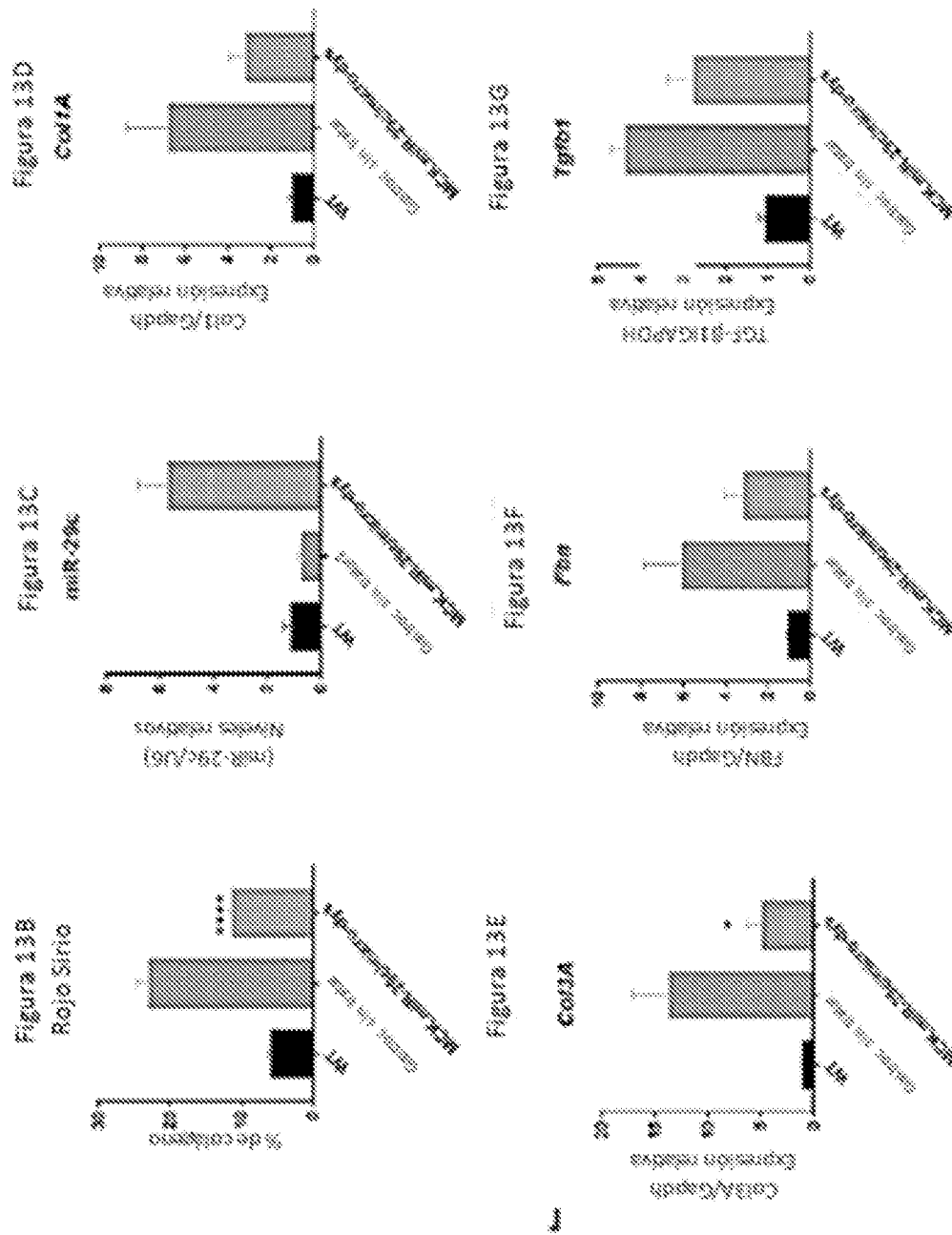
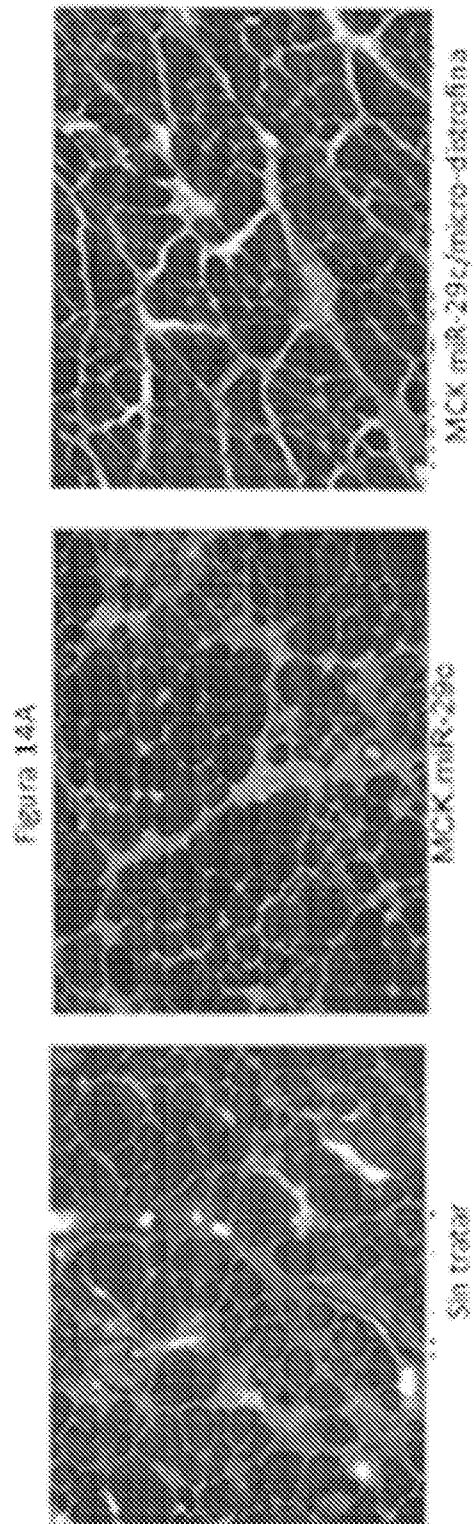


Figura 13A







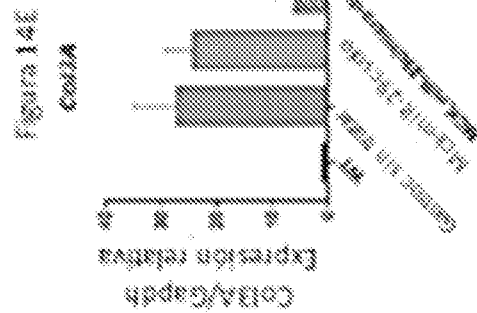
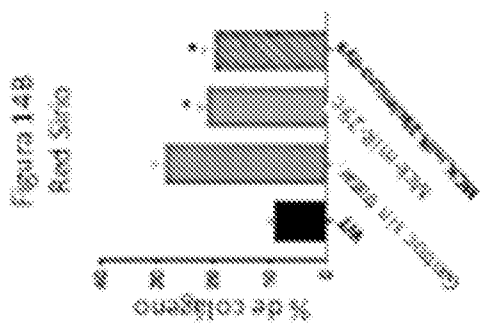
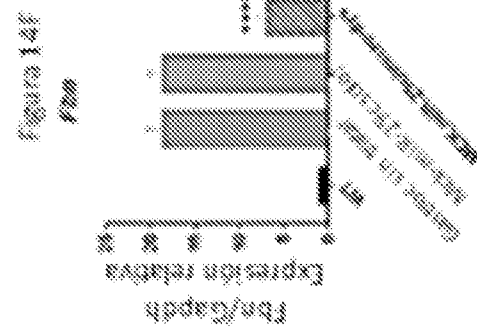
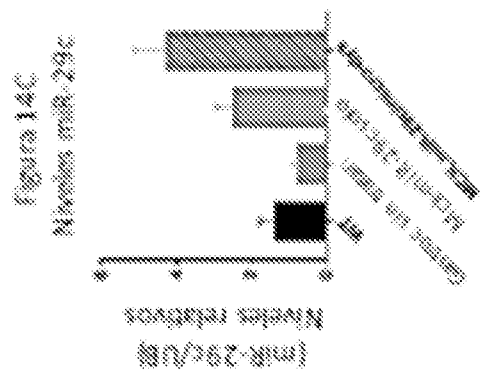
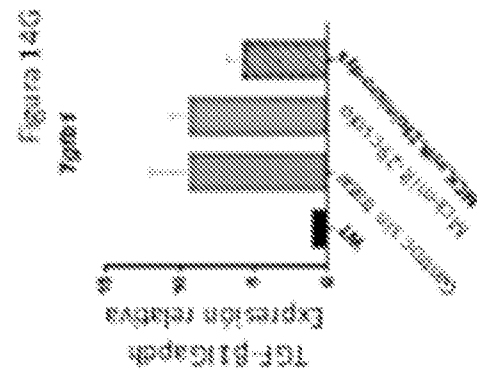
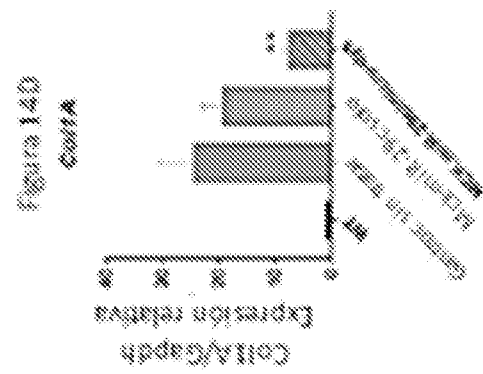


Figura 15A
Fuerza absoluta

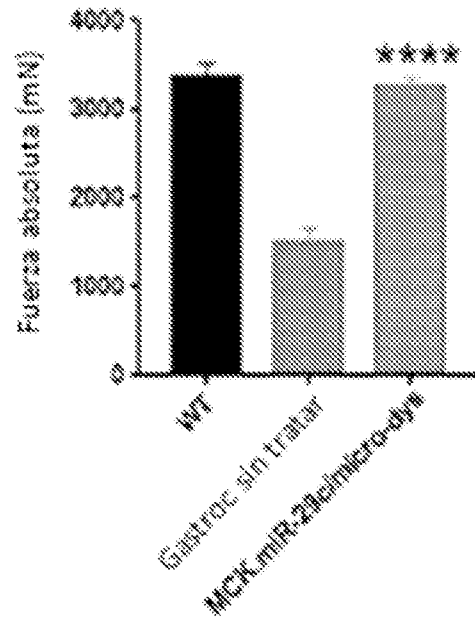


Figura 15B
Fuerza específica

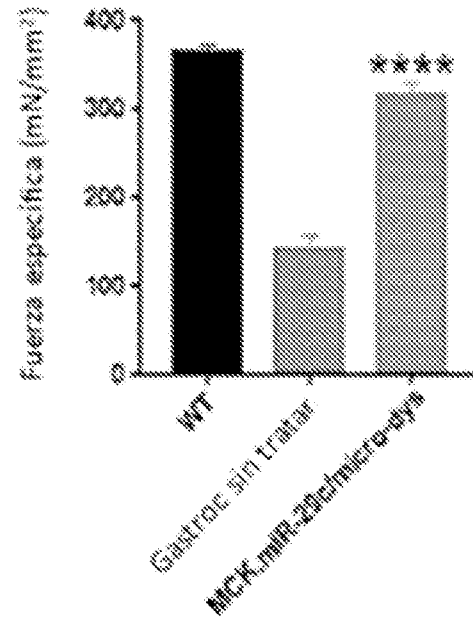


Figura 15C

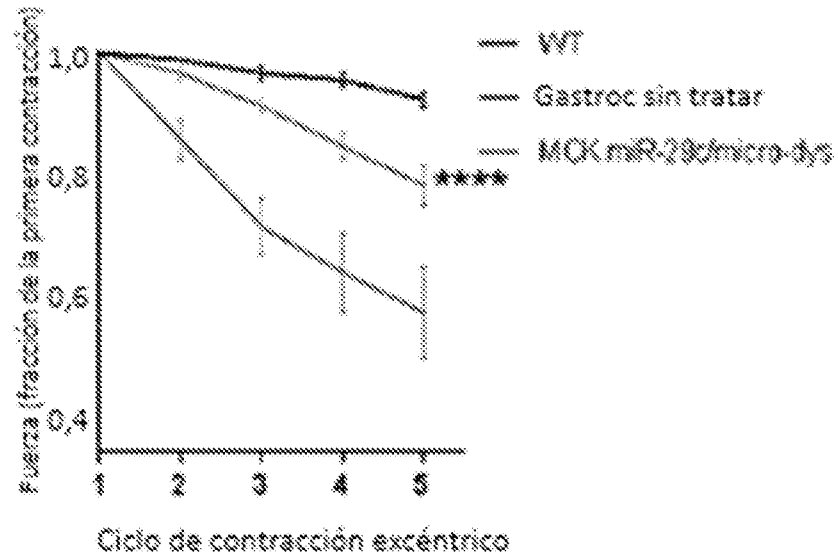


Figura 16A
Fuerza absoluta

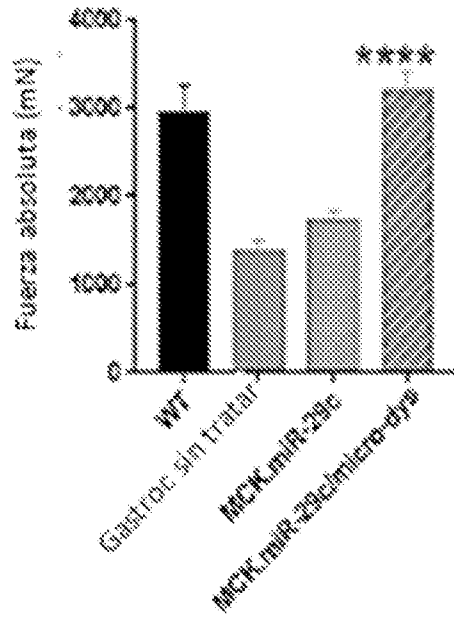


Figura 16B
Fuerza específica

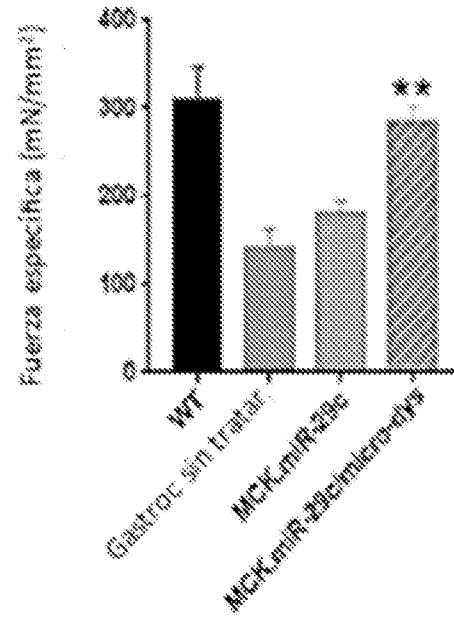


Figura 16C

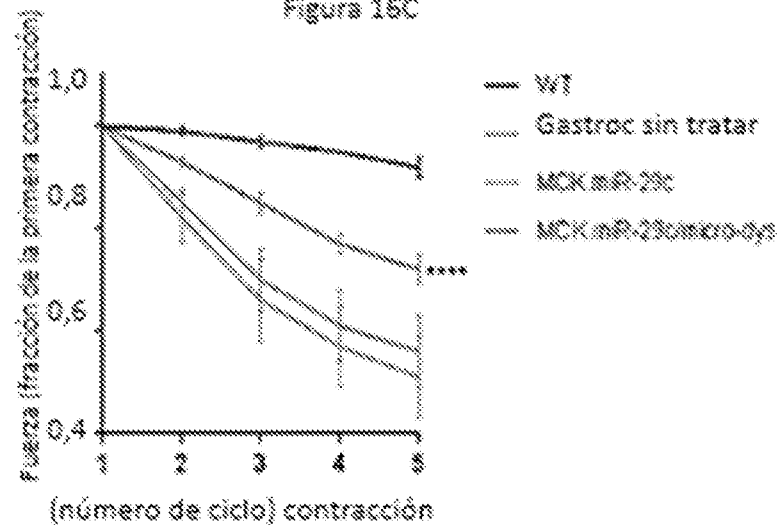


Figura 17A
Pesos de gas

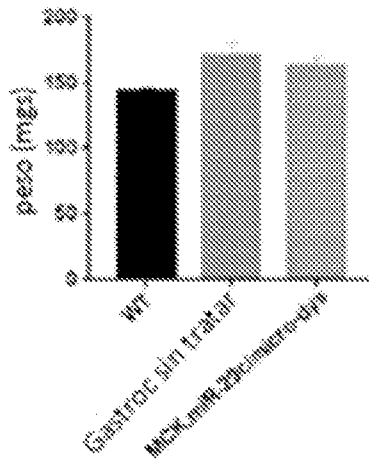


Figura 17B
Diámetro de fibra

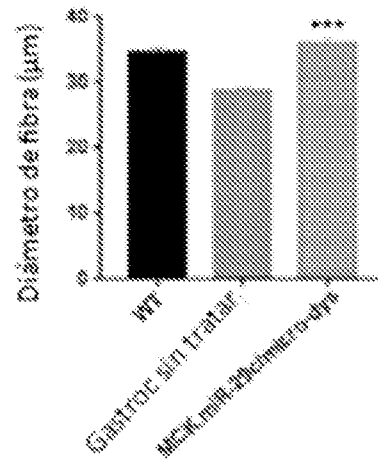


Figura 17C

Histograma de todos los diámetros

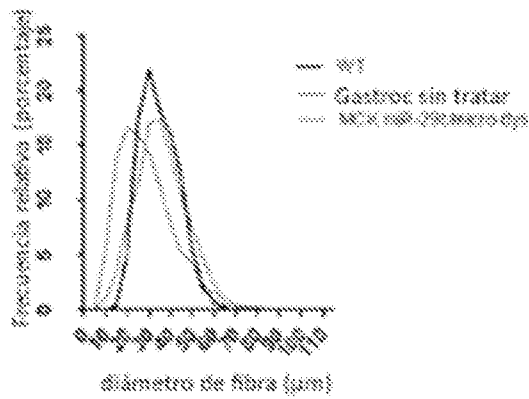


Figura 17D

Número de fibras/mm²

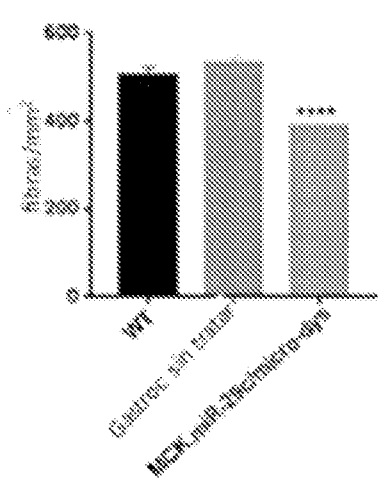


Figure 159

~~SECRET~~

Copyright © 2004 by John Wiley & Sons, Inc.

From: CCH 1052

0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000 0000

.....

slu44-mil29 con secuencia sencilla: primario 1000-1075

2001

CAGCAGCTCGCGGCTCGCTGCTGCTCACTGAGGCGCGCCCGGCAAAAGCCGCGGCGTGGGCGCACTTTGGTGCGCG
 GECTCACTGAGGCGAGCGAGCGCGGCGCAGAGAGGAGTGGGGTTAAACTCGTTACATAACTTAAGGTAAATGGCGCG
 CTTGGCTGAGCGCGCAGCGAGCGCGCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGCTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
 CTTTCCATTGACGTCAATGGGCTGACGATTATGCTAANCGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATATATATGCC
 AAGTACGCGCGCCATTGAGGTCAATGACGGTAAATGGCGCGCGCTTGGCATATGCCCAGTACATGACCTATGGGAC
 TTTCCTACTTGGCAGTACATCTAGCTATTAGTCATGCTATTACCATGGTGATGCGGGTTTGGCAGTACATCAATGG
 GGGTGGATAGCGGCTTGGACTACGGGGATTTCAGGCTTCACCGCATGACGTCAATGGCAGTTTGGTTTGGCAI
 CAAAATCAACGGGACTTTTCAAAATGTCGTAAACAACGCCCGCCCATTTGACGCAAAATGGCGGGTAGGGCGTGTACGG
 TGGGAGGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAAACGGTCAGATCGCTCGAGACGCCATCCACGCTGTTTGGAC
 TCCATAGAACAGACCGGGAGCGGATCCAGCGCTCGGACTCTAGAGCATCGGCTACTCGAGGAACCTGAAAAACGAGA
 AAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTGTCTTTTATTTCAAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTG
 CTCCTCAGTGGATGTTGCTTACTCTAGGCGCTGACGGAAAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTCGCGGAATTGTAC
 CCGGGGGCGGATCCACCGGCTCTTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCAGAACACAGGTAAGTGCCCTGTGTGTGTTCCCG
 CGGGCGCGGACCGGGGGCGCGGTGCGCGCGGCGACATGTTTCGGCGAGCGCGGGCGCTCGCGACCGCGGCCACCGAG
 AATCGGACGGGGGAGTCTCAAGCTGCGCGCGCGCTGTTTGAATGGGCTTCAGTACTTTACAGAGTCTGCTCCCTGC
 ACATCTTGGAAACACTTCTCGGGATTACTCTTCAGGTAAACCAACAGAAAGGCTCGAGAGGTATATTGCTGTGTG
 ACAGTGAACCGCAACCGGATTTCAAATGGTGCTAGAGTGAACTCACAGATGCTTACGACCATTTGGAATCGGTTAG
 CTTACTGCTCGGAATTCAAGGGGCTACTTTAGGAGCAATATCTTGTGTTACTAAAACGGAATACCTTCTCTATCTCTT
 TCATACATTGGCGCGGCTGCTCTGGTGGCTGGCTTCGCGCGCGGTGATGCGCGCGCTGGCGCGGCAAGGCTG
 GCGCGCTCGGCACTAATTGCGTGAAGGGAAGATGGCGCTTCGCGCGCTGCTCGAGGAGCTCAAAATGGAG
 GACCGCGCTCGCGGAGGCGCGCGGCTGAGTCAACCACACAAGGAAAAAGGCGCTTTCGCTCTCGAGCGGTG
 CTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGCGCGCGCTCCAGGCACTCGGATTAGTTCTCGAGCTTTGGAGTACGTCTC
 TTAGGTTGGGGGCGAGCGGTTTATGCGATGGAGTTTCCACACTGAGTGGGTGGAGCTCAAGTTAGGCGAG
 CTGGGCACTTGATGTAATTCTCTTGAATTGGCGCTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCTCTAGACAG
 TGGTTCAAGGTTTCTTCTTCAATTCAAGTGTGTGAAAGGCTAGGGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGC
 GCGGGGATCCAGATATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGCAAAACACAACTAGAATGCAAGTGAAAAAAATGCT
 TTATTGTGAAATTTGGGATGCTATTCTCTTATTGTGAACTATAAGGCTCAATAAAGCAAGTTAACCAACAAATTT
 GCAATCATTTTATTTTTCAATTTCAAGGCGCAAGTTTGGCAAGCTTTTCACTAGTAGCATGGCTACGTAGATAAGT
 AGCATGGCGGTTAATCATTAACACAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCACTCGCTCTCTGCGCGCTGCGCTC
 GCTCACTGAGGCGCGGGGCAACCAAGGTGCGCGGAGCGCGCGGCTTGGCGGGGGGCTCACTGAGCGAGCGAG
 CGCGCGAGCTGCGGTAATAGCGAGAGAGCGCGCACTCGCGCTTCCCAAGGTTGGCAGGCTGAATGGCGAA
 TGGAAATCCAGACGAGATTAGCGCAAAATGTAGGATTATTCATGAGCGTTTCTCTGTGCAATGGCTGCGGGTAA
 TATTGTTCTGGATATTACGAGCAAGGCGGATAGTTTGAATCTTCTACTACGGAAGTGAATGTTATTACTGACAA
 GAAGTATTGCGACAACGGTTAATTGCGGTGATGGACAGACTCTTTTACTGCGTGGCTCACTGATTATAAAACAC
 TTCTCAGGATTCTGGGCGTACCGGTTCTGTCTAAAAATCCTTTAATCGGCTCTCTGTTAGCTCGCGCTCTGATTCTAA
 CGAGGAAAGCACTTATACGTTGCTGTGAAAGCAAC

Page 200

CAGTACGGCGGCGCTGTAGTGGCGGCTGATTAAGCGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGGCGAGCGTGAACCGCTACACTCT
 CAGCGCGCCCTAGCGGCGCCGCTCCTTTCGCTTCTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGGCGCGCTTCCCGCTCAAGCTCT
 AAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGGTGAT
 GGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTG
 GACTCTTGTTCAAAACCTGGAAACAACCTCAACCCATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTCGCCGATT
 CGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAAT
 TAAATATTTGCTTATACAATCTTCTGTTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACGGGGGTACATATGATTGACATGCTA
 GTTTTACGATTACCGTTTCATCGATTCTCTGTGTTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCCTTTGTAGAGAC
 FCTCAAAAATAGCTACCCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTGACT
 GTCTCCGGCCCTTCTCACCCGTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAAATATAGAGGGTCT
 AAAAATTTTTATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAAC
 CGATTTAGCTTATGCTCTGAGGCTTATGCTTAATTTTGCTAATCTTTGCTTGCTGTATGATTTATTGGATGTY
 CGAATTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAA
 FCTGCTCTGATGCGGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCGCCAAACACCGCTGACCGCGCCCTGACGGGCTTGCT
 GCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTCACCGTCATCA
 CCGAAACCGCGGAGACGAAAGGGCCCTCGTGATACGCTATTTTTATAGGTTAATGTGATGATAAATAGGTTCTT
 AGAGCTCAGGTGGCACTTTTCGGGCAAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATG
 FATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATT
 FCCGTGTGCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA
 AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGA
 GTTTTCGCCCGCAAGAACGTTTTCGAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCGATTT
 GACGCGCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATCTCAGAAAGACTGGTTGAGTACTCACCACTCACA
 GAAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGTCATAACCATGAGTGATAACACTGCG
 GCCAACTTACTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGCGGATCATGTA
 ACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAAACGACGAGCTGACACCAAGATGCCCTGA
 GCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACT
 GATGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCGGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAT
 CTGGAGCGGCTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGACAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG
 FTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGA
 TTAAGCATTTGGTAACGTGTGAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAA
 GGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA
 GACCCCGTAGAAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAA
 ACCACCGCTACCAAGCGGTGGTTTGTGTTGCGCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGC
 AGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTCAAGAACTCTGTAGCACCGC
 CTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCGAGTGGCGATAAGTGGTGTCTTACCGGGTTGGA
 CTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGSTCGGGCTSAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTG
 AGCGAACGACCTACACGAAGTGAATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGGAAGGGAGA
 AAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCAGGGGGGAAAC
 GCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGGATTTTGTGATGCTGTCAGGGGG
 GCGGAGCTATGGMAAACGCCAGCAACCGCGCCCTTTTACGGTTCTGGGCTTTTGCTGGCTTTTGCTCACATG
 FTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACC6CCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAG
 CCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCG
 CCGCTTGGCGGATTCATTAATG

Figure 19

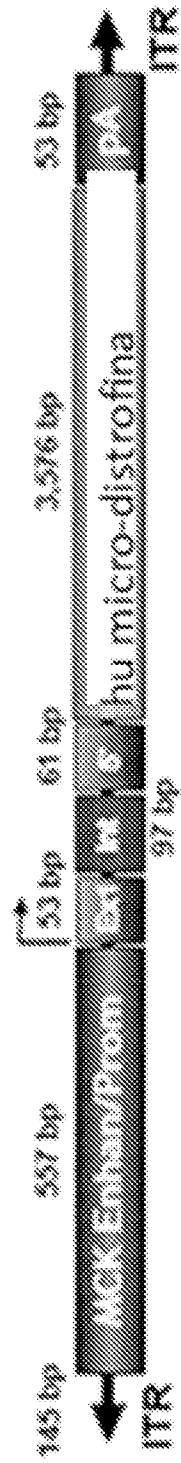


Figura 20A

SEQ ID NO: 9

Características principales:

Promotor MRE

Secuencia de intrón quimérica

Secuencia de micro-distrofina humana

Cola poli A

Resistencia a la ampicilina

Estructura principal de plásmido pDEX con origen o replicación pBB322

GCCCCAATACGCCAAACCGCCTCTCCCCCGCCGTTTGGCCGATTTCATTAAATGCAGCTGGC
GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCCGCCCCGGGCAAGGCCCGCCGCTCGGGCGACCTTT
GGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGGAGTGCCCAACTCCAT
CACTAGCGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTAATTATCTACGTAGCC
ATGTCTAGACAGCCACTATGGGCTAGGCTGCCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCCTGGG
GACACCCGAGATGCCCTGGTTATAAATTAACCCAGACATGTGGCTGCTCCCCCCCCCA
ACACCTGCTGGCTGAGCCTCACCCCCACCCCGGTGCTGGGTCTTAGGCTCTGTACA
CCATGGAGGAGAAAGCTCGCTCTAAAAAATAACCTGTGCTGCTGGTGGGCTGTGGGGGA
CTGAGGGCAGGCTGTAAACAGGCTTGGCGGCCAGGGCTTATACGTGCTGGGACTCC
CAAAGTATTAAGTGTTCATGTTCGCGGCGAAGGGGCCAGCTGTTCGCGCGCCAGCTAGA
CTCAGCACTTAGTTTAGGAACAGTGAGCAAGTCAGCCCTTGGGGCAGCCCATACA
AGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGACAGCTGCGGTTCCGGGCTGGGCACGTGTCCTGG
GCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGGCCCCCTCCCTGGGGGACAGCCCCCTCC
TGGCTAGTCAACCCCTGTAGGCTCCCTCTATATAACCCAGGGGGCACAGGGGCTGCCCC
CGGGTACCAACCACTCCACAGCACAGACAGACACTCAGGAGCCAGCCAGCCAGGT
AAGTTTAGTCTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGC AAATCAA
AGAACTGCTCCCTCAGTGGATGTTGCCCTTACTTCTAGGCCCTGTACGGAGAGTGTACTT
CTGCTCTAAAAGCTCCGGAATGTATACCCCGCCCGCCACCCATGCTGTGGTGGGAGG
AGGTGGAGGATTTTATGAAAGGGAGGAGCTGCAAGAGGAGACTTACCAAGTGG
GTGAGGCTCAGTTCAGCAAAATTTGGGAGGAGCAGCACATCGGAGAACTGTGTCTGAC
CTGCAGGATGGAGAGCTGCTGCTGGGCTCTGCTGGAGGAGACTGAGTGGCCAGAGGCT
GCCCCAAGAGGAGGGGGGCTCACTAGGCTTCACGCCCCGAAACAACTGTGAAACAAAGCT
CTGAGAGGCTTCAGAACAAACAAATTTGGATCTGGTGAATATTTGACAGTCTGATAT
CTGTGAGCGGGAAACCACAAACTTACACTGGGGCTGATCTGGAACATTATTCAGCACTG
GCAGCTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGCTTGGCTGCAAGCAGAACCAATTCCG
AGAAGATCTGCTGCTGCTGCTGGGTCAGAGCAACCCGCAACTATCCCAAGCTGAAC
GTGATTAACCTTCACTACATCTGTGAGGCAACGGGCTGCTGCTTGAATGCTCTGATTCAC
AGGCACAGGGCTGAGCTGTCTGACTGGGATAGCTGGGTGCTCCAGGAGCTCTGCTACA
CAGGGCTTGGAAACATGCTTCAATAAGCTGGGATCCAGCTGGGATCGAAAAACCT
GCTGGAGCTCAGAGGATTTGGACACTACATACCCAGATAAAAAGGCTATTCAGATG
ACATTACTAGGCTGTTCAGGGTGTGCTGACAGGAGGAGTCTATTGAGGCTATTCAGG
AGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCAAGGTGACTAAGAGGAGGAGCACTTTCAGCTG
CATCATCAGATGCAATTACAGCCAGCAGATTACCTTGGGCTTGGCTCAGGATATGA
GCTCAGCAGTATGTCAAAACCAAGCTTCAAGTCTACGCTATATAC

Figura 208

CCAGGCTGCTACGTTGACAACCTAGGGACCCCTACTAGATCCCCCTTCCATGCCAGCA
 CCTGGAGGCTCCAGAGGACCAAGAGCTTGGGGCCAGGCTTGATGG
 AAAGCGAGGAGAAATCTGGATCTGTACCAAGACAGCCCTGGAGGAGGGTGCCTGAGCTGG
 CTGCTGAGTGTGAAGACACACTGCAAGGCTCAGGAGCAAAATTTCCAAATGACGTGGA
 AGTGTGAAGGATCAGTGTCCACACACACAGAGGCTATATGATGGACCTGACAGGCTC
 ACCAGGGGCTGCTTGGCAATATGCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGCACCCGGG
 AAACCTGATGAGGACCAAGCAAAACAGAACTGACAGGACCAAGATGAACCTGCTGAACA
 GCGGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGGAAGCAGTCCAAACCTGCACCGG
 GTGCTGATGGACCTGCAGGAACCCAGAAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAA
 GACTGAGGAACTCCACAAGCAAGATGGAGGAGGAGGCTACTGGGACCTGACCTGGAG
 GATCTGAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAAGTGTCTGCAGGAGGATCTGGAAACAGG
 AGCAGGTTCTGGTTGAACTGCTGACACATATGTTGGTTGGTTGGTTGGAGCAATCTAGT
 GGAGATCACTCCACTGGCCGCTGGAGGAAACAGCTGAAAGGTGCTGGGGGAGCCGTT
 GGGCAACATTGGCGGTTGGAGGACAGGAGGACAGGTTGGTTGCTGCTGACAGGACATCTGCTG
 TGAANAATGACAGAGGCTGAGCTGAGGAGGAGGAGTGTCTGTTTLAGTGGCTTGGCTGAGCGAG
 AAAGAGGAGCGGCTGAACAAAGATCCACACAAACCGGCTTAAAGGATCAGAAACGAAAT
 GCTGTCTAGGCTTGCAGAAACTGGCTGTGGCTGAAGGCGGATCTGGAGGAAAAGGAGG
 AGAGCATGGGCAAACTGTATAGGCTGAAACAGGACCTGCTGAGCAGCTTGAAGAAC
 AAGAGCTTGACTCAGAAAGACAGAAAGCTTGGCTGGAATACTTGGCCGCTGCTGGA
 CAACCTGGGTGCAGAAACTGGAGCAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCA
 CAACCCAGCTTAGGCTGACCCAGACAAACCTGATGGAAACCTGAGCCACCGTGAACA
 ACCCGCGAAACAGATCTTGGTGAACAATGCCAGGGAAGAGCTTGCACCTTCCACCTTC
 CCAGAGAGAAAGAGAACTCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGGCACTGAGCAAA
 CTGGACCTGAAGCTGAGGCAAGGCTGAAGTGAATTAAGGAGTCTTGGCAGGCTTGTGG
 CGATCTGCAGATGATGCTCTGCAGGAGCTACCCTGGAAAGGAGGAGGAGCTTGAAGG
 GCGAAATGTGCTTCACTGAAGGAGAACTGAGGTCAGTGAACGATCTGGCTAGACAG
 CTGACAAACATGGGCACTCAGCTGAGGCTCATACAACTGAGGACACTGGAGGAGCT
 GAATACCAGGTGGAAAGCTGCTGCAGGCTGGCTGGGAAGAGCTGCTGGGCAAGCTGC
 ATGAGGCTCATGCGGACTTCTGAGCCAGCCAGGCAAGCACTTCTGAGGACATCCCTGCT
 AGGGGCTCTGGAGAGGAGGCTATTTCTCCCAACAAAGGAGGCTTACTATATTAATCAGG
 AGACCCAGAGCACTTGTGTGGGAGCAATCCCAAGATGACAGAACTGTACAGGCTGTG
 GCGGATCTGAACAACCTGAGGTTAGGCTCTACAGAAACCTTATGAGGCTGAGAGG
 GCTGAGAGAGGCTGTGCTGAGATCTGCTGAGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCT
 GGATCAGCATTAATCTGAAGCAGAAAGATCAGGCAATGGATATGCTGCAGATCATCA
 ACTGCTGACCACTATCTACGACAGGCTTGAAGCAGGAGGACAAACAACTGCTGTAAC
 GTGGCTCTGTGGCTGGATAAGTGGCTCAACTGCTGCTGGAAGGTTATGACACTGGG
 GGCACCTGCTGGATCAGAGTGGCTGAGTTTAAAACTGGGATTAATCTGCTGTGTAAAG
 GCGCAGCTGGAGGACAAATACAGGAGCTTGTTCAGGCAAGTGGCTAGGAGGACTGG
 ATTTGTGAGCAGGCGGCGCTGGGAGCTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAG
 ACAGCTGGGAGAGGTTGGCTAGGTTCTGAAGGATCTAACTGAACTCAGGTTTGGCA
 GCTGTCTCCAGCTTGGCAATTAACAAACCTGAATTCAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 GGATGCGCTTGAAGCACAGAGGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG

None of the

ATTAATCGGCTTTCCCTACAGGAGTCTGAAGACATTTAACTACGAT
 ATTTCACAGAGCTTGCTTTCTTTCCGGAAGAGTGTGCTAAAGGACACAAAGATGCACTAC
 CTTATGTTGGAAATATTACCTCCAACTACATCTGCTGAAGATGTGCTGATTTTTC
 AAGGTGCTGAAGAAATAAGTTCTCGACTAAGAGGTTACTTCCCCAAAGCAGCTCCGCAI
 GGGGATCTGCCAGTTCAGACATTCCTGGAAGGAGACAAATATGGAGAGCTGATACAA
 TGTGAGCTGGCCGCAATAAAAAGATCTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTGTGGTTTTTG
 TGTGTCTAGAGCATGCTTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACCTACA
 AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCCCTCGCTCACTG
 AGGCCCGGCGAACCAAAGGTGCCCAGACGCCCGGGCTTTGCCCGGCGCGGCTCAGTG
 AGCGAGCGAGCTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGGAAGAGGCCCCGACCGATCGGCCCTT
 CCCAACAGTTGGCGAGCTTGAATGGCGAATGGGAAGTTCCAGACGATTTGAGCGTCAA
 AATGTAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTTCCTGTTTGCATGGCTGGCGGTAATATTGTTC
 TGGATATTAACAGCAAGGCCGATAGTTTGAAGTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTA
 TTAATAATCAAAGAAGTATTGGGACAACGGTTAATTTGGCGTGATGGACAGACTCTTT
 TACTCGGTGGGCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATCTTGGCGTACCGTTCCT
 GTCTAAAATCCCTTTAATCGGCTCTCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTTCAACGAGGAA
 AGCAGCTTATACGTGCTGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCCGCGCATY
 AAGCCGCGCGGCTGTGTGTTGTTACGCCAGCGTGACCGCTACACTTCCAGCGGCC
 TAGCGCCCGCTCTCTTCCCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCC
 CUTCAGCTCTAAAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGATTTACGGCAC
 CTCGACCCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGTAAGTGGGCCATCGCCCTGA
 TAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGT
 TCCAAACATGGAACAACACTCAACCTATCTCGGCTATCTCTTTTGATTTATGAAGGAT
 TTTGCCGATTTCCGCTATTTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC
 GAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAAATCTTCCTG
 TTTTGGCGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTAC
 GATTACCGTTTCATCGATTCTCTGTGTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAAG
 CTTTGTAGAGACCTCTCAAAAATAGCTACCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGA
 ACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTGACTGTCTCCGGCTTTCTCACCGGTTG
 AATCTTTACCTACACATTAATCAGGCAATTGCATTTAAAAATATATGAGGGTTCTAAAA
 ATTTTATCCTTTCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCCCAAAAGTATTACAGGTCATA
 ATGTTTTTGGTACAACCGATTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATGCTTAATTTTGT
 AATCTTTTGCCTTGCCTGTATGATTTATTTGATGTTTGAAGTTCTTGATGCGGTATTT
 TCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATC
 TGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCCGCCAAACACCCCGCTGACCG
 CCTGACCGGCTTGTCTGCTCCCGGATCCGCTTACAGACAAAGCTGTGACCGCTCTCC
 GGGAGCTGCATGTGTCAAGAGTTTTACCGTCAATCACCGAAACGCGCGAGACGAAA
 GGGCTCTGTGATACGCTATTTTTATAGGTTAATGTATGATAATAATGGTTTCTTAG
 ACGTCAGGTGGCACTTTTGGGGAAATGTGGCGGAACCCCTATTGTGTTATTTTCT
 AAATACATTCAAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAAT
 AATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACAAATTCTGGTGTGCGCTT

Figura 20D

ΔTDCCTTTTGTGCGGCATTTTGGCTTCTCTGTTTGTCTCAGCCAGAAACGCTGGTGA
 ΔAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTAC
 ΔTCGAACCTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGT
 TTTCCAAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTTGTCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTG
 ΔCGCCGGGCAAGAGCAACTTGGTTCGCCGCATACACTATCTTCAGAAATGACTTGGTIG
 ΔGTACTCACCAATCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATTA
 TGCAGTCTGCCATAAACCATGAGTGTATAACACTTGGGCCAACTTACTTCTGACAAACG
 ΔTCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCCTTTTGTGCACAACATGGGGGATCATGTAAAC
 TCGCTTGTATCTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAAGCAGGAGCGTG
 ΔCACCACGATGGCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGGCCCAAACTATTAACTGGCGAA
 CTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACATAAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTT
 GCAAGACCACTTCTGGCTCGGCGCTTTCGGCTGGCTGGTATATGGCTGATAAATCT
 GGAAGCCGGTGAAGCTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTTGGGGCAGATGGTAA
 GCGCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAAGGCAACTATGGATGAACG
 ΔAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTTACTGATTAAGCATGGTAACTGTTCAG
 ACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAAAG
 GATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTT
 TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCC
TTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGT
GGTTTGTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCGGAAGGTAACCTGGCTTCAG
CAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTT
CAAGAACTCTGTAGCACCGCGTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCACTGGC
TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACC
GGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCGAGCTTGG
AGCGAACGACCTACACCGAAGCTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCC
ACGCTTCCCGAAGGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAA
CAGGAGAGCGCACGAGGGGAGCTTCCAGGGGGGAAACGCTTGGTATCTTATAGTCTT
GTCGGGTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGGTACAGGGGG
CGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGCGGCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGC
 TGGCCTTTTGTCTACATGTCTTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTA
 TTACCGGGTGTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGC
 GAGTCAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC

Figura 21A

SEQ ID NO:7 gen de micro-distrofina humana

ATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGCAGAAGA
 AGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAGCACATC
 GAGAATCTGTTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGG
 ACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCCAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACGCCCTGA
 ACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCTGGTGAAT
 ATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCAACAACCTGACACTGGGCCTGATCTG
 GAACATTATCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGCCCCGGC
 TGCAGCAGACCAATTCGGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCGC
 AACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACCTTCACTACATCCTGGAGCGACGGCTGGCC
 CTGAATGCTCTGATTACAGCCACAGGCTTGATCTGTTGACTGGAAATAGCGTGGTG
 TGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCTTGGAAACATGCTTCAATATCGCTCGGTACCAG
 CTGGGGATCGAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACCCAGATAA
 AAAGTCTATCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCAGGTGTC
 TATTGAAGCCATTACAGGAGGTGGAAATGCTGCCCGCCCCCCCCAAAGTGAATAAG
 AGGAGCATTTTCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGCC
 TGGCTCAGGGATATGAGCGCACCAAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAAGTCTACGCTT
 ATACCCAGGCTGCCACGTGACAACCTAGCGACCCCTACTAGATCCCCCTTCCATCCC
 AGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGAAAGCGAG
 GTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGCTGCTGAG
 TGCTGAAGACACACTGCACGCCCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAAGTGGTGA
 AGGATCAGTTCCACACACAGGAGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCACCAGGGG
 CGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGGAAACTGAG
 TGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACACCCGCTGG
 GAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGGTGTGAT
 GGACCTGCAGAACCAAGAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAGACTGAG
 GAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGGATCTGA
 AGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGAGCAGGT
 GCGGGTGAACTCCCTGACACATATGGTGGT

Figura 218

GGTGGTGGACGAATCTAGTGGAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGA
 AGGTGCTGGGGGACCGGTGGGCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTG
 CTGCTGCAGGACATCCTGCTGAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTT
 AGTGCTTGCTTGAGCGAGAAAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCCGGCTT
 TAAGGATCAGAACGAAAATGCTGTCTAGCCTGCAGAACTGGCTGTGCTGAAGGCCG
 ATCTGGAGAAAAAGAAGCAGAGCATGGGCCAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTG
 CTGAGCACCCCTGAAGAACAAGAGCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATA
 ACTTTGCCCCCTGCTGGGACAACCTGGGTGCAGAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAG
 ATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGA
 AACCGTGACCACCGTGACAACCCCGGAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAG
 AGCTGCCACCTCCACCTCCCCAGAAGAAGAGAACCCCTGGAGCCGCTGCAGGAGCTG
 CAGGAAGCCACTGACGAACCTGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGG
 GTCTTGGCAGCCTGTGGCCCATCTGCTGATTGATTCCTGCAGGACCACCTGGAAAA
 GGTGAAGGCTCTGAGAGGCGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGA
 ACGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTG
 AGCACACTGGAGGACCTGAATACCAGGTGGAAAGCTGCTGCAGGTGCTGTGGAAAGA
 CCGGGTGCGGCAGCTGCATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACT
 TTCTGAGCACATCCGTGCAGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTG
 CCTACTATATTAATCACGAGACCCAGACCCTTGTGGGACCATCCCAAGATGACA
 GAACTGTACCAGTCCCTGGCCGATCTGAACAACGTGAGGTTTACCGCTTACAGAACC
 GCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCTGTGCCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCC
 GCCGCTGCCATGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGA
 TATECTGCAGATCATCAACTGCCCTGACCCTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGC
 ACAACAACCTGGTGAACGTGCCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCCTGAACCTGGCTGCTGA
 ACGTGTATGACACTGGGGCCACCGGCCCGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAACTGGG
 ATTATCTCCCTGTGTAAAGGCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAGCAG
 GTGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTGACCAGCCGCCCTGGGACTGCTGCTGCATGAT
 AGTATCCAGATTCCCTAGACAGCTGGGAGAGG

Figura 21C

TGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCGCAGCTGTTTCCAGTTTG
CCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTTCCTGGATTGGATGCGCCTGGAAC
CACAGAGCATGGTGTGGCTGCCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAAACTGCC
AAGCACCCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCCATTAATCGGCTTTCGCTAC
AGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGATATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTCCGGAAGA
GTGCCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCCTATGGTGGGAATATTGCACCCCAACTAC
ATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAAATAAGTTTCGGACTAA
GAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGTGCTGG
AAGGAGACAATATGGAGACCGATACAATGTGAGC

Figura 22A

Secuencia pAAV-MCK-miR29c (SEQ ID NO: 12)

Características principales:

Potenciador MCK: 190-395 (SEQ ID NO: 10)

Promotor MCK: 396-753 (SEQ ID NO: 11)

Intrón EF1a: 1155-1315, 1609-2083

miR-29c: 1487-1512

shARN-miR29-c con secuencia de semilla primaria: 1316-1608

PoliA SV40: 2094-2146

CTGNNNNNNNGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTC
 GGGCGACCTTTTGGTCGCCCGGCCCTCAAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGGAATG
 GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTAATTA
 TCTACGTAGCCATGTCTAGACAGCCACTATGGGCTTAGGCTGCCCATGTAAAGGAGGC
 AAGGCCCTGGGGACACCCGAGATGCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCTC
 CCCCCCCCAACACCTGCTGGCTGAGCCTCACCCCCACCCCGGTGCTTGGGTCTTAG
 GCTCTGTACACCATGGAGGAGAGAGCTGGCTCTAAAAATAACCCCTGTCCCTGGGTGGGC
 TGTGGGGGACTGAGGGGAGGCTGTAAACAGGCTTGGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCC
 TGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGTTCCCGGCGAAGGGGCCAGCTGTCCCCCG
 CCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAAAGAACCAAGTGAGCAAGTTCAGCCCTTGGGGCA
 GCCCATACAAGGCCATGGGGCTGGGGCAAGCTGCAAGGCTGGGTCCGGGGGTGGGCAC
 GGTGCTCCGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCTCCCTCCCTGGGGA
 CAGCCCTCTCTGGCTAGTTCACACCTGTAGGCTCCCTCTATATAACCCAGGGGCACAG
 GGGCTGCTCCCGGGTCAACACCACTCCACAGCACAGACAGACACTCAAGGAGCCAG
 CCAGCCAGGTAAGTTTATGCTCTTTTGTCTCTTTATTTCAAGGTCCCGGATCCGGTGGTGG
 TGCAAATCAAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGGCTTTACTTCTAGGCCGTGACGG
 AAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTTGTACCCGCTAGAGGATCCGGTAC
 TCGAGGAACTGAAAAACAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTATGCTCTTTTGTCTTTTAT
 TTCAGGTCCCGGATCCCGTGGTGGTGCAAATCAAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTT
 GCTTTACTTCTAGGCCGTGTACCGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATT
 GTACCCGGGGCCGATCCACCGGTCTTTTCCCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGG
 TAAGTGCCGTGTGTGGTTCCTCGCGGGCGGGGACGGGGCCCCGTGGGTCCCAAGCGCAC
 ATGTTGGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCCGACGGGGGTAGT
 CTCAAGCTGCCCGGCTGTGTGAATGAGGCTTCAGTACTTTCAGAAATGCTTGGCTG
 CACATCTTGGAAACACTGCTGGGATTACTTCTCAGGTTAAACCAACAGAAAGCTC
 GAGAAGCTATATGCTGTGTACAGTGAAGCGCAACCGATTCAGAAATGCTGTAGAGT
 GAAGCCACAGATGCTTACCACTTGAAGAACTGGTTATGCTTACCTGCTGGAATTC
 AAGGGCTACTTGAAGAGCAATGATCTGCTGCTTAAAGCTGAAATGCTGCTATCT
 CTGTGATACATGGCTGGCTGCTCTGGTGGCTGGCTTGGCGCCGGCGGTGTATCGCC
 CCGCCCTGGGCGGGCAAGGCTGGCCCGGTGGGACCAAGTTGGGTGAGCGGAAAGATG
 GCGGCTTCCCGGCCCTGCTGCAAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGCGGCTCGGGAG
 AGCGGGCGGGTGAGTCAACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCGGTCTTCAGCCGTC
 GCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGGTCCAGGCACCTCGATTAGTT

Figura 22B

CTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCCTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGA
 GTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTA
 ATTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTGGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAG
 ACAGTGGTTCAAAGTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAAAAGCTAGTGGCGGC
GCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAAGATCTGTGTGTGTGGTTTTTGTGTGTCTAGAC
 ATGGCTACGTAGATAATTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAG
 TGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGAC
 CAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG
 CGCNNNNNNCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC
 AGTTGCCGAGCCTGAATGGCGAATGGAAGTTCCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTA
 GGTATTTCCATGAGCGTTTTCTGTGTGCAATGGCTGGCGGTAAATATGTCTCTGGATA
 TTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTCTCTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTA
 ATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTCG
 GTGGCCTCACTGATTATAAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCTGTCTA
 AAATCCCTTTAATCGGCCCTCCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCA
 CGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC
 GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC
 GCGCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTCGCCGTC
 AAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTAGTGATTACGGCACCTCG
 ACCCCAAAAAAGTTGATTAGGGTGATGGTTACGTAAGTGGGCCATCGCCCTGATAGA
 CGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTCCA
 AACTGGAAACAACACTCAACCCATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTG
 CCGATTTCGGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTTAACCGGAAT
 TTTAACAAAAATTTAACGTTTACAATTTAAATATTTTGCTTATACAATCTTCTGTGTTT
 TGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATT
 ACCGTTTCATCGATTCTCTTGTGTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTT
 GTAGAGACCTCTCAAAAAATAGCTACCCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGG
 TTGAATATCATATTGATGGTGATTGACTGTCTCCGGGCTTTCTCACCCGTTTGAATC
 TTTACCTACACATTACTCAGGCATTTGCAATTTAAAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTT
 TATCCTTGGCTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTT
 TTTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATT
 CTTTGCCCTGCCCTGTATGATTATTGGATGTTGGAAGTTCTGATGCCGTATTTCTC
 CTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCT
 CTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACCGGCCCT
 GACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGA
 GCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCCGAGACGAAAGGGC
 CTCGTGATACGCCATTTTTATAGGTTAATGTGATGATAATAATGGTTTCTTAGACGT
 CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAAT
 ACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATA
 TTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACATTTCGGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTT
 GCGGCATTTTGCTTCTGTGTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGAT
 GCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACACCGG
 TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTT

Figura 22C

TTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGA
 CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACACTATICTCAGAATGACTTGCTTGA
 GTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT
 GCAGTGCCTGCCATAAACCATGAGTGATAAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGA
 TCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTCACACAACATGGGGGATCATGTAACCTC
 GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAAACGACGAGCGTGAC
 ACCACGATGCGCTGTAGCAATGCCAACACCGTTGCGCAAACTATTAACGGCGAACT
 ACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGGCGGATAAAAGTTGC
 AGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGG
 AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
 CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGA
 AATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACCTGTCAGAC
 CAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGA
 TCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTC
 GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTT
 TTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCACCGGTGGT
 TTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAG
 AGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAA
 GAACTCTGTAGCACCGCGTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGC
 TGCCAGTGGCGATAAGTTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA
 TAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGC
 GAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACG
 CTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAG
 GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACCGCTGGTATCTTTATAGTCTCTGC
 GGGTTTCCGCACCTCTGACTTGAGCGTCCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGG
 AGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGCGGCTTTTACCGTTCTTGGCCTTTTGTCTGG
 CCTTTTGTCTACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCGTGGATAACCGTATTAC
 CGGGTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
 CAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC