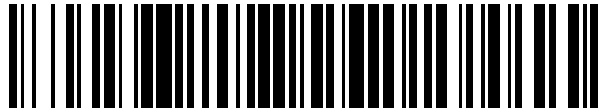


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 169**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2012 PCT/US2012/047999**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13016352**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2012 E 12816988 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2736539**

54 Título: **Productos de virus recombinantes y métodos para inhibición de la expresión de DUX4**

30 Prioridad:

25.07.2011 US 201161511319 P

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

28.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HARPER, SCOTT, QUENTON;
LIU, JIAN;
GARWICK, SARA y
WALLACE, LINDSAY**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 648 169 T3

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

DESCRIPCIÓN

Productos de virus recombinantes y métodos para inhibición de la expresión de DUX4

5 La presente solicitud reivindica las ventajas de la fecha de presentación de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º 61/511.319 presentada el 25 de julio, 2011.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a métodos basados en ARN de interferencia para inhibir la expresión del gen DUX4, un gen de homeocaja doble en el cromosoma 4q35 humano. Los virus adeno-asociados recombinantes de la invención administran los ADN que codifican los microARN que producen atenuación genética de la expresión de DUX4. Los métodos tienen aplicación en el tratamiento de distrofias musculares tales como distrofia muscular facioescapulohumeral.

15 Incorporación por Referencia del Listado de Secuencias

La presente solicitud contiene, como parte separada de la divulgación, un Listado de Secuencias en forma de lectura en ordenador (nombre del archivo: 45714PCT_SeqListing.txt; 1.661.020 bytes - archivo de texto ASCII) que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.

Antecedentes

25 Las distrofias musculares (MD) son un grupo de enfermedades genéticas. El grupo se caracteriza por debilidad y degeneración progresivas de los músculos esqueléticos que controlan el movimiento. Algunas formas de MD se desarrollan en la infancia o niñez, mientras que otras pueden aparecer hasta la edad media o posteriormente. Los trastornos se diferencian en términos de la distribución y alcance de la debilidad muscular (algunas formas de MD también afectan al músculo cardíaco), la edad de inicio, la tasa de evolución, y el patrón de herencia.

30 La distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD) es un trastorno dominante autosómico complejo caracterizado por debilidad progresiva y asimétrica de los músculos faciales, hombros y extremidades. Por lo general los síntomas aparecen en la edad adulta con la mayoría de los pacientes presentando características clínicas antes de los treinta años de edad. Aproximadamente un cinco por ciento de los pacientes desarrollan síntomas cuando son niños o jóvenes y por lo general éstos se ven más severamente afectados. La presentación clínica puede variar de leve (cierta debilidad muscular limitada) a severa (dependencia de silla de ruedas). Históricamente, la FSHD se clasificó como la tercera MD más común, afectando a uno entre 20.000 individuos en todo el mundo. Sin embargo, los datos recientes indican que la FSHD es la MD más común en Europa, lo que sugiere que su incidencia en todo el mundo puede estar subestimada.

40 Los casos habituales de FSHD (FSHD1A, en lo sucesivo denominadas FSHD) están relacionados con deleciones cromosómicas heterocigotas que disminuyen el número de copias de repeticiones de D4Z4 de 3,3 kilobases (kb) en el cromosoma 4q35 humano. De manera simple, los individuos normales tienen 11-100 copias de D4Z4 repetidas en tándem en ambos alelos 4q35, mientras que los pacientes con FSHD tienen un alelo normal Y uno contraído que contiene 1-10 repeticiones. Además las contracciones de D4Z4 asociadas a FSHD se deben producir en antecedentes específicos del cromosoma 4q35 que toleran la enfermedad. De forma importante, como resultado de deleciones asociadas a FSHD no se pierden genes completamente o mutan de forma estructural. Por lo tanto, aunque la enfermedad se clasificó formalmente en 1954, y el defecto genético primario se identificó en 1992, los mecanismos patogénicos siguen sin resolver.

50 En los principales modelos de patogénesis de la FSHD, se proponen contracciones de D4Z4 que causan cambios epigenéticos que permiten la expresión de genes con potencial miopático. Como resultado, la sobreexpresión anómala de genes de otro modo silenciosos o casi silenciosos en última instancia puede causar MD. Este modelo es coherente con los datos que muestran que las repeticiones de 4q35 D4Z4 normales tienen características de heterocromatina, mientras que las repeticiones de D4Z4 relacionadas con FSHD contienen marcas más indicativas de eucromatina transcrita activamente. Estos cambios epigenéticos que permiten la transcripción, junto con la observación de que las deleciones monosómicas completas de D4Z4 (es decir, cero repeticiones) no causan FSHD, respaldan la hipótesis de que las repeticiones de D4Z4 albergan marcos de lectura abiertos miopáticos (ORF) potencialmente anómalos en músculos con FSHD. Esta idea se consideró inicialmente en 1994, cuando se identificó por primera vez un ORF localizado en D4Z4, denominado DUX4. Sin embargo, el locus tenía algunas características de un pseudogén no expresado y por lo tanto DUX4 se descartó inmediatamente como un candidato de FSHD.

60 Durante muchos años a partir de ese momento, la búsqueda de genes relacionados con FSHD se centró principalmente fuera de las repeticiones de D4Z4, y aunque algunos candidatos interesantes surgieron a partir de estos estudios, no se ha relacionado de forma concluyente ningún gen con el desarrollo de FSHD. Este lento progreso llevó a la reaparición de DUX4 como candidato para FSHD en 2007. Sin embargo, a partir de 2010, los investigadores continuaron destacando otros genes como candidatos. Véase, por ejemplo, Wuebbles *et al.*, *Int. J.*

Clin. Exp. Pathol., 3 (4): 386-400 (2010) que destaca el gen 1 de la región de FSHD (frg1). Por el contrario, Wallace *et al.*, Mol. Ther., 17 (Supl. 1): S151 (2009); Wei *et al.*, Mol. Ther., 17 (Supl. 1): S200 (2009); y el informe de Lemmers *et al.*, de la edición Scienceexpress del 19 de agosto de 2010 destaca a DUX4. Neguembor y Gabellini, Epigenomics, 2 (2): 271-287 (2010) es un artículo de revisión reciente sobre la FSHD. La supresión de la expresión de DUX4 mediante estrategias antisentido ha sido informada por Vanderplanck *et al.*, (JOURNAL OF GENE MEDICINE, vol. 13, n.º 7-8, 1 de julio de 2011, página 414).

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo de regulación genética en células eucariotas que se ha considerado para el tratamiento de diversas enfermedades. El ARNi se refiere a un control post-transcripcional de la expresión genética mediada por los microARN (miARN). Los miARN son ARN no codificantes, pequeños (21-25 nucleótidos) que comparten la homología de secuencias y pares de bases con regiones no traducidas en la posición 3' de ARN mensajeros (ARNm) análogos. La interacción entre los miARN y los ARNm dirige la maquinaria de silenciamiento genético celular para evitar la traducción de los ARNm. La ruta del ARNi se resume en Duan (Ed.), Sección 7.3 del Capítulo 7 en Muscle Gene Therapy, Springer Science+Business Media, LLC (2010).

Como se ha desarrollado una comprensión de las rutas naturales del ARNi, los investigadores han diseñado miARN artificiales para su uso en la regulación de la expresión de genes diana para tratar la enfermedad. Como se describe en la Sección 7.4 de Duan, mencionado anteriormente, los miARN artificiales se pueden transcribir a partir de casetes de expresión de ADN. La secuencia de miARN específica para un gen diana se transcribe junto con secuencias requeridas para dirigir el procesamiento del miARN en una célula. Se han usado vectores virales tales como virus adeno-asociados para administrar los ARNm al músculo [Fechner *et al.*, J. Mol. Med., 86: 987-997 (2008)].

El virus adeno-asociado (AAV) es un parvovirus con deficiencia de replicación, cuyo genoma de ADN monocatenario tiene una longitud de aproximadamente 4,7 kb, incluyendo 145 repeticiones terminales invertidas (ITR) de nucleótidos. Hay múltiples serotipos de AAV. Se conocen las secuencias de nucleótidos de los genomas de los serotipos de AAV. Por ejemplo, el genoma completo de AAV-1 se proporciona con el N.º de Registro en GenBank NC_002077; el genoma completo de AAV-2 se proporciona con el N.º de Registro en GenBank NC_001401 y Srivastava *et al.*, J. Virol., 45: 555-564 {1983}; el genoma completo de AAV-3 se proporciona con el N.º de Registro en GenBank NC_1829; el genoma completo de AAV-4 se proporciona con el N.º de Registro en GenBank NC_001829; el genoma de AAV-5 se proporciona con el N.º de Registro en GenBank AF085716; el genoma completo de AAV-6 se proporciona con el N.º de Registro en GenBank NC_001862; al menos partes de los genomas de AAV-7 y AAV-8 se proporcionan con los N.ºs de Registro en GenBank AX753246 y AX753249, respectivamente; el genoma de AAV -9 se proporciona en Gao *et al.*, J. Virol., 78: 6381-6388 (2004); el genoma de AAV-10 se proporciona en Mol. Ther., 13 (1): 67-76 (2006); y el genoma de AAV-11 se proporciona en Virology, 330 (2): 375-383 (2004). Las secuencias de actuación *cis* que dirigen la replicación (rep) del ADN viral, encapsidación/empaquetamiento y la integración del cromosoma de la célula hospedadora están contenidas dentro de las ITR del AAV. Tres promotores de AAV (denominados p5, p19 y p40 por sus ubicaciones relativas en el mapa) conducen la expresión de los dos marcos de lectura abiertos internos de AAV que codifican los genes rep y cap. Los dos promotores rep (p5 y p19), junto con el corte y empalme diferencial del intrón de AAV único (en los nucleótidos 2107 y 2227), dan como resultado la producción de cuatro proteínas rep (rep 78, rep 68, rep 52 y rep 40) del gen rep. Las proteínas rep poseen múltiples propiedades enzimáticas que son en última instancia responsables de replicar el genoma viral. El gen cap se expresa a partir del promotor p40 y codifica las tres proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. Los sitios de inicio de la traducción alternativos de corte y empalme y sin consenso son responsables de la producción de las tres proteínas de la cápside relacionadas. Un solo sitio de poliadenilación consenso se encuentra en la posición 95 del mapa del genoma de AAV. El ciclo de vida y la genética de AAV se revisan en Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992).

El AAV posee características únicas que lo hacen atractivo como vector para administrar ADN extraño a células, por ejemplo, en terapia genética. La infección por AAV de células en cultivo no es citopática, y la infección natural de seres humanos y otros animales es silenciosa y asintomática. Además, el AAV infecta muchas células de mamíferos permitiendo la posibilidad de dirigirse a muchos tejidos diferentes *in vivo*. Además, el AAV transduce lentamente las células que se dividen y las que no se dividen, y puede persistir esencialmente durante la vida de esas células como un episoma nuclear transcripcionalmente activo (elemento extracromosómico). El genoma proviral de AAV es infeccioso como ADN clonado en plásmidos lo que hace factible la construcción de genomas recombinantes. Además, dado que las señales que dirigen la replicación de AAV, encapsidación e integración del genoma están contenidas dentro del ITR del genoma del AAV, algunos o todos los aproximadamente 4,3 kb internos del genoma (que codifican la replicación y las proteínas de la cápside estructural, rep-cap) se pueden sustituir con ADN extraño. Las proteínas rep y cap se pueden proporcionar en posición *trans*. Otra característica significativa de AAV es que es un virus extremadamente estable y abundante. Resiste fácilmente las condiciones usadas para inactivar adenovirus (de 56 °C a 65 °C durante varias horas), haciendo que la conservación en frío del AAV sea menos crítica. El AAV incluso se puede liofilizar. Por último, las células infectadas con AAV no son resistentes a superinfección.

En la técnica existe una necesidad de un tratamiento para distrofias musculares incluyendo la FSHD.

Sumario

La presente invención proporciona métodos y productos para prevenir o inhibir la expresión del gen DUX4. Los métodos de la invención utilizan ARNi para prevenir o inhibir la expresión del gen DUX4. Los métodos implican la administración de los ARN inhibitorios específicos para el gen DUX4 a células musculares. Los ARN que inhiben DUX4 contemplados incluyen, pero no se limitan a, ARN antisentido, ARN inhibitorios pequeños (ARNsi), ARN horquillados cortos (ARNsh) o microARN artificiales (miARN de DUX4) que inhiben la expresión de DUX4. El uso de los métodos y productos está indicado, por ejemplo, para prevenir o tratar la FSHD. Algunas realizaciones de la invención se aprovechan de las propiedades únicas de AAV para administrar los ARN inhibitorios de DUX4 que codifican ADN a células musculares. Otras realizaciones de la invención utilizan otros vectores (por ejemplo, otros vectores virales tales como adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus equino-asociado, alfavirus, virus de la viruela, virus del herpes, virus de la polio, virus Sindbis y virus Vaccinia) para administrar los ARN inhibitorios de DUX4 que codifican polinucleótidos.

En un aspecto, la invención proporciona los miARN de DUX4 codificados por los ADN que se presentan en las SEQ ID NOs: 1 y 2. En otro aspecto, la invención proporciona rAAV que codifica los miARN de DUX4 en los que el rAAV carece de los genes rep y cap.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un rAAV que codifica un miARN de DUX4 que comprende el ADN que se presenta en la SEQ ID NO: 1 o 2 en el que el rAAV carece de los genes rep y cap

En otro aspecto más, la invención proporciona un método para prevenir o inhibir la expresión del gen DUX4 en una célula que comprende poner en contacto la célula con un rAAV que codifica un miARN de DUX4 que comprende el ADN que se presenta en la SEQ ID NO: 1 o 2 en el que el rAAV carece de los genes rep y cap. La expresión de DUX4 se puede inhibir en al menos un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o un 99 por ciento.

Además en otro aspecto, la invención proporciona un método para administrar ADN que codifica un miARN de DUX4 a un animal con necesidad del mismo, que comprende administrar al animal un rAAV que codifica un miARN de DUX4 que comprende el ADN que se presenta en la SEQ ID NO: 1 o 2 en el que el rAAV carece de los genes rep y cap.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método para prevenir o tratar una distrofia muscular (que incluye, pero no se limita a, FSHD) que comprende administrar un rAAV que codifica un miARN de DUX4 que comprende el ADN que se presenta en la SEQ ID NO: 1 o 2 en el que el rAAV carece de los genes rep y cap. "Tratar" incluye mejorar uno o más síntomas de la distrofia muscular (tal como FSHD). Los criterios de valoración moleculares, bioquímicos, histológicos y funcionales demuestran la eficacia terapéutica miARN de DUX4. Los criterios de valoración contemplados en la invención incluyen uno o más de: la reducción o eliminación de proteína de DUX4 en músculos afectados, atenuación genética de DUX4, aumento de los diámetros de las miofibras, y aumento de la resistencia muscular.

Descripción Detallada

Los genomas de AAV recombinante de la invención comprende una o más ITR de AAV que flanquean un polinucleótido que codifica, por ejemplo, uno o más miARN de DUX4. El polinucleótido está unido de forma operativa a ADN de control de la transcripción, específicamente ADN promotor que es funcional en células diana. Algunos proveedores comerciales tales como Ambion Inc. (Austin, TX), Dharmacon Inc. (Lafayette, CO), InvivoGen (San Diego, CA), y Molecular Research Laboratories, LLC (Herndon, VA) generan moléculas de ARN inhibitorio adaptadas. Además, en el mercado hay disponibilidad de kits para producir moléculas de ARNsi adaptadas, tales como el Kit de Construcción de ARN si SILENCER™ (Ambion Inc., Austin, TX) o el Sistema psiRNA (InvivoGen, San Diego, CA). Algunas realizaciones incluyen un genoma de rAAV que comprende el ADN que se presenta en la SEQ ID NO: 1 que codifica el miARN de DUX4 denominado "miDux4.405" y un genoma de rAAV que comprende el ADN que se presenta en la SEQ ID NO: 2 que codifica el miARN de DUX4 denominado "miDux4.1156."

Los genomas de rAAV de la invención carecen de ADN de rep y cap de AAV. El ADN de AAV en los genomas de rAAV puede ser de cualquier serotipo de AAV para el que se puede obtener un virus recombinante que incluye, pero no se limita a, los serotipos AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 y AAV-11 de AAV. Como se ha indicado en la sección de Antecedentes mencionada anteriormente, las secuencias de nucleótidos de los genomas de diversos serotipos de AAV se conocen en la técnica.

Los plásmidos de ADN de la invención comprenden genomas de rAAV de la invención. Los plásmidos de ADN se transfieren a células que admiten la infección con un virus auxiliar de AAV (por ejemplo, adenovirus, adenovirus con delección de E1 o virus del herpes) para ensamblaje del genoma de rAAV en partículas virales infecciosas. Las técnicas para producir partículas de rAAV, en las que se va a empaquetar un genoma de AAV, genes rep y cap, y las funciones de virus auxiliares que se proporcionan a una célula son convencionales en técnica. La producción de rAAV requiere que los siguientes componentes estén presentes dentro de una sola célula (indicada en el presente

documento como una célula de empaquetamiento): un genoma de rAAV, genes rep y cap de AAV separados de (es decir, no en) el genoma de rAAV y funciones de virus auxiliares. Los genes rep y cap de AAV pueden ser de cualquier serotipo de AAV para el que el virus recombinante se pueda obtener y puede ser de un serotipo de AAV diferente al de las ITR del genoma de rAAV, que incluyen, pero no se limitan a, los serotipos AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 y AAV-11 de AAV. La producción de rAAV pseudotipado se desvela, por ejemplo, en el documento WO 01/83692.

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

Los principios generales de la producción de rAAV se revisan, por ejemplo, en Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; y Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). Diversos enfoques se describen en Ratschin *et al.*, Mol. Cell. Biol. 4: 2072 (1984); Hermonat *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6466 (1984); Tratschin *et al.*, Mol. Cell. Biol. 5: 3251 (1985); McLaughlin *et al.*, J. Virol., 62: 1963 (1988); y Lebkowski *et al.*, 1988 Mol. Cell. Biol., 7: 349 (1988). Samulski *et al.*, (1989, J. Virol., 63: 3822-3828); documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.173.414; documento WO 95/13365 y el correspondiente documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.658.776; documento WO 95/13392; documento WO 96/17947; documento PCT/US98/18600; documento WO 97/09441 (PCT/US96/14423); documento WO 97/08298 (PCT/US96/13872); documento WO 97/21825 (PCT/US96/20777); documento WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); documento WO 99/11764; Perrin *et al.*, (1995) Vaccine 13: 1244-1250; Paul *et al.*, (1993) Human Gene Therapy 4: 609-615; Clark *et al.*, (1996) Gene Therapy 3: 1124-1132; documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.786.211; documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.871.982; y documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.258.595.

Por lo tanto la invención proporciona células de empaquetamiento que producen rAAV infeccioso. En una realización las células de empaquetamiento pueden ser células cancerosas transformadas de forma estable tales como células HeLa, células 293 y células PerC.6 cells (una línea de 293 homóloga). En otra realización, las células de empaquetamiento son células que no son células cancerosas transformadas, tales como, células 293 de pasaje bajo (células de riñón fetal humano transformadas con E1 de adenovirus), células MRC-5 (fibroblastos fetales humanos), células WI-38 (fibroblastos fetales humanos), células Vero (células de riñón de mono) y células FRhL-2 (células de pulmón fetal de Rhesus).

El AAV recombinante (es decir, partículas de rAAV en cápside infecciosas) de la invención comprende un genoma de rAAV. Las realizaciones incluyen, pero no se limitan a, el rAAV denominado "AAV.miDUX4.405" que incluye un genoma que codifica el miARN de DUX4, hDux.mi405 (codificado por el ADN que se presenta en la SEQ ID NO: 1 y el rAAV denominado "AAV.miDUX4.1156" que incluye un genoma que codifica el miARN de DUX4, hDux.mi1156 (codificado por el ADN que se presenta en la SEQ ID NO: 2). Los genomas de ambos rAAV carecen de ADN de rep y cap de AAV, es decir, no hay ADN de rep o cap de AAV entre las ITR de los genomas.

El rAAV se puede purificar por métodos convencionales en la técnica tales como por cromatografía en columna o gradientes de cesio-cloruro. En la técnica se conocen métodos para purificar vectores de rAAV a partir de virus auxiliar e incluyen métodos desvelados, por ejemplo, en Clark *et al.*, Hum. Gene Ther., 10 (6): 1031-1039 (1999); Schenpp y Clark, Methods Mol. Med., 69 427-443 (2002); documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.566.118 y documento WO 98/09657.

En otra realización, la invención contempla composiciones que comprenden rAAV de la presente invención. Las composiciones de la invención comprenden rAAV en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también pueden comprender otros ingredientes tales como diluyentes y adyuvantes. Los vehículos, diluyentes y adyuvantes aceptables no son tóxicos para los receptores y son preferentemente inertes a las dosificaciones y concentraciones usadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, u otros ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos iónicos tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol (PEG).

5 Los títulos de rAAV para su administración en métodos de la invención variará dependiendo, por ejemplo, del rAAV en particular, el modo de administración, el objetivo del tratamiento, el individuo y el tipo o tipos de célula a los que se dirigen, y se pueden determinar por métodos convencionales en la técnica. Los títulos de rAAV pueden variar aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} a aproximadamente 1×10^{14} o más partículas resistentes a DNasa (DRP) por ml. Las dosificaciones también se pueden expresar en unidades de genomas virales (vg).

10 Los métodos de transducción de una célula diana con rAAV, *in vivo* o *in vitro*, están contemplados en la invención. Los métodos *in vivo* comprenden una etapa de administración de una dosis eficaz, o de múltiples dosis eficaces, de una composición que comprende un rAAV de una invención a un animal (incluyendo un ser humano) con necesidad del mismo. Si la dosis se administra antes del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es profiláctica. Si la dosis se administra después del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es terapéutica. En realizaciones de la invención, una dosis eficaz es una dosis que alivia (elimina o reduce) al menos un síntoma asociado con el trastorno/patología que se está tratando, que ralentiza o previene la progresión a un trastorno/patología, que ralentiza o evita la progresión de un trastorno/patología, que disminuye la extensión de la enfermedad, que da como resultado remisión (parcial o total) de la enfermedad, y/o que prolonga la supervivencia. Un ejemplo de una enfermedad contemplada para prevención o tratamiento con métodos de la invención es FSHD.

20 En la invención también se contemplan terapias de combinación. La combinación tal como se usa en el presente documento incluye tanto el tratamiento simultáneo como tratamientos secuenciales. Las combinaciones de métodos de la invención con tratamientos médicos convencionales (por ejemplo, corticosteroides) se contemplan de forma específica, al igual que las combinaciones con terapias nuevas.

25 La administración de una dosis eficaz de las composiciones se puede realizar mediante vías convencionales en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, intramuscular, parenteral, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, intracraneal, intraósea, intraocular, rectal, o vaginal. La vía o vías de administración y el serotipo o serotipos de los componentes de AAV del rAAV (en particular, las ITR de AAV y proteína de la cápside) de la invención las pueden elegir y/o emparejar los expertos en la materia teniendo en cuenta la infección y/o patología que se está tratando de las células/tejido o tejidos diana que van a expresar los miARN de DUX4.

35 En particular, la administración real del rAAV de la presente invención se puede conseguir usando cualquier método físico que transporte el vector recombinante de rAAV en el tejido diana de un animal. la administración de acuerdo con la invención incluye, pero no se limita a, inyección en el músculo, el torrente sanguíneo y/o directamente en el hígado. Se ha demostrado que simplemente la resuspensión de un rAAV en solución salina tamponada con fosfato es suficiente para proporcionar un vehículo útil para la expresión de tejido muscular, y no se conocen limitaciones con respecto a los vehículos u otros componentes que se puedan co-administrar con el rAAV (Aunque las composiciones que degradan el ADN se deberían evitar de una manera normal con rAAV). Las proteínas de la cápside de un rAAV se pueden modificar de modo que el rAAV se dirija a un tejido diana en particular De interés tal como el músculo. Véase, por ejemplo, el documento WO 02/053703, cuya divulgación se incorpora por referencia en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar como formulaciones inyectables o como formulaciones tópicas para su administración a los músculos mediante transporte transdérmico. Anteriormente se han desarrollado numerosas formulaciones tanto para inyección intramuscular como para transporte transdérmico y se pueden usar en la práctica de la invención. El rAAV se puede usar con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable para facilitar la administración y la manipulación.

50 Para fines de inyección intramuscular, se pueden emplear soluciones en un adyuvante tal como aceite de sésamo o de cacahuete en propilenglicol acuoso, así como soluciones acuosas estériles. Las soluciones acuosas de este tipo se pueden tamponar, si se desea, y el diluyente líquido primero se convierte en isotónica con solución salina o glucosa. Las soluciones de rAAV como un ácido libre (el ADN contiene grupos fosfato ácido) o una sal farmacológicamente aceptable se pueden preparar en agua mezcladas de forma adecuada con un agente tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También se puede preparar una dispersión de rAAV en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. En este sentido, todos los medios acuosos estériles empleados se pueden obtener fácilmente mediante técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

60 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en la que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de preparación y almacenamiento y se debe conservar frente a las acciones contaminantes de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de

microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando rAAV en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con otros diversos ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización con filtro. Por lo general, las dispersiones se preparan incorporando el principio activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos entre los
10 enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son el secado al vacío y la técnica de liofilización que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de la solución previamente filtrada de forma estéril del mismo.

15 La transducción con rAAV también se puede realizar *in vitro*. En una realización, las células musculares diana deseadas se retiran del sujeto, se transducen con rAAV y se reintroducen en el sujeto. Como alternativa, se pueden usar células musculares singénicas o xenogénicas en las que esas células no generarán una respuesta inmunológica inapropiada en el sujeto.

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

La transducción de células con rAAV de la invención como resultado una expresión sostenida de los miARN de DUX4. Por lo tanto la presente invención proporciona métodos para administrar/proporcionar rAAV que expresa los miARN de DUX4 a un animal, preferentemente un ser humano. Estos métodos incluyen transducción de tejidos (que incluyen, pero no se limitan a, tejidos tales como músculo, órganos tales como hígado y cerebro, y glándulas tales como glándulas salivares) con uno o más rAAV de la presente invención. La transducción se puede realizar con
30 casetes genéticos que comprenden elementos de control específicos de tejido. Por ejemplo, una realización de la invención proporciona métodos para transducir células musculares y tejidos musculares dirigidos por elementos de control específicos del músculo, que incluyen, pero no se limitan a, los obtenidos a partir de las familias de genes de actina y miosina, tales como a partir de la familia de genes myoD [Véase Weintraub *et al.*, Science, 251: 761-766 (1991)], el factor MEF-2 de unión a potenciador específico de miocitos [Cserjesi y Olson, Mol Cell Biol 11: 4854-4862 (1991)], elementos de control obtenidos a partir gen de actina del esqueleto humano [Muscat *et al.*, Mol Cell Biol, 7: 4089-4099 (1987)], el gen de actina cardíaco, elementos de secuencia de creatina quinasa muscular [Véase Johnson *et al.*, Mol Cell Biol, 9: 3393-3399 (1989)] y el elemento potenciador de creatina quinasa de murino (mCK), elementos de control obtenidos a partir del gen de la troponina C de contracción rápida esquelética, el gen de la troponina C de contracción lenta cardíaca y el gen de la troponina I de contracción lenta: factores nucleares inducibles por hipoxia [Semenza *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 88: 5680-5684 (1991)], elementos inducibles por
45 esteroides y promotores que incluyen el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) [Véase Mader y White, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5603-5607 (1993)], y otros elementos de control.

El tejido muscular es una diana atractiva para administrar el ADN *in vivo*, porque no es un órgano vital y tiene un acceso fácil. La invención contempla la expresión sostenida de los miARN de miofibras transducidas.

50 Por "célula muscular" o "tejido muscular" se hace referencia a una célula o grupos de células obtenidas a partir de músculo de cualquier tipo (por ejemplo, músculo esquelético y músculo liso, por ejemplo del tracto digestivo, vejiga urinaria, vasos sanguíneos o tejido cardíaco). Las células musculares de este tipo pueden ser diferenciadas o no diferenciadas, tales como mioblastos, miocitos, miotubos, cardiomiocitos y cardiomioblastos.

55 El término "transducción" se usa para hacer referencia a la administración/suministro de miARN de DUX4 a una célula receptora ya sea *in vivo* o *in vitro*, a través de rAAV con déficit de replicación de la invención dando como resultado una expresión de un miARN de DUX4 por la célula receptora.

60 Por lo tanto, la invención proporciona métodos para administrar una dosis eficaz (o dosis, administradas esencialmente de forma simultánea o dosis administradas a intervalos) de rAAV que codifica miARN de DUX4 a un paciente con necesidad del mismo.

Breve descripción de las figuras

65 La Figura1 muestra la secuencia de ADN de DUX4 humano.

Las Figuras 2A y 2B presentan secuencias de miARN dirigidos a DUX4. En cada panel, las secuencias de la parte superior indican los moldes de ADN a partir de los que se transcribe cada respectivo miARN. En el panel de la parte superior, el molde de ADN miDUX4.405 tiene la SEQ ID NO: 1. En el panel de la parte inferior, el molde de ADN miDUX4.1156 tiene la SEQ ID NO: 2. Las transcripciones de miARN plegado se muestran como estructuras horquilladas. El miARN plegado con miDUX4.405 tiene la SEQ ID NO: 8. El miARN plegado con miDUX4.1156 tiene la SEQ ID NO: 9. Las secuencias de miDUX4.405 y miDUX4.1156 maduros aparecen después del procesamiento en células diana mediante maquinaria de procesamiento de miARN hospedador (incluyendo Drosha, DGCR8, Dicer, y Exportina-5). Las secuencias sombreadas en color gris indican sitios de restricción usados para clonación de cada miARN en el vector U6T6. CTCGAG es un sitio XhoI y ACTAGT es un sitio SpeI (CUCGAG y ACUAGU en ARN, en el que la U es una base uracilo). La secuencia de color rojo indica la hebra guía antisentido de miARN maduro que por último ayuda a catalizar la escisión del ARNm diana de DUX4. Esta secuencia también está subrayada en las partes horquilladas del miARN de este diagrama. Las cabezas de flecha de color gris y negro indican sitios de escisión catalizados por Drosha y Dicer, respectivamente. Los números 13, 35, 53, y 75 se proporcionan para orientación. Las secuencias entre (e incluyendo) las posiciones 35-53 se obtienen a partir de la secuencia mir-30a humana natural, excepto la A en la posición 39, que es una G en la secuencia de mir-30a normal. Los inventores cambiaron este nucleótido por una A para facilitar el plegamiento del bucle de miARN, basándose en modelos de plegamiento de silico ARN. La base del tallo (5' de la posición 13 y 3' de la posición 75) también se obtiene a partir de estructura y secuencia de mir-30a con algunas modificaciones dependiendo de la secuencia primaria de la hebra guía. De forma específica, el nucleótido en la posición 13 puede variar para ayudar a facilitar una falta de coincidencias requerida entre la posición de los nucleótidos 13 y 75. Se tiene la hipótesis de que esta estructura con protuberancia facilita una escisión de Drosha apropiada.

La Figura 3 se refiere a un ensayo luciferasa usado para identificaciones sistemáticas de la eficacia de miDUX4 inicial. La Figura 3A muestra el plásmido doble de luciferasa e indicador usado para identificaciones sistemáticas *in vitro*. Este vector se modifica a partir de un plásmido disponible en el mercado (psiCheck2) obtenido en Promega. El ADNc de DUX4 humano se clonó cadena bajo del gen de luciferasa de Renilla, como se muestra. Esta conformación no produce una proteína de fusión de Luciferasa - DUX4, ya que las secuencias de DUX4 se colocan después del codón de parada de luciferasa de Renilla. En su lugar, se produce un ARNm de fusión, en el que las secuencias de DUX4 son la región sin traducir en la posición 3' *de facto* (3' UTR) de luciferasa de Renilla. Como resultado, cualquier miARN dirigido a DUX4 eficaz reducirá el ARNm pusieron de Luciferasa de Renilla-DUX4, que posteriormente disminuye la expresión de la proteína de luciferasa de Renilla en células transfectadas. Existe un gen de luciferasa de Luciérnaga separado situado en el mismo plásmido, que no contiene ninguna secuencia de DUX4 y que por lo tanto no está afectado por los miARN dirigidos a DUX4. La Figura 3B muestra la actividad de luciferasa de Luciérnaga y Renilla cuantificada por separado en células usando un Kit de Ensayo de Luciferasa Doble (Promega). Por lo tanto, el silenciamiento del gen DUX4 se mide indirectamente y está indicado mediante una baja proporción de actividad de luciferasa de Renilla:Luciérnaga. Todas las muestras en este ensayo están normalizadas con respecto a células co-transfectadas con el vector indicador de los inventores y el miARN de control de U6.miGFP. Las muestras transfectadas con miDUX4.405 y miDUX4.1156 presentaban una actividad de luciferasa de Renilla coherentemente menor, lo que indica el silenciamiento del gen DUX4. Los datos en B son representativos de dos experimentos independientes realizados en diferentes días por triplicado. Las barras de error indican el error típico de la media (e.t.m.).

La Figura 4A es un diagrama de construcciones usadas en experimentos de transferencia de Western que muestran que los plásmidos provirales de AAV.miDUX4 reducen la expresión proteica de DUX4 *in vitro*. En el diagrama de las construcciones, los rectángulos de color negro indican repeticiones terminales invertidas de AAV (ITR), CMV es el promotor de citomegalovirus, hrGFP es una región codificante de proteína fluorescente de color verde, pA está señal poliA de SV40 y V5 se refiere al epítipo V5 que se insertó en marco en el extremo C terminal de DUX4 humano para facilitar la detección con anticuerpos de epítipo V5 disponibles en el mercado (Invitrogen). Las secuencias de U6.miDUX4 (405 y 1156) y el control de U6.miGFP se clonaron cadena arriba del casete de CMV.hrGFP.pA, como se muestra. Los plásmidos provirales se co-transfectaron en células HEK293 con el vector de expresión CMV.DUX4.V5 que se muestra en la parte superior de la Figura 4A. La Figura 4B muestra transferencias de Western que usan anticuerpos que se dirigen al epítipo V5 (DUX4) demostrando el silenciamiento del gen DUX4 mediante ambas secuencias de miDUX4, en comparación con el control de miGFP de no direccionamiento. Los anticuerpos de GAPDH se usaron para controlar la carga equivalente de extractos de proteína para el experimento. La calle 'Unt' contiene extractos de proteína de células HEK293 sin transfectar.

La Figura 5 es un diagrama de genomas de rAAV que codifica los miARN de DUX4.

Ejemplos

El papel de DUX4 en la patogénesis de FSHD se puede explicar cómo sigue a continuación. En primer lugar, las repeticiones de D4Z4 no son pseudogenes. El locus DUX4 produce los ARNm de longitud completa de 1,7 kb y 2,0 kb con regiones codificantes idénticas, y las repeticiones D4Z4 también albergan transcripciones de sentido y antisentido menores, incluyendo algunos microARN similares. Las transcripciones de DUX4 sobreexpresadas y una

proteína DUX4 de ~50 kDa de longitud completa se encuentran en biopsias y en líneas celulares de pacientes con FSHD. Estos datos son coherentes con un modelo de desrepresión transcripcional de la patogénesis de FSHD.

Además, a diferencia de los pseudogenes, las repeticiones de D4Z4 y DUX4 probablemente tienen importancia funcional, ya que las repeticiones de D4Z4 dispuestas en tándem se conservan en al menos once especies diferentes de mamíferos placentarios (los animales no placentarios carecen de repeticiones de D4Z4), con la mayor conservación de secuencia produciéndose dentro del ORF de DUX4. En segundo lugar, el DUX4 sobreexpresado es tóxico para células de cultivo tisular y precursores embrionarios de organismos inferiores en desarrollo *in vivo*. Esta toxicidad se produce al menos parcialmente a través de un mecanismo proapoptótico, indicado por activación de Caspasa-3 en células transfectadas con DUX4, y presencia de núcleos TUNEL-positivos en embriones de *Xenopus* con su desarrollo detenido a los que se inyecta ARNm de DUX4 en la etapa de dos células. Estos hallazgos son coherentes con estudios que muestran algunas proteínas pro-apoptóticas, incluyendo Caspasa-3, están presentes en músculos del paciente con FSHD. Además de estimular la apoptosis, DUX4 puede regular negativamente la miogénesis. DUX4 humano inhibe la diferenciación de mioblastos de C2C12 de ratón *in vitro*, potencialmente al interferir con PAX3 y/o PAX7, y provoca detención del desarrollo y una menor tinción de algunos marcadores musculares cuando se administra a células precursoras de pez cebra o embriones de *Xenopus*. Por último, la función anómala de DUX4 se asocia directamente con los cambios moleculares potencialmente importantes observados en los músculos del paciente con FSHD. De forma específica, el DUX4 humano de longitud completa codifica un factor de transcripción de homeodominio doble de aproximadamente 50 kDa, y su única diana conocida, Pitx1, estaba elevada en los músculos del paciente con FSHD que sobreexpresan DUX4. Estos datos respaldan que DUX4 cataliza numerosos cambios moleculares cadena abajo que son incompatibles con el mantenimiento de la integridad muscular normal.

Por lo tanto, mediante los siguientes se ilustran ejemplos aspectos y realizaciones de la invención. El Ejemplo 1 describe los miARN específicos para el gen DUX4. El Ejemplo 2 describe el efecto de los miARN en la expresión de DUX4 tal como se mide con el ensayo de luciferasa. El Ejemplo 3 describe el efecto *in vitro* de plásmidos provirales que expresan los miARN en la expresión de DUX4 tal como se mide mediante transferencia de Western. El Ejemplo 4 describe vectores rAAV que codifican los miARN de DUX4. El Ejemplo 5 describe el alivio de la miopatía inducida por DUX4 por vectores AAV6.miDUX4.405. El Ejemplo 6 describe la protección de los músculos contra los cambios patológicos musculares asociados con FSHD. El Ejemplo 7 describe la protección de ratones a partir de los déficits de fuerza de agarre asociados a DUX4.

Ejemplo 1

MicroARN específicos para el gen DUX4

Dos miARN específicos para el gen DUX4 se generaron mediante PCR. Se usaron cuatro cebadores de PCR que tenían las siguientes secuencias.

Cebador 662 (miDUX4hum405F):

AAAAC TCGAGT GAGCGATCCAGGATTCAGATCTGGTTTCTGAAAGCCACAGATG

GG (SEQ ID NO: 3)

Cebador 663 (miDUX4hum405R):

TTTTACTAGTAGGCAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCCCATCTGTGGCTTTTCAG (SEQ ID NO: 4)

Cebador 665 (miDUX4hum1156F):

AAAAC TCGAGT GAGCGAAGGCGCAACCTCTCCTAGAAACTGAAAGCCACAGATG

GG (SEQ ID NO: 5)

Cebador 667 (miDUX4hum1156R):

TTTTACTAGTAGGCACAGGCGCAACCTCTCCTAGAAACCCATCTGTGGCTTTTCAG (SEQ ID NO: 6)

El ADN que codifica un miARN denominado hDux.mi405 se generó usando los cebadores 662 y 663. El ADN que codifica un miARN denominado hDux.mi1156 se generó usando los cebadores 665 y 667.

Un µg de cada cebador se añadió a una reacción de extensión de cebador de 1 ciclo: 95 °C durante 5 min.; 94 °C durante 2 min.; 52 °C durante 1 min.; 72 °C durante 15 min.; y a continuación manteniendo a 4 °C. Los productos de PCR se limpiaron con el kit de Purificación de PCR QIAquick de Qiagen antes de su digestión durante una noche con enzimas de restricción XHOI y SPEI. A continuación el producto de digestión se desarrolló en un gel de TBE al

1,5 % y la banda se escindió y se purificó usando el Kit de Extracción en Gel QIAquick de Qiagen. Las secuencias de los miARN se presentan a continuación y en las Figuras 2A y 2B, respectivamente.

miDux4.405

CTCGAGTGAGCGATCCAGGATTCAGATCTGGTTTCTGAAAGCCACAGATGGGAA

5 **ACCAGATCTGAATCCTGGACTGCCTACTAGT** (SEQ ID NO: 1)

miDux4.1156

CTCGAGTGAGCGAAGGCGCAACCTCTCCTAGAACTGAAAGCCACAGATGGGTT

10 **TCTAGGAGAGGTTGCGCCTGTGCCTACTAGT** (SEQ ID NO: 2)

Los dos productos de PCR se ligaron durante una noche a un vector U6T6 (a través de XhoI y XbaI) que contiene un promotor U6 de ratón y una señal de terminación de ARN polimerasa III (seis nucleótidos de timidina). Los miARN se clona en sitios de restricción XhoI y XbaI situados entre el extremo en la posición 3' del promotor U6 y la señal de terminación (el sitio SpeI en el extremo la posición 3' del molde de ADN para cada miARN tiene extremos cohesivos complementarios con el sitio XbaI). El producto de ligación se transformó en células de *E. coli* químicamente competentes con un choque térmico a 42 °C e incubado a 37 °C con agitación durante 1 hora antes de su siembra en placas de selección de kanamicina. Se permitió que las colonias crecieran durante una noche a 37 °C. Al día siguiente se mini-prepararon y se secuencian para precisión.

20 **Ejemplo 2**

Ensayo de Luciferasa para Efecto de Expresión de los miARN de DUX4

Se sometió a ensayo la expresión de la secuencia diana de DUX4 en presencia de los miARN de DUX4. Una transfección con lipofectamina 2000 se realizó en 293 células en una placa de ensayo con paredes de color blanco, de 96 pocillos. Se transfectaron 140.000 células con 20 ng de un plásmido de Renilla-luciérnaga que contenía la secuencia diana de DUX4 (Figura 3A) y 180 ng de diversos vectores codificantes de miARN de DUX4, incluyendo los vectores miDux4.405 o miDux4.1156 dirigidos por U6T6 del Ejemplo 1. Un ensayo de luciferasa se realizó 24 horas más tarde.

El medio se retiró de las células y se añadieron 20 µl de tampón de lisis por pocillo. La placa se colocó en un agitador durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de añadir 50 µl de sustrato de luciferasa. La primera lectura se tomó 10 minutos más tarde. A continuación, se añadieron 50 µl de sustrato de luciferasa Stop y Glo y la segunda lectura se tomó 10 minutos más tarde. La expresión de Renilla se dividió entre la expresión de luciérnaga para calcular la expresión relativa. La expresión relativa se normalizó a continuación con respecto a la expresión de células que se transfectar aun con un miARN de control que se dirige a eGFP. Los resultados se muestran en la Figura 3B. Los miARN de DUX4, miDUX4.405 y miDUX4.1156, eran los más eficaces para reducir la expresión de proteína de luciferasa en células transfectadas.

40 **Ejemplo 3**

Ensayo de Transferencia de Western para Efecto de Expresión de los miARN de DUX4 de rAAV

A continuación, los casetes de expresión de miARN de U6T6.miDUX4 se clonaron en plásmidos provirales AAV.CMV.hrGFP como se muestra en la Figura 4A. Los plásmidos provirales se co-transfectaron a continuación con un plásmido de expresión DUX4.V5 en 293 células y el efecto de la expresión de los miARN de DUX4 de los plásmidos provirales se sometió a ensayo mediante transferencia de Western. Una secuencia de U6.miGFP, que No se dirige a DUX4, se usó como control negativo para silenciamiento genético.

Un día antes de la transfección, se sembraron 293 células en una placa de 24 pocillos a $1,5 \times 10^5$ células/pocillo. A continuación las células se transfectaron con AAV-CMV-DUX4-V5 y AAV-CMV-miDUX4 (405 o 1156) usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, N.º de Cat. 11668-019):

Grupo 1: 50 ng de AAV-CMV-DUX4-V5 + 800 ng de AAV-CMV-miDUX4 (1:16)

55 Grupo 2: 100 ng de AAV-CMV-DUX4-V5 + 800 ng de AAV-CMV-miDUX4 (1:8)

Treinta y seis h después de la transfección, las células se recogieron y se lavaron con PBS frío una vez. A continuación se añadieron setenta µl de tampón de lisis (NaCl 137 mM, Tris 10 mM pH = 7,4, NP40 al 1 %). Las células se volvieron a suspender completamente y se incubaron en hielo durante 30 min. Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 13.000 rpm a 4 °C y el sobrenadante se recogió. El lisado celular se diluyó 5 veces Para el ensayo de concentración de proteína de Lowry (Reactivo A, B, S de Ensayo de Proteína Dc de Bio-Rad; N.º de Cat. 500-0113, 500-0114, 500-115). Se tomaron veintitrés µg de cada muestra y se añadieron 2x de tampón de

muestra (Tris 100 mM a pH = 6,8, DTT 100 mM, glicerol al 10 %, SDS al 2 %, azul de bromofenol al 0,006 %). Las muestras se llevaron a ebullición durante 10 min y a continuación se pusieron en hielo.

5 Las muestras se cargaron sobre geles de poliacrilamida al 10 % (basándose en una proporción de 37,5:1 de acrilamida:bis acrilamida, Bio-Rad, N.º de Cat. 161-0158), 3,5 µg y 18 µg en dos geles para cada muestra. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF a 15 V durante 1 h usando transferencia semiseca (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, N.º de Cat. 170-3940). Las transferencias se colocaron en tampón de bloqueo (leche seca sin grasa al 5 %, Tris 30 mM a pH = 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05 %) y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. El tampón de bloqueo se decantó y se añadió una solución de anticuerpo primario anti-DUX4
10 (DUX4 p12, Santa Cruz, N.º de Cat. sc-79927, 1:1.000) y se incubó con agitación durante una noche a 4 °C. A continuación las membranas se lavaron durante 30 min, cambiando el tampón de lavado (NaCl 150 mM, Tris 30 mM a pH = 7,5, Tween-20 al 0,05 %) cada 10 min. Se añadió Anticuerpo de Burro Anti-Cabra conjugado con Peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, N.º de Cat. 705-035-003, 1: 100.000) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación las membranas se lavaron durante 30 min, cambiando el tampón de lavado cada 10 min.
15 Las transferencias se colocaron en una solución de trabajo quimioluminiscente (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, N.º de Cat. WBKLS0500), incubado con agitación durante 5 min a temperatura ambiente, Y a continuación se expuso a una película de rayos X.

20 Las membranas se lavaron durante 20 min, cambiando el tampón de lavado cada 10 min. A continuación, se añadió tampón de separación (SDS al 2 %, Tris 62,5 mM a pH=6,7, b-ME 100 mM) a las transferencias y se incubó a 50 °C durante 30 min. Las membranas se lavaron de nuevo durante 30 min, cambiando el tampón de lavado cada 10 min.

25 A continuación las membranas se bloquearon de nuevo y se volvieron a sondear con una solución de anticuerpo primario anti-GAPDH (Chemicon, N.º de Cat. MAB374, 1:200) y como anticuerpo secundario se usó Anticuerpo de Cabra Anti-Ratón conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, N.º de Cat. 115-035-146, 1:100.000).

Por último, las membranas se separaron de nuevo y se volvieron a sondear con anticuerpo anti-V5 (Invitrogen, N.º de Cat. R960-25, 1:5.000).

30 Los plásmidos provirales de AAV.miDUX4 reducían la expresión de proteína DUX4 *in vitro*. AAV-CMV-miDUX4.405 era el más eficaz para atenuación genética de la expresión de DUX4.

Ejemplo 4

35 Producción de rAAV Que Codifica MicroARN de DUX4

El vector se produjo mediante co-transfección en células HEK293 de tres plásmidos (auxiliar de pAd, auxiliar de AAV, y el genoma de rAAV que contenía miDUX4; descrito con detalle a continuación), seguido de cosecha celular, unificación de vector, valoración, y ensayos de control de calidad.

40 **Plásmidos:** el pAd auxiliar contiene los genes E2A, E4 ORF6, y VA I/II de adenovirus; los plásmidos auxiliares de AAV contienen rep2 y cap6 de AAV (por ejemplo, ha una preparación del serotipo 6 de AAV, el gen de la cápside se podría denominar cap6); el plásmido de rAAV contiene secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV que los elementos genéticos a empaquetar en el vector. Para el AAV.miDUX4, esto incluye el clonado U6.miDUX4
45 cadena arriba del indicador CMV.eGFP.

Transfección: los plásmidos se transfectaron en 293 células (Corning 10-Stack) usando CaPO₄ a una proporción de 4:4:1 (20 µg de auxiliar de pAd: 20 µg de auxiliar de AAV: 5 µg de auxiliar de rAAV por placa).

50 **Cosecha celular:** Cuarenta y ocho h después de la transfección, las células se cosecharon y se volvieron a suspender en Tris 20 mM (pH 8,0), MgCl₂ 1 mM y NaCl 150 mM (T20M1N150) a una densidad de 5 x 10⁶ células/ml. Las células se lisaron mediante cuatro ciclos secuenciales de congelación/descongelación y se añadió nucleasa Benzonasa (AIC, Solución de Reserva: 250 U/ul) para una concentración final de 90 U/ml antes de clarificación del lisado celular.

55 **Purificación y Valoración del Vector:** Los lisados clarificados se sometieron a purificación con gradiente en etapas de iodixanol como se ha descrito anteriormente (Xiao, X, *et al.*, J. Virol 72: 2224-32). La fase de iodixanol al 40 % (que contiene rAAV) se diluyó 5 veces con un tampón de dilución no salino (pH que varía dependiendo del serotipo) y se aplicó a una columna Hi-Trap HP-Q/S. Después de elución con un gradiente salino de NaCl, se combinaron fracciones máximas de 1 ml (por lo general 3-5), se dializaron con T20M1N200 (pH 8,0), a continuación se filtraron de manera estéril y se complementaron con Pluronic F68 al 0,001 %. El vector se almacenó a -80 °C. El virus purificado se valoró para vg usando Q-PCR como se ha descrito anteriormente [Schnepp y Clark, Methods Mol. Med., 69: 427-443 (2002)].

65 Los diagramas esquemáticos de los genomas de rAAV se muestran en la Figura 5.

Ejemplo 5

Los AAV6.miDUX4 aliviaban la toxicidad muscular asociada a DUX4 *in vivo*

5 Los ratones C57BL/6 macho de tipo silvestre de adultos se co-inyectaron con 1) 3×10^9 partículas resistentes a DNasa (DRP) de AAV.CMV.DUX4.V5 o se inyectaron de forma simulada, y 2) 3×10^{10} DRP de AAV.miDUX4 o de AAV.CMV.GFP de control en el músculo anterior tibial. Los animales se sacrificaron dos semanas más tarde. Los músculos se crioconservaron y se cortaron en criosecciones de 10 mm, y a continuación se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E).

10 Los animales que recibieron los vectores DUX4 y eGFP mostraban indicadores histológicos de daño muscular. De forma específica, estas secciones de músculo contenían abundantes miofibras con núcleos situados en el centro, miofibras de diámetro pequeño (ambos de los cuales indican músculo recién regenerado), y deposición de tejido fibrótico. A las 4 semanas, los animales tratados con miDUX4 no se podían distinguir de los músculos de tipo silvestre normales inyectados de forma simulada.

15 El tratamiento con MiDUX4 aliviaba de forma significativa la degeneración muscular inducida por DUX4, en comparación con músculos a los que se inyecta GFP de control.

20 Ejemplo 6

Músculos protegidos con los AAV6.miDUX4 De cambios moleculares patológicos asociados con FSHD

25 La Caspasa-3 se expresa en miofibras de pacientes con FSHD y se activa mediante la expresión de DUX4 En músculo de ratón. Se examinó el efecto de la expresión de DUX4 en la presencia y ausencia de AAV6.miDUX4.

30 Los ratones hembra C57BL/6 de ocho semanas de edad recibieron 50 μ l de inyecciones intramusculares directas en el tibial anterior. Los cócteles de virus mezclados previamente contenían 8×10^8 partículas resistentes a DNasa de AAV6.DUX4 y 3×10^{10} de cualquiera de AAV6.miDUX4 o AAV6.eGFP. Las muestras de músculo se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 5 y se tiñeron con anticuerpos policlonales de Caspasa-3 escindida (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) con métodos convencionales.

35 La expresión de DUX4 no inhibido estaba asociada con lesiones positivas por caspasa-3 de control transducidos con AAV6.DUX4 en ratones. Por el contrario, no había miofibras positivas para caspasa-3 en músculos a los que se les coinyectaron los vectores AAV6.DUX4 y AAV.miDUX4.

Ejemplo 7

Los AAV6.miDUX4 protegen a los ratones de déficits de fuerza de agarre asociados con DUX4

40 Se midieron los efectos de AAV6.miDUX4 en déficits de fuerza de agarre de las extremidades posteriores asociados con DUX4 en ratones.

45 La fuerza de agarre se midió en las extremidades anteriores y en las extremidades posteriores de ratones C57BL/6 (n = 8 animales) una semana antes de la inyección para establecer una medida inicial, y a continuación semanalmente hasta 4 semanas después de la inyección como se ha descrito anteriormente en Wallace *et al.*, Ann. Neurol., 69: 540-552 (2011). A las dos semanas, los ratones a los que se les inyecta AAV6.DUX4 solo o AAV6.DUX4 con AAV.eGFP de control presentaban una fuerza de agarre significativamente reducida en comparación con los otros grupos. Este punto temporal es coherente con el inicio de degeneración en criosecciones de músculo. La debilidad se solucionó en tres semanas, a medida que los procesos degenerativos se encontraban en progreso. Por el contrario, a los animales que se les coinyecta AAV6.DUX4 y AAV6.miDUX4 no se encontraban significativamente más débiles que los ratones de tipo silvestre a los que se les inyecta solución salina en ningún punto temporal después de la inyección. Los ratones que recibieron AAV6.miDUX4 solo no estaban afectados, lo que indica que la expresión de miDUX4 era bien tolerada por los músculos normales.

55 Aunque la presente invención se ha descrito en términos de realizaciones específicas, se entiende que los expertos en materia concebirán variaciones y modificaciones. Por consiguiente, en la invención solamente se deberían colocar las limitaciones de este tipo tal como aparecen en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus adeno-asociado recombinante que comprende el ADN que codifica miARN de DUX4 que se presenta en la SEQ ID NO: 1 o 2, en el que el virus adeno-asociado recombinante carece de los genes rep y cap.
2. Una composición que comprende el virus adeno-asociado recombinante de la reivindicación 1.
- 10 3. Un método para inhibir la expresión del gen DUX4 en una célula *in vitro* que comprende poner en contacto la célula con un virus adeno-asociado recombinante de la reivindicación 1 o la composición de la reivindicación 2.
4. Un virus adeno-asociado recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el ADN que codifica miARN de DUX4 que se presenta en la SEQ ID NO: 1, para su uso en un método para administrar el ADN que codifica miARN de DUX4 que se presenta en la SEQ ID NO: 1 a un animal con necesidad del mismo.
- 15 5. Un virus adeno-asociado recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el ADN que codifica miARN de DUX4 que se presenta en la SEQ ID NO: 2, para su uso en un método para administrar el ADN que codifica miARN de DUX4 que se presenta en la SEQ ID NO: 2 a un animal con necesidad del mismo.
- 20 6. Un virus adeno-asociado recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el ADN que codifica miARN de DUX4 que se presenta en la SEQ ID NO: 1, para su uso en un método para tratar la distrofia muscular facioescapulohumeral.
- 25 7. Un virus adeno-asociado recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el ADN que codifica miARN de DUX4 que se presenta en la SEQ ID NO: 2, para su uso en un método para tratar la distrofia muscular facioescapulohumeral.
- 30 8. El virus adeno-asociado recombinante de la reivindicación 1 en el que la expresión del ADN que codifica miARN está bajo el control de un promotor de CMV, un promotor de creatina quinasa (MCK) muscular, un promotor-amplificador de cadena pesada de alfa-miosina/-amplificador de MCK (MHCK7) o un promotor de desmina.
9. La composición de la reivindicación 2 en la que la expresión del ADN que codifica miARN está bajo el control de un promotor de CMV, un promotor de creatina quinasa (MCK) muscular, un promotor-amplificador de cadena pesada de alfa-miosina/-amplificador de MCK (MHCK7) o un promotor de desmina.
- 35 10. El método de la reivindicación 3 en el que la expresión del ADN que codifica miARN está bajo el control de un promotor de CMV, un promotor de creatina quinasa (MCK) muscular, un promotor-amplificador de cadena pesada de alfa-miosina/-amplificador de MCK (MHCK7) o un promotor de desmina.
- 40 11. El virus adeno-asociado recombinante para su uso en un método de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 en el que la expresión del ADN que codifica miARN está bajo el control de un promotor de CMV, un promotor de creatina quinasa (MCK) muscular, un promotor-amplificador de cadena pesada de alfa-miosina/-amplificador de MCK (MCK7) o un promotor de desmina.
- 45 12. Un ADN que se presenta en la SEQ ID NO: 1 que codifica miDUX4.405.
13. Un ADN que se presenta en la SEQ ID NO: 2 que codifica miDUX4.1156.

Figura 1

```

ccaccccccc cccccaccac caccaccacc accacccccg cggccggccc caggcctcga 61
cgccctgggt cccttccggg gtggggcggg ctgtcccagg ggggctcacc gccattcatg 121
aaggggtgga gcctgcctgc ctgtgggcct ttacaagggc ggctggctgg ctggctggct 181
gtccgggcag gcctcctggc tgcacctgcc gcagtgcaca gtccggctga ggtgcacggg 241
agcccgcggg cctctctctg cccgcgtccg tccgtgaaat tccggccggg gctcaccgcg 301
atggccctcc cgacaccctc ggacagcacc ctccccgagg aagcccgggg acgaggacgg 361
cgacggagac tcgtttggac cccgagccaa agcagggccc tgcgagcctg ctttgagcgg 421
aaccctgacc cgggcatcgc caccagagaa cggctggccc aggccatcgg cattccggag 481
cccaggggtc agatttggtt tcagaatgag aggtcacgcc agctgaggca gcaccggcgg 541
gaatctcggc cctggcccgg gagacggggc ccgccagaag gccggcgaaa gcggaccgcc 601
gtcaccggat cccagaccgc cctgctcctc cgagcctttg agaaggatcg ctttccaggc 661
atcgccgccc gggaggagct ggccagagag acgggcctcc cggagtccag gattcagatc 721
tggtttcaga atcgaagggc caggcaccoc ggacaggggtg gcagggcgcc cgcgcaggca 781
ggcggcctgt gcagcgcggc ccccgggcgg ggtcaccctg ctccctcgtg ggtcgccttc 841
gcccacaccg gcgcgtgggg aacggggcct cccgcacccc acgtgcctcg cgcgcctggg 901
gctctcccac agggggcttt cgtgagccag gcagcgaggg ccgccccgcg gctgcagccc 961
agccaggccg cgccggcaga gggggtctcc caacctgcc cggcgcgcgg ggatttcgcc 1021
tacgcccgcc cggctcctcc ggacggggcg ctctcccacc ctcaggctcc tcggtggcct 1081
ccgcaccccg gcaaaagccg ggaggaccgg gaccgcagc gcgacggcct gccgggcccc 1141
tgcgcggtgg cacagcctgg gcccgctcaa gcggggccgc agggccaagg ggtgcttgcg 1201
ccacccacgt cccaggggag tccgtggtgg ggctggggcc ggggtcccca ggtcgccggg 1261
gcggcgtggg aacccaagc cggggcagct ccacctccc agcccgcgcc cccggacgcc 1321
tccgcctccg cgcggcaggg gcagatgcaa ggcacctcgg cgccctcca ggcgctccag 1381
gagccggcgc cctggtctgc actcccctgc ggctgctgc tggatgagct cctggcgagc 1441
ccggagtttc tgcagcaggc gcaacctctc ctagaaacgg agggcccggg ggagctggag 1501
gcctcggaag aggccgcctc gctggaagca cccctcagcg aggaagaata cccggctctg 1561
ctggaggagc tttaggacgc ggggttggga cggggtcggg tggttcgggg cagggcg

```

SEQ ID NO: 7

Figura 2A

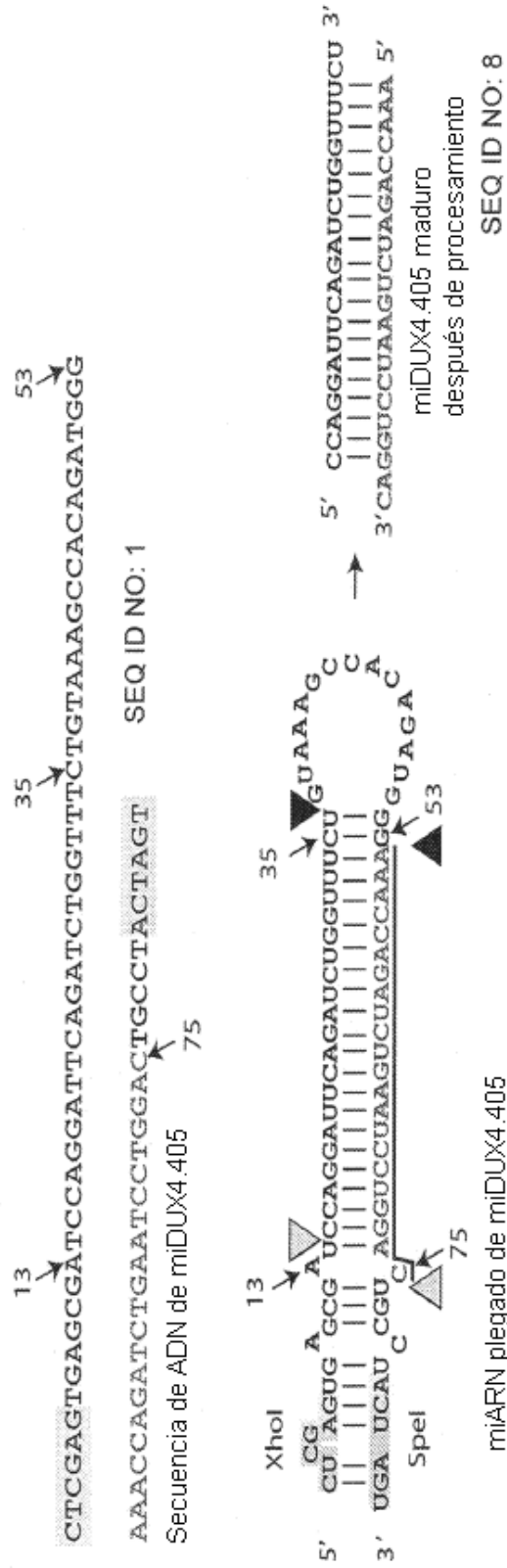
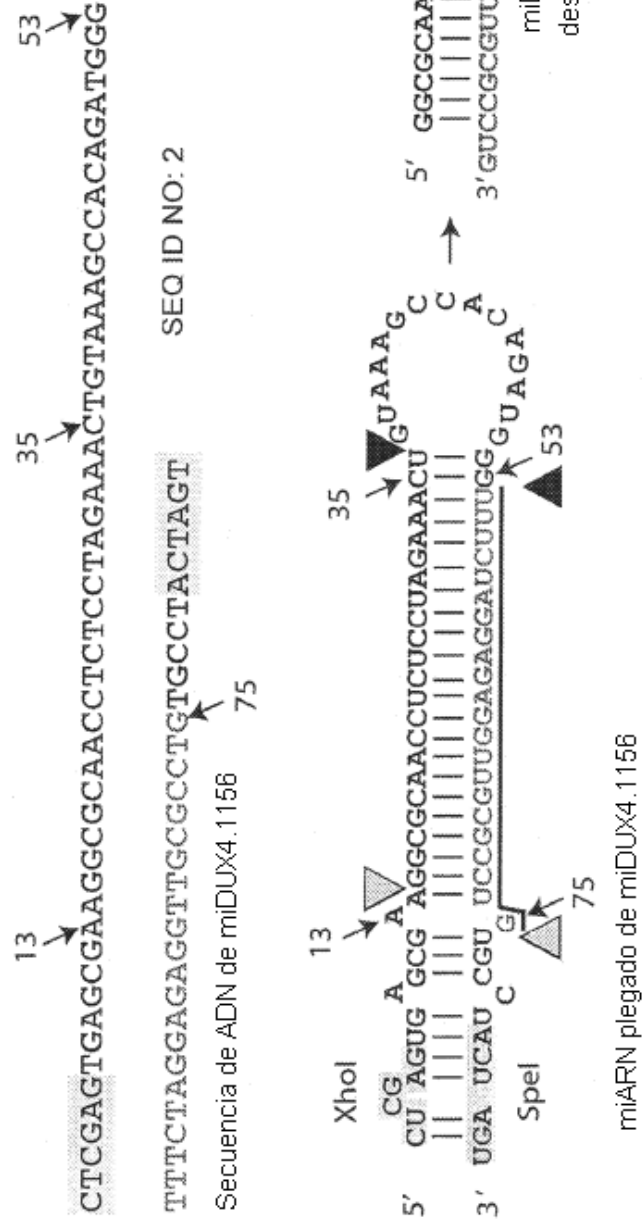


Figura 2B



Une las secuencias 1456:477 de DUX4 de Refseq NM_033178.2

Figura 3B

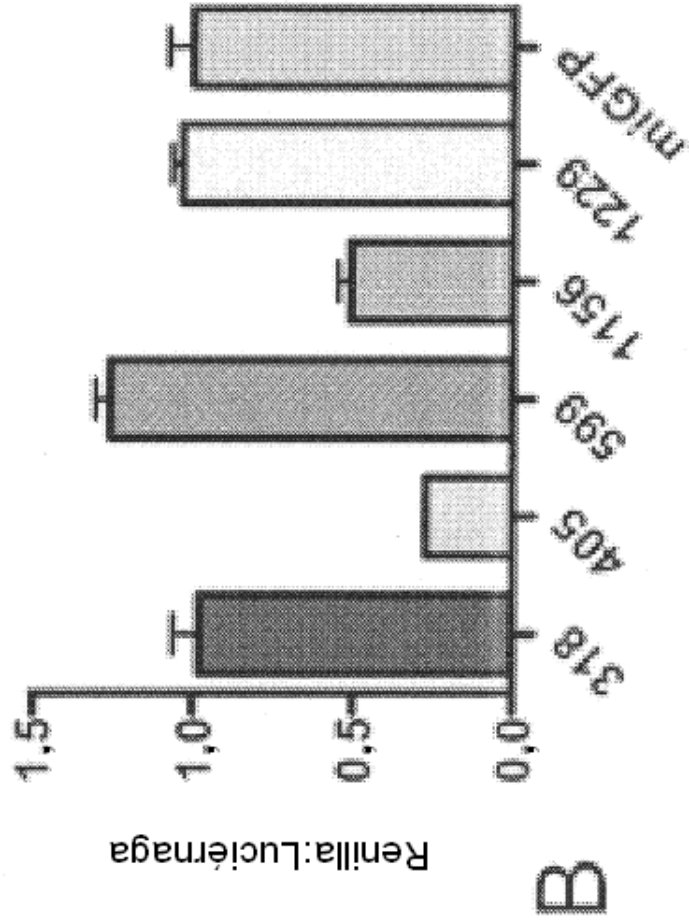


Figura 3A

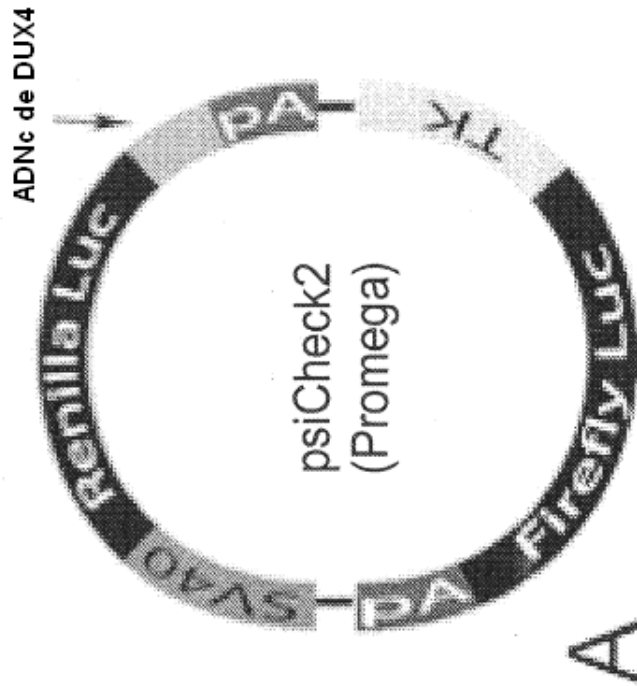


Figura 4A

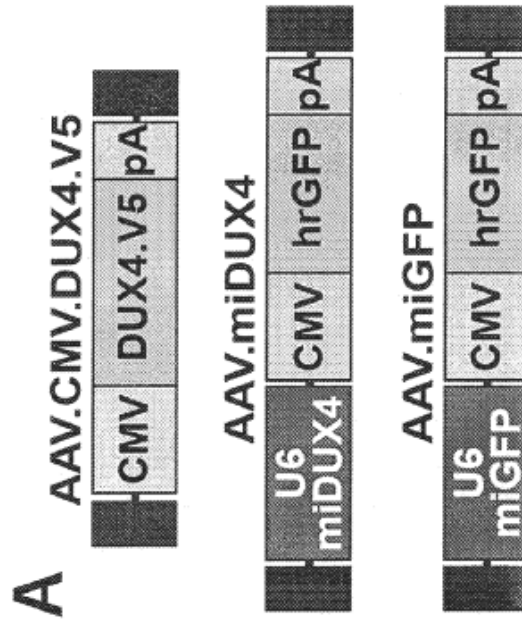


Figura 4B

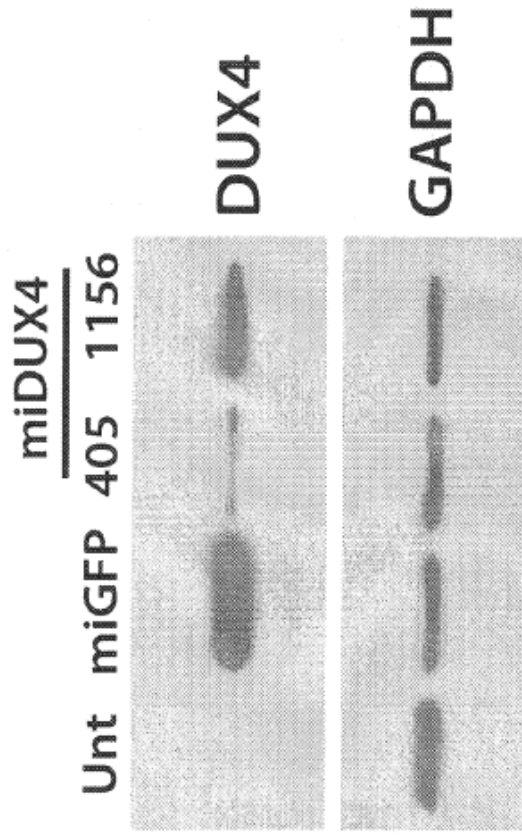


Figura 5

