

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 146**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2010 E 10723980 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2435582**

54 Título: **Biomarcadores de miARN para el diagnóstico de distrofia muscular y su progresión**

30 Prioridad:

**25.05.2009 EP 09161038**

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

**18.02.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "LA  
SAPIENZA" (100.0%)  
Piazzale Aldo Moro, 5  
00185 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**BOZZONI, IRENE;  
MARTONE, JULIE;  
CACCHIARELLI, DAVIDE y  
GIRARDI, ERIKA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 443 146 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

Biomarcadores de miARN para el diagnóstico de distrofia muscular y su progresión

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método para el diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) y trastornos degenerativos musculares relacionados por medio de detección en suero o bióptica de una clase específica de miARN.

10 **Antecedentes**

Deleciones y mutaciones puntuales en el gen de distrofina larga de 2,5 Mb humano provocan la miopatía progresiva grave Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) o la más leve Distrofia Muscular de Becker (BMD), dependiendo de si el marco de lectura de la traducción se pierde o se mantiene. En la Distrofia Muscular de Duchenne, la completa ausencia de distrofina conduce a una reducción drástica del Complejo de Proteína Asociada a Distrofina (DAPC) requerido para conectar los microfilamentos de actina intracelulares con la matriz extracelular (Matsumura *et al.*, 1994; Ervasti *et al.*, 2008). En consecuencia, las fibras musculares se hacen más sensibles al daño mecánico lo que conduce a degeneración muscular, respuesta inflamatoria crónica y aumento en fibrosis, todos los cuales empeoran el fenotipo distrófico. Todos estos rasgos están atenuados en pacientes aquejados de distrofia de Becker que tienen un fenotipo miopático muy leve.

Haciendo uso de la estrategia de omisión de exones los autores mostraron que es posible rescatar la síntesis de distrofina en mioblastos de DMD humanos (De Angelis *et al.*, 2002) así como en ratones de Duchenne (*mdx*) (Denti *et al.*, 2006). Se demostró que este tratamiento no solamente rescata los parámetros moleculares sino que también proporciona un fuerte beneficio morfofuncional a los músculos: de hecho, la examinación histológica de ratones tratados con omisión de exones reveló un mantenimiento significativo del fenotipo muscular en comparación con compañeros de camada no tratados *mdx*. En particular, mientras los ratones *mdx* mostraban infiltración inflamatoria masiva y degeneración, los músculos curados presentaron una morfología tisular correcta y fuerte reducción en fibrosis (Denti *et al.*, 2006). Este efecto fue aún más evidente en animales viejos: las fibras seniles de *mdx* mostraron una reducción prominente en el número de músculos con mionecrosis intensiva, mientras que en ratones *mdx* tratados con omisión de exones resultó evidente la conservación del fenotipo muscular con una clara reducción de la inflamación y el tejido fibrótico (Denti *et al.*, 2008).

En la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), la deficiencia en distrofina también da como resultado cardiomiopatía dilatada, que se desarrolla independientemente de los defectos patológicos en el músculo esquelético y representa una causa importante de mortalidad y una diana terapéutica importante. En particular, aunque los ratones *mdx* pocas veces presentan anomalías cardíacas, muestran necrosis miocárdica e inflamación en la edad senil. Se mostró que el tratamiento de omisión de exones mejoraba también el fenotipo cardíaco. Aunque el músculo cardíaco de ratones *mdx* envejecidos mostró grandes áreas de fibrosis e infiltración mononuclear, el corazón de los ratones *mdx* tratados de forma sistémica se conservó histológicamente con reducción significativa en la acumulación de fibrosis (Denti *et al.*, 2008).

En trabajos posteriores los autores descubrieron que la distrofina, además de su función estructural, también es capaz de alterar el patrón de expresión de un subconjunto específico de genes de miARN relevantes para la diferenciación muscular (Chen *et al.*, 2006; Eisenberg *et al.*, 2007) y la morfología tisular apropiada (Van Rooij *et al.*, 2008); descubrieron que esta regulación estaba mediada por una ruta dependiente de distrofina que afecta a la actividad de la enzima de remodelación HDAC2, sugiriendo de este modo una conexión directa entre la distrofina y la reprogramación génica mediante alteración de la identificación epigenética.

Además, los autores realizaron los perfiles de las variaciones en el patrón de expresión de miARN en animales de tipo silvestre frente a DMD/ *mdx* y tratados con omisión de exones y descubrieron que los miARN específicos podían ser diagnósticos para evaluar el estado de daño del tejido muscular.

Como parte de la presente invención los autores han descubierto que, como consecuencia del daño muscular, se liberan miARN musculares específicos al suero y que su abundancia es proporcional al alcance del daño tisular.

Callis *et al.*, Eisenberg *et al.*, McCarthy *et al.*, y Yuasa *et al.*, desvelan todos miARN como marcadores para trastornos distróficos musculares en muestras musculares.

60 **Descripción de la invención**

En este trabajo, los autores identificaron una identificación específica de miARN (moléculas que se sabe que desempeñan funciones cruciales en el compromiso de diferenciación de varios tipos celulares y que están implicadas en muchos procesos patofisiológicos) que se correlacionaban con la patología de la DMD. Describieron que existe un perfil de expresión de miARN diferente entre las células de tipo silvestre y Duchenne (tanto DMD

humana como ratones *mdx*). Además, el análisis del perfil de miARN en células en las que se ha rescatado la distrofina mediante el enfoque de omisión de exones indicó la existencia de una clase específica de miARN que se controla directamente por la distrofina, siendo alguno de ellos importantes para la diferenciación y regeneración muscular. Se descubrió que un grupo diferente de miARN cambiaba como consecuencia del beneficio del tratamiento terapéutico después del rescate de distrofina; esta clase incluye miARN de diagnóstico de los procesos inflamatorios y fibróticos.

Las diferencias observadas en los niveles de expresión de ambas clases de miARN (distromiR) pueden utilizarse como biomarcadores para evaluar la gravedad/progresión de la enfermedad en pacientes humanos así como para medir los resultados de intervenciones terapéuticas. Al considerar su conexión con la degeneración muscular proponen que estos miARN también pueden ser diagnóstico de otros tipos de trastornos musculares en los que se produce degeneración de las fibras musculares con efectos secundarios posteriores tales como inflamación y fibrosis.

Además, los autores pudieron medir alteraciones del perfil de distromiR directamente en las muestras de suero de una manera cuantitativa y rápida.

Son distromiR relevantes:

- **miR-223.** Se expresa en células inflamatorias y se sabe que la inflamación es muy relevante en músculos de Duchenne. Tras el rescate de distrofina los valores se corrigen a niveles casi de tipo silvestre debido al efecto beneficioso del rescate de distrofina en la integridad tisular.
- **miR-29 y miR-30.** Se regulan negativamente en músculos *mdx* y esto provoca el aumento en fibrosis.
- **miR-206.** Se expresa en células satélite activadas y sus niveles se correlacionan con la cantidad de fibras que se regeneran. Aumentan en músculos distróficos en paralelo con el daño muscular. Sus niveles también son altos después de la omisión de exones, puesto que en estas condiciones la regeneración muscular aún está muy activa. Los niveles de miR-206 aumentan en el suero de ratones distróficos y pacientes con DMD humana; se rescatan casi a los niveles de wt en ratones tratados con tratamiento de omisión de exones.
- **miR-1 y miR-133.** Son marcadores de la diferenciación muscular. Su acumulación se reduce en músculos distróficos mientras que se restauran tras el rescate de distrofina. Los niveles de miR-1 aumentan en el suero de ratones distróficos y pacientes con DMD humana; se rescatan casi a niveles de wt en ratones tratados con tratamiento de omisión de exones.

Es un objeto de la presente invención un método para el diagnóstico de un trastorno muscular en el que se produce degeneración de las fibras musculares en un sujeto que consiste en determinar *in vitro* si:

- al menos una molécula que pertenece al siguiente grupo: miR-206 y miR-1 o
- la molécula miR-133

tiene niveles aumentados en una muestra de sangre o suero del sujeto en comparación con una muestra obtenida de un individuo sano. Otro objeto de la presente invención es un método para controlar el progreso de un tratamiento terapéutico de un trastorno muscular en el que se produce degeneración de las fibras musculares en un sujeto aquejado que consiste en detectar *in vitro*:

- al menos una molécula que pertenece al siguiente grupo: miR-206 y miR-1 o
- la molécula miR-133

en una muestra de sangre o suero del sujeto, en la que la muestra del sujeto tiene niveles aumentados de uno cualquiera de dichos marcadores al comienzo del tratamiento, en comparación con una muestra de un individuo de control. Preferentemente el trastorno muscular es Distrofia Muscular de Duchenne.

En una realización preferida del método de la invención las moléculas son miR-206 y miR-1. La detección de al menos una molécula que pertenece al siguiente grupo:

miR-206

y miR-1, o de la molécula miR-133 se realiza preferentemente por amplificación inversa de dicha molécula y detección en tiempo real de productos amplificados.

### Leyendas de las figuras

**Figura 1. Análisis de morfología muscular en animales de tipo silvestre, *mdx* y tratados con omisión de exones.** (A) Representación esquemática de la estrategia de omisión de exones en el ratón *mdx*. (B) transferencia de Western con anticuerpos anti distrofina (DYS) y anti tubulina (TUB) realizado en extractos proteicos del gastrocnemio de animales WT, *mdx* y *mdx* tratados con AAV N° 23 sacrificados 4 semanas después de la inyección sistémica del virus AAV-U1 N° 23. Tinción con Hematoxilina/Eosina (H y E) en WT, *mdx* y *mdx* tratados con AAV N° 23 analizada después de 4 semanas (C) o 18 meses (D). Ampliación original, X20. La barra de escala es de 100  $\mu$ m.

**Figura 2. Perfiles de miARN** (A) transferencia de Western con anticuerpos anti distrofina (DYS) y antitubulina

(TUB) realizada en extractos proteicos del gastrocnemio de animales WT, *mdx* y *mdx* tratados con AAV N° 23 (G1, G2 y G3) sacrificados 4 semanas después de la inyección sistémica del virus AAV-U1 N° 23. (B) una lista de miARN expresados diferencialmente (al menos una variación de 1,5 veces), en gastrocnemio WT y *mdx*, derivó de los valores de matrices de baja densidad basadas en tiempo real. Al considerar la heterogeneidad celular del músculo distrófico, los inventores distinguieron tres grupos de miARN (Caja B1-B3). Los miARN, rescatados hacia niveles de WT en ratones tratados con omisión de exones, están subrayados. Los asteriscos indican familias de miARN. (C) los histogramas muestran la expresión relativa de miARN en ratones WT, G1-G3 y *mdx*, medida por qRT-PCR. Los miR-23a y miR-27a invariables se usaron como controles. Los niveles de expresión se normalizaron a ARNpno55 y se mostraron con respecto a WT ajustado a un valor de 1. (D) transferencia de Western con anticuerpos antidistrofina (DYS) y anti tubulina (TUB) en extractos proteicos de mioblastos con DMD humana infectados con el vector lentiviral LV N° 51 (LV N° 51) o un vector de control (simulación de LV) y diferenciados durante 7 días. (E) niveles de miARN en células con DMD de control (simulación de LV) y tratadas con antisentido (LV N° 51) medidos por qRT-PCR. Se usó ARNpn U6 como control endógeno. Se muestran los niveles de expresión relativos con respecto a células con DMD infectadas con simulación, ajustados a un valor de 1. (F) Los histogramas muestran la expresión relativa de miARN en pacientes sanos (Ctrl) frente a con Duchenne (DMD) y Becker (BMD), medida por qRT-PCR. Los niveles de expresión se normalizaron a ARNpn U6 y se mostraron con respecto a un control sano ajustado a un valor de 1.

**Figura 3. Expresión de miR-206** (A) Se hibridó una sonda marcada con miR-1 DIG en secciones de gastrocnemio WT y *mdx*. Ampliación original, X20. Barra de escala 100  $\mu$ m. (B) Se hibridó una sonda marcada con miR-206 DIG en secciones de gastrocnemio *mdx*. Se muestra la tinción de DAPI. Ampliación original, X20. Barra de escala 100  $\mu$ m. (C) Igual que en B) con ampliación original, X40. Barra de escala 50  $\mu$ m. (D) Transferencia de Northern para miR-206 y ARNpno55 en ARN de células satélite en proliferación (GM - medio de cultivo) y después del cambio a medio de diferenciación durante las horas indicadas.

**Figura 4. Expresión de miARN en sangre y suero.** (A) Los histogramas muestran la expresión relativa de miR-206 y miR-1 en sangre y suero total de ratones WT (barras blancas) y *mdx* (barras negras) y *mdx* tratados con AAV N° 23 (barras grises), medida por qRT-PCR. Los factores de cambio se muestran con respecto a los niveles en suero de WT ajustados a un valor de 1. (B) Los histogramas muestran la expresión relativa de miR-206 y miR-1 en suero de pacientes con Duchenne (DMD) y Becker (BMD) de diferentes edades en comparación con sus controles sanos (Ctrl). Los factores de cambio se muestran con respecto a niveles en suero de WT ajustados a un valor de 1.

## Materiales y métodos

### Secuencia de miARN que se analiza

Los miARN maduros a continuación muestran conservación de secuencia perfecta entre ser humano y ratón. La secuencia madura del miARN no enumerada puede encontrarse en la base de datos pública de miARN ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)).

miR- 1: uggaauguaaagaaguau (SEC ID N°: 1, MI0000651) (la misma secuencia de miARN madura deriva de los dos genes de miARN (miR- 1- 1 y miR- 1- 2).

miR- 206: uggaauguaaggaugugugg (SEC ID N°: 2, MI0000490)

miR- 223: ugucaguuugucaauacccca (SEC ID N°: 3, MI0000300)

miR- 29a: uagcaccaucugaaucgguaa (SEC ID N°: 4, MI0000087)

miR- 29b1/2: uagcaccuuugaaucaguuu (SEC ID N°: 5, MI0000105)

miR- 29c: uagcaccuuugaaucgguaa (SEC ID N°: 6, MI0000735)

La familia del miR-29 incluye miR-29<sup>a</sup>, miR-29b1/2 y miR-29c (cada uno producido a partir de un locus específico). Cuando se indican los niveles de expresión de miR-29, los valores presentados son el resultado medio de los tres miARN maduros. Además en este caso la misma secuencia de miARN madura puede derivar de diferentes localizaciones genómicas (genes miR-29b-1 y miR-29b-2).

miR-133a1/2: uuuggucccucaaccagcug (SEC ID N°: 7, MI0000450)

miR-133b: uuuggucccucaaccagcua (SEC ID N°: 8, MI0000822)

La familia del miR-133 incluye miR-133a1/2 y miR-133b (cada uno producido a partir de un locus específico). Cuando se indican los niveles de expresión de miR-133, los valores presentados son el resultado medio de los dos miARN maduros. Además en este caso la misma secuencia de miARN madura puede derivar de diferentes localizaciones genómicas (genes miR- 133a- 1 y miR- 133a- 2).

miR- 30c1/2: uguaacaucacucucagc (SEC ID N°: 9, MI0000736).

Los miARN añadidos usados como controles de carga fueron ath-mir-159a (MI0000189), cel-mir-2 (MI0000004), cel-lin-4 (MI0000002).

**Tratamientos de animales y construcciones.** Se inyectó a ratones *mdx* de 6 semanas de edad en la vena de la cola  $0,5-1 \times 10^{12}$  copias del genoma del AAV-U1 N° 23 (AAV N° 23) o virus como se ha descrito previamente (Denti *et al.*, 2006) y se sacrificaron después de 4 semanas.

**Preparación y análisis del ARN.** Se preparó ARN total de tejidos o células pulverizados en nitrógeno líquido homogeneizados en reactivo QIAzol (QIAGEN). Se realizó el perfil de miARN como se describe posteriormente mientras que el análisis de miARN y ARNm individuales se realizó usando ensayos específicos de TaqMan (Applied Biosystems) o SYBRgreen (QIAGEN). Se realizó cuantificación relativa de los miARN individuales usando ARNpno55 o ARNpn U6.

Se extrajo ARN total de 200- 400 µl de suero humano con miRNeasy (QIAGEN). Se realizó extracción de ARN con o sin mimético de miARN con adiciones (QIAGEN) (ath-mir-159a, cel-mir-2 e cel-lin-4) añadido a reactivo de quiazol (QIAGEN) antes de la extracción. Se realizó retrotranscripción de ARN y cuantificación de miARN con sistemas tanto Taqman (Applied Biosystems) como SYBRgreen (mirscript QIAGEN) de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes. Se realizó cuantificación relativa usando controles sanos como muestras de referencia y miARN con adiciones para normalizar la cantidad de material de partida y ADNc usados en análisis a tiempo real. Los ID de los ensayos de miARN usados en análisis en tiempo real fueron:

15 QIAGEN:

Hs\_miR-223\_1 (MS00003871)  
 Hs\_miR-206\_1 (MS00003787)  
 Hs\_miR-1\_1 (MS00008358)  
 20 Hs\_miR-29c\_1 (MS00003269)  
 Hs\_miR-133b\_1 (MS00007385)  
 Hs\_miR-133a\_1 (MS00007378)  
 Hs\_miR-29b\_1 (MS00006566)  
 Hs\_miR-29a\_1 (MS00003262)  
 25 Hs\_miR-30c\_2 (MS00009366)  
 ath- mir- 159a (ath- mir-159a\_ 9)  
 cel- mir- 2 (cel-mir-2\_5)  
 cel- lin- 4 (cel-lin-4\_3)

30 BIOSISTEMAS APLICADOS:

Hs\_miR-223 (002295)  
 Hs\_miR-206 (000510)  
 Hs\_miR-1 (002222)  
 35 Hs\_miR-29c (000587)  
 Hs\_miR-133b (002247)  
 Hs\_miR-133a (002246)  
 Hs\_miR-29b (000413)  
 Hs\_miR-29a (002112)  
 40 Hs\_miR-30c (000419)  
 ath-mir-159a (000338)  
 cel-mir-2 (000195)  
 cel-lin-4 (000258)

45 **Perfiles de miARN y análisis de datos.** Para sintetizar ADNc monocatenario, se transcribieron de forma inversa 700 ng de ARN total usando el kit de transcripción inversa de miARN en combinación con el grupo de cebadores RT A Megaplex de tallo-lazo (Applied Biosystem). Se realizaron los perfiles de 335 ARN pequeños usando la Matriz de Baja Densidad TaqMan de Applied Biosystems. Puesto que se mostró que las variaciones de manipulación de líquidos e instrumentos eran mínimas, no se midieron repeticiones de PCR de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se calcularon los valores de Ct sin tratar usando el software SDS V.2.3 y los datos se analizaron posteriormente mediante la plataforma StatMiner de acuerdo con los planes del fabricante. Se aplicó el algoritmo StatMiner Genorm para determinar los mejores controles endógenos invariables en una lista de 5.

55 **Análisis *in situ* de proteínas y miARN.** Se realizó transferencia de Western en extractos totales, tinción de H y E y análisis *in situ* en criosecciones de gastrocnemio de 7 µm de grosor como se ha descrito (Denti *et al.*, 2006). Se realizó hibridación *in situ* de miARN en criosecciones de gastrocnemio fijado con formaldehído y EDC de acuerdo con Pena *et al.* (2009).

60 **Análisis estadísticos.** Cada dato mostrado en qRT-PCR es el resultado de al menos tres experimentos independientes realizados en al menos tres muestras/animales diferentes. Los datos se muestran como la media ± desviación típica. A no ser que se indique específicamente, la significación estadística de las diferencias entre las medias se evaluó por ensayo de t de dos colas y se consideró significativa una  $p < 0,05$ .

## Resultados

Se inyectó a animales *mdx* de 6 semanas de edad en la vena de la cola virus recombinantes AAV (AAV- U1 N° 23) que portaban una construcción antisentido quimérica U1 (Figura 1A) que se ha indicado previamente que inducen la omisión del exón mutado 23 del gen de la distrofina murina y que restauran la síntesis de distrofina (Denti *et al.*, 2006 y 2008). Después de 1 mes, se sacrificaron compañeros de camada *mdx* y *mdx* tratados en paralelo con animales de edad coincidente/isogénicos de tipo silvestre (WT). Se diseccionaron diferentes distritos musculares y se subdividieron para análisis de ARN y proteínas. Se obtuvo rescate de distrofina (Denti *et al.*, 2006 y Fig. 1B-D). Los inventores aprovecharon la variabilidad intrínseca de la transducción *in vivo*, después del suministro sistémico (Denti *et al.*, 2006), para clasificar a los animales basándose en los niveles de rescate de distrofina. Se obtuvieron tres grupos diferentes, incluyendo cada uno al menos tres individuos diferentes (G1, G2 y G3); en comparación con ratones de tipo silvestre, presentan  $\leq 1$  %, 1-5 % y 5-10 % de rescate de distrofina, respectivamente (Figura 2A). Incluso si estos niveles parecen muy bajos para conferir cualquier efecto beneficioso, se demostró que cantidades tan bajas como un pequeño porcentaje son capaces de conferir beneficios de larga vida a los músculos *mdx* (Denti *et al.*, 2008; Ghahramani Seno *et al.*, 2008). El rescate de distrofina fue comparable a la mejora morfológica del músculo transducido (Figura 1C).

Se realizaron matrices de baja densidad basadas en tiempo real en ARN del gastrocnemio de animales de tipo silvestre, *mdx*, y *mdx* tratados con AAV-U1 N° 23. Los niveles de expresión del miARN, normalizados para 5 controles endógenos, revelaron claras diferencias entre WT y *mdx*. En el diagrama de la Figura 2B, se indican los miARN que presentan las variaciones más significativas (factor de cambio  $> 1,5$ ) entre WT y *mdx*. Conscientes de la heterogeneidad celular del músculo distrófico, se realizó un análisis de perfil en paralelo en mioblastos con DMD humana. Las diferencias relevantes entre el animal y los mioblastos diferenciados cultivados *in vitro* se debieron a que los miARN pertenecen a tipos celulares distintos de los musculares (caja B2 y B3) y, en particular como se esperaba para una fibra distrófica dañada, a miARN relacionados con el proceso inflamatorio (caja B2, Fazi *et al.*, 2005; Baltimore *et al.*, 2008). Entre los otros, el grupo B1 contiene miARN en común entre mioblastos cultivados y músculos diseccionados. Los miARN subrayados identifican las especies que en *mdx* tratados con AAV-U1 N° 23 se recuperan a niveles similares al WT. Resulta interesante que este efecto fue proporcional a los niveles del rescate de distrofina mostrando los animales G1 un efecto muy limitado y proporcionando G3 niveles muy cercanos a los de tipo silvestre. Se realizaron qRT-PCR individuales en miARN B1 y en una selección de miARN de control. Los miR-1, miR-133a, miR-186, miR-29c y miR-30c, que mostraban niveles reducidos en *mdx*, se recuperan hacia niveles de tipo silvestre en los tres grupos de animales tratados proporcionalmente con el nivel de rescate de distrofina (Figura 2C). A diferencia de miR-1 y miR-133, los niveles de miomiR, miR-206 aumentan en ratones *mdx* y tratados. Resulta interesante que miR-29 y miR-30 se correlacionan de forma inversa con el estado fibrótico del músculo. De hecho se ha mostrado que reprime la traducción de ARNm para proteínas de la matriz extracelular (van Rooij *et al.*, 2008).

Resulta interesante que el miR-223 específico inflamatorio (Fazi *et al.*, 2005), muy abundante en *mdx*, se reduce proporcionalmente en los tres grupos diferentes de animales, lo que indica el alivio del estado inflamatorio del músculo debido al rescate de distrofina (véase figura 1B-D y Denti *et al.*, 2008). Los miR-23a y 27a ubicuos, sin cambios en WT y *mdx*, se comportaron de forma similar también en animales tratados. La expresión relativa de los miARN seleccionados en animales WT, *mdx* y G3 fue igual también en otros distritos musculares (no mostrado), lo que demuestra que el perfil de expresión de miARN se correlaciona con el rescate de distrofina en todo el cuerpo.

Estos datos indican que un subconjunto específico de miARN experimenta expresión alterada en Distrofia Muscular de Duchenne como consecuencia directa de la ausencia de distrofina, mientras que un subconjunto diferente varía como consecuencia del daño a las fibras.

Estos experimentos clasifican una nueva conexión entre la distrofina y genes importantes que codifican miARN que actúan como reguladores de la diferenciación y morfología de tejido muscular. Además, el patrón alterado de la expresión de miARN en DMD puede extenderse a otros trastornos musculares en los que el complejo DAPC está ausente o alterado (tal como en distrofia muscular de cinturas). Estos datos también apoyan la hipótesis de que el beneficio morfofuncional observado en animales tratados con *mdx* con omisión de exones (Denti *et al.*, 2008) puede no deberse solamente a la mejora estructural de la membrana muscular sino también a una cascada intracelular de acontecimientos que controlan la expresión de genes relevantes para la homeostasis muscular apropiada.

Entre los miARN que varían como consecuencia del daño a las fibras se seleccionó el miomiR-206 para investigaciones adicionales. Se realizaron análisis de hibridación *in situ* en músculo gastrocnemio WT y *mdx* usando sondas marcadas con DIG: se encontraron niveles aumentados de miR-206 en fibras musculares/miotubos de nueva formación (Figura 3B y 3C). La señales para miR-206 se restringieron a *mdx* y solamente en fibras en regeneración inmaduras con núcleos centralizados mientras que la sonda miR-1, mostró acumulación intensa en fibras diferenciadas maduras en fibras tanto WT como *mdx* (Figura 3A). Por lo tanto, el aumento de la expresión de miR-206 en músculos *mdx* se debe a células satélite en diferenciación (Figura 3D). Estos datos sugieren un papel de miR-206 en la regeneración activa y maduración eficaz de fibras del músculo esquelético.

Finalmente, se ensayó la posibilidad de que, como consecuencia del daño muscular, pudieran liberarse a la sangre miARN musculares específicos. Se realizó qRT-PCR en sangre y suero de animales de tipo silvestre frente a

distróficos. La Figura 4A indica que se encuentran miR-206 y miR-1 a niveles mucho mayores (aumento de 30 y 15 veces respectivamente) en el suero de animales *mdx* con respecto a los de tipo de silvestre. En animales tratados con omisión de exones se detectaron niveles normales de distromir también en la sangre, por lo tanto los autores demuestran que puede utilizarse medición de miARN también durante la intervención terapéutica de DMD para seguir el beneficio del tratamiento. También se realizó cuantificación de miR-206 y miR-1 en suero humano de chicos con Duchenne y Becker. El aumento de ambos miomiR se detecta específicamente en pacientes con Duchenne con respecto a sus hermanos/hermanas sanos. Además, los niveles de miomiR son mayores en pacientes jóvenes (6 años de edad) con respecto a mayores (18 años de edad) lo que es coherente con los mayores niveles de degeneración/regeneración observados en la primera década de vida de estos pacientes.

Estos resultados indican que, como consecuencia del daño muscular, se liberan miARN expresados específicamente en estas células a la sangre en la que se acumulan en una forma estable y proporcionalmente al grado del daño. Por lo tanto, esta característica puede utilizarse como un modo sencillo y no invasivo para evaluar el nivel del daño muscular. Resulta interesante que el mismo enfoque puede extenderse a otras enfermedades en las que el daño muscular es una causa principal o un efecto secundario.

## Referencias

- Baltimore, D., *et al.* MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat. Immunol.* 9: 839-45 (2008).
- CALLIS THOMAS E *ET AL*: "Muscling through the microRNA world." *EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE* (MAYWOOD, N. J.) FEB 2008, vol. 233, Nº 2, Febrero 2008 (2008-02), páginas 131-138, XP002532418 ISSN: 1535-3702
- Chen J.F. *et al.* (2006) The role of mic/roRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 38: 228-33.
- De Angelis F., *et al.* (2002) Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin premRNA induce exon skipping and restoration of a corrected phenotype in  $\Delta$ 48-50 DMD cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 9456-61.
- Denti, M. A., *et al.* Body-wide gene therapy of Duchenne Muscular Dystrophy in the *mdx* mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3758-3763 (2006).
- Denti M. A., *et al.* Life-long benefit of AAV/anti-sense-mediated exon skipping in dystrophic mice. *Hum. Gene Ther*-19: 601-608 (2008).
- Eisenberg, I., *et al.* Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 17016-17021 (2007).
- Ervasti, J. M., Sonnemann, K. J. Biology of the striated muscle dystrophin-glycoprotein complex. *Int Rev Cytol.* 265: 191-225 (2008).
- Fazi, F., *et al.* A mini-circuitry comprising microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP $\alpha$  regulates human granulopoiesis. *Cell* 123: 819-831 (2005).
- Ghahramani Seno, M. M., *et al.* RNAi-mediated knockdown of dystrophin expression in adult mice does not lead to overt muscular dystrophy pathology. *Hum. Mol. Genet.* 17: 2622-2632 (2008).
- Lee, Y., *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23: 4051- 4060 (2004)
- Matsumura, K., *et al.* Expression of dystrophin-associated proteins in dystrophin-positive muscle fibers (revertants) in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 4: 115-120 (1994).
- MCCARTHY JOHN J *ET AL*: "MicroRNA-206 is overexpressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of *mdx* mouse" *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - CELL PHYSIOLOGY*, vol. 293, Nº 1, julio de 2007 (07-2007), páginas C451-C457, XP002532417 ISSN: 0363-6143
- 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).
- YUASA KATSUTOSHI *ET AL*: "MicroRNA-206 Is Highly Expressed in Newly Formed Muscle Fibers: Implications Regarding Potential for Muscle Regeneration and Maturation in Muscular Dystrophy" *CELL STRUCTURE AND FUNCTION*, vol. 33, Nº 2, 2008, páginas 163-169, XP002532415 ISSN: 0386-7196

## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Università degli Studi di Roma "La Sapienza"
- <120> BIOMARCADORES DE miARN PARA EL DIAGNÓSTICO DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE, SU PROGRESIÓN Y PARA CONTROLAR LAS INTERVENCIONES TERAPÉUTICAS
- <130> PCT109052
- <160> 9
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 22

	<212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 1 uggaauguaa agaaguaugu au	22
10	<210> 2 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 2 uggaauguaa ggaagugugu gg	22
20	<210> 3 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 3 ugucaguuug ucaaaauaccc ca	22
30	<210> 4 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 4 uagcaccauc ugaaaucggu ua	22
40	<210> 5 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 5 uagcaccuu ugaaucagu guu	23
50	<210> 6 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 6 uagcaccuu ugaaaucggu ua	22
60	<210> 7 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<400> 7 uuugguuccc uucaaccagc ug	22
	<210> 8 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8 uuugguuccc uucaaccagc ua	22
	<210> 9 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	

# ES 2 443 146 T3

<400> 9  
uguaaacauc cuacacucuc agc 23

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para el diagnóstico de un trastorno muscular en el que se produce degeneración de las fibras musculares en un sujeto, que consiste en determinar *in vitro* si:
- al menos una molécula que pertenece al siguiente grupo: miR-206 y miR-1 o
  - la molécula miR-133
- 10 tiene niveles aumentados en una muestra de sangre o de suero del sujeto cuando se compara con una muestra obtenida de un individuo sano.
- 15 2. Un método para controlar el progreso de un tratamiento terapéutico en un trastorno muscular en el que se produce degeneración de las fibras musculares en un sujeto aquejado, que consiste en detectar *in vitro*:
- al menos una molécula que pertenece al siguiente grupo: miR-206 y miR-1 o
  - la molécula miR-133
- 20 en una muestra de sangre o de suero del sujeto,  
en donde la muestra del sujeto tiene niveles aumentados de uno cualquiera de dichos marcadores al comienzo del tratamiento, en comparación con una muestra de un individuo de control.
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que dicho trastorno muscular es Distrofia Muscular de Duchenne.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que las moléculas son miR-206 y miR-1.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la detección de al menos una molécula se realiza por amplificación inversa de dicha molécula y detección en tiempo real de productos amplificados.



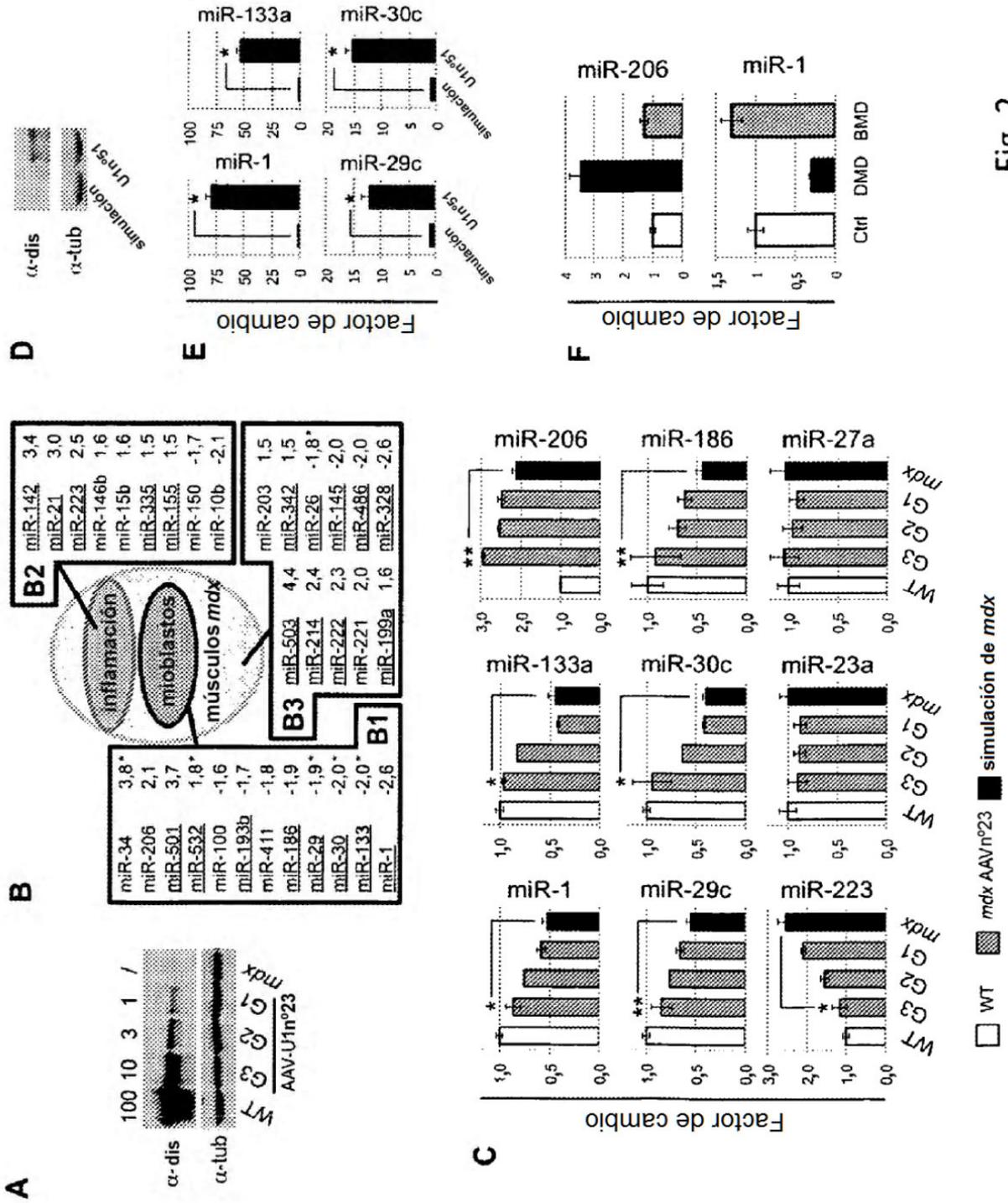


Fig. 2

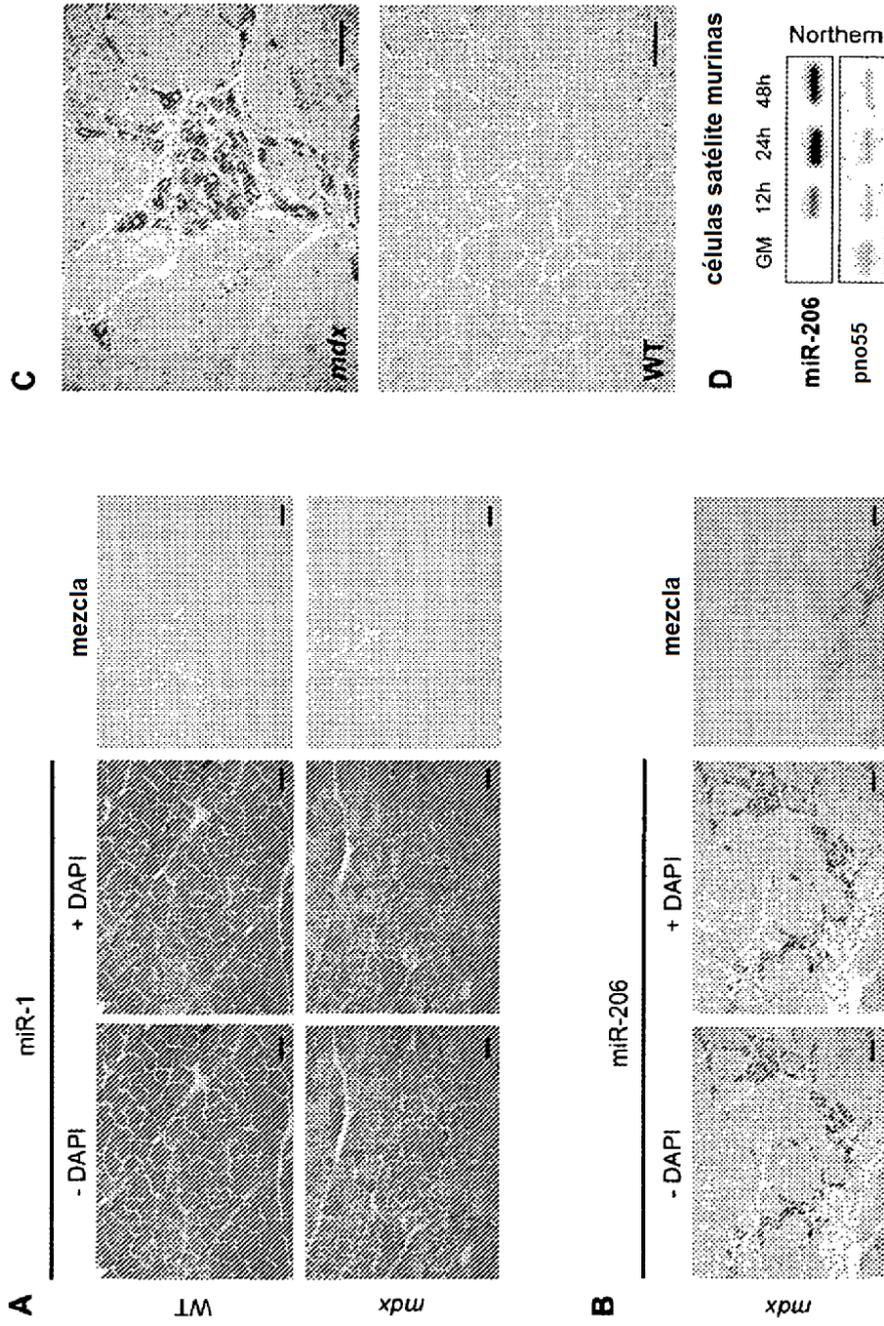


Fig. 3

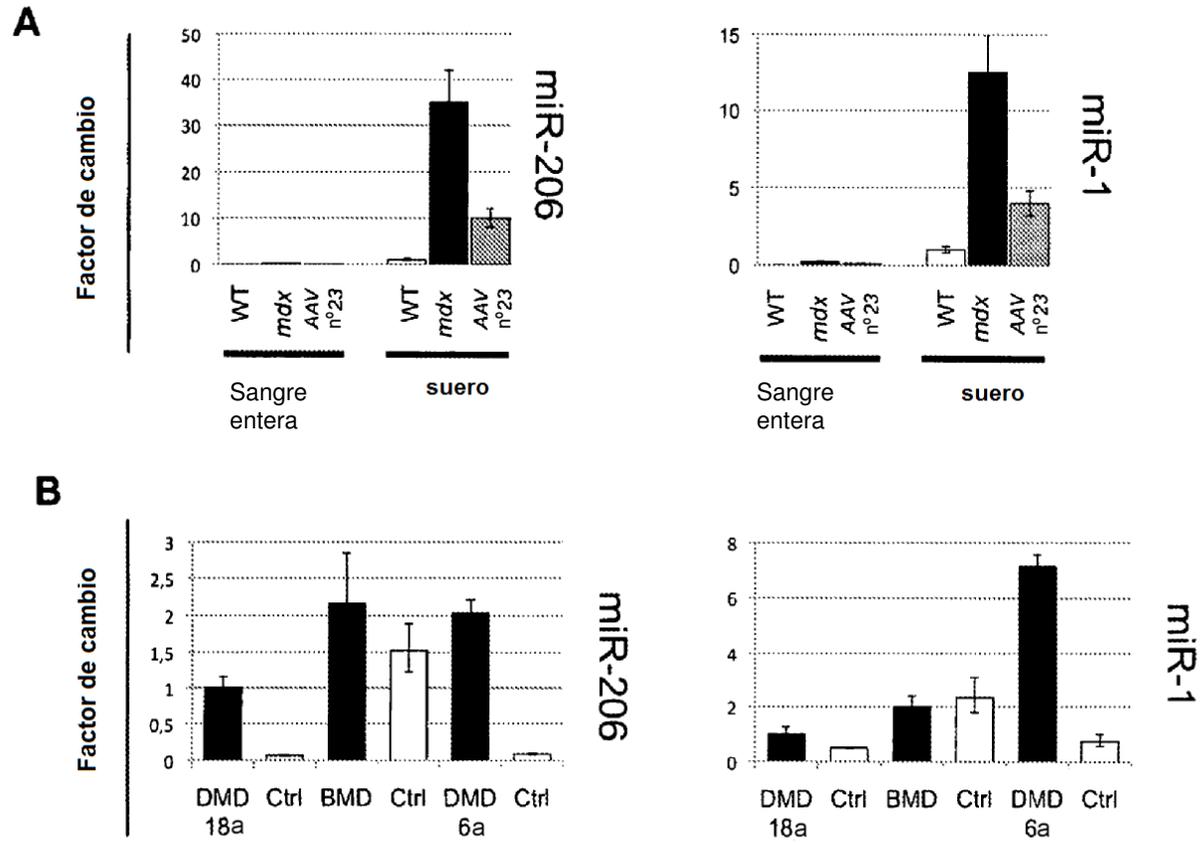


Fig. 4