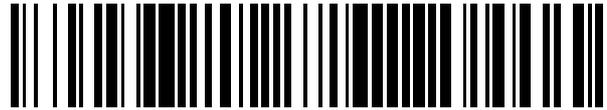


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 057**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2010 PCT/US2010/038703**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010 WO10148010**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2010 E 10790070 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2443155**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de la miopatía miotubular usando polipéptidos quiméricos que comprenden polipéptidos de miotubularina 1 (mtm1)**

30 Prioridad:

15.06.2009 US 268732 P

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

17.08.2017

73 Titular/es:

**VALERION THERAPEUTICS, LLC (100.0%)
100 Main Street, Suite 110
Concord, MA 01742, US**

72 Inventor/es:

ARMSTRONG, DUSTIN, D.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 630 057 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

Métodos y composiciones para el tratamiento de la miopatía miotubular usando polipéptidos quiméricos que comprenden polipéptidos de miotubularina 1 (mtm1)

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La miopatía miotubular (MTM) es un raro y grave trastorno muscular ligado al cromosoma X que se presenta con una incidencia estimada de 1 varón por cada 50 000 nacimientos. La miopatía miotubular forma parte de una categoría de enfermedades a las que se denomina miopatías centronucleares. Una característica esencial de las miopatías centronucleares es que el núcleo se sitúa en el centro de muchas de las células musculares del individuo afectado, en lugar de en su posición normal en los extremos de estas células. Aunque las miopatías centronucleares comparten este signo característico, las diversas enfermedades tienen diferentes causas, afectan a diferentes poblaciones de pacientes y tienen una progresión y un pronóstico de la enfermedad únicos.

15

La miopatía miotubular es causada por una deficiencia de la proteína miotubularina 1 (MTM1), una fosfoinosítido fosfatasa (Bello AB et al., Human Molecular Genetics, 2008, Vol. 17, No. 14). En el nacimiento, los pacientes con MTM presentan hipotonía severa y dificultad respiratoria y aquellos que sobreviven al periodo neonatal frecuentemente son total o parcialmente dependientes de soporte ventilatorio (Taylor GS et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Aug 1;97(16):8910-5; Bello AB et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23):15060-5; Pierson CR et al., Neuromuscul Disord. 2007 July; 17(7): 562-568; Herman GE et al., THE JOURNAL OF PEDIATRICS VOLUME 134, NUMBER 2). Los pacientes con MTM exhiben retardo en las etapas del desarrollo motor y son susceptibles a sufrir complicaciones tales como la escoliosis, maloclusión, estenosis pilórica, esferocitosis y cálculos biliares y renales, aunque el crecimiento lineal y la inteligencia son normales y la enfermedad sigue un curso no progresivo (Herman GE et al., THE JOURNAL OF PEDIATRICS VOLUME 134, NUMBER 2). La estancia hospitalaria promedio de pacientes neonatales con MTM es de ~90 días. Sin embargo, los pacientes que sobreviven requerirán asistencia ventilatoria y atención domiciliaria a largo plazo. El coste de los cuidados paliativos básicos, así como los costes asociados al tratamiento de las complicaciones médicas que surgen con frecuencia en pacientes con MTM, suponen una carga personal y económica sustancial a los pacientes y familias. La patente US7189396 describe métodos de transporte selectivo del anticuerpo monoclonal (mAb), 3E10, y fragmentos activos del mismo in vivo al núcleo de células de mamíferos sin efecto citotóxico.

20

RESUMEN DE LA INVENCION

Actualmente, no hay terapias para la MTM. El tratamiento se limita a la asistencia ventilatoria y otras formas de cuidado paliativo para intentar tratar las discapacidades asociadas a la enfermedad. La presente divulgación proporciona métodos y composiciones para el tratamiento de la MTM.

35

La presente divulgación proporciona polipéptidos quiméricos que comprenden un polipéptido de miotubularina (MTM1) o un fragmento bioactivo del mismo y un grupo internalizante, así como composiciones que comprenden los polipéptidos quiméricos en combinación con un vehículo farmacéutico. También se describen constructos útiles para la producción de tales polipéptidos quiméricos. Además, la presente divulgación da a conocer métodos de fabricación de los polipéptidos quiméricos y los constructos que los codifican. Adicionalmente, en el presente documento se describen métodos de uso de los polipéptidos quiméricos, por ejemplo, para manipular la actividad fosfatasa en una célula y como parte de un tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas a la mutación o deficiencia de MTM1.

45

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un polipéptido quimérico que comprende (i) un polipéptido de miotubularina (MTM1) o un fragmento bioactivo del mismo y (ii) un grupo internalizante. En ciertos aspectos, el polipéptido quimérico tiene actividad fosfoinosítido fosfatasa. Es decir, el polipéptido quimérico tiene la capacidad de escindir o hidrolizar una molécula de fosoinosítido fosforilada. En ciertos aspectos, un sustrato para el polipéptido quimérico es el PI3 o PIP3. En ciertos aspectos, el grupo internalizante favorece el transporte de dicho polipéptido quimérico al interior de las células musculares. En otras palabras, el grupo internalizante ayuda al tránsito efectivo y eficiente del polipéptido quimérico a través de las membranas celulares. En algunos aspectos, el grupo internalizante transita a través de las membranas celulares por medio de un transportador ENT2. En otras palabras, el grupo internalizante favorece el transporte del polipéptido quimérico a través de las membranas celulares por medio de un transportador ENT2.

50

55

En ciertos aspectos, el polipéptido MTM1 descrito en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N°: 1, o un fragmento bioactivo de la misma. En algunos

60

aspectos, el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a un polipéptido MTM1 (tal como los polipéptidos MTM1 representados por uno o más de las SEC ID N°: 1, 6, 8, o un fragmento bioactivo de cualquiera de los anteriores). En ciertos aspectos, el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a un polipéptido MTM1 representado por la SEC ID N°: 1. En ciertos aspectos, cualquiera de los polipéptidos MTM1 anteriores o siguientes descritos en el presente documento y para uso en un polipéptido quimérico además comprenden una o más porciones de polipéptido que mejoran una o más de la estabilidad in vivo, la semivida in vivo, la captación/administración y/o la purificación. En ciertos aspectos, cualquiera de los polipéptidos MTM1 anteriores o siguientes y/o polipéptidos quiméricos pueden además incluir uno o más epítomos marcadores. Tales epítomos marcadores pueden estar unidos al polipéptido MTM1 y/o al grupo internalizante. Cuando está presente más de un epítomo marcador (por ejemplo, 2, 3, 4), los epítomos pueden ser iguales o diferentes.

En algunos aspectos, el grupo internalizante de cualquiera de los polipéptidos quiméricos anteriores comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En ciertos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En ciertos aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la SEC ID N°: 4. En ciertos aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la SEC ID N°: 2. En ciertos aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno que comprende: un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la SEC ID N°: 4 y un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la SEC ID N°: 2. La invención contempla específicamente grupos internalizantes basados en cualquier combinación de las cadenas VH y VL anteriores, por ejemplo, un grupo internalizante que comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 98 % idéntica a la SEC ID N°: 2 y una VL al menos un 96 % idéntica a la SEC ID N°: 4. En ciertos aspectos, el grupo internalizante comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID N°: 2 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID N°: 4. Tal y como se detalla en el presente documento, los dominios VH y VL puede estar incluidos como parte de un anticuerpo de longitud completa o como parte de un fragmento, tal como un scFv. Asimismo, los dominios VH y VL pueden estar unidos mediante un conector o pueden estar unidos directamente. En cualquier caso, los dominios VH y VL pueden estar unidos en cualquier orientación (por ejemplo, con el extremo N-terminal del dominio VL al dominio VH o con el extremo N-terminal del dominio VH al dominio VL).

En ciertos aspectos, cualquiera de los polipéptidos quiméricos anteriores se puede producir por conjugación química del polipéptido MTM1, o un fragmento bioactivo del mismo, al grupo internalizante. En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos anteriores se pueden producir recombinantemente para conjugar recombinantemente el polipéptido MTM1, o un fragmento bioactivo del mismo, al grupo internalizante. Por ejemplo, el polipéptido quimérico se puede producir usando un vector recombinante que codifica tanto el polipéptido MTM1 como el grupo internalizante. En algunos aspectos, el polipéptido quimérico se produce en una célula procarionota o eucariota. Por ejemplo, la célula eucariota se puede seleccionar de entre una célula de levadura, una célula aviar, una célula de insecto o una célula de mamífero. Nótese que para los aspectos en los que el polipéptido MTM1 está conjugado químicamente al grupo internalizante, la divulgación contempla que el polipéptido MTM1 y/o el grupo internalizante se pueden producir recombinantemente.

En algunos aspectos, el polipéptido MTM1 o un fragmento bioactivo del mismo se pueden conjugar o unir (ya sea químicamente o recombinantemente) al grupo internalizante mediante un conector. En otros aspectos, el polipéptido MTM1 o un fragmento bioactivo del mismo se pueden conjugar o unir directamente al grupo internalizante. Por ejemplo, un polipéptido quimérico conjugado recombinantemente se puede producir como una fusión en el marco de la porción MTM1 y la porción del grupo internalizante. En ciertos aspectos, el conector puede ser un conector escindible. En cualquiera de los aspectos anteriores, el grupo internalizante se puede conjugar (directamente o por medio de un conector) al aminoácido N-terminal o C-terminal del polipéptido MTM1. En otros aspectos, el grupo internalizante se puede conjugar (directamente o indirectamente) a un aminoácido interno del polipéptido MTM1. Nótese que las dos porciones del constructo están conjugadas/unidas entre sí. A menos que se especifique lo contrario, la descripción del polipéptido quimérico como una conjugación de la porción MTM1 al grupo internalizante se usa de forma equivalente que una conjugación del grupo internalizante a la porción MTM1. En ciertos aspectos, un conector une una o más porciones del grupo internalizante, tales como un dominio VH y VL de un anticuerpo. La invención contempla el uso de 0 conectores, 1 conector, 2 conectores y más de dos conectores. Cuando se usa más

de 1 conector, los conectores pueden ser iguales o diferentes.

En ciertos aspectos, cualquiera de los polipéptidos quiméricos anteriores se puede formular como composiciones formuladas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertos aspectos, las composiciones se formulan para 5 administración intravenosa.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona polipéptidos quiméricos que comprenden la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID N°: 11 o la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID N°: 11, pero en ausencia de uno ambos epítomos marcadores. Tales polipéptidos quiméricos, así como cualquiera de los 10 polipéptidos quiméricos descritos en el presente documento, se pueden usar en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

En lo que respecta a los polipéptidos quiméricos, la invención contempla todas las combinaciones de cualquiera de los aspectos anteriores y aspectos, así como combinaciones con cualquiera de los aspectos descritos en la 15 descripción detallada y los ejemplos. Además, cualquiera de los polipéptidos quiméricos de la divulgación puede usarse en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un constructo de ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MTM1 o un fragmento bioactivo del mismo, conectado operativamente a 20 una secuencia de nucleótidos que codifica un grupo internalizante. En ciertos aspectos, el constructo de ácido nucleico codifica un polipéptido quimérico que tiene actividad fosfoinosítido fosfatasa. En ciertos aspectos, el grupo internalizante se dirige a las células musculares para favorecer el transporte al interior de las células musculares. En otros aspectos, el grupo internalizante transita a través de las membranas celulares por medio de un transportador ENT2.

En algunos aspectos, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MTM1 comprende una secuencia de nucleótidos al menos un 90% idéntica a la SEC ID N°: 5. En ciertos aspectos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de nucleótidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una o más de las SEC ID N°: 5, 7, o 9. En ciertos aspectos, la secuencia de 30 nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MTM1 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una o más de las SEC ID N°: 1, 6, o 8. En ciertos aspectos, la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MTM1 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEC ID N°: 1.

En ciertos aspectos, los constructos de ácido nucleico también pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un conector.

En ciertos aspectos, el grupo internalizante puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende cualquiera de las composiciones de polipéptidos quiméricos o constructos de ácido nucleico anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertos aspectos, la composición también puede comprender un segundo agente que actúa de forma adicional o sinérgica para tratar la miopatía miotubular, para tener un efecto bioactivo del MTM1 45 en las células, y/o para favorecer el transporte al interior de las células. El segundo agente puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un polipéptido, un anticuerpo, un oligonucleótido antisentido o una molécula de ARNip.

En lo que respecta a los constructos de ácido nucleico, la invención contempla todas las combinaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, así como combinaciones con cualquiera de las formas de realización descritas 50 en la descripción detallada y los ejemplos.

En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de la miopatía miotubular en un sujeto que necesita del mismo, que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva de cualquiera de los polipéptidos quiméricos o constructos de ácido nucleico anteriores. En ciertos aspectos, el método comprende 55 la administración de un polipéptido quimérico, polipéptidos que comprenden: (i) un polipéptido MTM1 o un fragmento bioactivo del mismo y (ii) un grupo internalizante que favorece el transporte de dicho polipéptido quimérico al interior de las células musculares. En ciertos aspectos, el polipéptido quimérico tiene actividad fosfoinosítido fosfatasa. En ciertos aspectos, el sujeto es un humano. En otros aspectos, el sujeto se selecciona de entre un ratón, una rata o un primate no humano.

60

En algunos aspectos, el grupo internalizante transita a través de las membranas celulares por medio de un transportador ENT2. En otras palabras, el grupo internalizante favorece el transporte al interior de las células por medio de un transportador ENT2. En ciertos aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En ciertas formas de realización, el grupo internalizante comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

En ciertos aspectos, el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N°: 1, o un fragmento bioactivo de la misma. En algunos aspectos, el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a un polipéptido MTM1 (tal como los polipéptidos MTM1 representados en una o más de las SEC ID N°: 1, 6, 8, o un fragmento bioactivo de cualquiera de los anteriores).

En algunos aspectos, cualquiera de los polipéptidos quiméricos anteriores se puede formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos para uso en el método reivindicado se pueden conjugar (por ejemplo, químicamente o recombinantemente) tal y como se describe en el presente documento.

En ciertos aspectos, cualquiera de los métodos anteriores también puede comprender una segunda terapia que actúe de forma adicional o sinérgica para el tratamiento de la miopatía miotubular. En algunos aspectos, la segunda terapia puede ser un fármaco para ayudar a aliviar uno o más síntomas de la miopatía miotubular, o una terapia física u otra terapia no farmacológica para tratar o ayudar a aliviar uno o más síntomas de la miopatía miotubular. Las terapias no farmacológicas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, la terapia ventilatoria, la terapia ocupacional, la acupuntura y los masajes.

En algunos aspectos, cualquiera de los polipéptidos quiméricos anteriores se puede administrar por una vía de administración adecuada, por ejemplo, sistémicamente, localmente o intravenosamente. En ciertos aspectos, el polipéptido quimérico se administra intravenosamente por medio de inyección en bolo o infusión.

En lo que respecta a los métodos de tratamiento de la miopatía miotubular, la divulgación contempla todas las combinaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, así como combinaciones con cualquiera de las formas de realización descritas en la descripción detallada y los ejemplos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de liberación *in vitro* de un polipéptido quimérico o un constructo de ácido nucleico en el interior de una célula por medio de un transportador equilibrador de nucleósidos (ENT2), que comprende la puesta en contacto de una célula con un polipéptido quimérico o un constructo de ácido nucleico. En ciertos aspectos, el método comprende la puesta en contacto de una célula con un polipéptido quimérico, polipéptido quimérico que comprende un polipéptido MTM1 o un fragmento bioactivo del mismo y un grupo internalizante que media el transporte a través de una membrana celular por medio de un ENT2, liberando de ese modo el polipéptido quimérico en el interior de la célula. En ciertos aspectos, la célula es una célula muscular.

En ciertos aspectos, el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N°: 1, o un fragmento bioactivo de la misma. En algunas formas de realización, el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a un polipéptido MTM1 (tal como los polipéptidos MTM1 representados en una o más de las SEC ID N°: 1, 6, 8, o un fragmento bioactivo de cualquiera de los anteriores).

En ciertos aspectos, el polipéptido MTM1 puede además comprender una o más porciones de polipéptido que mejoran una o más de la estabilidad *in vivo*, la semivida *in vivo*, la captación/administración y/o la purificación. En otras formas de realización, el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En otras formas de realización, el grupo internalizante comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos para uso en el método se pueden producir por conjugación química del polipéptido MTM1, o un fragmento bioactivo del mismo, al grupo internalizante. En algunos aspectos, el polipéptido quimérico se puede producir recombinantemente para conjugar recombinantemente el polipéptido MTM1, o un fragmento bioactivo del mismo, al grupo internalizante. En ciertas formas de realización, los polipéptidos quiméricos para uso en el método reivindicado se pueden conjugar (por ejemplo, químicamente o recombinantemente) tal y como se describe en el presente documento.

En lo que respecta a los métodos de liberación de un polipéptido quimérico en el interior de una célula por medio de un transportador equilibrador de nucleósidos (ENT2), la divulgación contempla todas las combinaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, así como combinaciones con cualquiera de las formas de realización descritas en la descripción detallada y los ejemplos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de liberación de un polipéptido quimérico en el interior de una célula muscular, que comprende la puesta en contacto de una célula muscular con un polipéptido quimérico o un constructo de ácido nucleico. En ciertos aspectos, el método comprende la puesta en contacto de la célula muscular con un polipéptido quimérico, polipéptido quimérico que comprende un polipéptido MTM1 o un fragmento bioactivo del mismo y un grupo internalizante que favorece el transporte al interior de las células musculares, liberando de ese modo el polipéptido quimérico en el interior de la célula muscular. En ciertos aspectos, el grupo internalizante favorece el transporte por medio de un transportador equilibrador de nucleósidos (ENT2).

En ciertos aspectos, el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N°: 1, o un fragmento bioactivo de la misma. En algunos aspectos, el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a un polipéptido MTM1 (tal como los polipéptidos MTM1 representados en una o más de las SEC ID N°: 1, 6, 8, o un fragmento bioactivo de los mismos).

En ciertos aspectos, el polipéptido MTM1 puede además comprender una o más porciones de polipéptido que mejoran una o más de la estabilidad in vivo, la semivida in vivo, la captación/administración y/o la purificación. En otros aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En otros aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

En algunos aspectos, el polipéptido quimérico de cualquiera de los métodos anteriores se puede producir por conjugación química del polipéptido MTM1, o un fragmento bioactivo del mismo, al grupo internalizante. En otros aspectos, el polipéptido quimérico se puede producir recombinantemente para conjugar de recombinantemente el polipéptido MTM1, o un fragmento bioactivo del mismo, al grupo internalizante. En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos para uso en el método reivindicado se pueden conjugar (por ejemplo, químicamente o recombinantemente) tal y como se describe en el presente documento.

En lo que respecta a los métodos de liberación de un polipéptido quimérico en el interior de una célula por medio de un transportador equilibrador de nucleósidos (ENT2), la invención contempla todas las combinaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, así como combinaciones con cualquiera de las formas de realización descritas en la descripción detallada y los ejemplos.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un método de liberación de un polipéptido en un sujeto con necesidad del mismo, que comprende la administración a un sujeto con necesidad del mismo de un polipéptido quimérico o un constructo de ácido nucleico. En ciertos aspectos, el método comprende la administración de un polipéptido quimérico, polipéptido quimérico que comprende un polipéptido MTM1 o un fragmento bioactivo del mismo y un grupo internalizante que favorece el transporte al interior de las células musculares, liberando de ese modo el polipéptido quimérico en el interior de la célula muscular. En ciertos aspectos, el grupo internalizante favorece el transporte por medio de un transportador ENT2.

En ciertos aspectos, el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N°: 1, o un fragmento bioactivo de la misma. En algunas formas de realización, el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a un polipéptido MTM1 (tal como los polipéptidos MTM1 representados en una o más de las SEC ID N°: 1, 6, 8, o un fragmento bioactivo de los mismos).

En ciertos aspectos, el polipéptido MTM1 puede además comprender una o más porciones de polipéptido que mejoran una o más de la estabilidad in vivo, la semivida in vivo, la captación/administración y/o la purificación. En otros aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En otros aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

En algunos aspectos, el polipéptido quimérico de cualquiera de los métodos anteriores se puede producir por conjugación química del polipéptido MTM1, o un fragmento bioactivo del mismo, al grupo internalizante. En otros

aspectos, el polipéptido quimérico se puede producir recombinantemente para conjugar de recombinantemente el polipéptido MTM1, o un fragmento bioactivo del mismo, al grupo internalizante. En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos para uso en el método reivindicado se pueden conjugar (por ejemplo, químicamente o recombinantemente) tal y como se describe en el presente documento.

5

En ciertos aspectos, el sujeto de cualquiera de los métodos anteriores puede ser un humano. En algunos aspectos el método de suministro puede ser, por ejemplo, por vía parenteral o intravenosa. En ciertos aspectos, el polipéptido quimérico se administra intravenosamente, por ejemplo, por medio de inyección en bolo o infusión.

10 En lo que respecta a los métodos de suministro de un polipéptido quimérico al interior de las células musculares, la invención contempla todas las combinaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, así como combinaciones con cualquiera de las formas de realización descritas en la descripción detallada y los ejemplos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar la bioactividad del MTM1 en una célula muscular, que comprende la puesta en contacto de una célula muscular con un polipéptido quimérico, polipéptido quimérico que comprende un polipéptido MTM1 o un fragmento bioactivo del mismo y un grupo internalizante que favorece el transporte al interior de las células musculares, aumentando de ese modo la bioactividad del MTM1 en la célula muscular. En ciertos aspectos, el grupo internalizante favorece el transporte por medio de un transportador ENT2.

20

En ciertos aspectos, el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N°: 1, o un fragmento bioactivo de la misma. En algunos aspectos, el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a un polipéptido MTM1 (tal como los polipéptidos MTM1 representados en una o más de las SEC ID N°: 1, 6, 8, o fragmentos bioactivos de cualquiera de los anteriores).

25

En ciertos aspectos, el polipéptido MTM1 puede además comprender una o más porciones de polipéptido que mejoran una o más de la estabilidad in vivo, la semivida in vivo, la captación/administración y/o la purificación. En otros aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En otros aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

30

En otros aspectos, el polipéptido quimérico para uso en cualquiera de los métodos anteriores se puede producir por conjugación química del polipéptido MTM1, o un fragmento bioactivo del mismo, al grupo internalizante. En otros aspectos, el polipéptido quimérico se puede producir recombinantemente para conjugar de recombinantemente el polipéptido MTM1, o un fragmento bioactivo del mismo, al grupo internalizante.

35

En algunos aspectos, la bioactividad del MTM1 incluye, por ejemplo, actividad fosfoinosítido fosfatasa del MTM1, o asociación del MTM1 con una proteína endosomal, o ambas. En ciertos aspectos, la actividad fosfoinosítido es al menos el 50 % de la del MTM1 nativo, o al menos el 80 % de la de MTM1 nativo. En otros aspectos, la actividad fosfoinosítido es al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100% de la del MTM1 nativo. La bioactividad se puede evaluar en comparación con la de un control.

40

En lo que respecta a los métodos de aumento de la bioactividad del MTM1 en las células, la invención contempla todas las combinaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, así como combinaciones con cualquiera de las formas de realización descritas en la descripción detallada y los ejemplos. Los métodos anteriores basados en la administración de polipéptidos quiméricos o en la puesta en contacto de las células con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a un polipéptido MTM1 (tal como los polipéptidos MTM1 representados por una o más de las SEC ID N°: 1, 6, 8, o fragmentos bioactivos de cualquiera de los anteriores).

50

En ciertos aspectos, el polipéptido MTM1 puede además comprender una o más porciones de polipéptido que mejoran una o más de la estabilidad in vivo, la semivida in vivo, la captación/administración y/o la purificación. En otros aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En otros aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede ser un anticuerpo monoclonal 3E10, o una variante del mismo que retenga la actividad de penetración celular del 3E10, o un fragmento de unión al antígeno del 3E10, o dicha variante del 3E10. Adicionalmente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede ser un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se una al mismo epítipo que el 3E10, o un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que tenga sustancialmente la misma actividad de penetración celular

55

60

que el 3E10, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. aspecto

En otros aspectos, el polipéptido quimérico para uso en cualquiera de los métodos anteriores se puede producir por conjugación química del polipéptido MTM1, o un fragmento bioactivo del mismo, al grupo internalizante. En otros aspectos, el polipéptido quimérico se puede producir recombinantemente para conjugar de recombinantemente el polipéptido MTM1, o un fragmento bioactivo del mismo, al grupo internalizante.

En algunos aspectos, la bioactividad del MTM1 incluye, por ejemplo, actividad fosfoinosítido fosfatasa del MTM1, o asociación del MTM1 con una proteína endosomal, o ambas. En ciertos aspectos, la actividad fosfoinosítido es al menos el 50 % de la del MTM1 nativo, o al menos el 80 % de la de MTM1 nativo. En otros aspectos, la actividad fosfoinosítido es al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100% de la del MTM1 nativo. La bioactividad se puede evaluar en comparación con la de un control.

En lo que respecta a los métodos de aumento de la bioactividad del MTM1 en las células, la invención contempla todas las combinaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, así como combinaciones con cualquiera de los aspectos expuestos en la descripción detallada y los ejemplos. Los métodos anteriores basados en la administración de polipéptidos quiméricos o en la puesta en contacto de células con polipéptidos quiméricos se pueden realizar in vitro (por ejemplo, en células o cultivos) o in vivo (por ejemplo, en un paciente o modelo animal). En ciertos aspectos, el método es un método in vitro. En ciertos aspectos, el método es un método in vivo.

En otros aspectos, la presente divulgación también proporciona un método de producción de cualquiera de los polipéptidos quiméricos anteriores tal y como se describe en el presente documento. Además, la presente divulgación contempla cualquier número de combinaciones de los métodos y composiciones anteriores.

La divulgación contempla todas las combinaciones de cualquiera de los aspectos anteriores y aspectos, así como combinaciones con cualquiera de los aspectos descritos en la descripción detallada y los ejemplos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental para evaluar la actividad fosfoinosítido fosfatasa, la asociación endosomal y la secreción de Fv3E10-GS3-hMTM1 conjugado genéticamente. Ciertos resultados pronosticados para los grupos de control se indican mediante "sí" o "no", "?" indica resultados que se deben medir. "+" o "-" indica la presencia o ausencia de un compuesto concreto en la muestra. "*" indica que el pronóstico está basado en la suposición de que las actividades fosfoinosítido fosfatasa serán función de la actividad endógena y dependiente del hMTM1.

Tabla 2. Diseño experimental para evaluar si Fv3E10-GS3-hMTM1 entra en las células por medio de transportadores ENT y se asocia con las proteínas endosomales. Véanse las anotaciones en la descripción de la Tabla 1. "*" indica que la muestra ha inmunoprecipitado y se ha detectado mediante inmunoelectrotransferencia solo si ha inmunoprecipitado en la Tabla 1, grupos 10 a 18. "*" indica que la predicción se basa en la suposición de que el conjugado genético no tiene defectos de asociación entre Vps34 y hMTM1.

Tabla 3. Plan de dosificación in vivo para 3E10-MTM1 conjugado químicamente y genéticamente. La dosificación planeada es de dos veces a la semana durante 20 semanas. La sangre y los tejidos se recogerán para inmunohistoquímica (IHQ), tinción de hematoxilina y eosina (H&E) y aislamiento de proteínas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las proteínas de la familia MTM se dividen en dos categorías básicas: los miembros de la familia que exhiben actividad fosfoinosítido fosfatasa y los miembros de la familia que se unen a fosfoinosítidos pero son catalíticamente inactivos. El MTM1, cuyas mutaciones derivan en miopatía miotubular, es catalíticamente activo y posee actividad fosfoinosítido fosfatasa. Algunos ejemplos de fosfoinosítidos que actúan como sustratos para el MTM1 incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)P), PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P₂, PI(4,5) P₂, PI(3,5) P₂, PI(3,4,5) P₃, así como compuestos fosfoinosítidos útiles para ensayos in vitro. En ciertos aspectos, el polipéptido quimérico es capaz de escindir o hidrolizar uno o más de los fosfoinosítidos anteriores. En ciertas formas de realización, el polipéptido quimérico es capaz de escindir o hidrolizar el PIP3.

La MTM1, así como otras proteínas relacionadas con las MTM (MTMRs) se agrupan individualmente o en heterodímeros en las vesículas endocíticas en diferentes etapas del transporte subcelular. La MTM1 se asocia con la MTMR12 e interacciona con otras proteínas endosomales tales como la GTPasa Rab5 y la PI 3-quinasa hVps34 por medio de la molécula adaptadora hVps15. Sin limitación teórica, las actividades diferenciales de reclutamiento y

oposición de la MTM1 PIP3 fosfatasa y la hVps34 PI-3 quinasa pueden coordinar la distribución temporal en la membrana de PI y PIP3 que dirige los patrones de tráfico intracelular de las vesículas endocíticas. Aunque otras proteínas relacionadas con las MTM poseen actividad fosfoinosítido fosfatasa, su localización subcelular no es lo suficientemente superpuesta a la de la MTM1 como para que sean incapaces de compensar funcionalmente la deficiencia de MTM1. La MTM1 se expresa de forma generalizada, aunque la ausencia de MTM1 en el músculo esquelético solo se justifica para la fisiopatología de la MTM (Taylor GS et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Aug 1;97(16):8910-5; Bello AB et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23):15060-5), y sugiere que la actividad fosfoinosítido fosfatasa de la MTM1 posee una función subcelular única que es particularmente crucial para el funcionamiento normal del músculo esquelético. Se cree que la MTM1 participa en el mantenimiento de la arquitectura longitudinal y transversal del sistema de túbulos T y, de ese modo, los defectos en la organización de estas estructuras afectarían al acoplamiento excitación-contracción y derivarían en la subsiguiente debilidad muscular y atrofia características de la enfermedad (Bello AB et al., Human Molecular Genetics, 2008, Vol. 17, No. 14; Laporte J et al., HUMAN MUTATION 15:393.409 (2000); Herman GE et al., THE JOURNAL OF PEDIATRICS VOLUME 134,NUMBER 2; Weisbart RH et al., J Immunol. 2000 Jun 1;164(11):6020-6).

En ciertos aspectos, la invención proporciona conjugados de MTM1 (por ejemplo, polipéptidos quiméricos que comprenden MTM1 o un fragmento bioactivo del mismo) que se pueden usar para tratar afecciones asociadas a la deficiencia de MTM1, por ejemplo, la miopatía miotubular. Los términos "polipéptido," "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido es un mimético químico artificial de un aminoácido presente naturalmente correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos presentes naturalmente y polímeros de aminoácidos no presentes naturalmente.

I. Polipéptidos MTM1

Tal y como se usan en el presente documento, los polipéptidos MTM1 incluyen diversas isoformas generadas mediante corte y empalme, variantes, proteínas de fusión y formas modificadas del polipéptido MTM1 de tipo salvaje. Tales isoformas, fragmentos bioactivos o variantes, proteínas de fusión y formas modificadas de los polipéptidos MTM1 tienen al menos una porción de la secuencia de aminoácidos de identidad de secuencia substancial con la proteína MTM1 nativa y retienen al menos una función de la proteína nativa MTM1. En ciertos aspectos, un fragmento bioactivo, variante, o proteína de fusión de un polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a un polipéptido MTM1 (tal como los polipéptidos MTM1 representados en una o más de las SEC ID N°: 1, 6, y 8). Tal y como se usa en el presente documento, "fragmentos" se entiende que incluyen fragmentos bioactivos o variantes bioactivas que exhiben "bioactividad" tal y como se describe en el presente documento. Es decir, los fragmentos bioactivos o variantes de MTM1 exhiben bioactividad que se puede medir y ensayar. Por ejemplo, los fragmentos bioactivos o variantes exhiben la misma, o sustancialmente la misma, bioactividad que la proteína MTM1 nativa (es decir, de tipo salvaje o normal), y tal bioactividad se puede evaluar mediante la capacidad del fragmento o variante para, por ejemplo, escindir o hidrolizar un sustrato fosfoinosítido endógeno conocido en la técnica, o un sustrato fosfoinosítido artificial para ensayos in vitro (es decir, una actividad fosfoinosítido fosfatasa), reclutar y asociarse con otras proteínas tales como, por ejemplo, la GTPasa Rab5, la PI 3-quinasa Vps34 o Vps15 (es decir, localización adecuada), o tratar la miopatía miotubular. En el presente documento se describen los métodos de evaluación de cualquiera de estos criterios. Tal y como se usa en el presente documento, "sustancialmente el/la/los/las mismo/a/os/as" se refiere a cualquier parámetro (por ejemplo, la actividad) que es al menos el 70 % de un control contra el que se mide el parámetro. En ciertos aspectos, "sustancialmente el/la/los/las mismo/a/os/as" también se refiere a cualquier parámetro (por ejemplo, la actividad) que es al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 102 %, 105 %, o 110 % de un control contra el que se mide el parámetro.

La estructura y los diversos motivos del polipéptido MTM1 se han caracterizado bien en la técnica (véase, por ejemplo, Laporte et al., 2003, Human Molecular Genetics, 12(2):R285-R292; Laporte et al., 2002, Journal of Cell Science 15:3105-3117; Lorenzo et al., 2006, 119:2953-2959). Por tanto, en ciertos aspectos, diversos fragmentos o variantes bioactivos de los polipéptidos MTM1 se pueden diseñar e identificar mediante cribado de los polipéptidos fabricados, por ejemplo, recombinantemente a partir del correspondiente fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido MTM1. Por ejemplo, varios dominios de la MTM1 han demostrado ser importantes para su actividad fosfatasa o localización. A modo ilustrativo, entre estos dominios se incluyen: la glucosiltransferasa, el activador GTPasa tipo Rab y las miotubularinas (GRAM; posiciones de aminoácidos 29-97 o superiores a 160 de la SEC ID N°: 1), dominio de reclutamiento inducido por Rac (RID; posiciones de aminoácidos 161-272 de la SEC ID N°: 1), homología PTP/DSP (posiciones de aminoácidos 273-471 de la SEC ID N°: 1; cisteína catalítica es el aminoácido 375 de la SEC ID N°: 1), dominio de interacción SET (SID; posiciones de aminoácidos 435-486 de la SEC ID N°: 1). En consecuencia, se puede construir cualquier combinación de tales dominios para identificar fragmentos o variantes

de la MTM1 que exhiban la misma, o substancialmente la misma, bioactividad que la MTM1 nativa. Los fragmentos bioactivos adecuados se pueden usar para fabricar polipéptidos quiméricos, y tales polipéptidos quiméricos se pueden usar en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

- 5 Los fragmentos ejemplares que se pueden usar como parte de un polipéptido quimérico incluyen, por ejemplo, aproximadamente los residuos 29-486 de la SEC ID N°: 1. Por consiguiente, en ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos comprenden los residuos 29-486 de la SEC ID N°: 1.

En ciertos aspectos, la porción MTM1 del polipéptido quimérico corresponde a la secuencia de la MTM1 humana.

- 10 Por ejemplo, la porción MTM1 del polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la SEC ID N°: 1.

Además, los fragmentos o variantes se pueden sintetizar químicamente usando técnicas conocidas en la técnica tales como la síntesis química en fase sólida f-Moc y t-Boc de Merrifield convencional. Los fragmentos o variantes se pueden producir (recombinantemente o mediante síntesis química) y ensayar para identificar aquellos fragmentos o variantes que pueden funcionar tan bien como, o de forma substancialmente similar a, la proteína MTM1 nativa, por ejemplo, ensayando su capacidad para escindir o hidrolizar un sustrato fosfoinosítido endógeno o un sustrato fosfoinosítido sintético (es decir, actividad fosfoinosítido fosfatasa), reclutar y/o asociarse con otras proteínas tales como, por ejemplo, la GTPasa Rab5, la PI 3-quinasa hVps34 o hVps15 (es decir, localización adecuada), o tratar la miopatía miotubular.

- En ciertos aspectos, la presente divulgación contempla la modificación de la estructura de un polipéptido MTM1 para propósitos tales como mejorar la eficacia terapéutica o profiláctica, o la estabilidad (por ejemplo, la semivida ex vivo y la resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Tales polipéptidos MTM1 tienen la misma o substancialmente la misma bioactividad que los polipéptidos MTM1 presentes naturalmente (es decir, nativos o tipo salvaje). Los polipéptidos modificados se pueden producir, por ejemplo, por sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar, por ejemplo, que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadoras) no tendrá un impacto importante en la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados por sus cadenas laterales.

- Esta invención además contempla la generación de conjuntos de mutantes combinatoriales de un polipéptido MTM1, así como mutantes por truncamiento, y es especialmente útil para la identificación de secuencias de variantes bioactivas. Se pueden generar variantes obtenidas combinatorialmente que tengan una potencia selectiva en comparación con un polipéptido MTM1 presente naturalmente. Del mismo modo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tengan semividas intracelulares drásticamente diferentes de las del polipéptido MTM1 de tipo salvaje. Por ejemplo, la proteína alterada se puede hacer más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que derivan en la destrucción o inactivación de la proteína que nos interesa. Tales variantes se pueden utilizar para alterar el nivel del polipéptido MTM1 mediante modulación de su semivida. Hay muchas formas de generar la biblioteca de potenciales secuencias de variantes de MTM1, por ejemplo, a partir de la secuencia de un oligonucleótido degenerado. La síntesis química de una secuencia genética degenerada se puede llevar a cabo en un sintetizador de ADN automático y, a continuación, los genes sintéticos se pueden ligar a un gen adecuado para su expresión. El propósito de un conjunto degenerado de genes es proporcionar, en una mezcla, todas las secuencias que codifican el grupo deseado de secuencias de polipéptidos potenciales. La síntesis de oligonucleótidos es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al., (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 198:1056; Ike et al., (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477). Tales técnicas han sido empleadas en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott et al., (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al., (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; así como las patentes: US5223409; US5198346; y US5096815.

- Alternativamente, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una biblioteca combinatorial. Por ejemplo, se pueden generar variantes del polipéptido MTM1 y aislarlas de una biblioteca mediante cribado usando, por ejemplo, mutagénesis por escaneo de alanina y similares (Ruf et al., (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al., (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; y Cunningham et al., (1989) *Science* 244:1081-1085), mediante mutagénesis de escaneo del conector (Gustin et al., (1993) *Virology* 193:653-660; Brown et al., (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight et

al., (1982) *Science* 232:316); mediante mutagénesis por saturación (Meyers et al., (1986) *Science* 232:613); mediante mutagénesis por PCR (Leung et al., (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); o mediante mutagénesis aleatoria, mutagénesis química incluida, etc. (Miller et al., (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; y Greener et al., (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34). La mutagénesis por escaneo del conector, particularmente en un entorno combinatorial, es un atractivo método para la identificación de formas truncadas (bioactivas) del polipéptido MTM1.

En la técnica se conocen un amplio rango de técnicas para el cribado de productos génicos de bibliotecas combinatoriales producidos mediante mutaciones y truncamientos puntuales, y, es más, para el cribado de genotecas de ADNc en busca de productos génicos que tienen una propiedad determinada. Generalmente, tales técnicas serán adaptables para permitir el cribado rápido de las genotecas génicas mediante mutagénesis combinatorial de los polipéptidos MTM1. Habitualmente, las técnicas más ampliamente usadas para cribar genotecas génicas grandes comprenden el clonado de la genoteca génica en vectores de expresión replicables, la transformación de las células adecuadas con la biblioteca de vectores resultante y la expresión de los genes combinatoriales bajo condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilite el relativamente fácil aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado. Cada uno de los ensayos ilustrativos descritos a continuación son susceptibles de análisis de alto rendimiento, según sea necesario, para cribar números altos de secuencias degeneradas creadas mediante técnicas de mutagénesis combinatorial.

En ciertos aspectos, un polipéptido MTM1 puede incluir un péptido y un peptidomimético. Tal y como se usa en el presente documento, el término "peptidomimético" incluye péptidos modificados químicamente y moléculas similares a los péptidos que contienen aminoácidos no presentes naturalmente, peptoides y similares. Los peptidomiméticos ofrecen diversas ventajas sobre los péptidos, entre las que se incluye una mayor estabilidad cuando se administran a un sujeto. Los métodos de identificación de un peptidomimético son bien conocidos en la técnica e incluyen el cribado de bases de datos que contienen bibliotecas de peptidomiméticos potenciales. Por ejemplo, la base de datos estructurales de Cambridge contiene una colección de más de 300 000 compuestos que tienen estructuras cristalinas conocidas (Allen et al., *Acta Crystallogr. Section B*, 35:2331 (1979)). Cuando la estructura de una molécula diana no está disponible, se puede generar una estructura usando, por ejemplo, el programa CONCORD (Rusinko et al., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 29:251 (1989)). Otra base de datos, el Directorio de Productos Químicos Disponibles (Molecular Design Limited, Informations Systems; San Leandro Calif.), contiene aproximadamente 100 000 compuestos que están disponibles en el mercado y también se puede buscar en ella para identificar peptidomiméticos potenciales de los polipéptidos MTM1.

En ciertos aspectos, un polipéptido MTM1 puede también comprender modificaciones postraduccionales. Las modificaciones postraduccionales ejemplares de proteínas incluyen la fosforilación, acetilación, metilación, ADP-ribosilación, ubiquitinación, glicosilación, carbonilación, sumoilación, biotinilación o la adición de una cadena lateral de un polipéptido o de un grupo hidrófobo. Como resultado, los polipéptidos MTM1 modificados pueden contener elementos que no sean aminoácidos, tales como lípidos, poli- o monosacáridos y fosfatos. Se pueden ensayar los efectos de tales elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido MTM1 en cuanto a su actividad biológica, por ejemplo, su capacidad para tratar la miopatía miotubular o su capacidad para escindir fosfoinosítidos (por ejemplo, PIP3). Dado que el polipéptido MTM1 nativo está glicosilado, en ciertos aspectos, un polipéptido MTM1 usado en un polipéptido quimérico de acuerdo con la presente divulgación está glicosilado. En ciertos aspectos, el nivel y patrón de glicosilación son los mismos o sustancialmente los mismos que los del polipéptido MTM1 nativo. En otros aspectos, el nivel y/o patrón de glicosilación difiere de el del polipéptido MTM1 nativo (por ejemplo, está subglicosilado, superglicosilado o no glicosilado).

En un aspecto específico de la presente divulgación, un polipéptido MTM1 se puede modificar con polímeros no proteínicos. En un aspecto específico, el polímero es el polietilenglicol ("PEG"), el polipropilenglicol o polioxialquilenos, tal y como se describe en las patentes US4640835; US4496689; US4301144; US4670417; US4791192 o US4179337. El PEG es un polímero hidrosoluble bien conocido que se encuentra disponible en el mercado o se puede preparar mediante polimerización por apertura de anillo del etilenglicol de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (Sandler and Karo, *Polymer Synthesis*, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161).

En ciertos aspectos, los fragmentos o variantes del polipéptido MTM1 retendrán preferentemente al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de la actividad biológica asociada al polipéptido MTM1 nativo. En ciertos aspectos, los fragmentos o variantes del polipéptido MTM1 tienen una semivida ($t_{1/2}$) mejorada en comparación con la semivida de la proteína nativa. Para los aspectos en los que la semivida está mejorada, la semivida de los fragmentos o variantes del MTM1 estará mejorada en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 % o 500 %, o incluso en un 1000

% en comparación con la semivida de la proteína MTM1 nativa. En algunos aspectos, la semivida de la proteína se determina *in vitro*, tal como en una solución salina tamponada o en suero. En otros aspectos, la semivida de la proteína es una semivida *in vivo*, tal como la semivida de la proteína en el suero u otro fluido corporal de un animal.

5 En ciertos aspectos, un polipéptido MTM1 puede ser una proteína de fusión que además comprende uno o más dominios de fusión. Entre los ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión se incluyen, pero no se limitan a, la polihistidina, Glu-Glu, la glutatión-S-transferasa (GST), la tioredoxina, la proteína A, la proteína G y una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina (Fc) y la proteína de unión a maltosa (MBP), que son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para los
10 propósitos de la purificación por afinidad, se usan matrices pertinentes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Los dominios de fusión también incluyen "epítomos marcadores", que normalmente son secuencias peptídicas cortas para las que hay anticuerpos monoclonales específicos fácilmente disponibles, se incluyen los epítomos FLAG, hemaglutinina (HA) del virus de la influenza y c-myc. En algunos casos,
15 los dominios de fusión tienen un sitio de escisión por proteasa, tal como el factor Xa o trombina, que permite que la proteasa pertinente digiera parcialmente las proteínas de fusión y de ese modo libere las proteínas recombinantes a partir de las mismas. Entonces, las proteínas liberadas se pueden aislar del dominio de fusión mediante separación cromatográfica posterior. En ciertos aspectos, los polipéptidos MTM1 pueden contener una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos. Por ejemplo, tales modificaciones mejoran la semivida de los
20 polipéptidos *in vitro*, mejoran la semivida en circulación de los polipéptidos o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos. Se debe tener en cuenta que cualquier porción de un polipéptido quimérico de la invención puede ser marcada por epítomo de forma similar. En otras palabras, un epítomo marcador puede ser para el MTM1 y/o el grupo internalizante. Asimismo, los polipéptidos quiméricos pueden comprender más de un epítomo marcador, tal como 2 epítomos marcadores, o pueden incluir 0 epítomos marcadores.

25 En algunos aspectos, una proteína MTM1 puede ser una proteína de fusión con toda o una porción de una región Fc de una inmunoglobulina. De forma similar, en ciertos aspectos, se puede usar toda o una porción de una región Fc de una inmunoglobulina como conector para conectar una proteína MTM1 a un grupo internalizante. Como se sabe, cada región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina comprende cuatro o cinco dominios. Los
30 dominios se denominan consecutivamente como se indica a continuación: CH1-bisagra-CH2-CH3(-CH4). Las secuencias de ADN de los dominios de cadena pesada tienen homología cruzada entre las clases de inmunoglobulinas, por ejemplo, el dominio CH2 de la IgG es homólogo al dominio CH2 de la IgA e IgD, y al dominio CH3 de la IgM e IgE. Tal y como se usa en el presente documento, el término "región Fc de inmunoglobulina" se entiende que significa la porción terminal carboxilo de una región constante de una cadena de inmunoglobulina,
35 preferentemente la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción de la misma. Por ejemplo, una región Fc de inmunoglobulina puede comprender 1) un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3, 2) un dominio CH1 y un dominio CH2, 3) un dominio CH1 y un dominio CH3, 4) un dominio CH2 y un dominio CH3, o 5) una combinación de dos o más dominios y una región bisagra de inmunoglobulina. En un aspecto preferido, la región Fc de inmunoglobulina comprende al menos una región bisagra de inmunoglobulina, un dominio
40 CH2 y un dominio CH3 y, preferentemente, le falta el dominio CH1. En un aspecto, la clase de inmunoglobulina a partir de la cual se deriva la región constante de la cadena pesada es IgG (Igy) (y subclases 1, 2, 3, o 4). Se pueden usar otras clases de inmunoglobulinas, IgA (Iga), IgD (Igd), IgE (Ige) e IgM (Igm). La elección de las regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina se trata en detalle en las patentes US5541087, y US5726044. La elección de secuencias concretas de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina de
45 determinadas clases y subclases de inmunoglobulinas para conseguir un resultado concreto se considera que entra dentro de las competencias del experto en la materia. La porción del constructo de ADN que codifica la región Fc de la inmunoglobulina comprende preferentemente al menos una porción de un dominio bisagra y, preferentemente, al menos una porción de un dominio CH3 de Fc y o los dominios homólogos de cualquiera de las IgA, IgD, IgE, o IgM. Además, se considera que la sustitución o delección de aminoácidos de las regiones constantes de la cadena pesada
50 de inmunoglobulina puede ser útil en la práctica de la invención. Un ejemplo sería la introducción de sustituciones de aminoácidos en la región CH2 superior para crear una variante Fc con una afinidad reducida por los receptores de Fc (Cole et al. (1997) J. IMMUNOL. 159:3613). Cualquier experto en la materia puede preparar tales constructos usando técnicas de biología molecular bien conocidas.

55 **II. Grupos internalizantes**

Tal y como se usa en el presente documento, el término "grupo internalizante" se refiere a un grupo capaz de interactuar con un tejido o tipo de célula diana para liberar la molécula adherida a la célula (es decir, penetrar en la célula deseada, transportarla a través de la membrana celular). En ciertos aspectos, esta invención se refiere a un
60 grupo internalizante que selectivamente, aunque no necesariamente de forma exclusiva, se dirige a y penetra en las

células musculares. En ciertos aspectos, el grupo internalizante tiene reactividad cruzada limitada y, por tanto, se dirige preferentemente a una célula o tipo de tejido concretos. En ciertos aspectos, entre los grupos internalizantes adecuados se incluyen, por ejemplo, los anticuerpos, los anticuerpos monoclonales o derivados o análogos de los mismos. Entre otros grupos internalizantes se incluyen, por ejemplo, los péptidos localizadores, las proteínas de fusión, los receptores, los ligandos, los aptámeros, los peptidomiméticos y cualquier miembro de un par de unión específico. En ciertos aspectos, el grupo internalizante media el tránsito a través de las membranas celulares por medio de un transportador ENT2.

(a) Anticuerpos

10 En ciertos aspectos, un grupo internalizante puede comprender un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal y un anticuerpo humanizado. Sin limitación teórica, tal anticuerpo puede unirse a un antígeno de un tejido diana y así mediar la liberación del polipéptido quimérico que nos ocupa al tejido diana (por ejemplo, el músculo). En algunos aspectos, los grupos internalizantes pueden comprender fragmentos de
15 anticuerpos, derivados o análogos de los mismos, incluyendo sin limitación: fragmentos Fv, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, anticuerpos de dominio sencillo, anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpos, así como versiones multivalentes de los anteriores. Los grupos internalizantes multivalentes incluyen sin limitación: anticuerpos monoespecíficos o biespecíficos, tales como fragmentos Fv estabilizados por puentes disulfuro, tándems scFv (fragmentos (scFv)₂), fragmentos scFv de
20 diacuerpos, tricuerpos o tetracuerpos, que están habitualmente unidos por enlaces covalentes o fragmentos scFv estabilizados de otra manera (es decir, estabilizados por cremallera o hélice de leucina) y moléculas de receptores que interactúan naturalmente con una molécula diana deseada. En ciertos aspectos, los anticuerpos o variantes de los mismos, se pueden modificar para hacerlos menos inmunogénicos cuando se administran a un sujeto. Por ejemplo, si el sujeto es humano, el anticuerpo puede ser "humanizado", donde la(s) región(es) que determinan la
25 complementariedad del anticuerpo derivado del hibridoma ha(n) sido transplantada(s) a un anticuerpo monoclonal humano, por ejemplo, tal y como se describe en Jones, P. et al. (1986), *Nature*, 321, 522-525 or Tempest et al. (1991), *Biotechnology*, 9, 266-273. También se pueden usar ratones transgénicos u otros mamíferos para expresar anticuerpos humanizados. Tal humanización puede ser parcial o completa. En ciertos aspectos, aunque el anticuerpo sea un anticuerpo murino u otro anticuerpo no humano, su puntuación de humanidad es suficiente y la
30 humanización no es necesaria. En otros aspectos más, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es completamente humano.

En ciertos aspectos específicos, el grupo internalizante comprende el anticuerpo monoclonal 3E10, un fragmento de unión al antígeno del mismo o un fragmento Fv de cadena sencilla del mismo. Tal y como se usa en el presente
35 documento, el término "anticuerpos" se refiere a anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpo capaces de unirse a una diana seleccionada. Se incluyen los Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂, los anticuerpos monoclonales y policlonales, los anticuerpos modificados por ingeniería genética y los anticuerpos sintéticos o semisintéticos producidos usando expresión en fago o técnicas alternativas. Los anticuerpos monoclonales 3E10 se pueden reproducir recombinantemente o mediante un hibridoma depositado permanentemente en la American Type Culture
40 Collection (ATCC) bajo el número de ingreso ATCC PTA-2439 (véase la patente US7189396). Otros anticuerpos adecuados adicionales tienen similar o sustancialmente la misma actividad de penetración a través de la membrana que el 3E10 y/o se unen al mismo epítipo que el 3E10 y/o tienen sustancialmente las mismas características de unión al antígeno que el 3E10.

45 El anticuerpo monoclonal 3E10 ha demostrado penetrar en las células sin toxicidad y ha atraído un considerable interés como medio de liberación de proteínas y ácidos nucleicos en el interior de los espacios citoplasmáticos o nucleares de los tejidos diana (Weisbart RH et al., *J Autoimmun.* 1998 Oct;11(5):539-46; Weisbart RH, et al. *Mol Immunol.* 2003 Mar;39(13):783-9; Zack DJ et al., *J Immunol.* 1996 Sep 1;157(5):2082-8.). Además, las secuencias VH y Vk del 3E10 son altamente homólogas a los anticuerpos humanos, con puntuaciones z de humanidad
50 respectivas de 0,943 y - 0,880. Por tanto, se espera que el Fv3E10 induzca menos respuesta de anticuerpo que muchos otros anticuerpos humanizados homologados (Abhinandan KR et al., *Mol. Biol.* 2007 369, 852-862). Un fragmento Fv de cadena sencilla del 3E10 posee toda la capacidad de penetración celular del anticuerpo monoclonal original, y proteínas tales como la catalasa, distrofina, HSP70 y p53 retienen su actividad tras su conjugación al Fv3E10 (Hansen JE et al., *Brain Res.* 2006 May 9;1088(1):187-96; Weisbart RH et al., *Cancer Lett.* 2003 Jun 10;
55 195(2):211-9; Weisbart RH, et al., *J Drug Target.* 2005 Feb;13(2):81-7; Weisbart RH et al., *J Immunol.* 2000 Jun 1;164(11):6020-6; Hansen JE et al., *J Biol Chem.* 2007 Jul 20;282(29):20790-3). El 3E10 está integrado en la estructura del anticuerpo presente en todos los mamíferos; una cadena pesada variable de ratón y una cadena ligera kappa variable. El 3E10 consigue entrar en las células por medio del transportador de nucleótidos ENT2, del que están particularmente enriquecidos el músculo esquelético y las células cancerosas, y estudios in vitro han
60 demostrado que el 3E10 no es tóxico. (Weisbart RH et al., *Mol Immunol.* 2003 Mar;39(13):783-9; Pennycooke M et

- al., *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jan 26;280(3):951-9). Dada la afinidad del 3E10 y los fragmentos del mismo por el músculo esquelético y la capacidad de diversos conjugados de 3E10 y MTM1 para mantener sus respectivas actividades, una terapia recombinante 3E10-MTM1 (y otras variantes de conjugados descritas en el presente documento) representa un valioso enfoque al tratamiento de la MTM. Tal y como se describe en el presente documento, un 3E10 recombinante o un fragmento o variante se pueden conjugar químicamente o genéticamente a MTM1 humana (hMTM1) y la actividad de cada conjugado se puede confirmar *in vitro*. Además, los conjugados purificados se pueden inyectar en ratones deficientes en MTM1 y se pueden examinar las mejoras en el fenotipo de la enfermedad, tal y como se describe en el presente documento.
- 5 El grupo internalizante también puede incluir mutantes de mAb 3E10, tales como variantes del 3E10 que retienen las mismas o sustancialmente las mismas características de penetración celular que el mAb 3E10, así como variantes modificadas mediante mutación para mejorar la utilidad del mismo (por ejemplo, con capacidad mejorada para dirigirse a tipos de células específicos, capacidad mejorada para penetrar a través de la membrana celular, capacidad mejorada para localizar el ADN celular, afinidad de unión mejorada y similares). Entre tales mutantes se incluyen variantes donde se introducen una o más sustituciones conservadoras en la cadena pesada, la cadena ligera y/o la(s) región(es) constante(s) del anticuerpo. Se han caracterizado numerosas variantes del mAb 3E10 en, por ejemplo, las patentes US7189396 y WO2008091911. En ciertos aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del 3E10, o al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de un Fv de cadena sencilla del 3E10 (por ejemplo, un Fv de cadena sencilla que comprende la SEC ID N°: 2 y la SEC ID N°: 4). En ciertos aspectos, el grupo internalizante comprende un Fv de cadena sencilla del 3E10, y la secuencia de aminoácidos del dominio V_H es al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la SEC ID N°: 2, y la secuencia de aminoácidos del dominio V_L es al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la SEC ID N°: 4. La variante 3E10 o fragmento de la misma retiene la función de un grupo internalizante.

- En ciertos aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la SEC ID N°: 4. En ciertos aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la SEC ID N°: 2. En ciertos aspectos, el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la SEC ID N°: 4 y un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la SEC ID N°: 2. La invención contempla específicamente grupos internalizantes basados en cualquier combinación de las cadenas VH y VL anteriores, por ejemplo, un grupo internalizante que comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 98 % idéntica a la SEC ID N°: 2 y una VL al menos un 96 % idéntica a la SEC ID N°: 4. En ciertos aspectos, el grupo internalizante comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 2 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID N°: 4. Tal y como se detalla en el presente documento, los dominios VH y VL puede estar incluidos como parte de un anticuerpo de longitud completa o como parte de un fragmento, tal como un svFv. Asimismo, los dominios VH y VL pueden estar unidos mediante un conector o pueden estar unidos directamente. En cualquier caso, los dominios VH y VL pueden estar unidos en cualquier orientación (por ejemplo, con el extremo N-terminal del dominio VL al dominio VH o con el extremo N-terminal del dominio VH al dominio VL).

- Como reconocen fácilmente los expertos en la materia, el mAb 3E10 alterado (por ejemplo, quimérico, humanizado, injertado con CDR, completamente humano, bifuncional, dímeros de polipéptidos de un anticuerpo - es decir, una asociación de dos cadenas polipeptídicas de un anticuerpo, tales como un brazo de un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, o un fragmento Fab que comprende dominios de anticuerpo V_L, V_H, C_L y C_{H1}, o un fragmento Fv que comprende un dominio V_L y un dominio V_H - anticuerpos de cadena sencilla - por ejemplo, un fragmento scFv que comprende un dominio V_L conectado a un dominio V_H mediante un conector, y similares) - también se puede producir mediante métodos bien conocidos en la técnica. Tales anticuerpos también se pueden producir mediante hibridoma, síntesis química o métodos recombinantes descritos, por ejemplo, en (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2d Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory 1988)). Asimismo, se pueden fabricar fácilmente otros grupos internalizantes a base de anticuerpos e incluyen roedores, quiméricos, humanizados, completamente humanos, etc.

60

- La preparación de anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ejemplo, un fragmento Fv de cadena sencilla codificado por V_H-conector-V_L) es bien conocida en la técnica. En particular, los métodos de producción recombinante de fragmentos de anticuerpo mAb 3E10 así como conjugados del mismo (por ejemplo, Fv3E10-GS3-hMTM1, tal y como se describe en el presente documento) se han descrito en WO 2008/091911. Además, los métodos de generación de fragmentos scFv de anticuerpos son bien conocidos en la técnica. El método ejemplar de la presente divulgación usa un conector (GGGS)₃ (SEC ID N^o: 3) para unir un dominio VL y VH del 3E10. Sin embargo, se entiende que también se pueden diseñar otros conectores. Por ejemplo, entre los aminoácidos superficiales habituales de las regiones flexibles de las proteínas se incluyen Gly, Asn y Ser. Se espera que las permutaciones de secuencias de aminoácidos que contienen Gly, Asn y Ser satisfarán los criterios (por ejemplo, que sean flexibles y con un carácter mínimamente hidrófobo o cargado) para una secuencia de conector. También se pueden usar en la secuencia del conector otros aminoácidos prácticamente neutros, tales como Thr y Ala. En un aspecto específico, se puede usar una longitud de secuencia de conector de aproximadamente 15 aminoácidos para proporcionar una separación adecuada de dominios de proteínas funcionales, aunque también se pueden usar secuencias de conector más largas o más cortas. Asimismo, se entiende que, en ciertos aspectos, un polipéptido quimérico puede incluir un conector adicional que una el grupo internalizante a la porción del polipéptido MTM del polipéptido quimérico. Por tanto, en ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos pueden incluir más de un conector, tal como dos conectores. Para aspectos en los que el polipéptido quimérico incluye más de un conector, se entiende que los conectores se seleccionan independientemente y pueden ser el mismo o diferentes.
- 20 La preparación de anticuerpos y fragmentos de los mismos también se puede realizar mediante un número indefinido de métodos bien conocidos para general anticuerpos monoclonales. Habitualmente, estos métodos incluyen la etapa de inmunización de los animales, habitualmente ratones, con un inmunógeno deseado (por ejemplo, una molécula diana deseada o fragmento de la misma). Una vez que se han inmunizado los ratones, y preferentemente estimulado una o más veces con el inmunógeno(s) deseado(s), se pueden preparar y cribar
- 25 hibridomas productores de anticuerpos monoclonales de acuerdo con métodos bien conocidos (véase, por ejemplo, Kuby, Janis, Immunology, Third Edition, pp. 131-139, W.H. Freeman & Co. (1997), for a general overview of monoclonal antibody production). A lo largo de varias de las décadas pasadas, la producción de anticuerpos ha llegado a ser extremadamente sólida. Los métodos *in vitro* que combinan el reconocimiento de anticuerpos y técnicas de expresión en fago permiten la amplificación y selección de anticuerpos con capacidades de unión muy específicas. Véase, por ejemplo, Holt, L. J. et al., "The Use of Recombinant Antibodies in Proteomics," Current Opinion in Biotechnology, 2000, 11:445-449. Habitualmente, estos métodos son mucho menos engorrosos que la preparación de hibridomas mediante los métodos de preparación de anticuerpos monoclonales tradicionales. En un aspecto, se puede usar la tecnología de expresión en fago para generar un grupo internalizante específico para una molécula diana deseada. Se provoca una respuesta inmune a un inmunógeno seleccionado en un animal (tal como un ratón, conejo, cabra u otro animal) y la respuesta se estimula para expandir la población de células B específicas para el inmunógeno. Se aísla ARN mensajero de esas células B, u opcionalmente una población de hibridomas monoclonales o policlonales. El ARNm se somete a transcripción inversa mediante métodos conocidos usando o un cebador poli-A o cebador(es) específico(s) para la inmunoglobulina murina, habitualmente específicos para secuencias adyacentes a las cadenas V_H y V_L deseadas, para generar ADNc. Las cadenas V_H y V_L deseadas se amplifican mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) habitualmente usando grupos de cebadores específicos a V_H y V_L, y se ligan, separadas por un conector. Los grupos de cebadores específicos para V_H y V_L están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Stratagene, Inc. de La Jolla, California. Se selecciona el producto conjunto V_H-conector-V_L (que codifica un fragmento scFv) y se amplifica mediante PCR. Los sitios de restricción se introducen en los extremos del producto V_H-conector-V_L mediante PCR con cebadores que incluyen sitios de
- 45 restricción y el fragmento scFv se inserta en un vector de expresión adecuado (habitualmente un plásmido) para ser sometido a expresión en fago. Otros fragmentos, tales como un fragmento Fab' se pueden clonar en vectores de expresión en fago para su expresión superficial en partículas de fago. El fago puede ser cualquier fago, tal como lambda, pero habitualmente es un fago filamentoso, tal como el fd y M13, habitualmente el M13. En ciertos aspectos, se fabrica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo recombinantemente. En otras palabras, una vez que se conoce la secuencia del anticuerpo (por ejemplo, usando los métodos anteriormente descritos), el anticuerpo se puede fabricar recombinantemente usando técnicas estándar. Por tanto, otros anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno relacionados con el 3E10 o con características similares de penetración celular/tránsito se pueden identificar fácilmente mediante cribado, por ejemplo, de una biblioteca de expresión en fago.
- 50 En ciertos aspectos, los grupos internalizantes se pueden modificar para hacerlos más resistentes a la escisión por proteasas. Por ejemplo, la estabilidad de un grupo internalizante que comprende un polipéptido se puede incrementar mediante sustitución de uno o más de los aminoácidos presentes naturalmente en la configuración (L) por aminoácidos D. En diversos aspectos, al menos el 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 50 %, 80 %, 90 % o 100 % de los residuos de aminoácidos de un grupo internalizante pueden ser de la configuración D. El cambio de aminoácidos L a
- 60 D neutraliza la capacidad de digestión de muchas de las peptidasas que se encuentran de forma generalizada en el

tracto digestivo. Alternativamente, se puede conseguir una mejora de la estabilidad de un grupo internalizante que comprende un enlace peptídico mediante introducción de modificaciones de las uniones peptídicas tradicionales. Por ejemplo, la introducción de un anillo cíclico en la cadena principal del polipéptido puede conferirle una mayor estabilidad para eludir el efecto de muchas enzimas proteolíticas que se sabe que digieren los polipéptidos en el estómago u otros órganos digestivos y en el suero. En otros aspectos más, se puede conseguir la mejora de la estabilidad de un grupo internalizante mediante intercalación de uno o más aminoácidos dextrógiros (tales como, fenilalanina dextrógira o triptófano dextrógiro) entre los aminoácidos de un grupo internalizante. En aspectos ejemplares, tales modificaciones aumentan la resistencia a proteasas de un grupo internalizante sin afectar a la actividad o especificidad de la interacción con una molécula diana deseada.

(B) Péptidos localizadores

En ciertos aspectos, un grupo internalizante puede comprender un péptido localizador que dirige selectivamente el polipéptido MTM1 quimérico que nos ocupa a través de una membrana celular y al interior de las células. En cierto aspecto, un grupo internalizante puede comprender un péptido localizador que dirige selectivamente el polipéptido MTM1 quimérico en cuestión a un tejido diana (por ejemplo, el músculo). Por ejemplo, la liberación de un polipéptido quimérico en el músculo puede ser mediada por un péptido localizador que comprende una secuencia de aminoácidos de ASSLNIA. En el documento WO 98/53804 se describen péptidos localizadores ejemplares adicionales. Entre los ejemplos adicionales de péptidos localizadores se incluyen el transactivador de transcripción del VIH (TAT) que comprende la secuencia de localización nuclear Tat48-60; el factor de transcripción homeodominio de Antennapedia de *Drosophila* (por ejemplo, penetratina que comprende el homeodominio Antp43-58 3ª hélice); péptidos de homoarginina (por ejemplo, Arg7 protección del agonista del péptido PKC- ϵ del corazón de ratas isquémicas); péptidos alfa-helicoidales; péptidos catiónicos (proteínas cargadas "superpositivamente").

Adicionalmente, los péptidos localizadores para un tejido (u órgano) diana se pueden identificar usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. Una vez identificado, en ciertos aspectos, se puede usar un péptido localizador que es selectivo para un tejido diana concreto.

Un método ejemplar es el método de expresión en fago *in vivo*. Específicamente, se expresan secuencias de péptidos aleatorios como péptidos de fusión con las proteínas superficiales del fago, y esta biblioteca de péptidos aleatorios se infunde en la circulación sistémica. Tras su infusión en ratones huésped, se extraen los tejidos y órganos diana, a continuación, se aísla y se expande el fago, y se repite el proceso de inyección dos veces o más. Cada ronda de inyección incluye, por defecto, un componente de selección negativo, ya que el virus inyectado tiene la oportunidad de unirse aleatoriamente a los tejidos o de unirse específicamente a tejidos no diana. Las secuencias del virus que se unen específicamente a tejidos no diana se eliminarán rápidamente mediante el procedimiento de selección, mientras que el número de fagos de unión inespecífica disminuye con cada ronda de selección. Muchos laboratorios han identificado los péptidos localizadores selectivos para la vasculatura del cerebro, riñón, pulmón, piel, páncreas, intestino, útero, glándula adrenal, retina, músculo, próstata o tumores. Véase, por ejemplo, Samoylova et al., 1999, *Muscle Nerve*, 22:460; Pasqualini et al., 1996, *Nature*, 380:364; Koivunen et al., 1995, *Biotechnology*, 13:265; Pasqualini et al., 1995, *J. Cell Biol.*, 130:1189; Pasqualini et al., 1996, *Mole. Psych.*, 1:421, 423; Rajotte et al., 1998, *J. Clin. Invest.*, 102:430; Rajotte et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, 274:11593. Véanse, también, las patentes. US5622699; US6068829; US6174687; US6180084; US6232287; US6296832; US6303573; y US6306365.

III. Polipéptidos quiméricos

Los polipéptidos quiméricos de la presente divulgación se pueden fabricar de diversas maneras. En ciertos aspectos, el C-terminal de un polipéptido MTM1 se puede conectar al N-terminal de un grupo internalizante (por ejemplo, un anticuerpo o un péptido localizador). Alternativamente, el C-terminal de un grupo internalizante (por ejemplo, un anticuerpo o un péptido localizador) se puede conectar al N-terminal de un polipéptido MTM1. Por ejemplo, los polipéptidos quiméricos se pueden diseñar para colocar el polipéptido MTM1 en el extremo carboxilo o amino terminal de la cadena pesada o ligera del mAb 3E10. En ciertos aspectos, entre las configuraciones potenciales se incluye el uso de porciones truncadas de secuencias de cadena ligera y pesada de un anticuerpo (por ejemplo, mAb 3E10) según sea necesario para mantener la integridad funcional del polipéptido MTM1 adherido. Aún más, el grupo internalizante se puede conectar a un residuo interno (no terminal) expuesto del MTM1 o a una variante del mismo. En aspectos adicionales, se puede emplear cualquier combinación de las configuraciones del grupo internalizante del MTM1, resultando de ese modo una proporción MTM1:grupo internalizante superior a 1:1 (por ejemplo, dos moléculas de MTM1 a una de grupo internalizante).

El polipéptido MTM1 y el grupo internalizante se pueden conjugar directamente uno al otro. Alternativamente, se pueden conectar uno al otro mediante una secuencia de conector, que separa el polipéptido MTM1 y el grupo

internalizante con una distancia suficiente para garantizar que cada dominio se pliegue adecuadamente para formar sus estructuras secundaria y terciaria. Las secuencias de conector preferidas (1) deben adoptar una conformación extendida flexible, (2) no deben exhibir propensión al desarrollo de una estructura secundaria ordenada que pueda interactuar con los dominios funcionales del polipéptido MTM1 o del grupo internalizante, y (3) deben tener un carácter hidrófobo o cargado mínimo, que pueda favorecer la interacción con los dominios de la proteína funcional. Entre los aminoácidos superficiales habituales en las regiones flexibles de las proteínas se incluyen Gly, Asn y Ser. Se espera que las permutaciones de secuencias de aminoácidos que contienen Gly, Asn y Ser satisfarán los criterios anteriormente mencionados para una secuencia de conector. También se pueden usar en la secuencia del conector otros aminoácidos prácticamente neutros, tales como Thr y Ala. En un aspecto específico, se puede usar una longitud de secuencia de conector de aproximadamente 15 aminoácidos para proporcionar una separación adecuada de dominios de proteínas funcionales, aunque también se pueden usar secuencias de conector más largas o más cortas. La longitud de la secuencia de conector que separa el polipéptido MTM1 y el grupo internalizante puede ser de 5 a 500 aminoácidos de longitud, o más preferentemente de 5 a 100 aminoácidos de longitud. Preferentemente, la secuencia de conector es de aproximadamente 5-30 aminoácidos de longitud. En aspectos preferidos, la secuencia de conector es de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, y resulta más ventajosa de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos. En otros aspectos, el conector que une el polipéptido MTM1 a un grupo internalizante puede ser un dominio constante de un anticuerpo (por ejemplo, un dominio constante del mAb3E10 o toda o una porción de una región Fc de otro anticuerpo). A modo de ejemplo, el conector que une el MTM1 con un grupo internalizante es GSTSGSGKSSEGK (SEQ ID N°: 10). En ciertos aspectos, el conector es un conector escindible. Tal y como se ha indicado anteriormente, el polipéptido quimérico puede incluir más de un conector, tal como un conector que una el grupo internalizante al polipéptido MTM1 y un conector que una porciones del grupo internalizante entre sí (por ejemplo, un conector que una un dominio VH y VL de un fragmento Fv de cadena sencilla). Cuando el polipéptido quimérico incluye más de un conector, tal como dos conectores, los conectores se seleccionan independientemente y pueden ser el mismo o diferentes.

En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos de la presente divulgación se pueden generar usando reactivos y protocolos de entrecruzamiento bien conocidos. Por ejemplo, hay un gran número de agentes de entrecruzamiento químico bien conocidos por los expertos en la materia y útiles para el entrecruzamiento del polipéptido MTM1 con un grupo internalizante (por ejemplo, un anticuerpo). Por ejemplo, los agentes de entrecruzamiento son agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales, que se pueden usar para conectar moléculas de forma gradual. Los agentes entrecruzadores heterobifuncionales ofrecen la capacidad de diseñar más métodos de acoplamiento más específicos para la conjugación de proteínas, reduciendo de ese modo la incidencia de reacciones secundarias no deseadas tales como polímeros de homoproteínas. En la técnica se conocen una amplia variedad de agentes entrecruzadores heterobifuncionales, entre los que se incluyen el 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), el éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS); el (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), el 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB), el clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC); 4-succinimidiloxicarbonil-a-metil-a-(2-piridilditio)-toluno (SMPT), el 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) y el 6-[3-(2-piridilditio)propionato]hexanoato de succinimidilo (LC-SPDP). Esos agentes de entrecruzamiento que tienen grupos N-hidroxisuccinimida se pueden obtener como análogos de la N-hidroxisulfosuccinimida, que generalmente tienen mayor solubilidad en agua. Además, esos agentes de entrecruzamiento que tienen puentes disulfuro en la cadena de enlace se pueden sintetizar, en cambio, como derivados de alquilo para reducir así la cantidad de escisión del conector in vivo. Además de los agentes entrecruzadores heterobifuncionales, existe un determinado número de otros agentes de entrecruzamiento entre los que se incluyen los agentes entrecruzadores homobifuncionales y fotoreactivos. El suberato de disuccinimidilo (DSS), el bismaleimidohexano (BMH) y el dimetilpimelidato.2 HCl (DMP) son ejemplos de agentes de entrecruzamiento homobifuncionales útiles, y el disulfuro de bis-[B-(4-azidosalicilamido)etilo] (BASED) y el 6(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato de N-succinimidilo (SANPAH) son ejemplos de agentes entrecruzadores fotoreactivos útiles para su uso en esta invención. Para conocer un análisis reciente de las técnicas de acoplamiento de proteínas, véase Means et al. (1990) *Bioconjugate Chemistry*. 1:2-12.

Una clase particularmente útil de agentes entrecruzadores heterobifuncionales, antes incluidos, contiene el grupo reactivo amina primaria, N-hidroxisuccinimida (NHS) o su análogo hidrosoluble N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS). Las aminas primarias (grupos épsilon de la lisina) a pH alcalino están sin protonar y reaccionan por ataque nucleófilo sobre los ésteres NHS o sulfo-NHS. Esta reacción da como resultado la formación de un enlace amida y la liberación del NHS o sulfo-NHS como subproducto. Otro grupo reactivo útil como parte de un agente entrecruzador heterobifuncional es un grupo reactivo tiol. Entre los grupos reactivos tiol comunes se incluyen las maleimididas, los halógenos y los disulfuros de piridilo. Las maleimididas reaccionan específicamente con los grupos sulfhidrilo (residuos de cisteína) en minutos, en condiciones neutras o ligeramente ácidas (pH 6,5-7,5). Los halógenos (funciones yodoacetilo) reaccionan con los grupos -SH a pH fisiológicos. Ambos grupos reactivos dan como resultado la formación de enlaces tioéter estables. El tercer componente del agente entrecruzador heterobifuncional es el brazo

espaciador o puente. El puente es la estructura que conecta los dos extremos reactivos. El atributo más aparente del puente es su efecto sobre el impedimento estérico. En algunos casos, un puente más largo puede abarcar más fácilmente la distancia necesaria para conectar dos biomoléculas complejas.

- 5 La preparación de conjugados de proteínas usando reactivos heterobifuncionales es un procedimiento de dos etapas que implica la reacción de la amina y la reacción del sulfhidrilo. Para la primera etapa, la reacción de la amina, la proteína seleccionada debe contener una amina primaria. Esta puede ser una amina épsilon de lisina o una amina primaria alfa que se encuentra en el extremo N-terminal de la mayoría de proteínas. La proteína no debe contener grupos sulfhidrilo libres. En los casos en los que las proteínas que se deben a conjugar contienen grupos sulfhidrilo
- 10 libres, una proteína se puede modificar de tal forma que todos los sulfhidrilos estén bloqueados usando, por ejemplo, N-etilmaleimida (véase Partis et al. (1983) *J. Pro. Chem.* 2:263). Se puede usar el reactivo de Ellman para calcular la cantidad de grupos sulfhidrilo en una proteína concreta (véase, por ejemplo, Ellman et al. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* 74:443 y Riddles et al. (1979) *Anal. Biochem.* 94:75).
- 15 En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos de la invención se pueden producir mediante el uso de un sistema de transporte universal. Por ejemplo, un polipéptido MTM1 se puede conjugar a un vehículo tal como una proteína A, poli-L-lisina, hex-histidina y similares. A continuación, el vehículo conjugado formará un complejo con un anticuerpo que actúa como grupo internalizante. Se podría usar como vehículo una pequeña porción de la molécula del vehículo que es responsable de la unión de la inmunoglobulina.
- 20 En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos de la invención se pueden producir usando técnicas de química proteica estándar tales como las descritas en Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) and Grant G. A. (ed.), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. H. Freeman and Company, New York (1992). Además, se dispone en el mercado de sintetizadores automatizados de péptidos (por ejemplo, Advanced ChemTech
- 25 Model 396; Milligen/Biosearch 9600). En cualquiera de los métodos anteriores de entrecruzamiento para la conjugación química del MTM1 a un grupo internalizante, se puede usar un dominio escindible o un conector escindible. La escisión permitirá la separación del grupo internalizante y el polipéptido MTM1. Por ejemplo, después de la penetración de un polipéptido quimérico en una célula, la escisión del conector escindible permitirá la separación del MTM1 del grupo internalizante.
- 30 En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos de la presente divulgación se pueden generar en forma de una proteína de fusión que contiene un polipéptido MTM1 y un grupo internalizante (por ejemplo, un anticuerpo o un péptido localizador), expresada en forma de una cadena polipeptídica contigua. En el presente documento, se hace referencia a tales polipéptidos quiméricos como conjugados recombinantemente. En la preparación de tales
- 35 proteínas de fusión, se construye un gen de fusión que comprende ácidos nucleicos que codifican un polipéptido MTM1 y un grupo internalizante y, opcionalmente, una secuencia de péptido conector que distancia el polipéptido MTM1 del grupo internalizante. El uso de técnicas de ADN recombinante para crear un gen de fusión, en el que el producto de traducción es la proteína de fusión deseada, es bien conocido en la técnica. Tanto la secuencia de codificación de un gen como sus regiones reguladoras se pueden rediseñar para cambiar las propiedades
- 40 funcionales de la proteína resultante, la cantidad de proteína fabricada o el tipo de célula en el que se produce la proteína. La secuencia de codificación de un gen se puede alterar ampliamente, por ejemplo, mediante fusión de parte de ella con la secuencia de codificación de un gen diferente para producir un gen híbrido nuevo que codifique una proteína de fusión. En las siguientes solicitudes PCT se describen ejemplos de producción de proteínas de fusión PCT/US87/02968, PCT/US89/03587 y PCT/US90/07335, así como en Trauneker et al. (1989) *Nature* 339:68.
- 45 En esencia, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se lleva a cabo de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos romos y extremos cohesivos para la ligación, digestión con enzima de restricción para proporcionar los extremos adecuados, relleno de los extremos cohesivos de la forma adecuada, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión no deseable y ligación enzimática. Alternativamente, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales entre las que se incluyen
- 50 los sintetizadores automatizados de ADN. En otro método, la amplificación por PCR de los fragmentos de gen se puede llevar a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de gen consecutivos que se pueden posteriormente anillar para generar una secuencia de gen quimérico (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992). Los polipéptidos quiméricos codificados por el gen de fusión se pueden producir recombinantemente usando diversos sistemas de
- 55 expresión, como bien se sabe en la técnica (véase también a continuación).

Los polipéptidos quiméricos conjugados recombinantemente incluyen aspectos en los que el polipéptido MTM1 está conjugado al extremo N-terminal o C-terminal del grupo internalizante.

- 60 En algunos aspectos, la inmunogenicidad del polipéptido quimérico se puede reducir mediante identificación de un

epítopo de células T candidato de una región de unión que distancia el polipéptido quimérico y cambio de un aminoácido de la región de unión, tal y como se describe en la patente US2003/0166877.

Los polipéptidos quiméricos de la invención tienen varios usos. Por ejemplo, los polipéptidos quiméricos se pueden usar para identificar ligandos del MTM1, tales como proteínas a las que se une endógenamente el MTM1 o sustratos para el MTM1. Los polipéptidos quiméricos también se pueden usar para representar células del músculo esquelético, tales como células del músculo esquelético deficientes en MTM1 y para estudiar la localización subcelular del MTM1 en el tipo salvaje o células del músculo esquelético deficientes en MTM1. Los polipéptidos quiméricos también se pueden usar como parte de un método terapéutico para sustituir la proteína MTM1 en células deficientes, en animales o en pacientes humanos. Los polipéptidos quiméricos se pueden usar por sí solos o como parte de un régimen terapéutico para el tratamiento de la miopatía miotubular.

IV. Ácidos nucleicos relacionados con el MTM1 y su expresión

En ciertos aspectos, la presente divulgación usa ácidos nucleicos para producir un polipéptido MTM1 (fragmentos bioactivos, variantes y fusiones del mismo incluidos). En ciertos aspectos específicos, los ácidos nucleicos pueden además comprender ADN que codifica un grupo internalizante (por ejemplo, un anticuerpo o un péptido localizador) para fabricar una proteína quimérica recombinante de la invención. Nos referimos colectivamente a todos estos ácidos nucleicos como ácidos nucleicos MTM1.

Los ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN monocatenarias o bicatenarias. En ciertos aspectos, la invención se refiere a secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a una región de una secuencia de nucleótidos MTM1 (por ejemplo, las SEC ID N°: 5, 7, y 9). En aspectos adicionales, las secuencias de ácidos nucleicos MTM1 pueden ser aisladas, recombinantes y/o fusionadas con una secuencia de nucleótido heterólogo, o en una ADN genoteca.

En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos MTM1 también incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones altamente rigurosas a cualquiera de las secuencias de nucleótidos MTM1 nativos anteriormente mencionadas o a secuencias complementarias de los mismos. Un experto en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de rigurosidad adecuadas para favorecer la hibridación del ADN se pueden variar. Por ejemplo, uno podría realizar la hibridación en 6,0 x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguida de un lavado de 2,0 x SSC a 50 °C. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar de entre una rigurosidad baja de aproximadamente 2,0 x SSC a 50 °C a una rigurosidad alta de aproximadamente 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura de la etapa de lavado se puede incrementar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Se puede variar tanto la temperatura como la sal o se puede mantener la temperatura o la concentración de sal constantes mientras se cambia la otra variable. En un aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja rigurosidad de 6 x SSC a temperatura ambiente seguida de 2 x SSC a temperatura ambiente.

También están dentro del alcance de la divulgación los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos MTM1 nativos debido a una degeneración del código genético. Por ejemplo, varios aminoácidos se designan mediante más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden dar como resultado mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que entre las células de mamíferos existirán polimorfismos de la secuencia de ADN que llevan a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas que nos ocupan. Un experto en la materia apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente el 3-5 % de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína concreta pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. Todas y cada una de tales variaciones de nucleótidos y polimorfismos de los aminoácidos resultantes se encuentran dentro del alcance de esta divulgación.

En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos MTM1 recombinantes se pueden conectar operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladores en un constructo de expresión. Generalmente, las secuencias de nucleótidos reguladores serán apropiadas para una célula huésped usada para la expresión. En la técnica se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y de secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped. Habitualmente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladores pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión ribosomal, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. Los promotores constitutivos o inducibles, tal y como se conocen en la técnica, se contemplan en la invención. Los promotores pueden ser promotores presentes naturalmente o promotores híbridos que combinan

elementos de más de un promotor. Un constructo de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o el constructo de expresión puede estar insertado en un cromosoma. En un aspecto preferido, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de las células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped usada. En ciertos aspectos, esta invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MTM1 y está operativamente conectada a al menos una secuencia reguladora. La técnica reconoce las secuencias reguladoras y éstas se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido codificado. En consecuencia, el término secuencia reguladora incluye los promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. En Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990) se describen secuencias reguladoras ejemplares. Se debe entender que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se debe transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Asimismo, se debe considerar también el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como los marcadores de resistencia a antibióticos.

Esta invención también se refiere a una célula huésped transfectada con un gen recombinante que codifica un polipéptido MTM1, un grupo internalizante o un polipéptido quimérico de la invención. La célula huésped puede ser una célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido MTM1 o un polipéptido quimérico se pueden expresar en células bacterianas tales como las de *E. coli*, en células de insectos (por ejemplo, usando el sistema de expresión basado en baculovirus), en levaduras o en células de mamíferos. Otras células huésped adecuadas son bien conocidas por los expertos en la materia.

La presente divulgación además se refiere a los métodos de producción de un polipéptido MTM1, un grupo internalizante y/o un polipéptido quimérico de la invención. Por ejemplo, se puede cultivar una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido MTM1, un grupo internalizante, o un polipéptido quimérico en condiciones adecuadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido. El polipéptido se puede secretar y aislar a partir de una mezcla de células y medio que contenga los polipéptidos. Alternativamente, los polipéptidos pueden quedar retenidos en el citoplasma o en una fracción de membrana y se pueden extraer las células, lisar y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye las células huésped, el medio y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos se pueden aislar del medio del cultivo celular, de las células huésped o de ambos usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica, entre las que se incluyen la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de filtración en gel, la ultrafiltración, la electroforesis y la purificación por inmunoespecificidad con anticuerpos específicos para epítopos concretos de los polipéptidos (por ejemplo, un polipéptido MTM1). En un aspecto preferido, el polipéptido es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

Un ácido nucleico MTM1 recombinante se puede producir mediante ligación del gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para su expresión en células procariotas, células eucariotas (levaduras, aves, de insectos o de mamíferos) o ambas. Entre los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido recombinante se incluyen los plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, entre los vectores adecuados se incluyen los plásmidos de los tipos: plásmidos derivados del pBR322, plásmidos derivados del pEMBL, plásmidos derivados del pEX, plásmidos derivados del pBTac y plásmidos derivados del pUC para la expresión en células procariotas tales como las de *E. coli*. Los vectores de expresión en mamíferos preferidos contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados del pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión en mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores están modificados con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como el pBR322, para facilitar la replicación y la selección de la resistencia a fármacos tanto en células procariotas como eucariotas. Alternativamente, se pueden usar derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus Epstein-Barr (pHEBo, derivado del pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de los organismos huésped son bien conocidos en la técnica. Para consultar otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser conveniente expresar el polipéptido recombinante mediante el uso de un sistema de expresión basado en baculovirus. Entre los ejemplos de tales sistemas de expresión basados en baculovirus se incluyen los vectores derivados del pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), los vectores derivados del pAcUW (tales como pAcUW1), y los vectores derivados del pBlueBacs (tales como el β -gal que contiene pBlueBac III).

60

Las técnicas de fabricación de genes de fusión son bien conocidas. En esencia, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se lleva a cabo de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos romos y extremos cohesivos para la ligación, digestión con enzima de restricción para proporcionar los extremos adecuados, relleno de los extremos cohesivos de la forma adecuada, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión no deseable y ligación enzimática. En otro aspecto, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales entre las que se incluyen los sintetizadores automatizados de ADN. Alternativamente, la amplificación por PCR de los fragmentos de gen se puede llevar a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de gen consecutivos que se pueden posteriormente anillar para generar una secuencia de gen quimérico (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

Se debe entender que los polipéptidos quiméricos se pueden fabricar de numerosas formas. Por ejemplo, un polipéptido MTM1 y un grupo internalizante se pueden fabricar por separado, tal como recombinantemente en dos cultivos celulares independientes a partir de constructos de ácido nucleico que codifican sus respectivas proteínas. Una vez fabricados, las proteínas se pueden conjugar químicamente directamente o mediante un conector. A modo de otro ejemplo, el polipéptido quimérico se puede fabricar como una fusión conservando la pauta de lectura en la que el polipéptido quimérico completo, que opcionalmente incluye uno o más conectores, se fabrica a partir de un constructo de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica tanto el polipéptido MTM1 como el grupo internalizante.

V. Métodos de tratamiento

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de afecciones asociadas a la deficiencia de la proteína miotubularina no funcional 1 (MTM1), tales como la miopatía miotubular. Estos métodos implican la administración a un individuo en necesidad de la misma de una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido quimérico como los anteriormente descritos. Específicamente, el método comprende la administración de un polipéptido quimérico que comprende (a) un polipéptido de miotubularina (MTM1) o un fragmento bioactivo del mismo y (b) un grupo internalizante. En particular, el objetivo de estos métodos es el tratamiento terapéutico y profiláctico de animales y, más particularmente, humanos.

La MTM es un raro y grave trastorno muscular ligado al cromosoma X que se presenta con una incidencia estimada de 1 varón por cada 50 000 nacimientos y es causada por una deficiencia de MTM1, una fosfoinosítido fosfatasa (Bello AB et al., Human Molecular Genetics, 2008, Vol. 17, No. 14). En el nacimiento, los pacientes con MTM presentan hipotonía severa y dificultad respiratoria y aquellos que sobreviven al periodo neonatal frecuentemente son total o parcialmente dependientes de soporte ventilatorio (Taylor GS et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Aug 1;97(16):8910-5; Bello AB et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23):15060-5; Pierson CR et al., Neuromuscul Disord. 2007 July; 17(7): 562-568; Herman GE et al., THE JOURNAL OF PEDIATRICS VOLUME 134, NUMBER 2). Los pacientes con MTM exhiben retardo en las etapas del desarrollo motor y son susceptibles a sufrir complicaciones tales como la escoliosis, maloclusión, estenosis pilórica, esferocitosis y cálculos biliares y renales, aunque el crecimiento lineal y la inteligencia son normales y la enfermedad sigue un curso no progresivo (Herman GE et al., THE JOURNAL OF PEDIATRICS VOLUME 134, NUMBER 2). Una complicación adicional es que los pacientes con MTM son particularmente susceptibles a infecciones respiratorias graves e incluso mortales. Sin limitación teórica, estas infecciones respiratorias pueden ser debidas a la disminución de la capacidad de los individuos para producir y limpiar el moco, así como al debilitamiento del tejido pulmonar provocado por el uso de ventilación a largo plazo. La estancia media hospitalaria de pacientes neonatales con MTM es de ~90 días, y la necesidad de asistencia ventilatoria y atención domiciliaria a largo plazo, así como los costes asociados a la gestión de las complicaciones médicas que surgen con frecuencia en pacientes con MTM, suponen una carga personal y económica sustancial para los pacientes y familias.

Las MTM son una familia de proteínas relacionadas que exhiben actividad fosfoinosítido fosfatasa o, alternativamente, se unen a fosfoinosítidos pero son catalíticamente inactivas. La MTM1, así como otras proteínas relacionadas con las MTM (MTMRs) se agrupan individualmente o en heterodímeros en las vesículas endocíticas en diferentes etapas del transporte subcelular. La MTM1 se asocia con la MTMR12 e interacciona con otras proteínas endosomales tales como la GTPasa Rab5 y la PI 3-quinasa Vps34 mediante la molécula adaptadora Vps15. Las actividades diferenciales de reclutamiento y oposición de la MTM1 PIP3 fosfatasa y la Vsp34 PI-3 quinasa probablemente coordinan la distribución temporal de la membrana de PI y PIP3 que dirige los patrones de tráfico intracelular de las vesículas endocíticas. Aunque otras proteínas relacionadas con las MTM poseen actividad PIP3 fosfatasa, su localización subcelular no es lo suficientemente superpuesta a la de la MTM1 como para que sean incapaces de compensar funcionalmente la deficiencia de MTM1. La MTM1 se expresa de forma generalizada, pero la ausencia de MTM1 en el músculo esquelético solo se justifica para la fisiopatología de la MTM (Taylor GS et al.,

Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Sep 22;9(15):2223-9; Taylor GS et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Aug 1;97(16):8910-5; Bello AB et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23):15060-5), y sugiere que la actividad PIP3 fosfatasa de la MTM1 posee una función subcelular única que es particularmente crucial para el funcionamiento normal del músculo esquelético. Se espera que la MTM1 participe en el mantenimiento de la arquitectura longitudinal y transversal del sistema de túbulos T y así, los defectos en la organización de estas estructuras afectarían al acoplamiento excitación-contracción y derivarían en la subsiguiente debilidad muscular y atrofia características de la enfermedad (Bello AB et al., Human Molecular Genetics, 2008, Vol. 17, No. 14; Laporte J et al., HUMAN MUTATION 15:393.409 (2000); Herman GE et al., THE JOURNAL OF PEDIATRICS VOLUME 134,NUMBER 2).

10 Dado que la identidad de los compartimentos endosomales concretos puede consistir en una relación y distribución de PI y sus formas fosforiladas definidas, no es probable que un enfoque terapéutico en el que bloques de Pi-3 quinasa y/o aumentos alternativos de PIP4 (también "PI(4)P"), PIP5 (también "PI(5)P") o PIP4,5 (también "PI(4,5)P₂") impartan especificidad terapéutica alguna a la MTM. MTM1, MTMR1 y MTMR2 son las fosfoinosítido
15 fosfatasa relacionadas más estrechamente y se expresan en el músculo esquelético, esto sugiere que el aumento farmacológico de otras MTMR podría proporcionar un beneficio compensatorio a la MTM. Sin embargo, las localizaciones subcelulares de MTMR1, MTMR2 y MTM1 no se solapan lo suficiente (Lorenzo O et al., Journal of Cell Science 119, 2953-2959 2005) y la mutación de la MTMR2 en la neuropatía desmielinizante sensitivo-motora recesiva de tipo Charcot-Marie-Tooth tipo 4B (CMT4B) se presenta con manifestaciones patológicas y clínicas muy
20 diferentes de las de la MTM. Por lo tanto, un aumento compensatorio de la MTMR2 u otras proteínas relacionadas con las MTM es probable que proporcione poca, si es que alguna, compensación terapéutica a la deficiencia de MTM1. Las tecnologías de rescate de ARNm basadas en la lectura del codón de terminación pueden resultar efectivas para ~ el 20 % de los pacientes con MTM, aunque no hay indicios de que las tecnologías basadas en el salto de exón sean útiles para ~ el 50% de los pacientes que poseen deleciones y mutaciones en el sitio de corte y
25 empalme (Laporte J et al., HUMAN MUTATION 15:393.409 (2000)). Un enfoque basado en la administración de IGF, inhibición de la miostatina o activación de la AKT no corregiría la deficiencia bioquímica de MTM subyacente, pero podría contrarrestar cualquier señalización hipotrófica que pueda existir en la MTM.

Un enfoque que restaure la MTM1 al músculo esquelético bien mediante genes, células madre o terapia intravenosa
30 recombinante es una estrategia terapéutica conveniente para la MTM. En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona polipéptidos adecuados para su uso en métodos de tratamiento de la MTM. Los polipéptidos quiméricos ejemplares comprenden (a) un polipéptido MTM1 o un fragmento bioactivo del mismo y (b) un grupo internalizante. En ciertos aspectos, el grupo internalizante dirige selectivamente el polipéptido quimérico a las células musculares y/o atraviesa las membranas celulares por medio del transportador ENT2.

35 La liberación intravenosa de MTM1 recombinante puede proporcionar la mayor flexibilidad de dosificación con las menores barreras logísticas al desarrollo. Por ejemplo, se puede valorar el efecto de la dosificación de MTM1 intravenosa o retirar si un paciente concreto experimenta un efecto secundario.

40 La MTM1 es una enzima citoplasmática y no posee un grupo internalizante muscular inherente, por lo tanto, la MTM1 se puede conjugar a una proteína permeable a las células para atravesar el sarcolema del músculo esquelético y alcanzar los compartimentos citoplasmáticos adecuados. Como se ha demostrado que la MTM1 retiene la actividad PIP3 fosfatasa tras múltiples fusiones génicas tales como la conjugación genética del extremo N y C-terminal a marcadores de purificación tales como el GST y el 6-His (Kim SA et al., J. Biol. Chem., Vol. 277, Issue
45 6, 4526-4531, February 8, 2002), y reporteros fluorescentes tales como la proteína roja y verde fluorescentes (Chaussade C et al., Molecular Endocrinology 17 (12): 2448-2460 2003), se espera que la MTM1 retenga la actividad tras la conjugación química y genética a, por ejemplo, Fv3E10, un anticuerpo internalizante muscular de cadena sencilla. Adicionalmente, la hMTM1 mantiene la capacidad de localización de endosomas tempranos e inmunoprecipitación de proteínas accesorias tales como la Vps15 y la Vps34 seguida de conjugación genética a los
50 marcadores de purificación 6-His y GST (Taylor GS et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Aug 1;97(16):8910-5; Cao C et al., Traffic 2007; 8: 1052-1067; Kim SA et al., J. Biol. Chem., Vol. 277, Issue 6, 4526-4531, February 8, 2002), Green and Red Fluorescent Proteins (Cao C et al., Traffic 2007; 8: 1052-1067; Chaussade C et al., Molecular Endocrinology 17 (12): 2448-2460 2003; Robinson FL et al., Trends in Cell Biology, 2006, 16(8): 403-412), y marcado con epítipo FLAG (Cao C et al., Traffic 2007; 8: 1052-1067; Kim SA et al., J. Biol. Chem., Vol. 277, Issue 6,
55 4526-4531, February 8, 2002). Por lo tanto, los conjugados químicos y genéticos de 3E10 y hMTM1 retendrán la capacidad de penetración celular, escisión de PIP3 a PI y asociación con proteínas endosomales.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares, tal y como se usan en el presente documento, generalmente significan la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en
60 términos de prevención completa o parcial de una enfermedad, afección o síntomas de las mismas, y/o puede ser

terapéutico en términos de curación completa o parcial de una enfermedad, afección y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad o afección. Tal y como se usa en el presente documento, "tratamiento" cubre cualquier tratamiento de una enfermedad o afección de un mamífero, particularmente un humano, e incluye: (a) prevención de que la enfermedad o afección se de en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o afección pero aún no
 5 haya sido diagnosticado de tenerla; (b) inhibición de la enfermedad o afección (por ejemplo, deteniendo su desarrollo); o (c) alivio de la enfermedad o afección (por ejemplo, provocando una regresión de la enfermedad o afección, mejorando uno o más síntomas). Por ejemplo, el "tratamiento" de la MTM abarca una reversión o cura completa de la enfermedad o cualquier rango de mejora de afecciones y/o efectos adversos atribuibles a la MTM. Simplemente a modo ilustrativo, el "tratamiento" de la MTM incluye una mejora de cualquiera de los siguientes
 10 efectos asociados a la MTM o combinación de los mismos: esperanza de vida corta, insuficiencia respiratoria (parcial o completa), bajo tono muscular, párpados caídos, poca fuerza en los músculos proximales, poca fuerza en los músculos distales, debilidad facial con o sin debilidad del músculo del ojo, curvatura anómala de la columna, deformidades en las articulaciones y debilidad en los músculos que controlan el movimiento de los ojos (oftalmoplejia). La mejora de cualquiera de estas afecciones se puede evaluar fácilmente de acuerdo con métodos y
 15 técnicas estándar conocidas en la técnica. La población de sujetos tratados mediante el método de la enfermedad incluye sujetos que padecen la enfermedad o afección no deseada, así como sujetos en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección.

El término "dosis terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" significa una dosis que produce el efecto deseado
 20 para el que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento y la determinará un experto en la materia usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

En ciertos aspectos, se pueden administrar uno o más polipéptidos quiméricos de la presente divulgación, juntos
 25 (simultáneamente) o en momentos diferentes (secuencialmente). Además, los polipéptidos quiméricos de la presente divulgación se pueden administrar en combinación con uno o más compuestos o terapias adicionales de tratamiento de la miopatía miotubular o de tratamiento de trastornos neuromusculares en general. Por ejemplo, se pueden coadministrar uno o más polipéptidos quiméricos conjuntamente con uno o más compuestos terapéuticos. La terapia combinada puede abarcar la administración simultánea o alternativa. Además, la combinación puede abarcar la
 30 administración aguda o crónica. Opcionalmente, el polipéptido quimérico de la presente divulgación y compuestos adicionales actúan de forma aditiva o sinérgica para el tratamiento de la miopatía miotubular. A modo de ejemplo, el presente método se puede usar en combinación con cualquiera de los métodos terapéuticos de la MTM descritos anteriormente (por ejemplo, incremento compensatorio de la MTMR2 u otras proteínas relacionadas con las MTM o tecnologías de rescate del ARNm basadas en la lectura del codón de terminación) para conseguir un efecto aditivo o
 35 sinérgico. Entre los compuestos adicionales que se pueden usar en terapias combinadas se incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, polipéptidos, anticuerpos, oligonucleótidos antisentido y moléculas de ARNip. Además, la terapia combinada también incluye los métodos descritos en el presente documento junto con otras terapias para la MTM (por ejemplo, terapia física, soporte ventilatorio, terapia ocupacional, acupuntura, etc.). Dependiendo de la naturaleza de la terapia combinada, la administración de los polipéptidos quiméricos de la
 40 invención puede continuar mientras se está administrando la otra terapia y/o a partir de entonces. La administración de los polipéptidos quiméricos se puede hacer en una dosis única o en dosis múltiples. En algunos casos, la administración de los polipéptidos quiméricos ha comenzado al menos varios días antes de la otra terapia, mientras que en otros casos, la administración comienza o inmediatamente antes o a la vez que la administración de la otra terapia.

45 Independientemente de si el polipéptido quimérico se administra como terapia única o conjunta, los métodos de tratamiento incluyen la administración de una dosis única o dosis múltiples. Las dosis múltiples incluyen la administración del polipéptido quimérico a intervalos especificados, tales como diariamente, semanalmente, dos veces al mes, mensualmente, etc. Las dosis múltiples incluyen un esquema de administración en el que el
 50 polipéptido quimérico se administra a intervalos especificados durante toda la vida del paciente.

VI. Terapia génica

Se pueden usar métodos de transferencia génica viral o no viral convencionales para introducir ácidos nucleicos que
 55 codifican polipéptidos de MTM1 en células de mamíferos o tejidos diana. Tales métodos se pueden usar para administrar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención (por ejemplo, MTM1, variantes del mismo incluidas) a células in vitro. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos que codifican los MTM1 se administran para terapias génicas in vivo o ex vivo. Los sistemas de liberación del vector no virales incluyen plásmidos de ADN, ácido nucleico desnudo y ácido nucleico complejado con un vehículo de transporte y liberación tal como un liposoma. Los
 60 sistemas de liberación de vectores virales incluyen virus ADN y ARN que tienen genomas en estado episomal o

integrado tras su liberación en la célula. Tales métodos son bien conocidos en la técnica.

Entre los métodos de liberación no viral de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos modificados por ingeniería genética de la invención se incluyen la lipofección, microinyección, biolística, los virosomas, liposomas, inmunoliposomas, conjugados policación o lípido:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales y captación de ADN potenciada por agentes. Los métodos de lipofección y los reactivos de lipofección son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Transfectam™ y Lipofectin™). Entre los lípidos catiónicos y neutros adecuados para un reconocimiento eficaz del receptor en la lipofección de polinucleótidos se incluyen los de Felgner, WO 91/17424, WO 91/16024. La liberación se puede hacer en células (administración ex vivo) o en tejidos diana (administración in vivo). La preparación de complejos lípido:ácido nucleico, incluyendo liposomas dirigidos tales como los complejos de inmunolípidos, es bien conocida por un experto en la materia.

El uso de sistemas basados en ARN o ADN viral para la liberación de ácidos nucleicos que codifican MTM1 o sus variantes se beneficia de procedimientos muy evolucionados de internalización de un virus en células específicas del cuerpo y tránsito de la carga viral al núcleo. Los vectores virales se pueden administrar directamente a pacientes (in vivo) o se pueden usar para tratar células in vitro y administrar las células modificadas a pacientes (ex vivo). Entre los sistemas convencionales de liberación de polipéptidos de la invención basados en virus se podrían incluir los vectores de transferencia génica basados en retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados y virus herpes simplex. Actualmente, los vectores virales son el método más eficaz y versátil de transferencia génica a células y tejidos diana. La integración en el genoma huésped es posible con los métodos de transferencia génica basados en retrovirus, lentivirus y virus adeno-asociados y con frecuencia da como resultado la expresión a largo plazo del transgén insertado. Adicionalmente, se han observado altas eficacias de transducción en muchos tipos de células y tejidos diana diferentes.

El tropismo de un retrovirus se puede alterar mediante incorporación de proteínas de envoltura extrañas, expandiendo así la población objetivo potencial de células diana. Los vectores lentivirales son vectores retrovirales que son capaces de transducir o infectar células que no se dividen y, habitualmente, producen títulos virales altos. Por lo tanto, la selección de un sistema de transferencia génica retroviral dependerá del tejido diana. Los vectores retrovirales comprenden repeticiones terminales largas de acción en cis con una capacidad de empaquetamiento de hasta 6-10 kb de secuencia extraña. Las LTR de acción en cis mínimas son suficientes para la replicación y empaquetamiento de los vectores, que, a continuación, se usan para integrar el gen terapéutico en la célula diana para proporcionar una expresión transgénica permanente. Entre los vectores retrovirales ampliamente usados se incluyen los basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), el virus de la leucemia del gibón (GaLV), el virus de la inmunodeficiencia simiesca (SW), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y combinaciones de los mismos, todos ellos bien conocidos en la técnica.

En aplicaciones en las que se prefiere la expresión transitoria de los polipéptidos de la invención, habitualmente se usan sistemas adenovirales. Los vectores adenovirales presentan una eficacia de transducción muy alta en muchos tipos de células y no requieren división celular. Con tales vectores se han obtenido títulos y niveles de expresión altos. Este vector se puede producir en grandes cantidades con un sistema relativamente sencillo. Los vectores basados en virus adeno-asociados ("AAV") también se usan para transducir células con ácidos nucleicos diana, por ejemplo, en la producción in vitro de ácidos nucleicos y péptidos, y para los procedimientos de terapia génica in vivo y ex vivo. La construcción de vectores AAV recombinantes se describe en varias publicaciones, entre ellas la patente US5173414; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al.; Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984); y Samulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989).

Los vectores basados en virus adeno-asociados recombinantes (rAAV) son un sistema alternativo prometedor de liberación génica basado en el virus adeno-asociado tipo 2 parvovirus defectuoso y no patógeno. Todos los vectores derivan de un plásmido que retiene solo las repeticiones terminales invertidas AAV 145 bp que flanquean al casete de expresión génica. La eficacia de transferencia génica y la estabilidad de la liberación transgénica debido a la integración en los genomas de la célula transducida son las características principales de este sistema de vectores.

Los vectores adenovirales recombinantes de replicación defectuosa (Ad) se pueden diseñar de tal forma que un transgén sustituya a los genes Ad E1a, E1b, y E3 y posteriormente el vector de replicación defectuosa se propague a células humanas que suministran la función del gen deletado en trans. Los vectores Ad pueden transducir múltiples tipos de tejidos in vivo, incluyendo las células diferenciadas que no se dividen tales como las que se encuentran en los tejidos del hígado, riñón y sistema muscular. Los vectores Ad convencionales tienen una gran capacidad transportadora.

Las células empaquetadoras se usan para formar partículas virales capaces de infectar una célula huésped. Entre

tales células se incluyen las células 293, que empaquetan adenovirus, y las células 42 o PA317, que empaquetan retrovirus. Normalmente, los vectores virales usados en terapia génica son generados por una línea celular productora que empaqueta un vector ácido nucleico en una partícula viral. Habitualmente, los vectores contienen las secuencias virales mínimas requeridas para el empaquetamiento y posterior integración en un huésped, siendo las otras secuencias virales sustituidas por un casete de expresión para la proteína que se debe expresar. Las funciones virales perdidas son suministradas en trans por la línea celular empaquetadora. Por ejemplo, los vectores AAV usados en terapia génica habitualmente solo poseen las secuencias ITR del genoma AAV necesarias para el empaquetamiento e integración en el genoma huésped. El ADN viral se empaqueta en una línea celular que contiene un plásmido auxiliar que codifica los otros genes AAV, concretamente los genes rep y cap, pero no tiene secuencias ITR. La línea celular también se infecta con adenovirus como auxiliar. El virus auxiliar favorece la replicación del vector AAV y la expresión de los genes AAV del plásmido auxiliar. El plásmido auxiliar no está empaquetado en cantidades significativas debido a una falta de secuencias ITR. La contaminación con adenovirus se puede reducir mediante, por ejemplo, tratamiento térmico, al cual los adenovirus son más sensibles que los AAV.

15 En muchas aplicaciones de terapia génica resulta conveniente que el vector de terapia génica se libere con un alto grado de especificidad en un tipo de tejido concreto. Habitualmente, un vector viral se modifica para que tenga especificidad por un tipo de célula dado mediante expresión de un ligando como una proteína de fusión con una proteína de revestimiento viral en la superficie exterior de los virus. El ligando se selecciona de forma que tenga afinidad por un receptor que se sabe que está presente en el tipo de célula de interés. Este principio se puede extender a otras parejas de virus que expresan una proteína de fusión ligando y una célula diana que expresa un receptor. Por ejemplo, se puede diseñar un fago filamentoso que presente fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, FAB o Fv) que tengan una afinidad de unión específica por virtualmente cualquier receptor celular elegido. Aunque la descripción anterior se aplica principalmente a los vectores virales, se pueden aplicar los mismos principios a los vectores no virales. Tales vectores se pueden diseñar de forma que contengan secuencias de captación específicas que se cree que favorecen la captación por parte de células diana específicas, tales como las células musculares.

Los vectores de terapia génica se pueden liberar in vivo mediante administración a un paciente individual, mediante administración sistémica (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica o infusión intracraneal) o mediante aplicación tópica. Alternativamente, los vectores se pueden liberar en células ex vivo, tales como las células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia tisular) o células madre hematopoyéticas de donante universal y posterior reimplantación de las células en un paciente, normalmente después de haber seleccionado las células que han incorporado el vector.

La transfección ex vivo para diagnóstico, investigación o terapia génica (por ejemplo, mediante reinfusión de las células transfectadas al organismo huésped) es bien conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, las células se aíslan del organismo en cuestión, se transfectan con un ácido nucleico (gen o ADNc) que codifica, por ejemplo, MTM1 o sus variantes, y se reinfunden en el organismo en cuestión (por ejemplo, un paciente). Diversos tipos de células adecuadas para la transfección ex vivo son bien conocidas por los expertos en la materia.

En ciertos aspectos, se usan células madre en procedimientos ex vivo de transfección celular y terapia génica. La ventaja de usar células madre es que se pueden diferenciar para convertirse en otro tipo de células in vitro o se pueden introducir en un mamífero (tal como el donante de las células) donde se injertarán en la médula ósea. Las células madre se aíslan por transducción y diferenciación mediante métodos conocidos.

También se pueden administrar directamente al organismo vectores (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, liposomas, etc.) que contienen ácidos nucleicos terapéuticos para la transducción de células in vivo. Alternativamente, se puede administrar ADN desnudo. La administración se hace por cualquiera de las rutas normalmente usadas para la introducción de una molécula en contacto final con células sanguíneas o células de tejidos. Hay disponibles métodos de administración de tales ácidos nucleicos y son bien conocidos por los expertos en la materia y, aunque se puede usar más de una ruta para la administración de una composición en particular, una ruta concreta puede, con frecuencia, proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra ruta.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables vienen determinados en parte por la composición concreta que se va a administrar, así como por el método concreto usado para administrar la composición. En consecuencia, tal como se describe en el presente documento, hay una amplia variedad de formulaciones de composiciones farmacéuticas adecuadas de la presente divulgación.

VII. Métodos de administración

Se conocen diversos sistemas de liberación y se pueden usar para la administración de los polipéptidos quiméricos

de la invención, por ejemplo, diversas formulaciones, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto y endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Los métodos de introducción pueden ser enterales o parenterales, entre los que se incluyen, pero no se limitan a, intradérmico, transdérmico, intramuscular, intraperitoneal, intravenoso, subcutáneo, pulmonar, intranasal, intraocular, epidural y vía oral. En aspectos
5 particulares, la introducción parenteral incluye la administración intramuscular, subcutánea, intravenosa, intravascular e intrapericardial.

Los polipéptidos quiméricos se pueden administrar por cualquier ruta conveniente, por ejemplo, por infusión o
10 inyección en bolo, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, la mucosa oral, la mucosa rectal o intestinal, etc.) y se pueden administrar de forma conjunta con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. También se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante.

15 En ciertos aspectos, puede ser conveniente la administración de los polipéptidos quiméricos de la invención localmente en la zona que necesita tratamiento (por ejemplo, el músculo); esto se puede conseguir, por ejemplo, y no limitado a, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, mediante inyección, mediante un catéter, o mediante un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, membranas
20 incluidas, tales como membranas sialásticas, fibras o sustitutos de piel comerciales.

En otros aspectos, los polipéptidos quiméricos de la invención se pueden liberar en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, 1990, Science 249:1527-1533). En otro aspecto más, los polipéptidos quiméricos de la invención se pueden liberar en un sistema de liberación controlada. En otro aspecto, se puede usar una bomba (véase Langer, 1990, supra). En otro aspecto, se pueden usar materiales poliméricos (véase Howard et al., 1989, J.
25 Neurosurg. 71:105). En ciertos aspectos específicos, los polipéptidos quiméricos de la invención se pueden liberar intravenosamente.

En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos se administran por infusión intravenosa. En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos se infunden durante un periodo de al menos 10, al menos 15, al menos 20 o al menos 30
30 minutos. En otros aspectos, los polipéptidos quiméricos se infunden durante un periodo de al menos 60, 90 o 120 minutos. Independientemente del periodo de infusión, la invención contempla que cada infusión es parte de un plan de tratamiento general en el que el polipéptido quimérico se administra de acuerdo con un programa regular (por ejemplo, semanalmente, mensualmente, etc.).

35 **VIII. Composiciones farmacéuticas**

En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos objeto de la presente divulgación se pueden formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se pueden administrar uno o más polipéptidos quiméricos por sí solos o como componentes de una formulación farmacéutica (composición). Los polipéptidos quiméricos se pueden formular
40 para su administración de cualquier forma conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria. También pueden estar presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como el lauril sulfato sódico, agentes desmoldeantes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

45 Entre las formulaciones de los polipéptidos quiméricos que nos ocupan se incluyen aquellas adecuadas para su administración oral, nasal, tópica, parenteral, rectal y/o intravaginal. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped que se vaya a tratar y del modo concreto
50 de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un vehículo para producir una forma de dosificación única será, generalmente, la cantidad de compuesto que produzca un efecto terapéutico.

En ciertos aspectos, entre los métodos de preparación de estas formulaciones o composiciones se incluye la combinación de otro tipo de agentes terapéuticos, un vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes adicionales.
55 En general, las formulaciones se pueden preparar con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido o ambos y, a continuación, si es necesario, dando forma al producto.

Las formulaciones para administración oral pueden ser en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, grageas (usando una base con sabor, normalmente sucrosa y acacia o tragacanto), polvo, gránulos, o como una solución o
60 una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión de aceite en agua o agua en aceite, o

como un elixir o un jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sucrosa y acacia) y/o enjuagues bucales y similares, todas ellas conteniendo una cantidad predeterminada del agente polipeptídico que nos ocupa como ingrediente activo. Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, tragacanto y mezclas de los mismos.

En las formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares) se pueden mezclar uno o más agentes terapéuticos polipeptídicos de la presente divulgación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o diluyentes, tales como féculas, lactosa, sucrosa, glucosa, manitol y/ ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, alginatos de carboximetilcelulosa, gelatina, polivinilpirrolidona, sucrosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como el glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como el agar-agar, carbonato cálcico, fécula de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico; (5) agentes retardadores de la solución, tales como la parafina; (6) acelerantes de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerilo; (8) absorbentes, tales como el caolín y la arcilla bentonítica; (9) lubricantes, tales como talco, estearato cálcico, estearato magnésico, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponadores. También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina duras y blandas usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Entre las formas de dosificación líquidas para administración oral se incluyen las emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica, tales como agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato etílico, acetato etílico, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol 1,3-butilenglicol, aceites (en concreto, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles, ésteres de ácidos grasos de sorbitano y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes de suspensión y emulsionantes, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos quiméricos en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles que se puedan reconstituir para dar soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, las cuales pueden contener antioxidantes, tamponadores, bacteriostáticos, solutos que hagan la formulación isotónica con la sangre del destinatario previsto o agentes de suspensión o espesantes. Entre los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención se incluyen el agua, el etanol, los polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como el oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos se puede garantizar mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retardan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Las formas inyectables de liberación prolongada se fabrican mediante formación de matrices de uno o más agentes terapéuticos polipeptídicos encapsuladas en polímeros biodegradables tales como el copolímero polilactida-poliglicolida. La velocidad del fármaco se puede controlar dependiendo de la relación entre fármaco y polímero y de la naturaleza del polímero concreto empleado. Entre los ejemplos de otros polímeros biodegradables se incluyen los poliortoésteres y los polianhídridos. Las formulaciones inyectables de liberación prolongada también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones compatibles con los tejidos celulares.

60

En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos de la presente divulgación se formulan de acuerdo con procedimientos rutinarios en forma de una composición farmacéutica adaptada para su administración intravenosa a seres humanos. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como la lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de inyección. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición se va a administrar mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o una solución salina para que los ingredientes se mezclen antes de su administración.

10 La cantidad de polipéptidos quiméricos de la invención que será efectiva en el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con los tejidos (por ejemplo, la miopatía miotubular) se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos in vitro para ayudar a identificar los rangos de dosificación óptimos. La dosis exacta que se debe emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la afección, y deberá ser decidida de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada sujeto. Sin embargo, los rangos de dosificación adecuados para administración intravenosa son generalmente de 20-5000 microgramos de polipéptido quimérico activo por kilogramo de peso corporal. Los rangos de dosificación adecuados para administración intranasal son generalmente de aproximadamente de 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de las curvas dosis-respuesta obtenidas a partir de sistemas de ensayo in vitro o en modelos animales.

20 En ciertos aspectos, los polipéptidos quiméricos y las composiciones de la invención, preparados farmacéuticos incluidos, son no pirogénicas. En otras palabras, en ciertos aspectos, las composiciones están sustancialmente exentas de pirógenos. En un aspecto, las formulaciones de la invención son formulaciones no pirogénicas que están sustancialmente exentas de endotoxinas y/o sustancias pirogénicas relacionadas. Las endotoxinas incluyen toxinas que están confinadas en el interior de un microorganismo y se liberan solo cuando los microorganismos se descomponen o mueren. Las sustancias pirogénicas también incluyen sustancias termoestables, inductoras de fiebre (glicoproteínas) procedentes de la membrana externa de bacterias y otros microorganismos. Estas sustancias pueden provocar fiebre, hipotensión y shock si se administran a humanos. Debido a su potencial efecto nocivo, se deben eliminar incluso las cantidades bajas de endotoxinas de las soluciones de fármacos farmacéuticos administrados intravenosamente. La Administración de Alimentos y Medicamentos ("FDA") ha establecido un límite superior de 5 unidades de endotoxina (EU) por dosis y kilogramo de peso corporal en un único periodo de una hora para las aplicaciones de fármacos intravenosos (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). Cuando se administran proteínas terapéuticas en dosificaciones relativamente altas y/o a lo largo de un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, tal como durante toda la vida del paciente), incluso cantidades pequeñas de endotoxinas nocivas y peligrosas podrían resultar peligrosas. En ciertos aspectos, los niveles de endotoxina y pirógeno en la composición son inferiores a 10 EU/mg, o inferiores a 5 EU/mg, o inferiores a 1 EU/mg, o inferiores a 0,1 EU/mg, o inferiores a 0,01 EU/mg, o inferiores a 0,001 EU/mg.

Lo anterior se aplica a cualquiera de los polipéptidos quiméricos, composiciones y métodos descritos en el presente documento. La invención contempla específicamente cualquier combinación de las características de tales polipéptidos quiméricos, composiciones y métodos (solos o combinados) con las características descritas para las diversas composiciones farmacéuticas y vías de administración descritas en esta sección.

IX. Modelos animales de MTM

45 Ratones que poseen una inactivación específica del gen MTM1 (MTM1 KO) nacen en una distribución submendeliana que por lo demás parece normal. Sin embargo, en las primeras semanas de vida los ratones MTM1 KO empiezan a perder masa muscular que rápidamente progresa a colapso respiratorio y muerte a una edad media de 7 semanas (14 semanas máximo). Las miofibras de los ratones MTM KO parecen hipotróficas y vacuoladas con núcleos localizados centralmente rodeados de mitocondria y glicogen, aunque hay muy poco daño al sarcolema y no hay signos de apoptosis o inflamación. Ultraestructuralmente, la proteína MTM1 aparece en las submembranas y vesículas del citoplasma; y las tríadas del sistema de túbulos T del músculo esquelético (Bello AB et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23):15060-5). Como la deficiencia de MTM1 en el músculo esquelético solo se justifica por el fenotipo de los ratones MTM1 KO, se puede evaluar la eficacia terapéutica de los constructos descritos en el presente documento usando el modelo de ratón MTM1 KO. Además, los ratones que poseen una inactivación parcial específica del gen MTM1 también pueden servir como sistema modelo adecuado para la presente divulgación. Tales modelos de ratón son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en ratones MTM1^{Δ4}, el exón 4 está sustituido por un sitio loxP y el alelo Cre está ausente (Buj-Bello et al., 2002, PNAS 99(23):15060-15065).

60

En consecuencia, en ciertos aspectos, la presente divulgación contempla métodos de prospección de mejoras en el fenotipo de la enfermedad usando los constructos de MTM1 (por ejemplo, los polipéptidos quiméricos que comprenden MTM1) descritos en el presente documento en un modelo de MTM de ratón. Los estudios llevados a cabo en ratones deficientes en MTM1 demuestran diferencias fenotípicas marcadas entre el tipo salvaje y los ratones deficientes en MTM1 (véase, por ejemplo, Buj-Bello et al., 2002, PNAS 99(23):15060-15065). Por ejemplo, se puede ver una clara divergencia en la ganancia de peso entre los ratones normales y los ratones deficientes en MTM1 a las ~3 semanas de edad. (Bello AB et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12; 99(23): 15060-5) También, las pruebas de evaluación de suspensión indican una dramática diferencia entre el comportamiento durante la suspensión de ratones con deficiencia de MTM1 y ratones normales. Adicionalmente, los ratones deficientes en MTM1 muestran un deterioro significativo de la fuerza de agarre (por ejemplo, agarre con la extremidad anterior) en comparación con los ratones normales. Además, tal y como determina el análisis de la marcha, en comparación con los ratones normales que prácticamente no manifiestan arrastre de pies, los ratones con deficiencia de MTM1 muestran mayor arrastre de patas. En el presente documento se describen protocolos de evaluación del efecto de los polipéptidos quiméricos que comprenden MTM1 en este modelo animal (Ejemplo 4).

En consecuencia, tras administración (por ejemplo, intravenosa) a ratones deficientes en MTM1, la capacidad del conjugado químico y/o genético de un polipéptido quimérico que comprende MTM1 (por ejemplo, el polipéptido quimérico 3E10-hMTM1 descrito en los ejemplos) para mejorar uno o más síntomas en ratones deficientes en MTM1 (por ejemplo, aumentar el peso corporal y la esperanza de vida, disminuir el arrastre de pies, mejorar la fuerza de agarre de la extremidad anterior, mejorar la capacidad de los ratones tratados para mantenerse a sí mismos en contra de la fuerza de la gravedad). Experimentos adicionales pueden también evaluar cualquier mejora en la fuerza de contracción isométrica de los músculos esqueléticos seleccionados, el aumento del área transversal de las miofibras, la reducción de núcleos centrales, la morfometría, la microscopía óptica/de fluorescencia, la actividad espontánea, la miografía ex vivo y la normalización de la tinción NADH-TR. Los niveles de 3E10-hMTM1 en el suero y los tejidos, así como el desarrollo de cualquier anticuerpo anti-3E10-hMTM1 también se evaluarán usando métodos de detección inmunológicos.

Asimismo, una vez que se ha establecido que la fusión génica de 3E10*MTM1 o MTM1 (por ejemplo, 3E10-GS3-hMTM1 o 3E10-GSTS-hMTM1) resulta en una mejora del fenotipo, se puede definir un estudio farmacocinético completo para determinar la dosis efectiva, la velocidad de eliminación, el volumen de distribución y la semivida del 3E10-MTM1. La farmacocinética del 3E10-MTM1 probablemente seguirá un modelo multicompartmental en el que varios tejidos exhibirán diferentes grados de eliminación y la simple evaluación de la semivida en suero no proporcionará información suficiente para calcular una tasa de dosificación terapéutica. Por lo tanto, en última instancia, el cálculo de una dosis y una tasa de dosificación provendrá de observaciones empíricas de la farmacocinética, farmacodinámica y toxicología de una dosis dada de 3E10-MTM1; y la velocidad y el grado en el que se observan, por ejemplo, un aumento de peso, del tiempo de suspensión en el alambre, de la fuerza de agarre de la extremidad anterior, del arrastre de pies, de la actividad espontánea, del diámetro de las miofibras y de la esperanza de vida. La dosis y tasa de dosificación del 3E10-MTM1 determinadas en un estudio farmacocinético posterior se puede usar como estándar comparativo para evaluar lotes optimizados de 3E10-MTM1 recombinante. A continuación, se examinará el PK/PD/TK del producto final en animales de mayor tamaño como ratas, perros y primates.

Los modelos de ratón anteriores proporcionan un sistema de modelo animal adecuado para la evaluación de la actividad y efectividad de los polipéptidos quiméricos que nos ocupan. Además, estos modelos están fuertemente correlacionados con la MTM y proporcionan un modelo adecuado para la MTM. La actividad del polipéptido se puede evaluar en estos modelos de ratón y se pueden comparar los resultados con los observados en los animales control de tipo salvaje y en animales no tratados con los polipéptidos quiméricos. Los resultados se pueden evaluar mediante examen de los ratones, así como mediante examen de la ultraestructura de sus células musculares. De forma similar, los polipéptidos quiméricos que nos ocupan se pueden evaluar usando células en cultivo, por ejemplo, células preparadas a partir de ratones mutantes.

En otros aspectos, también se puede usar un modelo animal de gran tamaño para evaluar la actividad y efectividad de los polipéptidos quiméricos que nos ocupan. A modo de ejemplo, un modelo de perro puede ser un sistema particularmente útil para el estudio de la MTM. El perro afectado lleva un gen deficiente en MTM1 y, por lo tanto, los estudios descritos en el presente documento para un modelo de ratón se aplican de forma similar a un modelo de perro. La dosis de evaluación del 3E10 conjugado químicamente o genéticamente a hMTM1 liberado en perros deficientes en MTM1 se determinará empíricamente.

X. Otros modelos adecuados

60

Entre otros métodos adecuados para la evaluación de la actividad de los polipéptidos quiméricos de la invención se incluyen los ensayos sin células y con células. Los polipéptidos quiméricos poseerán dos actividades: una bioactividad del MTM1 y una actividad de penetración celular del grupo internalizante que favorece la transferencia a través de las membranas celulares al interior de las células. Los modelos adecuados permiten la evaluación de una o ambas de estas actividades.

A modo de ejemplo, los polipéptidos quiméricos se pueden evaluar en cuanto a la penetración celular usando células primarias en cultivo o una línea celular. Las células se ponen en contacto con el polipéptido quimérico y se ensayan para determinar si el polipéptido quimérico ha entrado en la célula y en qué cantidad. Por ejemplo, se puede usar IHQ para evaluar si el polipéptido quimérico ha entrado en la célula y se pueden comparar los resultados con un control adecuado. En ciertos aspectos en los que se cree que la transferencia al interior de las células ocurre por medio de un transportador ENT2, las células se pueden examinar en presencia o ausencia de un inhibidor del transportador ENT2.

Además, tal y como se describe en el presente documento, los polipéptidos quiméricos de la presente divulgación se pueden usar para ensayar la funcionalidad en ensayos con células. En un aspecto ejemplar, se pueden usar células musculares primarias de ratones deficientes en MTM1 (por ejemplo, MTM1 δ 4) para determinar si el tratamiento con polipéptidos quiméricos descrito en el presente documento puede mejorar la deficiencia de fusión de los mioblastos deficientes en miotubularina. Los métodos detallados se ejemplifican en el presente documento.

A modo de ejemplo, se puede medir la bioactividad del MTM1 en ensayos sin células, por ejemplo, para confirmar que el polipéptido quimérico retiene la capacidad de unión a ligandos adecuados y/o retiene la actividad fosfatasa. Se pueden realizar ensayos similares en células primarias en cultivo o en una línea celular en cultivo.

25 ***XI. Kits***

En ciertos aspectos, la invención también proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con al menos un polipéptido quimérico de la invención. Entre los recipientes ejemplares se incluyen, pero no se limitan a, viales, botellas, jeringas previamente llenadas, bolsas IV y envases blíster (que comprenden una o más píldoras). Opcionalmente, asociada a dicho(s) recipiente(s) puede haber una nota, de la forma prescrita por una agencia gubernamental, que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, nota que refleja (a) la homologación por parte de la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana, (b) instrucciones de uso o ambas.

35 **EJEMPLIFICACIÓN**

La invención que se está describiendo de modo general, se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen únicamente con el propósito de ilustrar ciertos aspectos y aspectos de la presente divulgación, y no pretenden limitar la invención. Por ejemplo, los constructos y diseños experimentales concretos descritos en el presente documento representan herramientas y métodos ejemplares para la validación de la función adecuada. Como tal, resultará fácilmente evidente que cualquiera de los constructos y planes experimentales específicos descritos se pueden sustituir dentro del alcance de la presente divulgación.

Ejemplo 1 Conjugación química de 3E10 y hMTM1 (mAb3E10**h*MTM1)

Conjugación química

El anticuerpo monoclonal 3E10 es del subtipo IgG2a y deriva de la fusión de células esplénicas de un ratón MRL/lpr/mpj con células de hibridoma FOX-NY (Mankodi A et al., Mol Cell. 2002 Jul;10(1):35-44). Se conjugan covalentemente diez miligramos (10 mg) de mAb 3E10 a MTM1 humano recombinante (AbNova) en una proporción molar 1/1 usando dos reactivos heterobifuncionales diferentes, 3-(2-piridilditio)propionato de succinimidilo y *trans*-4-(maleimidilmetil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo. Esta reacción modifica los residuos de lisina del mAb 3E10 a tioles y añade grupos maleimida tiol reactivos al MTM1 (Weisbart RH, et al., J Immunol. 2000 Jun 1;164(11):6020-6). Tras la desprotección, las proteínas modificadas se hacen reaccionar entre ellas para crear un enlace tioéter estable. La conjugación química se ha realizado y los productos se fraccionan mediante cromatografía de filtración en gel. La composición de las fracciones se evalúa mediante electroforesis nativa y SDS-PAGE en ambientes reductores y no reductores. Las fracciones que contienen la mayor proporción de conjugado químico mAb 3E10**h*MTM1 a mAb 3E10 libre y *h*MTM1 libre se agrupan y seleccionan para su uso en estudios posteriores.

Se fabrican de forma similar conjugados químicos adicionales para su ensayo posterior. A modo de ejemplo no

limitante: (a) hMTM1*3E10, (b) Fv3E10*hMTM1, (c) hMTM1*Fv3E10. Nótese que a lo largo de todo el ejemplo, la abreviatura Fv se usa para hacer referencia a un Fv de cadena sencilla del 3E10. De forma similar, se usan mAb 3E10 y 3E10 indistintamente. Estos y otros polipéptidos quiméricos se pueden ensayar en cuanto a actividad enzimática y funcionalidad usando, por ejemplo, los ensayos detallados en el presente documento. Cualquier polipéptido quimérico que comprenda una porción MTM1 y un grupo internalizante se puede ensayar de forma similar para confirmar que el polipéptido quimérico mantiene la actividad del MTM1 y la actividad de penetración celular del grupo internalizante. La referencia a cualquier polipéptido quimérico concreto en estos ejemplos es únicamente a modo de ejemplo. En ciertos aspectos, se ensaya un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 11, o la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 11 en ausencia de uno o ambos epítomos marcadores, mediante uno o más de estos ensayos descritos en cualquiera de los ejemplos. En ciertos aspectos, se ensaya un polipéptido quimérico en el que el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 4 y que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 2. En otros aspectos, se ensaya un polipéptido quimérico en el que el grupo internalizante comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99% idéntica a la SEC ID N°: 4 y que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99% idéntica a la SEC ID N°: 2.

20 **Actividad PI(3)P y PI(3,5)P fosfatasa in vitro del mAb3E10*hMTM1**

Se evalúa la actividad fosfatasa de diluciones equimolares que abarcan 5 log de 1) mAb3E10*hMTM1 conjugado químicamente, 2) la mezcla sin conjugar de mAb 3E10 y hMTM1 3) mAb 3E10 por sí solo, o 4) hMTM1 por sí solo de acuerdo con las instrucciones del kit de ensayo de fosfatasa con verde de malaquita (Echelon Biosciences, Inc.) y tal y como describen Schaletzky, J. et al. (Current Biology 13:504-509, 2003; Supplemental Data, S1-S3). Se evalúa la actividad fosfatasa para determinar si el constructo de 3E10*hMTM1 conjugado químicamente retiene la actividad enzimática. Se evalúa la actividad fosfatasa tanto en un sistema sin células como en células BHK en cultivo (por ejemplo, en células BHK tratadas con los conjugados y comparadas con células BHK tratadas con controles). La evaluación de la actividad fosfatasa tanto en sistemas sin células como con células resulta útil porque la evaluación de la actividad fosfatasa en las células puede verse complicada por el hecho de que existan otras proteínas con actividad PI(3)P y PI(3,5)P fosfatasa (varias proteínas relacionadas con la MTM1 (MTMR) que tienen actividad PI(3)P y PI(3,5)P fosfatasa incluidas). En consecuencia, y dado que las células BHK puede que no proporcionen un contexto claro para el ensayo de la actividad PI(3)P o PI(3,5)P fosfatasa de estos constructos, la actividad de los constructos se evaluará usando tanto sistemas sin células como con células. Los criterios de actividad incluyen, por ejemplo, una actividad demostrada del MTM1 por sí solo del 50 % (en peso) o una actividad demostrada del 50 % de los niveles publicados (véase, por ejemplo, la Figura S1 de Supplemental Data by Schaletzky, J. et al.).

Aunque los presentes ejemplos usan específicamente PIP3 (también conocida como "PI(3)P") y PI(3,5)P como sustratos para el MTM1, un experto entenderá fácilmente que también se pueden usar otros sustratos fosfoinosítidos, tal y como se describe en el presente documento, como sustratos para ensayos in vitro.

Entrada en las células del mAb3E10*hMTM1 y asociación con la proteína endosomal Vps34

1. Se transfectan células BHK con el ADNc que codifica hVps34 y/o el ADNc para el transportador ENT2 que media la captación celular del mAb 3E10 (Hansen JE et al., J Biol Chem. 2007 Jul 20;282(29):20790-3). Dos días después (48 horas después de la transfección) se aplica mAb3E10*hMTM1 conjugado químicamente o una mezcla de mAb 3E10 y hMTM1 sin conjugar a las células transfectadas, se realizan inmunoprecipitaciones con anti-Vps34, anti-hMTM1, o anti-mAb3E10 y se detectan mediante inmunoelectrotransferencia el mAb 3E10, hVps34, y hMTM1. Se realizan inmunoprecipitaciones inversas como controles. Las células BHK son inmunológicamente negativas para la MTM1 humana (hMTM1), y Vps34 humana (hVps34) (Cao C et al., Traffic 2007; 8: 1052-1067). Se verificará la entrada en las células del mAb3E10*hMTM1 por medio del transportador ENT2 tratando las células transfectadas con un inhibidor de ENT2 (NBMPR) antes de la adición del material conjugado y sin conjugar. Se sabe que la MTM1 humana inmunoprecipita hVps34 y hVps15 (Cao C et al., Traffic 2007; 8: 1052-1067), y la inmunoprecipitación de hVps15 se puede usar como validación posterior de una asociación endosomal o como una alternativa a la hVps34 para su uso en inmunoprecipitaciones. Dado que las células BHK son inmunológicamente negativas para hMTM1 y hVps34, cualquier indicio de coinmunoprecipitación de hVps34 y hMTM1, seguida de adición de material conjugado, pero no sin conjugar, resulta consistente con la conclusión de que se liberó hMTM1 en las células y retuvo su capacidad de asociación con la hVps34.

60

- **Síntesis de ADNc humano para Vps34 y ENT2: El ADNc para hVps34 y el transportador ENT2** son tal y como se ha publicado previamente (Hansen JE et al., J Biol Chem. 2007 Jul 20;282(29):20790-3; Cao C et al., Traffic 2007; 8: 1052-1067). Cada ADNc se clona en un casete de expresión de mamíferos basado en CMV y se fabricarán preparaciones a gran escala usando el kit de purificación EndoFree Plasmid Mega de Qiagen.
- **Transfecciones:** Se transfectan diez microgramos del plásmido pCMV hVps34 y/o pCMV ENT2 en un 80 % de células BHK confluentes usando reactivos de transfección disponibles en el mercado. Cuarenta y ocho horas después de la transfección se aplica mAb3E10*hMTM1 conjugado químicamente o una mezcla de mAb 3E10 sin conjugar y hMTM1 libre a las células. De cuatro a 6 horas después se lavan las células, lo que limpia los contenidos citoplasmáticos a la vez que mantiene las estructuras celulares intactas (Cao C et al., Traffic 2007; 8: 1052-1067). Para hacer un seguimiento de la eficiencia de transfección, se realizan transfecciones duplicadas con plásmidos que codifican un reportero adecuado tal como beta-galactosidasa o GFP.
- **Inmunoprecipitación e inmunoelectrotransferencias:** Las **inmunoprecipitaciones se llevan a cabo** tal y como se ha descrito previamente (Weisbart RH et al., Mol Immunol. 2003 Mar;39(13):783-9; Cao C et al., Traffic 2007; 8: 1052-1067) con anti-hMTM1, anti-hVps34, y anticuerpo anti-mAb3E10, seguido de detección por inmunoelectrotransferencia del hMTM1, hVps34, y mAb3E10 coinmunoprecipitados. También se realizan inmunoprecipitaciones inversas como controles. Cuando no se emplean epítopos marcadores, la presencia de una banda inmunorreactiva de ~190 kDa coincidente con anti-3E10 y anti-MTM1 en células tratadas con mAb3E10*hMTM1 frente a controles de 3E10 por sí solo y hMTM1 por sí solo supondrá una penetración correcta del 3E10*hMTM1 conjugado químicamente. Si el conjugado químico mAb3E10*hMTM1 permanece intacto después de la penetración celular, debería inmunoprecipitar la hVps34 transfectada y del mismo modo la hVps34 debería inmunoprecipitar hMTM1 y 3E10. La detección de tubulina se usa como control de carga.
- **Inhibición ENT2:** Para verificar la especificidad del mAb3E10*MTM1 por el transportador ENT2, se tratarán todos los grupos con el inhibidor de ENT2 nitrobenzilmercaptopurina ribósido (NBMPR) durante 1 hora antes de la adición del mAb3E10*hMTM1 conjugado químicamente o una mezcla de mAb 3E10 recombinante libre y hMTM1 libre, y de 4 a 6 horas más tarde se recogen el medio y las células para las inmunoprecipitaciones antes descritas.

2. Las células musculares primarias se disocian en paralelo a partir de Mtm1 δ 4 (y/o a partir de otros ratones deficientes en MTM1) y camadas de ratones de tipo salvaje siguiendo el método establecido. Brevemente, se recogen músculos esqueléticos, finamente picados y digeridos usando dispasa II y colagenasa D. Se cultivan células miogénicas primarias en un medio de crecimiento (MC: F10 20 % FBS, 10 ng/ml 3/4-FGF, 1 % penicilina/estreptomina) en placas recubiertas de colágeno y se transfieren cuando alcanzan aproximadamente el 70 % de confluencia.

Las células se tratan con Fv3E10-MTM1 recombinante en un rango de dosificación y se fijan por inmunodetección, o se recogen los lisados celulares en una secuencia temporal de variables. Cuando está presente, el marcador myc o 6His de la proteína Fv3E10-MTM1 recombinante, tal como la proteína descrita en la SEC ID N $^{\circ}$: 11, se utiliza para inmunodetección y posterior determinación de captación intracelular y localización interna. También se utilizan anticuerpos marcadores anti Fv3E10-MTM1 para coinmunoprecipitar la Fv3E10-MTM1 intracelular, para detectar la presencia de proteínas de unión y para ensayar la actividad enzimática (usando el kit de ensayo de fosfatasa con verde de malaquita descrito en el presente documento) de la proteína Fv3E10-MTM1 transportada internamente.

Corrección del déficit de fusión en células musculares primarias

Las células musculares primarias se disocian en paralelo a partir de Mtm1 δ 4 (y/o a partir de otros ratones deficientes en MTM1) y camadas de ratones de tipo salvaje siguiendo el método establecido. Brevemente, se recogen músculos esqueléticos, finamente picados y digeridos usando dispasa II y colagenasa D. Se cultivan células miogénicas primarias en un medio de crecimiento (MC: F10 20 % FBS, 10 ng/ml 3/4-FGF, 1 % penicilina/estreptomina) en placas recubiertas de colágeno y se transfieren cuando alcanzan aproximadamente el 70 % de confluencia. Para evaluar las diferencias en proliferación celular, se siembran en placa el mismo número de células primarias de Mtm1 δ 4 (y/o de otros ratones deficientes en MTM1) y mioblastos de tipo salvaje. Los cultivos se siguen diariamente durante aproximadamente 2 semanas, con o sin adición de MTM1 o Fv3E10-MTM1 recombinantes.

Para determinar si el tratamiento con proteína recombinante mejora la deficiencia de 'fusión' de los mioblastos deficientes en miotubularina, se siembran en placa células primarias en una placa de 12 pocillos a una concentración de 2x10 5 células/pocillo. Las células se mantienen en un medio de diferenciación constituido por DMEM suplementado con un 2 % de suero de caballo durante 7 días y se cambia en medio diariamente. Se monitoriza la

formación de microtubulos y se documenta mediante adquisición de imágenes microscópicas diariamente. Se calcula el índice de fusión en los cultivos celulares control y deficientes en microtubularina como la proporción de núcleos fusionados en los microtubulos del número de núcleos totales. Los índices de fusión se comparan en los cultivos control, mutante y tratado usando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. Estas evaluaciones indican si las células tratadas difieren en contenido, proliferación y capacidad de diferenciación.

Después de los ensayos o tratamientos, las miofibras o microtubulos diferenciados de FDB en cultivo se hacen crecer en placas, se fijan en metanol, se bloquean en 10 % FBS/0,1 % Triton X-100 y se incuban con anticuerpos monoclonales de ratón contra cadenas pesadas de desmina o miosina tipo 1, tipo 2a, o tipo 2b, tal y como se ha descrito anteriormente. Se cuentan las fibras positivas y se realizan medidas punto a punto del diámetro MinFerret usando un microscopio Nikon Eclipse 90i que usa un software NIS-Elements-AR (Nikon, Melville, NY).

Ejemplo 2 Constructo génico de fv 3E10 y hMTM1 (Fv3E10-GS3-hMTM1 y Fv3E10-GSTS-hMTM1)

Se generan vectores de expresión de mamíferos que codifican una fusión génica de Fv3E10 y hMTM1 (fv3E10-GS3-hMTM1, que comprende el scFv del mAb 3E10 fusionado a hMTM1 mediante el conector GS3 - SEC ID N°: 3; fv3E10-GSTS-hMTM1 que comprende el scFv del mAb 3E10 fusionado a hMTM1 mediante el conector "GSTS" - SEC ID N°: 10). Se proporciona una secuencia ejemplar para un polipéptido quimérico fv3E10-GSTS-hMTM1 en la SEC ID N°: 11. Por tanto, los polipéptidos quiméricos de la invención incluyen un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 11, en presencia o ausencia de los epítopos marcadores (por ejemplo, la SEC ID N°: 11 contiene internamente un marcador myc y un marcador 6x-His en el extremo terminal C).

Después de la transfección, se inmunoprecipitan las células para verificar que la fusión génica retiene la capacidad de asociación con las proteínas endosomales, tal y como se describe en el Ejemplo 1. El medio acondicionado se somete a inmunoelectrotransferencia para detectar secreción de 3E10 y hMTM1 al medio de cultivo. Después de concentrar el medio de cultivo, se mide la actividad fosfatasa contra, por ejemplo, PI(3)P o PI(3,5)P, y se aplica el material concentrado a células BHK que expresan Vps34 y ENT2 para validar posteriormente que la fusión hMTM1 secretada entra a las células y retiene la capacidad de asociación con las proteínas endosomales. Nótese que también se hace referencia a estas fusiones génicas como conjugados recombinantes o conjugados producidos recombinantemente.

Se fabricarán de forma similar conjugados producidos recombinantemente adicionales para su ensayo posterior. A modo de ejemplo no limitante: (a) hMTM1-GS3-3E10, (b) 3E10-GS3-hMTM1, (c) hMTM1-GS3-Fv3E10, (d) hMTM1-3E10, (e) 3E10-hMTM1 (f) hMTM1-Fv3E10. Nótese que a lo largo de todo el ejemplo, la abreviatura Fv se usa para hacer referencia a un Fv de cadena sencilla del 3E10. De forma similar, se usan mAb 3E10 y 3E10 indistintamente. Estos y otros polipéptidos quiméricos se pueden ensayar usando, por ejemplo, los ensayos detallados en el presente documento.

• **Síntesis de ADNc para hMTM1 y Fv3E10:** Se sintetiza el ADNc para hMTM1 humana (número de acceso: NP 000243.1) y el ADNc para la cadena ligera variable Fv3E10 de ratón conectada a la cadena pesada del 3E10 con sitios de restricción flanqueantes que facilitan la clonación a vectores de expresión adecuados. Para maximizar la expresión, cada ADNc tendrá codones optimizados para la expresión en mamíferos, *Pichia* y/o *E. coli*. El ADNc de la hMTM1 humana tiene tres secuencias consenso de glicosilación que pueden modificarse tras la secreción. El ADNc que codifica una cadena ligera variable Fv3E10 ejemplar de ratón conectada a la cadena pesada del 3E10 para su uso en el presente documento contiene una mutación que mejora la capacidad de penetración celular del fragmento Fv, que se produce en la posición 31 (D31Q) de la secuencia completa del 3E10 de ratón (Zack DJ et al., *J Immunol.* 1996 Sep 1;157(5):2082-8), y es la variante usada en los ejemplos. El ADNc resultante se clonará en un casete de expresión de mamífero, o en otro casete de expresión adecuado, y se fabricarán preparaciones a gran escala del plásmido pCMV-Fv3E10-GS3-hMTM1 usando el kit de purificación EndoFree Plasmid Mega de Qiagen. Las secuencias ejemplares de 3E10 VH de ratón y 3E10 VL de ratón se representan por las SEC ID N°: 2 y 4, respectivamente.

• **Transfecciones:** Se transfectan diez microgramos del plásmido pCMV-hMTM1, pCMV-Fv3E10-GS3-hMTM1, pCMV ENT2 o pCMV en un 80 % de células BHK confluentes usando reactivos de transfección disponibles en el mercado. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recoge y concentra el medio acondicionado y se lavan y tratan las células con saponina tal y como se describe en el Ejemplo 1. Para hacer un seguimiento de la eficiencia de transfección se realizan transfecciones duplicadas con plásmidos que codifican un reportero adecuado tal como beta-galactosidasa o GFP.

• **Actividad PIP3 fosfatasa de las fusiones de la hMTM1 conjugada genéticamente:** Se recogen lisados celulares y medio acondicionado concentrado a partir de células BHK transfectadas con fusión pCMV-hMTM1, pCMV-hMTM1 tal y como se describe en el presente documento o pCMV y se evalúa la actividad fosfatasa, por ejemplo contra

PI(3)P o PI(3,5)P de cada transfección siguiendo las instrucciones del kit de ensayo de fosfatasa con verde de malaquita (Echelon Biosciences, Inc). La descripción general de los grupos experimentales y los resultados esperados para ciertos grupos de control se indican en la Tabla 1. Las células marcadas como "?" indican resultados que se deben obtener. Los grupos de control 13-16 (véase la Tabla 1) incluirán la aplicación de mAb3E10*MTM1 conjugado químicamente a las células transfectadas a pCMV (simuladas) seguida un día más tarde de evaluación de la actividad fosfatasa en lisados celulares y medio acondicionado concentrado. Al día siguiente (24 horas después) se examina la actividad fosfatasa en los lisados celulares y el medio acondicionado concentrado. Por ejemplo, no se espera observar actividad fosfatasa en el lisado del grupo 13 que ha sido pretratado con inhibidor de ENT2 (Grupo 13 de la Tabla 1). Los grupos de control adicionales 17-18 tendrán una actividad conocida del mAb3E10*MTM1 conjugado químicamente enriquecido en los lisados celulares y medio acondicionado concentrado de células transfectadas pCMV (simuladas) y servirá como control positivo y curva estándar para la actividad fosfatasa.

Tabla 1. Diseño experimental para evaluar la actividad PIP3 fosfatasa, la asociación endosomal y la secreción de Fv3E10-GS3-MTM1

Tabla 1: Estrategia para evaluar la actividad PIP3 fosfatasa, la asociación endosomal y la secreción de Fv3E10-GS3-MTM1 conjugado genéticamente.

Grupo	ADNc transfectados	Anticuerpo de inmunoprecipitación	¿También ha la inmunoprecipitado siguiente proteína?			¿Actividad PIP3 en las inmunoprecipitaciones?	
			Vps34	hMTM1	3E10	Lisado*	Medio acondicionado
1	pCMV hMTM1 + CMV hVps34	anti-hMTM1	Sí	Sí	No	Sí	No
2		anti-hVps34	Sí	Sí	No	Sí	No
3		anti-3E10	No	No	No	Sí	No
4	pCMV hMTM1 + CMV	anti-hMTM1	No	Sí	No	Sí	No
5		anti-hVps34	No	No	No	Sí	No
6		anti-3E10	No	No	No	Sí	No
7	pCMV 3E10-GS3-hMTM1 + CMV hVps34	anti-hMTM1	?	Sí	Sí	?	?
8		anti-hVps34	Sí	?	?	?	?
9		anti-3E 10	?	Sí	Sí	?	?
10	pCMV 3E10-GS3-hMTM1 + CMV	anti-hMTM1	No	Sí	Sí	?	?
11		anti-hVps34	No	No	No	?	?
12		anti-3E10	No	Sí	Sí	?	?

15

Grupo	ADNc transfectados	Inhibidor ENT2:	Aplicación de mAb3E10*hMTM1 a las células	¿Actividad PIP3 en las inmunoprecipitaciones?	
				Lisado*	Medio acondicionado
13	CMV + CMV ENT2	+	+	No	Sí
14		-	+	Sí	Sí
15	CMV	+	+	?	Sí
16		-	+	?	Sí
17	CMV	-	-	Sí, enriquecido	No
18		-	-	No	Sí, enriquecido

*, las actividades PIP3 fosfatasa serán función de la actividad endógena y dependiente de hMTM1. Los grupos del 13 al 16 son controles para mostrar que el ENT2 controla la captación celular de conjugados químicos de 3E10*hMTM1, y los grupos 17 y 18 son controles para la detección de actividad fosfatasa de la MTM1 en lisados celulares y medio acondicionado

Captación celular de hMTM1 conjugada genéticamente: El mAb3E10*hMTM1 conjugado químicamente y el medio acondicionado concentrado de células BHK transfectadas con fusión pCMV hMTM1 o pCMV se aplica a las células BHK transfectadas 48 horas antes con pCMV ENT2 o pCMV Tabla 2. A continuación se procederá con las inmunoprecipitaciones como en el Ejemplo 1. El tratamiento de grupos duplicados con el inhibidor NBMPR del transportador verificará que la captación de 3E10 es específica al transportador ENT2.

20

Tabla 2. Diseño experimental para evaluar si Fv3E10-GS3-hMTM1 entra en las células por medio del ENT2 y se asocia con las proteínas endosomales

Tabla 2: Estrategia para evaluar si Fv3E10-GS3-hMTM1 entra en las células por medio del ENT2 y se asocia con las proteínas endosomales				Células tratadas con SALINA antes de la proteína recombinante			Células tratadas con NBMPR antes de la proteína recombinante		
				¿También ha inmunoprecipitado la siguiente proteína?			¿También ha inmunoprecipitado la siguiente proteína?		
Grupo	ADNc transfectado	Fuente de 3E10-hMTM1	Anticuerpo IP	Vps34	hMTM1	3E10	Vps34:	hMTM1:	3E10
1	pCMV hVps34 + pCMV ENT2	3E10+hMTM1 mezclados sin conjugar	anti-hMTM1	No	No	No	No	No	No
2			anti-hVps34	Sí	No	No	Sí	No	No
3			anti-3E10	No	No	Sí	No	No	No
4	pCMV hVps34 + pCMV		anti-hMTM1	No	No	No	No	No	No
5			anti-hVps34	Sí	No	No	Sí	No	No
6			anti-3E10	No	No	?	No	No	No
7	pCMV + pCMV ENT2		anti-hMTM1	No	No	No	No	No	No
8			anti-hVps34	No	No	No	No	No	No
9			anti-3E10	No	No	Sí	No	No	No
10	pCMV hVps34 + pCMV ENT2	mAb 3E10* hMTM1 (conjugados químicamente)	anti-hMTM1	Sí*	Sí	Sí	No	No	No
11			anti-hVps34	Sí	Sí*	Sí*	Sí	No	No
12			anti-3E10	Sí*	Sí	Sí	No	No	No
13	pCMV hVps34 + pCMV		anti-hMTM1	Sí*	Sí	Sí	No	No	No
14			anti-hVps34	Sí	Sí*	Sí*	Sí	No	No
15			anti-3E10	Sí*	Sí	Sí	No	No	No
16	pCMV + pCMV ENT2		anti-hMTM1	No	Sí	Sí	No	No	No
17			anti-hVps34	No	No	No	No	No	No
18			anti-3E10	No	Sí	Sí	No	No	No
19	pCMV hVps34 + pCMV ENT2	Medio acondicionado concentrado de la transfección pCMV Fv3E10-GS3-hMTM1 (conjugado genéticamente)	anti-hMTM1	?	?	?	No	No	No
20			anti-hVps34	Sí	?	?	Sí	No	No
21			anti-3E10	?	?	?	No	No	No
22	pCMV hVps34 + pCMV		anti-hMTM1	?	?	?	No	No	No
23			anti-hVps34	Sí	?	?	Sí	No	No
24			anti-3E10	?	?	?	No	No	No
25	pCMV + pCMV ENT2		anti-hMTM1	No	?	?	No	No	No
26			anti-hVps34	No	No	No	No	No	No
27			anti-3E10	No	?	?	No	No	No
28	pCMV Vps34 + pCMV 3E10	Medio acondicionado concentrado de	anti-hMTM1	Sí**	Sí	Sí	Sí**	Sí	Sí
29			anti-	Sí	Sí**	Sí**	Sí	Sí**	Sí**

	- GS3-	la transfección	hVps34						
30	hMTM1	pCMV simulada	anti-3E10	Sí**	Sí	Sí	Sí**	Sí	Sí
*, inmunoprecipitado y detectado mediante inmunoelectrotransferencia solo si ha inmunoprecipitado en el objetivo específico 1 de la tabla 2, grupos 10 al 18.**, asume que el conjugado genético no tiene defectos de asociación entre Vps34 y hMTM1.									

Ejemplo 3 Producción recombinante de fusiones de hMTM1 y verificación de la actividad PIP3 fosfatasa, la penetración celular y la asociación endosomal con Vps34

5 El 3E10-GS3-hMTM1 o 3E10-GSTS-hMTM1 recombinante se produce usando el sistema de expresión de proteínas en levadura *Pichia* (Invitrogen, RCT). *Pichia* exhibe una excelente expresión proteica, altas densidades celulares, procedimientos controlables, estabilidad de generación, durabilidad y procesamiento del producto similar al de las células de mamíferos. Se producen tanto las formas secretadas como no secretadas del 3E10-GS3-hMTM1. La secuencia hMTM1 contiene tres sitios NXS/T de glicosilación potenciales que pueden afectar a la actividad biológica de cualquier material secretado. En otros aspectos, los polipéptidos quiméricos se producen en un sistema de expresión bacteriano (por ejemplo, *E. coli*) o en un sistema de expresión celular en mamíferos.

- **Construcción de vectores de expresión proteica para *Pichia*:** La construcción de plásmidos, transfección, selección de colonias y cultivos para *Pichia* usarán kits y manuales de instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los ADNc para hMTM1 conjugados genéticamente (3E10-GS3-hMTM1 o 3E10-GSTS-hMTM1) creados y validados en el Ejemplo 2 se clonan en dos plásmidos alternativos; PICZ para expresión intracelular y PICZalfa para expresión secretada. La expresión proteica a partir de cada plásmido es impulsada por el promotor AOX1. Las *Pichia* transfectadas se seleccionan con zeocina y se ensayan las colonias en busca de expresión de la fusión hMTM1 recombinante. Las que más se expresen se seleccionarán y escalarán para purificación.
- **Purificación de la fusión de hMTM1 recombinante:** las fusiones de ADNc con mAb 3E10 Fv se ligan en el vector de expresión de la levadura *pPICZA* que se electropora posteriormente en la cepa *Pichia pastoris* X-33. Las colonias se seleccionan con zeocina (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se identifican con anticuerpos anti-his6 (Qiagen Inc, Valencia, CA). Se hacen crecer las células X-33 en matraces oscilantes de tres bocas con un medio atamponado de glicerol/metanol, y se induce la síntesis de proteínas con un 0,5 % de metanol de acuerdo con el protocolo del fabricante (EasySelect *Pichia* Expression Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se lisan mediante dos pasos a través de una prensa celular francesa a 20 000 lbs/in², y se purifica la proteína recombinante a partir de sedimentos celulares solubilizados en 9 M de guanidina HCl y 2 % de NP40 mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) en Ni-NTA-Agarosa (Qiagen, Valencia, CA). La proteína ligada se eluye en 50 mM de NaH₂PO₄ que contiene 300 mM de NaCl, 500 mM de imidazol y un 25 % de glicerol. Muestras de las fracciones eluidas se someten a electroforesis SDS-PAGE en un gradiente del 4-20 % (NuSep Ltd, Frenchs Forest, Australia) y se identifican las proteínas recombinantes mediante Western blot a membranas de nitrocelulosa desarrolladas con anticuerpos de ratón específicos a carga seguidos de anticuerpos de cabra conjugados con fosfatasa alcalina a IgG de ratón. Se mide la actividad fosfatasa alcalina mediante el sustrato cromogénico, cloruro de nitroblue tetrazolium/sal 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato de p-toluidina. Las proteínas se identifican en geles SDS-PAGE con reactivo de tinción azul GelCode (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). La proteína eluída está concentrada, reconstituida con suero de ternera fetal al 5 % y sustituida mediante diálisis por centuplicado en filtros para centrifugado 30 000 MWCO (Millipore Corp., Billerica, MA) contra medio McCoy (Mediatech, Inc., Herndon, VA) que contiene un 5 % de glicerol.
- **Expresión es bacteria:** El polipéptido quimérico también se puede expresar en un sistema de expresión bacteriano, tal como el *E. coli*. En tales casos, el constructo de ácido nucleico que codifica el polipéptido quimérico es de preferencia codónica optimizado para la expresión en *E. coli*. Para la expresión en *E. coli*, se usa el vector pGEX-2T GST. Se pueden ensayar diferentes cepas de *E. coli* para optimizar la expresión, tales como las cepas de *E. coli* WCA, BL21(DE3) y BL21(DE3) pLysE.
- **Evaluación de la calidad y formulación:** La inmunoelectrotransferencia contra 3E10 y hMTM1 se usará para verificar el tamaño e identidad de las proteínas recombinantes, seguida de tinción con plata para identificar la pureza relativa de las preparaciones de fusión 3E10 MTM1 y hMTM1. Se formulará material recombinante en un tampón y concentración (~0,5 mg/ml) que sean consistentes con las necesidades de las posteriores administraciones in vivo.
- **Evaluación in vitro del material recombinante:** En base a los estudios del Ejemplo 2, se determina la cantidad de actividad fosfatasa (por ejemplo, contra PI(3)P o PI(3,5)P por mol de conjugado que existe en el medio acondicionado de células transfectadas de fusión hMTM1 y este valor se usa como

estándar para la evaluación de la actividad fosfatasa de la fusión hMTM1 recombinante derivada de Pichia o E. coli. Tal y como se muestra en la Tabla 2, la actividad PIP3 fosfatasa relativa del conjugado químico, derivado de célula de mamífero y 3E10-GS3-hMTM1 recombinante derivado de Pichia en células BHK transfectadas con Vps34 se compara de forma similar.

5

Ejemplo 4 Evaluación in vivo de hMTM1 dirigida al músculo en ratones MTM KO

Selección de un modelo de ratón para evaluación

- 10 Ratones que poseen una inactivación específica del gen MTM1 (MTM1 KO) nacen en una distribución submendeliana que por lo demás parece normal. Sin embargo, en las primeras semanas de vida los ratones MTM1 KO empiezan a perder masa muscular que rápidamente progresa a colapso respiratorio y muerte a una edad media de 7 semanas (14 semanas máximo) (Bello AB et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23): 15060-5). El declive progresivo de los ratones MTM KO coincide con una atenuación de la ganancia de peso, reducción de la fuerza de agarre en la extremidad anterior, reducción de la capacidad para soportarse a sí mismos en contra de la fuerza de la gravedad y aumento del arrastre de pies (Bello AB et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23):15060-5). Las miofibras de los ratones MTM KO aparecen hipotróficas y vacuoladas con núcleos localizados centralmente rodeados de mitocondria y glicogen, aunque hay muy poco daño al sarcolema y no hay signos de apoptosis o inflamación (Bello AB et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23):15060-5). Una ventaja del uso de ratones MTM1 KO es la capacidad de usar ELISA para hacer el seguimiento de los niveles séricos y en tejido de 3E10-GS3-MTM1, y será necesaria para la posterior evaluación farmacocinética y las respuestas farmacodinámicas y toxicológicas respectivas. Para controlar si los niveles de MTM1 superiores a los fisiológicos resultan perjudiciales, se administrará 3E10-hMTM1 a ratones homocigóticos MTM1 de tipo salvaje (+/+).
- 25 A continuación se describen ensayos ejemplares para la evaluación de los ratones tratados. Además, la mejora en la afección de los ratones se evalúa en base a la esperanza de vida (aumento de la esperanza de vida en los ratones tratados), peso y disminución del arrastre de pies.

Selección de la dosis de 3E10-GS3-hMTM1

30

- Se determina la dosis de evaluación de 3E10 conjugado químicamente o genéticamente a hMTM1 liberado en los ratones MTM KO. Como punto de partida, para demostrar una respuesta terapéutica, se administra intravenosamente una dosis alta (por ejemplo 5,0 mg/kg) dos veces a la semana durante 20 semanas o hasta la muerte, lo que suceda primero. Se administra una dosis de 5 mg/kg de 3E10-GS3-MTM1 dos veces a la semana durante 20 semanas a ratones MTM KO (Tabla 3), seguida de evaluación de los cambios en los puntos finales de la enfermedad. Los controles incluyen ratones MTM1 +/- heterocigóticos vehículo y tratados y ratones MTM1 -/- tratados con el vehículo. También se monitoriza el desarrollo de anticuerpos anti-3E10-MTM1. Si establecemos que las fusiones génicas de 3E10*MTM1 o MTM1 intravenosas (por ejemplo, 3E10-GS3-hMTM1 o 3E10-GSTS-hMTM1) resultan en una mejora del fenotipo, se iniciarán evaluaciones de PK posteriores in vivo en ratones MTM KO para identificar un régimen de dosificación que favorezca el mayor efecto farmacodinámico con las menores consecuencias toxicológicas.
- 35
- 40

Tabla 3. Plan de dosificación in vivo para 3E10-MTM1 conjugado químicamente y genéticamente

Tabla 3: Plan de dosificación in vivo para 3E10-MTM1 conjugado químicamente y genéticamente					
Grupo	Cepa	Edad (semanas)	N.º de ratones	Tratamiento	Dosis (mg/kg)
1	MTM1 -/-	10	5	mAb 3E10* hMTM1 (conjugado químicamente)	5
2	MTM1 -/-	10	5	mAb 3E10 & hMTM1 (mezclados sin conjugar)	5
3	MTM11 - /-	10	5	Fv3E10-GS3-hMTM1 (conjugado genéticamente)	5
4	MTM1 -/-	10	5	Vehículo	NA
5	MTM1 +/-	10	5	mAb 3E10* hMTM1 (conjugado químicamente)	5
6	MTM1 +/-	10	5	mAb 3E10 & hMTM1 (mezclados sin conjugar)	5
7	MTM1	10	5	Fv3E10-GS3-hMTM1	5

	+/+			(conjugado genéticamente)	
8	MTM1 +/+	10	5	Vehículo	NA
Información sobre el intervalo temporal: Dosis dos veces a la semana durante 20 semanas. Observaciones diarias. Recolección de sangre y tejidos para aislamiento de proteínas IHQ, H&E					

- 5

10

15

• **Fuerza de agarre:** El dispositivo de evaluación de la fuerza de agarre (Columbus Instruments) no requiere entrenamiento previo por parte del ratón. En la prueba de tensión corporal total empleada por otros (Bello AB et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23):15060-5) se ata un animal por su cola a un transductor de fuerza, a continuación, la cola se pellizca y se mide la tensión ejercida a medida que el animal intenta escapar. Aparte de las implicaciones en materia de bienestar del animal al que se le induce dolor como condición para obtener una respuesta, no está claro cómo está estandarizada la fuerza del pellizco o cómo se asegura correctamente la cola al transductor. Como alternativa aceptable, un ensayo de fuerza de agarre de la extremidad anterior, normalizado para el peso del ratón, reproduciría suficientemente las mediciones de la prueba de tensión corporal total, sobreviviría al escrutinio de la IACUC y se puede realizar con un transductor de fuerza de fácil disposición (Columbus Instruments). El ángulo en el que se tira del ratón desde la rejilla metálica tendrá un efecto proporcional en la fuerza medida. Por lo tanto, la prueba de fuerza de agarre esta estandarizada para que se tire del ratón por la cola de forma paralela a la rejilla horizontal y en dirección contraria al transductor de fuerza a una velocidad de aproximadamente 5 cm/seg. Su usan cuatro tirones separados por ~20 segundos de descanso para medir cualquier fatiga.
- 20

• **Inyección de 3E10-MTM1 conjugado químicamente y genéticamente.** Se formula una fusión génica de 3E10**hMTM1* o *hMTM1* y se diluye en un tampón que sea consistente con la inyección intravenosa (por ejemplo, una solución salina estéril o una solución tamponada de 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, NaCl 0,15 M). La cantidad de fusión génica 3E10**hMTM1* o *hMTM1* dada a cada ratón se calcula como sigue: dosis (mg/kg) x peso del ratón (kg) x concentración de reserva (mg/ml) = volumen (ml) de reserva por ratón, c.s.p. 100 ul con vehículo.
- 25

• **Toma de muestras de sangre.** La sangre se recoge mediante punción cardiaca en el momento en que los animales se sacrifican para la disección de tejidos. Se retira el suero y se congela a -80 °C. Para minimizar los efectos de la descongelación y manipulación, todos los análisis de fusión génica 3E10**MTM1* o *MTM1* que circulan por la sangre se realizan en el mismo día.
- 30

• **Recogida y preparación de tejidos.** Los tejidos de muestra se dividen por inmunoelectrotransferencia, bloques de tejido fijados en formalina e integrados en parafina y secciones congeladas en OCT. Una mitad del corazón, hígado, pulmón, bazo, riñones, cuádriceps, EDL, sóleo, diafragma y bíceps se subdividirá y congelará en tubos de plástico para posterior procesado por análisis de inmunoelectrotransferencia. La mitad restante del corazón, hígado, pulmón, bazo, riñones, cuádriceps, EDL, sóleo, diafragma y bíceps se subdividirá, congelará en medio de seccionamiento de tejidos OCT o fijará en zinc-formaldehído durante 24 a 48 horas a 4 °C y se integrará en parafina.
- 35

• **Evaluación histológica.** Se usa microscopía de campo claro de las secciones HE para determinar el porcentaje de miofibras nucleadas centralmente y el área transversal de las miofibras a partir de cinco campos seleccionados al azar. Se cuentan al menos 200 fibras por ratón y grupo muscular. Otras secciones se someten a tinción con NADH-TR. También se realiza la puntuación de las secciones ciegas para núcleos centrales, el área transversal de las miofibras y la normalización de la tinción con NADH-TR.
- 40

• **Inmunoelectrotransferencia.** El aislamiento de proteínas y la detección por inmunoelectrotransferencia de 3E10 y *MTM1* se realiza tal y como se ha descrito anteriormente (Weisbart RH et al., Mol Immunol. 2003 Mar;39(13):783-9; Bello AB et al., Human Molecular Genetics, 2008, Vol. 17, No. 14; Lorenzo O et al., Journal of Cell Science 119, 2953-2959 2005).
- 45

• **Análisis de 3E10-*hMTM1* circulante:** Se ha desarrollado una técnica ELISA específica para el 3E10-*MTM1* y se ha validado usando anticuerpos anti-*MTM1* humanos disponibles en el mercado. El 3E10-*MTM1* recombinante se diluye y se usa para generar una curva estándar. Los niveles de 3E10-*MTM1* se determinan a partir de diluciones de suero (normalizadas a ng/ml de suero) o extractos de tejido (normalizado a ng/ml de tejido).
- 50

• **Monitorización de respuestas de anticuerpos anti-3E10-*hMTM1*.** El 3E10-*MTM1* purificado usado para inyectar ratones *MTM KO* se siembra en placas ELISA de alta capacidad de enlace de 96 pocillos en 1 ug/ml de tampón de revestimiento (Pierce Biotech), al que se le permitió que revistiera durante la

- 5 noche, se bloquea durante 30 minutos en un 1 % de leche en polvo no grasa (Biorad) en TBS y se aclara tres veces en TBS. Se cargan diluciones dobles de sero procedente de animales inyectados con vehículo y 3E10-MTM1 en pocillos, se les permite incubar durante 30 minutos a 37 °C, se lavan tres veces, se incuban con IgA, IgG e IgM de conejo anti-ratón conjugadas con peroxidasa de rábano picante (HRP), se dejan incubar durante 30 minutos a 37 °C, y se lavan tres veces. Los anticuerpos anti-3E10-MTM1 de ratón se detectan con sustrato líquido TMB y se leen a 405 nm en un lector de placas ELISA. El MTM1 de conejo anti-ratón policlonal (Bello AB et al., Human Molecular Genetics, 2008, Vol. 17, No. 14), seguido de cabra anti-conejo conjugado con HRP sirve reacción de anticuerpo de control positivo. Cualquier absorbancia a 405 nm superior a la de los ratones MTM1 KO tratados con el vehículo constituye una respuesta del anticuerpo anti-3E10-MTM1 positiva.
- 10 • **Análisis estadístico.** La comparación por pares empleará la prueba de t Student. Las comparaciones entre múltiples grupos emplearán ANOVA. En ambos casos, un valor de <0,05 se considerará estadísticamente significativo.
- 15 Los anteriores ejemplos ayudan a ilustrar los experimentos que se pueden usar durante la fabricación y ensayo de polipéptidos quiméricos para uso en los métodos descritos en el presente documento. Los polipéptidos quiméricos que comprenden una porción MTM1 y un grupo internalizante se ensayan usando, por ejemplo, tres métodos. Cualquiera de los polipéptidos quiméricos descritos en la memoria descriptiva se puede ensayar con facilidad. Cualquier polipéptido quimérico que comprenda una porción MTM1 y un grupo internalizante se puede ensayar de forma similar para confirmar que el polipéptido quimérico mantiene la actividad del MTM1 y la actividad de penetración celular del grupo internalizante. La referencia a cualquier polipéptido quimérico concreto en estos ejemplos es únicamente a modo de ejemplo. En ciertos aspectos, se ensaya un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 11, o la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 11 en ausencia de uno o ambos epítomos marcadores, mediante uno o más de los ensayos descritos en
- 20 cualquiera de los ejemplos. En ciertos aspectos, se ensaya un polipéptido quimérico en el que el grupo internalizante comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 4 y que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 2. En otros aspectos, se ensaya un polipéptido quimérico en el que el grupo internalizante comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que comprende una cadena ligera que comprende una
- 25 secuencia de aminoácidos al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99% idéntica a la SEC ID N°: 4 y que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99% idéntica a la SEC ID N°: 2.

INFORMACIÓN SOBRE SECUENCIAS

- 35 SEC ID N°: 1: secuencia de aminoácidos de la proteína MTM1 humana (NP_000243.1)

MASASTSKYNSHSLLENESIKRTRSDGVNRDLTEAVPRLPGETLITDKEVIYICPFNGPI
 KGRVYITNYRLYLRSLLETDSLLLDVPLGVISRIEKMGGATSRGENSYGLDITCKDMR
 NLRFALKQEGHSRRDMFEILTRYAFPLAHSPLFAFLNEEKFNVDGWTVYNPVEEYR
 RQGLPNHHWRITFINKCYELCDTYPALLVVPYRASDDDLRRVATFRSRNRIPVLSWIH
 PENKTIVVRCSQPLVGMMSGKRNKDDEKYLDVIRETNKQISKLTIYDARPSVNAVANK
 ATGGGYESDDAYHNAELFFLDIHNIHVMRESLKKVKDIVYPNVEESHWLSSLESTHW
 LEHIKLVLTGAIQVADKVSSGKSSVLVHCSDGWDRTAQLTSLAMLMLDSFYRSIEGF
 EILVQKKWISFGHKFASRIGHGDKNHTDADRSPIFLQFIDCVWQMSKQFPFAFEFNEQ
 FLIILDHLYSCRFGTFLFNCESARERQKVTERTVSLWLSLNSNKEKFKNPFYTKEinRV
 LYPVASMRHLELWVNYIIRWNPRIKQQPNPVEQRYMELLALRDEYIKRLEELQLA
 NSAKLSDPPTSPSSPSQMMPHVQTHF

- 40 SEC ID N°: 2: cadena pesada variable del 3E10

EVQLVESGGGLVKPGGSRKLSAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSS
TIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARRGLLLDYWGQGTTL
TVSS

SEC ID N°: 3: secuencia del conector "GS3"GGGSGGGSGGGGS

5 SEC ID N°: 4: cadena ligera variable del 3E10

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYL
ESGVPARFSGSGSSTDFHLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLELK

SEC ID N°: 5: secuencia de ácido nucleico MTM1 humano (NM_000252.2)

10

agagggggcg gagcagggcc cggcagccga gcagcctggc aacggcggcg gcgccccggag
ccccgagagtt tccaggatgg cttctgcatc aacttctaaa tataattcac actccttggg
gaatgagtct attaagagga cgtctcgaga tggagtcaat cgagatctca ctgaggctgt
tcctcgactt ccaggagaaa cactaatcac tgacaaagaa gttatttaca tatgtccttt
caatggcccc attaaggga gagtttcat cacaattat cgtctttatt taagaagttt
ggaaacggat tcttctctaa tacttgatgt tcctctgggt gtgatctcga gaattgaaaa
aatgggagggc gcgacaagta gaggagaaaa ttctatgggt ctagatatta cttgtaaaga
catgagaaac ctgaggttcg ctttgaaca ggaaggccac agcagaagag atatgtttga
gatcctcag agatacgggt tccccctggc tcacagctcg ccattatttg catttttaaa
tgaagaaaag tttaacgtgg atggatggac agtttacaat ccagtggag aatacaggag
gcagggcttg cccaatcacc attggagaat aacttttatt aataagtgc atgagctctg
tgacacttac cctgctcttt tgggtggtcc gtatcgtgcc tcagatgat acctccggag
agttgcaact tttagggtccc gaaatcgaat tcagtgctg tcatggattc atccagaaaa
taagacggtc attgtgcggt gcagtcagcc tcttgctgggt atgagtggga aacgaaataa
agatgatgag aaatatctcg atgttatcag ggagaactaa aaacaaattt ctaaactcag
catttatgat gcaagaccca gcgtaaatac agtggccaac aaggcaacag gaggaggata
tgaaagtgat gatgcatatc ataacgccga acttttcttc ttagacattc ataatttca
tgttatgagg gaatctttaa aaaaagtga ggacattggt tctcctaatg tagaagaatc
tcattgggtg tccagtttgg agtctactca ttggttgaa catatcaagc tcgttttgac
aggagccatt caagtagcag acaaagtttc ttcagggag agttcagtc ttgtgcattg

ES 2 630 057 T3

cagtgacgga tgggacagga ctgctcagct gacatccttg gccatgctga tgttggatag
cttctatagg agcattgaag ggttcgaaat actggtacaa aaagaatgga taagttttgg
acataaaattt gcacctcgaa taggtcatgg tgataaaaac cacaccgatg ctgaccgttc
tcctatTTTT ctccagttta ttgattgtgt gtggcaaagt tcaaaacagt tcctacagc
ttttgaattc aatgaacaat ttttgattat aattttggat catctgtata gttgccgatt
tggacttttc ttattcaact gtgaatctgc tcgagaaaga cagaaggtta cagaaaggac
tgtttcttta tggcactga taaacagtaa taaagaaaaa ttcaaaaacc cttctatac
taaagaaatc aatcgagttt tatatccagt tgccagtatg cgtcacttgg aactctgggt
gaattactac attagatgga accccaggat caagcaacaa cagccgaatc cagtggagca
gcgttacatg gagctcttag ccttacgcga cgaatacata aagcggcttg aggaactgca
gctcgccaac tctgccaagc tttctgatcc cccaacttca cttccagtc cttegcaaat
gatgccccat gtgcaaaact acttctgagg ggggacctg gcaccgcatt agagctcgaa
ataaaggcga tagctgactt tcatttgggg catttgtaaa aagtagatta aaatatttgc
ctccatgtag aacttgaact aacataatct taaactcttg aatatgtgcc ttctagaata
catattacaa gaaaactaca gggccacac ggcaatcaga agaaaggagc tgagatgagg
ttttggaaaa cctgacacc tttaaaaagc agtttttgaa agacaaaatt tagatttaat
ttacgtcttg agaaatacta tatatacaat atatattttg tgggcttaat tgaacaaca
ttatttttaa atcaaagggg atatatgttt gtggaatgga ttttctgaa gctgcttaac
agttgctttg gattctctaa gatgaatcca aatgtgaaag atgcatgtta ctgccaaaac
caaattgagc tcagcttctt aggcattacc caaaagcaag gtgtttaagt aattgccagc
ttttatacca tcatgagtgg tgacttaagg agaaataget gtatagatga gtttttcatt
atttgaaat ttaggggtag aaaatgtttt ccctaattt tccagagaag cctattttta
tatttttaa aaactgacag ggcccagtta aatatgattt gcatttttta aatttgccag
ttttatttcc taaattcttt catgagcttg cctaaaattc ggaatggttt tcgggttggtg
gcaaacecca aagagagcac tgtccaagga tgtcgggagc atcctgctgc ttaggggaat
gttttcgcaa atgttgctct agtcagtcca gctcatctgc caaaatgtag ggctaccgtc
ttggatgcat gagctattgc tagagcatca tccttagaaa tcagtcccc agatgtacat

ES 2 630 057 T3

gtggtgagcg tattcttgaa agtattgtgt ttatgcattt caatttcaat ggtggtggct
tcccccccc accccacgcg tgcataaaaa ctggttctac aaatttttac ttgaagtacc
aggccgtttg ctttttcagg ttgttttggt ttatagtatt aagtgaaatt ttaaagtac
agttctatatt gctatctgaa ctaattcatt tattaagtat atttgtaaaa gctaaggctc
gagttaaaac aatgaagtgt tttacaatga ttgttaaagg actatttata actaatatgg
ttttgttttc aatgaattaa gaaagattaa atatatcttt gtaaattatt ttatgtcata
gtttaattgg tctaccaagt aagacatctc aaatacagta gtataatgta tgaattttgt
aagtataaga aattttatta gacattctct tactttttgt aaatgctgta aatatttcat
aaattaacaa agtgtcactc cataaaaaga aagctaatac taatagccta aaagattttg
tgaaatttca tgaaaacttt ttaatggcaa taatgactaa agacctgctg taataaatgt
attaactgaa acctaaaaaa aaaaaaaaaa aa

SEC ID Nº: 6: secuencia de proteína MTM1 de ratón (NP_064310.1)

MASASASKYNSHLENESIKKVSQDGVSDVSETPRLPGELLITEKEVIYICPFNGPI
KGRVYITNYRLYLRSLTDSALILDVPLGVISRIEYMGGATSRGENSYGLDITCKDLR
NLRFAKQEGHSRRDMFEILVKHAFPLAHNLPLFAFVNEEKFNVDGWTVYNPVEEY
RRQGLPNHHWRISFINKCYELCETYPALLVVPYRTSDDDLRRIATFRSRNRLPVLSWI
HPENKMVIMRCSQPLVGMMSGKRNDDEKYLDVIRETNKQTSKLMYDARPSVNAVA
NKATGGGYESDDAYQNSELSFLDIHNIHVMRESLKKVKDIVYPNIEESHWLSSLESTH
WLEHIKLVLTGAIQVADQVSSGKSSVLVHCSDGWDRTAQLTSLAMLMLDSFYRTIE
GFEILVQKEWISFGHKFASRIGHGDKNHADADRSPIFLQFIDCVWQMSKQFPTAFEFN
EGFLITVLDHLYSCRFGTFLFNCD SARERQKL TERTVSLWSLINSNKDKFKNPFYTKEI
NRVLYPVASMRHLELWVNYIRWNPRVKQQQPNPVEQRYMELLALRDDYIKRLEE
5 LQLANS AKLADAPASTSSSSQMVPHVQTHF

SEC ID Nº: 7: secuencia de ácido nucleico MTM1 de ratón (NM_019926.2)

ggtgagttcg ctttcttgge tgacctggct cggagccggg cattgcgggg atccaggatt
ggaaagggtc caggatggct tctgcatcag catctaagta taattcacac tccttgagga

ES 2 630 057 T3

atgaatccat taagaaagtg tctcaagatg gagtcagtca ggatgtgagt gagactgtcc
ctcggctccc aggggagtta ctaattactg aaaaagaagt tatttacata tgtcctttca
atggcccat taaggaaga gtttacatca caaattatcg tctttattta agaagtttg
aaacggatc tgctetaata cttgatgttc ctctgggtgt gatatacaaga attgaatata
tgggaggcgc gactagtaga ggagaaaatt cctatggtct agatattact tgtaaagatt
tgagaaacct gaggtttgca ttgaagcaag aaggccacag cagaagagat atgtttgaga
tccttgtaaa acatgccttt cctctggcac acaatctgcc attatttgca tttgtaaag
aagagaagtt taacgtggat ggtggactg tttataatcc agttgaagaa tatagaaggc
agggcctgcc caatcccat tggaggataa gttttattaa caagtgctat gagctctgtg
agacataccc tgctcttttg gtggtccct atcggacctc agatgatgat cttaggagga
tcgcaacggt tagatccga aatcggttc ctgtactgtc gtggattcac ccagaaaaca
aatgggtcat tatgcgtgc agtcagctc ttgtcggat gagtggtaaa agaaataaag
atgacgagaa atacctggat gtgatcaggg aaactaaca acaaacttct aagctcatga
tttatgatgc acgaccagt gtaaagcag tcgccaaca ggcaacagga ggaggatag
aaagtgatga cgcataatca aactcagaac tttccttctt agacattcat aatattcatg
ttatgcgaga atcttataaa aaagtgaag atattgttta tcccaacata gaagaatctc
attggtgtc cagtttgag tctactcatt ggttagaaca tatcaagctt gttctgaccg
gtgccattca agtggcagac caagtgtctt caggaaagag ctcggtactt gtgcaactga
gtgacggatg ggacaggacc gctcagctga catccttggc catgctgatg ttggacagct
tctacagaac tattgaagge tttgagatat tggtagaagaa agagtggata agttttggcc
ataaatttgc atctagaata ggtcatggtg ataaaaacca tgctgatget gatcgatctc
ctatcttctc tcagtttatt gactgtgtgt ggcagatgtc gaaacagttc cccacagctt
ttgagttcaa tgaaggcttt ttgattaccg ttttggatca tctgtatagc tgtcgatttg
gtactttctt attcaactgt gactcggctc gagaaagaca gaaacttaca gaaagaacag
tttctctatg gtcgctaatt aacagcaata aagacaaatt caaaaacccc ttctatacaa
aagaaatcaa tcgggttttg tatccagttg ccagcatgcg toacttggaa ctgtgggtga
attattacat ccgatggaat cccaggttca agcagcaaca gcccaaccca gtggagcagc

ES 2 630 057 T3

gttacatgga gcttttgccc ttgcgtgacg attatataaa gaggctcgag gaattgcagc
tggccaactc cgccaagctt gctgatgccc ccgcttcgac ttccagttcg tcacagatgg
tgccccatgt gcagacgcac ttctgagggg actcaattct ggcactgcac ttgaacteta
gataagtgaa atagctgact ctcaattctgg gcatgtggac aaagtagatt taaagtgtct
gcctccattht agaagttcaa ctaacatctt agacttttga gtatgtgcct tctgtaatac
atatcacaag aaatcgatgg tgtccgtgtg gcaatcataa ggaaggagtc aagagggggg
tctggaaaaat cctcataactt ttttttacia agcacttttg caaagataaa acttaaattht
aatttacctc tatataaatt ctacatatac agtatgtatt ttgtgggctt aattgaaata
ttatthttaa tccagggggg agatthttht gcaaaatgta tthtctcca gctgcttata
acagttgctt tggattatct aaaattaatc caaatgtgaa agatgggtat tactgccaaa
gccaattgc actctgcttc ttcagcaaat tccaagagca aggcgtthta ataattgcca
atthtthttht taccataagt ggtaaggtaa aaagaaagat gaacattthca tcaattthgaa
thtthtgaaaa taaaaggthc tccatcatt thtcaagaga agcacatttht tatattaaga
aaaagtgata agthtthgatt thtthtthccc tcaacattct cagctthtgc thttaaatta
tccatgatt thtthtctaac actgagthc actcaggtthg aaggaaacct ataaatagca
ctgtgcgagg agctggctgg ctctgctgc ttagaggaat atgttcgcaa acatgctct
agtcaattcg ccttatctgc tgaagtgtag ggcaccgcc ttgaatggat gagctatggc
tagagcatct thctthtctag taatgcccc ggtgtattct gthtthtctct ctctgthttaa
atggtgtgcg tgcataaaaa ctgctctgc acattattac thgaagthct gggcaattthg
ctthtthoagg thtthtthtca thtthtthtthg tagthtthgaaa tggaaathttht aatgcaagtht
tctatthtthg atccgaaacta atthctthtthg taaatathttht thgtaaaagct aaagthtthttht
caatthtthttht thtthctagtht thtthtthtthttht thtthtthtthttht thtthtthtthttht
agthtthtthttht gagagattac atthtthtthttht thtthtthtthttht thtthtthtthttht
ctaccaaagtht agacatctca aatataatag tataatgtat ggatthtthttht agthtthtthttht
thtthtthtthttht thtthtthtthttht thtthtthtthttht actthtthtthttht thtthtthtthttht
cactccataa gaagaaaaaa ctaatactaa tagthtthtthttht gaattggthttht aattthctagtht
aaatthtthttht atthtthtthttht atthtthtthttht acctgctg

SEC ID N°: 8: secuencia de proteína MTM1 de rata (NP_001013065.1)

MASSASDCDAHPVERESMRKVSQDGVQRQDMSKSGPRLPGESAITDKEVIYICPFSGP
 VKGRLYITNYRLYLRSLETDLAPILDVPLGVISRIEKMGGVTSRGENSYGLDITCKDL
 RNLRFALKQEGHSRRDIFDVLTRHAFPLAYNLPLFAFVNEEKFKVDGWAIYNPVEEY
 RRQGLPDRHWISFVNQRYELCDTYPALLVVPYRASDDDLRRVATFRSRNRIPVLSW
 IHPENRAAIMRCSQPLVGVGGKRSRDDERYLDIIRETNKQTSKLTIIYDARPGVNAVA
 NKATGGGYEGEDAYPHAELSFLDIHNIHVMRESLRRVRDIVYPHVEEAHWLSSLEST
 HWLEHIKLLLTGAIRVADKVASGLSSVLVHCSDGWDRTAQLTTLAMLMLDGFYRSI
 EGFEILVQKEWISFGHKFSSRIGHGDKNHADADRSPIFLQFIDCVWQMTKQFPTAFEF
 NECFLVAILDHLYSCRFGTFLLNCEAARERQRLAERTVSVVSLINSNKDEFTNPFYAR
 ESNRVIYPVTSVRHLELWVNYYIRWNPRIRQQPHPM

SEC ID N°: 9: secuencia de ácido nucleico MTM1 de rata (NM_001013047.1)

gcgagcgcgt tggcaccagc ggcceccgga gtctcagggt ccaggatggc gtctctcgta
 gcctctgact gtgatgcaca ccccgaggag cgtgagtcca tgaggaaggt gtctcaagat
 ggagtcctgc aggatatgag caagagtggg cctcgcctcc caggggaatc agccatcact
 gacaaggaag tcctctacat ttgtcccttc agcggccccg taaagggagc actttacatc
 accaattacc gtctctacct gagaagtctg gagacggact tggctccgat tcttgacgtc
 cccctaggcg tgatategag aatagagaaa atgggaggcg tgacgagtcg aggagagaat
 tcctacggcc ttgatatac ctgcaaagac ctgaggaacc tgagggttcgc tctgaagcag
 gaaggacaca gcaggaggga catctttgac gtcctcacca gacacgcctt cccctggct
 tacaacctgc cgttgttgac attcgtgaac gaggagaagt ttaaagtgga tggatgggag
 atttacaacc cggttgaaga gtacagaagg cagggcctcc ccgatcgcca ttggcgggata
 agtttcgta atcagcgcta cgagctctgt gacacctacc ctgccctcct ggtcgteccc
 taccgtgcgt ccgatgatga cctcagaaga gttgcaacct ttaggtccag aaaccggatt
 cccgtgctgt cgtggatcca cccagagaac agggcggcga tcatggcgtg cagtcagcct
 ctggttggtg tgggcgggaa gagaagcaga gatgatgaga gataacctga catcatccgg

5

ES 2 630 057 T3

gaaaccaata agcagacctc gaagctcaca atttacgatg cgcggcccg cgtcaatgcg
gtggccaaca aggcaacggg aggcggctat gagggcgagg acgcgtacc tcacgcggag
ctctccttc tggacatcca caacatccac gtgatgcggg aatccttac gagggtgagg
gacatcgtgt accccacgt ggaggaagct cattggctgt ccagcttga gtccacccat
tggtagagc acatcaagct tctcctcact ggtgccatcc ggtcgcaga caaggtggca
tcgggctga gttcagtct cgtgcactgc agtgacggct gggaccggac ggotcaactg
accacgtgg ccatgctgat gctcgatggc ttctaccgca gcatcgagg ctttgagatc
ctggtgcaga aggagtggat cagcttcgga cacaagtttt catctagaat tggccacggt
gacaagaacc acgcggatgc cgaccgtcc ccgattttcc tgcagtccat cgactgcgtg
tggcagatga cgaagcagtt cccacagct ttcgagttca acgagtgctt cctggttgcc
atcttgatc acctgtacag ctgcccgttc gggactttct tactaaactg tgaggcggca
cgggagagac agagactcgc agaaaggacg gtgtctgtgt ggtccctgat caacagcaac
aaagacgaat tcacaaacc gttctacgca agggagagca accgcgtgat ctaccggtc
accagcgtgc gccacctgga actgtgggtg aattactaca tccggtgga cccaggatc
cggcagcagc agccccacc catgtagcag cgatataatg agctcctggc cctgcgtgac
gattacatca agaagctgga ggagctgcag ctggccacgc ccaccaagct cactgactcc
tccaccocgc ctcccggttc cgcacagata gctcccgcga tgcaaaactca cttctgaggg
ggttccgggc cccaaacct gaataagtga cgtcaccac ttccgttctg tgcgcttggtg
caaaggggat ataaagtctc cgcctctgtg tagaagtcca actaacacc tagaaccttg
tgtgacacgt gtgagtgtgc gccttttgtg acgtgtgagt gtgcgatttg tgtgacatgt
gtgaatgtgt acctgtgtg atacgtgcaa gtgtgcgct tgtgtaaagt tcgtgagtgt
gcacctcctg taacatgttt tgcaaggaat ctactgeget tgtgtgccag tcgtgagtac
agagtgggg ggtcccga aaaatcctca cactttttta caaagcgtt gtgcaaagat
taaaattaa ttatatcaat aattatataa attattataa ttatattgca aagattaa
agttaaattt agtttacctc tatataaatc cagacataca taatatgtac tctgtgcgt
taattgaaac gttattttta atccagagg gagatTTTT ttgtaaaatg gatttttct
ccagccactt attttgcaa gataaaaaag ttaaaataaa agttaaattt aattataaaa
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
aaaaaaaaa aaaaaa

SEC ID N°: 10: secuencia del conector "GSTS"GSTSGSGKSSEGGK

5

SEC ID N°: 11 - Fv3E10-GSTS-hMTM1

ES 2 630 057 T3

DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYL
ESGVPARFSGSGSGTDFHLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGKLELKGGGG
SGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSRKLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGL
EWWAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDTAMYCCARRGLL
LDYWGQGTTLTVSSEQKLSEELGSTSGSGKSSEGKGMASASTSKYNSHSLENESIKRT
SRDGVNRLDTEAVPRLPGETLITDKEVIYICPFNGPIKGRVYITNYRLYLRSLDSSLI
LDVPLGVISRIEKMGGATSRGENSYGLDITKDMRNLRFALKQEGHRRDMFEILTRYA
FPLAHSPLPLFAFLNEEKFNVDGWTVYNPVEEYRRQGLPNHHWRITFINKCYELCDTY
PALLVVPYRASDDDLRRVATFRSRNRIPVLSWIHPENKTVIVCSQPLVGMSGKRNKD
DKYLDVIRETNKQISKLTIYDARPSVNAVANKATGGGYESDDAYHNAELFFLDIHNI
HVMRESLKKVKDIVYPNVEESHWLSLESTHWLEHIKLVLTGAIQVADKVSSGKSVL
VHCSDGWDRTAQLTLAMLMLDSFYRSIEGFEILVQKKWISFGHKFASRIGHGDKNHT
DADRSPIFLQFIDCVWMSKQFPTAFEFNEQFLIIILDHLYSCRFGTFLFNCE SARERQ
KVTERTVLWLSLINSNKEKFKNPFYTEINRVLYPVASMRHLELWVNYIRWNPRIKQQ
QPNPVEQRYMELLALRDEYIKRLEELQLANS AKLSDPPTSPSSPSQMMPHVQTHFHH
HHHH

Nota: en SEC ID N°: 11 - las secuencias del conector están subrayadas y los epítomos marcadores están subrayados con línea doble

5

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido quimérico que comprende: (i) un polipéptido de miotubularina (MTM1), o un fragmento del mismo y (ii) un grupo internalizante, donde el polipéptido quimérico tiene actividad fosfoinosítido fosfatasa; donde el grupo internalizante es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 2, o una variante humanizada de la misma, y el VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 4, o una variante humanizada de la misma de la misma.
2. Polipéptido quimérico que comprende: (i) un polipéptido de miotubularina (MTM1), o un fragmento del mismo y (ii) un grupo internalizante, donde el polipéptido quimérico tiene actividad fosfoinosítido fosfatasa; donde el grupo internalizante es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), donde el VH comprende una variante humanizada de una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 2, y el VL comprende una variante humanizada de una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 4.
3. Polipéptido quimérico de la reivindicación 1 o 2, donde el grupo internalizante favorece el transporte de dicho polipéptido quimérico al interior de las células musculares.
4. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el polipéptido MTM1 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEC ID N°: 1.
5. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-4, donde el polipéptido MTM1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, y donde el grupo internalizante es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 2 y un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 4, y donde el polipéptido MTM1 es C-terminal al scFv y está conjugado al scFv por medio de un conector.
6. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el polipéptido MTM1 además comprende una o más porciones de polipéptido que mejoran una o más de la estabilidad in vivo, la semivida in vivo, la captación/administración y/o la purificación.
7. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6, donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEC ID N°: 4, o una variante humanizada de la misma, y un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEC ID N°: 2 o una variante humanizada de la misma.
8. Polipéptido quimérico de la reivindicación 7, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es quimérico o humanizado.
9. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-6 y 8, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 98 % idéntica a la SEC ID N°: 4, o una variante humanizada de la misma, y un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 98 % idéntica a la SEC ID N°: 2, o una variante humanizada de la misma.
10. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 2-6, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), donde el VH comprende una variante humanizada de una secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID N°: 2, y el VL comprende una variante humanizada de una secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID N°: 4.
11. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el polipéptido MTM1 o fragmento del mismo está conjugado o unido al grupo internalizante mediante un conector.

60

12. Polipéptido quimérico de la reivindicación 11, donde el grupo internalizante está conjugado al aminoácido N-terminal o C-terminal del polipéptido MTM1.
13. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el fragmento de unión al 5 antígeno del mismo es un Fv de cadena sencilla (scFv).
14. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 6-12, donde el grupo internalizante es un Fab'.
- 10 15. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 6-12, donde el grupo internalizante es un fragmento F(ab')₂.
16. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 6-12, donde el grupo internalizante es un anticuerpo de longitud completa.
- 15 17. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 6-10, donde el polipéptido MTM1 o fragmento del mismo está conjugado químicamente al grupo internalizante.
18. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde el polipéptido MTM1 se 20 expresa en células bacterianas.
19. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde el polipéptido MTM1 está subglicosado en comparación con un polipéptido MTM1 nativo.
- 25 20. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde el polipéptido MTM1 no está glicosado.
21. Constructo de ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MTM1 o un fragmento del mismo, conectado operativamente a una secuencia de nucleótidos que 30 codifica un grupo internalizante, donde el constructo de ácido nucleico codifica un polipéptido quimérico que tiene actividad fosfoinosítido fosfatasa; y donde el grupo internalizante es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL), donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 2, o una variante 35 humanizada de la misma, y el VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 4, o una variante humanizada de la misma de la misma.
22. Constructo de ácido nucleico de la reivindicación 21, donde el anticuerpo o fragmento de unión al 40 antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98 % idéntica a la SEC ID N°: 4, o una variante humanizada de la misma, y un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98 % idéntica a la SEC ID N°: 2, o una variante humanizada de la misma.
23. Constructo de ácido nucleico de la reivindicación 21, donde el anticuerpo o fragmento de unión al 45 antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una variante humanizada de una secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID N°: 2, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una variante humanizada de una secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID N°: 4.
24. Constructo de ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido 50 quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-20.
25. Constructo de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 21-24, donde el fragmento de unión al antígeno del mismo es un Fv de cadena sencilla (scFv).
- 55 26. Composición que comprende el polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
27. Composición de la reivindicación 26, que además comprende un segundo agente que actúa de forma 60 aditiva o sinérgica para uso en el tratamiento de la miopatía miotubular.

28. Polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-20 para uso en el tratamiento de la miopatía miotubular en un sujeto con necesidad del mismo.

29. Uso *in vitro* del polipéptido quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-20 para liberación en el interior de una célula muscular.