

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 066**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2000 PCT/US2000/31661**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.05.2001 WO01036475**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2000 E 00979197 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 1230262**

54 Título: **Biglicano y terapéuticas relacionadas y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

**18.11.1999 US 166253 P**

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

**08.03.2018**

73 Titular/es:

**BROWN UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION  
(100.0%)  
42 CHARLESFIELD STREET, P.O. BOX 1949  
PROVIDENCE, RI 02912, US**

72 Inventor/es:

**FALLON, JUSTIN;  
MCKECHNIE, BETH;  
RAFII, MICHAEL;  
BOWE, MARK A.;  
AMENTA, ALISON;  
MERCADO, MARY LYNN y  
HAGIWARA, HIROKI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 658 066 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

Biglicano y terapéuticas relacionadas y procedimientos de uso

5 **Antecedentes de la invención**

El complejo proteico asociado a la distrofina (DAPC) une el citoesqueleto a la matriz extracelular y es necesario para mantener la integridad de la membrana celular/célula muscular. El DAPC central consiste en la molécula armazón del citoesqueleto, distrofina, y los subcomplejos transmembrana distroglicano y sarcoglicano. El DAPC también sirve para localizar moléculas de señalización clave en la superficie celular, al menos en parte a través de sus sintrofinas asociadas (Brennan, y col., (1996) *Cell*. 84:757-767; Bredt, y col., (1998), *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 14592). Las mutaciones en la distrofina o en cualquiera de los sarcoglicanos producen distrofias musculares caracterizadas por la rotura de la membrana de la célula muscular, la pérdida de miofibras y fibrosis (Hoffman, y col., 1987. *Cell*. 51: 919; Straub y Campbell (1997) *Curr Opin Neurol*. 10: 168). Además, las mutaciones en la proteína de la matriz extracelular laminina- $\alpha$ 2, que se asocia con el DAPC en la superficie celular, es la base de una distrofia muscular congénita importante (Helbling-Leclerc, y col., (1995) *Nat Genet*. 11: 216).

El subcomplejo  $\alpha$ - $\beta$ -distroglicano forma un enlace estructural crítico en el DAPC. El  $\beta$ -distroglicano transmembrana y el  $\alpha$ -distroglicano totalmente extracelular surgen por división proteolítica de un precursor común (Ibraghimov, y col., (1992) *Nature* 355: 696; Bowe, y col., (1994) *Neuron* 12: 1173). La cola citoplasmática del  $\beta$ -distroglicano se une a la distrofina, mientras que el  $\alpha$ -distroglicano altamente glucosilado similar a la mucina se une a varios elementos de la ECM, incluyendo agrina, laminina y perlecan (Ervasti y Campbell, (1993) *J Cell Biol*. 122: 809; Bowe, y col., (1994) *Neuron*. 12: 1173; Gee, y col., (1994) *Cell* 77: 675; Hemler, (1999) *Cell* 97: 543). Esta unión a las proteínas de la matriz parece ser esencial para el ensamblaje de la lámina basal, ya que los ratones deficientes en distroglicano no pueden formar estas estructuras y mueren muy temprano en el desarrollo, (Henry, M. D. y K. P. Campbell. 1998. *Cell*. 95: 859). El  $\beta$ -distroglicano puede unirse a la molécula adaptadora de señalización Grb2 y se asocia indirectamente con p125FAK (Yang, y col., (1995) *J. Biol. Chem*. 270: 11711; Cavaldesi, y col., (1999), *J. Neurochem*. 72: 01648). Aunque la importancia de estas asociaciones sigue siendo desconocida, estas propiedades de unión sugieren que el distroglicano también puede servir para localizar las moléculas de señalización en la superficie celular.

Varias líneas de evidencia sugieren que el distroglicano también puede funcionar en la formación de la unión neuromuscular, en particular, en la diferenciación postsináptica. Con fines de claridad, los componentes de la unión neuromuscular se resumen en el presente documento. Las principales características estructurales de la unión neuromuscular (NMJ) o sinapsis nerviosa-muscular son las especializaciones pre y postsinápticas de la neurona motora y el músculo, respectivamente, la lámina basal sináptica intermedia y la cápsula de Schwann especializada (Salpeter, y col., (1987) *The Vertebrate Neuromuscular Junction*. New York, Alan R. Liss.). El aparato presináptico está marcado por matrices ordenadas de vesículas sinápticas, un subconjunto de las cuales está destinado a fusionarse con la membrana plasmática en las zonas activas y libera acetilcolina, que es reconocida por los receptores de acetilcolina (AChR) sobre el músculo, y, en última instancia, da como resultado la activación y contracción del músculo (Heuser, y col., (1981) *J. Cell Biol*. 88: 564). Inmediatamente a través de la hendidura sináptica de 50 nm de estas zonas se encuentran las crestas de los pliegues postsinápticos. Estas crestas están repletas de receptores de acetilcolina (AChR), que pueden alcanzar densidades de  $> 10.000$  moléculas/ $\mu\text{m}^2$  (Fertuck, y col., (1976) *J Cell. Biol*. 69: 144). La secreción de acetilcolina localizada y fuertemente regulada en la estrecha hendidura sináptica, junto con la alta densidad de AChR en la membrana postsináptica, asegura una transmisión sináptica rápida y fiable entre la neurona y el músculo. Las perturbaciones de estas especializaciones, tal como la disminución en el número de AChR funcionales que se observan en la miastenia grave, pueden llevar a resultados clínicos debilitantes y con frecuencia mortales, (Oosterhuis, y col., (1992) *Neurology & Neurosurgery* 5: 638).

La lámina basal sináptica (SBL) está entre las membranas presináptica y postsináptica y contiene moléculas importantes para la estructura, función y regulación de la unión neuromuscular (Bowe, M.A & Fallon, J.R., (1995) *Ann. Rev. Neurosci*. 18: 443; Sanes, y col., (1999) *Ann. Rev. Neurosci*. 22: 389). Consiste en un conjunto distinto de moléculas de la matriz extracelular, incluidas lamininas especializadas, proteoglicanos y colágeno (Hall, y col., (1993) *Neuron* 10: (Suppl.) 99). La SBL también contiene moléculas esenciales para la regulación de la estructura y la función sináptica, incluidas AChE, neuregulinas y agrina. La SBL, por lo tanto, sirve tanto como una estructura especializada para mantener la diferenciación localizada de la sinapsis, además de como repositorio de moléculas reguladoras esenciales.

La composición molecular de la membrana postsináptica se conoce con mucho detalle. Como se ha indicado anteriormente, la proteína de membrana más abundante es el AChR. La proteína asociada al AChR citosólico, rapsina, (anteriormente conocida como proteína 43kD) está presente a niveles estequiométricos con el receptor y es probable que forme un enlace clave entre el dominio citosólico del AChR y el citoesqueleto (Froehner, y col., (1995) *Naturaleza* 377: 195; Gautam, y col., (1995) *Nature* 377: 232). La membrana postsináptica también está enriquecida en erbB2-4, algunos o todos los cuales sirven como receptores de neuregulina (Altiook, y col., (1995) *EMBO J*. 14: 4258; Zhu, y col., (1995) *EMBO J*. 14: 5842). Los AChR y otras moléculas esenciales para la comunicación nervio-

músculo. Los elementos del citoesqueleto se pueden agrupar ampliamente en dos subconjuntos. La distrofina y la utrofina son miembros del complejo proteico asociado a distrofina, o DAPC, y están unidas a la lámina basal sináptica a través del heterómero transmembrana  $\alpha/\beta$ -dístroglicano. El citoesqueleto postsináptico también está enriquecido en varias moléculas asociadas a la adhesión focal, incluyendo  $\alpha$ -actinina, vinculina, talina, paxillina y filamina (Sanes, y col., (1999) Ann. Rev. Neurosci. 22: 389). Las últimas proteínas probablemente se comunican, directa o indirectamente, con la matriz extracelular a través de integrinas, algunas de las cuales están enriquecidas en las sinapsis, (Martin, y col., (1996) Dev. Biol. 174: 125). La actina se asocia con ambos conjuntos de moléculas del citoesqueleto (Rybakova y col., (1996) J Cell Biol. 135: 661; Amann, y col., (1998) J. Biol. Chem. 273:28419-23; Schoenwaelder y col., (1999) Curr. Opin. Cell. Biol. 11: 274). Las funciones de estos conjuntos especializados de proteínas se consideran a continuación.

El  $\alpha$ -Dístroglicano se une a la molécula organizadora de sinapsis, agrina (Bowe, y col., (1994) Neuron. 12: 1173; Campanelli, y col., (1994) Cell. 77: 663; Gee, y col., (1994) Cell. 77: 675; Sugiyama, y col., (1994) Neuron. 13: 103; O'Toole, y col., (1996) Proc Natl Acad Sci U S A. 93: 7369) (revisado in Fallon and Hall, (1994) Trends Neurosci. 17: 469), y el  $\beta$ -dístroglicano se une a la proteína asociada a AChR, rapsina (Cartaud, y col., (1998) J Biol Chem. 273: 11321). Además, El agrupamiento de los AChR inducido por agrina en la membrana postsináptica disminuye notablemente en las células musculares que expresan niveles reducidos de dístroglicano (Montanaro, y col., (1998) J Neurosci. 18: 1250). El papel exacto de dístroglicano en este proceso es desconocido. La evidencia actualmente disponible sugiere que el dístroglicano no es parte del receptor primario de la agrina, sino que puede desempeñar un papel estructural en la organización de las especializaciones postsinápticas ((Gesemann, y col., (1995) Biol. 128: 625; Glass, y col., (1996) Cell. 85: 513; Jacobson, y col., (1998) J Neurosci. 18: 6340).

Otra molécula que desempeña un papel importante en la formación de la unión neuromuscular es el receptor de tirosina quinasa MuSK, que se fosforila en respuesta a la agrina. No obstante, la agrina no se une a MuSK y no está claro cómo la agrina estimula a la MuSK. Se ha sugerido la existencia de un correceptor. La activación de MuSK por la reticulación de anticuerpos es suficiente para inducir la agrupación de AChR en miotubos cultivados (Xie y col., (1997) Nat. Biotechnol. 15:768 y Hopf y Hoch (1998) J. Biol. Chem. 273: 6467) y una MuSK constitutivamente activa puede inducir la diferenciación postsináptica *in vivo* (Jones y col., (1999) J. Neurosci. 19:3376). No obstante, la fosforilación de MuSK es necesaria pero no suficiente para el agrupamiento de AChR inducido por agrina.

El ámbito de la función del dístroglicano va mucho más allá de los músculos. Como se ha indicado anteriormente, los ratones con deficiencias de dístroglicano mueren mucho antes de la diferenciación muscular. En un desarrollo sorprendente, se ha demostrado que el  $\alpha$ -dístroglicano en células no musculares funciona como receptor de los virus de la fiebre de Lassa y de la fiebre de la coriomeningitis (Cao, W., y col., 1998, Science. 282: 2079), y en las células de Schwann como correceptor de *Mycobacterium leprae* (Rambukkana, y col., (1998) Science. 282: 2076). El dístroglicano también es abundante en el cerebro, pero su función allí no se conoce (Gorecki, y col., (1994) Hum Mol Genet. 3: 1589; Smalheiser y Kim (1995) J Biol Chem. 270: 15425).

El  $\alpha$ -Dístroglicano está compuesto por tres dominios conocidos. Un dominio amino terminal se pliega en una configuración globular autónoma (Brancaccio, y col., (1995) Febs Lett. 368: 139). El tercio medio de la proteína es rico en serina y treonina y está altamente glicosilado (Brancaccio, y col., (1997) Eur J Biochem. 246: 166). De hecho, el peso molecular central del  $\alpha$ -dístroglicano es ~68 kDa, pero la molécula nativa migra en SDS-PAGE como una banda polidispersa cuyo tamaño varía de 120-190 kDa, dependiendo de la especie y fuente de tejido (Ervasti and Campbell (1993) J Cell Biol. 122: 809; Bowe, y col., (1994) Neuron. 12: 1173; Gee, y col., (1994) Cell. 77: 675; Matsumura, y col., (1997) J Biol Chem. 272: 13904). La glicosilación del  $\alpha$ -dístroglicano, probablemente en este tercio medio, es esencial para sus propiedades de unión a laminina y agrina.

Si bien está claro que el dístroglicano y el DAPC desempeñan papeles cruciales en diversos procesos en los músculos y en otros tejidos, los mecanismos subyacentes siguen siendo oscuros.

### Sumario de la invención

La invención proporciona procedimientos y composiciones para estabilizar los complejos proteicos asociados a la distrofina (DAPC) en la superficie de una célula. La estabilización de los complejos DAPC en las membranas celulares permite que las membranas tengan menos "fugas" y, por lo tanto, proporciona una vida más larga a las células. La invención también proporciona procedimientos para activar una membrana postsináptica, tal como hacer que la membrana sea más sensible a una señal entrante de una célula neuronal en una unión neuromuscular. La activación de una membrana postsináptica puede comprender estimular el agrupamiento de AChR en la membrana celular y/o la activación de MuSK, tal como mediante fosforilación.

En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto la célula diana con un biglicano que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a una porción de biglicano que tiene SEQ ID NO: 9 y que tiene al menos una actividad biológica de biglicano. En un procedimiento preferentemente, el biglicano o una porción del mismo (en el presente documento denominado "biglicano") se une a alfa-dístroglicano; alfa-sarcoglicano y/o gamma-sarcoglicano. En una realización aún más preferente, el biglicano estimula la fosforilación del alfa-sarcoglicano en una membrana celular. El biglicano también potencia, preferentemente, el

agrupamiento de AChR inducida por agrina en la superficie de la célula; estimula la fosforilación de MuSK en la célula; y potencia la fosforilación de MuSK inducida por agrina.

5 El biglicano puede comprender uno o más motivos de repetición de 24 aminoácidos en la Repetición Rica en Leucina (LRR) del biglicano humano que tiene la SEQ ID NO: 9. En otra realización, el biglicano comprende una región rica en cisteína, por ejemplo, la región rica en cisteína en el extremo C-terminal o el extremo N-terminal. El biglicano puede comprender cadenas laterales de glucosaminoglicano (GAG). En una realización aún más preferente, el biglicano comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a los aminoácidos 20-368 o 38-368 de la SEQ ID NO: 9, incluso más preferentemente al menos un 95 %  
10 idéntica o un 100 % idéntica a los aminoácidos 20-368 o 38-368 de la SEQ ID NO: 9. En otra realización, el biglicano está codificado por un ácido nucleico que hibrida con la SEQ ID NO: 8. El biglicano puede ser *Torpedo* DAG-125, o biglicano humano que tiene SEQ ID NO: 9, o una porción de biglicano y que tiene al menos una actividad biológica de biglicano.

15 La invención proporciona también un procedimiento para tratar, tratar, prevenir y diagnosticar enfermedades o trastornos que están asociados con niveles o actividad anormales del biglicano; con membranas citoplásmicas inestables, debido, en particular, a DAPC inestables; o uniones neuromusculares anómalas.

20 Por ejemplo, la invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una afección asociada con un complejo de proteína asociado a distrofina anormal (DAPC) en células de un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de biglicano o un compuesto que estabilice el DAPC. Los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse o prevenirse incluyen distrofias musculares, tales como distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular congénita, distrofia muscular de la cintura y extremidades, y distrofia miotónica; y cardiomiopatías.

25 En otro ejemplo, la invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una afección caracterizada por una unión neuromuscular anormal en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un biglicano u homólogo que se une y/o induce la fosforilación de MuSK. y/o que induce el agrupamiento de los receptores de acetilcolina (AChR). La afección puede ser una enfermedad neuromuscular.

30 En otro ejemplo más, la invención proporciona un procedimiento de diagnóstico para determinar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una afección asociada con un DAPC o unión neuromuscular anormal u otra enfermedad asociada con un nivel o actividad de biglicano anormal, que comprende determinar el nivel o actividad de biglicano en un tejido del sujeto, en el que la presencia de un nivel y/o actividad anormal de biglicano en el tejido  
35 de un sujeto indica que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una afección asociada con un DAPC o unión neuromuscular anormal u otra enfermedad asociada con un nivel o actividad anormal del biglicano.

También dentro del alcance de la invención están los procedimientos de cribado para identificar agentes que se unen a biglicano, tales como un biglicano humano o *Torpedo* DAG-125, o agentes que inhiben su unión a otra molécula, tal como un miembro de un DAPC o MuSK. Los agentes identificados en estos ensayos pueden usarse, por ejemplo, en procedimientos terapéuticos. Los procedimientos de cribado para identificar agentes que modulan la fosforilación inducida por biglicano también están dentro del alcance de la invención.

45 Otros aspectos de la invención se describen a continuación o serán evidentes para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación.

### Breve descripción de las figuras

50 La figura 1 es un diagrama de la interacción entre DAG-125 o biglicano con un DAPC.

La figura 2 muestra los resultados de un ensayo de superposición de transferencia de ligando, en el que se incubaron filtros con diversos extractos (como se indica) con porciones de alfa $\alpha$ -distroglicano.

55 La figura 3 (A - D) muestra los resultados de los ensayos de superposición de transferencia en los que los filtros con entrada y elución de las columnas se incubaron con porciones de alfa distroglicano o agrina.

La figura 4 es un diagrama que muestra las porciones de distroglicano usadas en los ensayos de superposición de transferencia y la presencia (+) o ausencia (-) de unión.

60 La figura 5A muestra un ensayo de superposición de transferencia en el que un filtro con membranas sinápticas, entrada o elución de una columna se incubó con una porción de alfa $\alpha$ -distroglicano.

65 La figura 5B muestra la alineación de secuencias entre las secuencias de *Torpedo* DAG-125 (SEQ ID NO: 1-3) y biglicano humano (SEQ ID NO: 4-6). La figura 5C es un diagrama de la estructura de biglicano: la región prepro, que está ausente en el biglicano maduro, corresponde a los aminoácidos 1-37 de la SEQ ID NO: 9; la región rica en cisteína en N-terminal corresponde a los aminoácidos 38-80 de la SEQ ID NO: 9; la región LLR corresponde a

aproximadamente los aminoácidos 81-314 de la SEQ ID NO: 9; y la región rica en cisteína en C-terminal corresponde a los aminoácidos 315-368 de la SEQ ID NO: 9. Los círculos representan cadenas laterales de sulfato de condroitina. "S-S" denota unión de disulfuro intracatenaria.

5 La figura 6 muestra los resultados de un análisis de glicosilación de Torpedo DAG-125.

La figura 7 muestra que la unión de distroglicano a biglicano depende de cadenas laterales de sulfato de condroitina específicas. QE-Bgn es núcleo de biglicano expresado en bacterias. AC significa cartílago articular.

10 La figura 8A-C muestra transferencias de los ensayos de superposición que contienen proteoglicano biglicano (BGNPG), núcleo de biglicano (BGN), un híbrido biglicano-decorina (híbrido), proteoglicano decorina (DEC-PG), decorina (DEC), biglicano producido en bacterias (QE-BIG) y fracción de membrana de órgano eléctrico Torpedo (TEOM), que se incubaron con alfa-sarcoglicano marcado con <sup>35</sup>S (figura 8A), gamma-sarcoglicano (figura 8B) y delta-sarcoglicano (Figura 8C).

15 La Figura 9 muestra la expresión de biglicano en la unión neuromuscular.

La figura 10 muestra la regulación por aumento de la expresión de biglicano en músculo de tipo salvaje (wt) y distrófico (mdx).

20 La figura 11 muestra los resultados de una coimmunoprecipitación de biglicano con MuSK-Fc recombinante.

La figura 12 es una transferencia de tipo Western que contiene extractos celulares de células incubadas con o sin agrina y con proteoglicano biglicano (BGNPG) o proteoglicano decorina (DECPG) incubados con anticuerpo anti-fosfotirosina.

25 La figura 13A muestra un análisis del genotipo. El genotipado por PCR se realizó en ADN genómico utilizando pares de cebadores específicos para alelos de biglicano mutantes y de tipo salvaje (Xu y col., 1998). Se muestran los productos de PCR de tipo salvaje (machos; +/o), un heterocigoto (hembra; +/-) y un defectivo (macho; -/o). El tamaño de los productos de PCR se indica a la izquierda.

30 La figura 13B muestra un agrupamiento de AChR inducido por agrina defectuoso en miotubos cultivados a partir de ratones deficientes biglicano y su rescate mediante la adición de biglicano exógeno. UN *Bgn* hembra (+/-) se apareó con un *Bgn* macho (+/o) y se establecieron cultivos y primarios de cada cachorro macho en la camada resultante. El genotipo de cada cachorro se determinó como se muestra en la figura 13A. Los cultivos de miotubos derivados de cada ratón se trataron a continuación con o sin agrina4,8 recombinante durante 18 horas. Después, los miotubos se marcaron con rodamina-a-bungarotoxina para visualizar los AChR. Los miotubos de tipo salvaje muestran una respuesta robusta a la agrina de agrupación de AChR, mientras que los miotubos de ratones biglicano-/o no agruparon AChR en respuesta a la agrina. El biglicano exógeno (1,4 nM) restablece la respuesta de agrupamiento de AChR inducida por agrina.

35 La figura 13C muestra la cuantificación del agrupamiento de AChR. Los agrupamientos de AChR y los miotubos se contaron en un mínimo de 10 campos para cultivos tratados con (AGRINA) o sin (Con) agrina4,8 recombinante en presencia de biglicano (1,4 nM), como se indica. Se observó un déficit similar en el agrupamiento de AChR inducido por agrina en otros dos experimentos.

40 La figura 14 muestra el nivel de creatina quinasa sérica en ratones de tipo salvaje y en ratones defectuosos para biglicano.

50 Figura 15. El biglicano exógeno induce la fosforilación de alfa-sarcoglicano de una manera dependiente de MuSK. Los miotubos de tipo salvaje C2C12 (carriles 1, 2 y 6) y los miotubos deficientes para MuSK (carriles 3-5) se trataron durante treinta minutos de la siguiente manera: carriles 1, 3 y 6, sin estimular; carriles 2 y 5, estimulados con una mezcla de proteoglicano recombinante y biglicano del núcleo (producido en células de osteosarcoma; 1 mg/ml); carril 4, estimulados con agrina 12.4.8. Los cultivos se extrajeron con detergente y el alfa-sarcoglicano se inmunoprecipitó, se separó mediante SDS-PAGE, se transfirió y se aplicaron sondas de anticuerpo anti-fosfotirosina (carriles 1-5) o MIgG (carril 6). La adición de biglicano indujo la fosforilación de tirosina de alfa-sarcoglicano y p35 en células de tipo salvaje C2C12, pero no en células defectuosas para MuSK.

## 60 Descripción detallada de la invención

### General

65 La presente divulgación se basa, al menos en parte, en la observación de que biglicano interacciona con, y a veces modifica, los componentes del complejo de proteína asociada a distrofina (DAPC), además de activar los componentes que desempeñan un papel importante en la formación de la unión neuromuscular. En particular, se ha demostrado que el biglicano interacciona con  $\alpha$ -distroglicano, un componente extracelular del DAPC, así como con

- 5  $\alpha$ -sarcoglicano y  $\gamma$ -sarcoglicano, que son componentes del complejo de sarcoglicano del DAPC. También se demostró que el biglicano fosforila el  $\alpha$ -sarcoglicano, lo que demuestra que el biglicano no interacciona únicamente con los componentes del DAPC, sino que también modifica algunos de los componentes. Se ha descubierto que el proteoglicano de la divulgación está sobreexpresado en un modelo animal de distrofia muscular que se caracteriza por la ausencia de distrofina. La integridad del DAPC y su asociación con la matriz extracelular (ECM) son esenciales para la viabilidad de las células musculares. En consecuencia, se cree que el biglicano estabiliza el complejo DAPC en la superficie de las células, en particular, las células musculares, y puede ser parte de un mecanismo compensatorio que permite la supervivencia de las fibras negativas para distrofina.
- 10 También se ha demostrado en el presente documento que el biglicano está implicado en la formación de la unión neuromuscular, por ejemplo, inducida por agrina. La agrina, que es una proteína de la matriz extracelular presente en la lámina basal sináptica, es secretada por la terminación nerviosa y desencadena la formación de la unión neuromuscular activando el receptor tirosina quinasa MuSK, induciendo de este modo la fosforilación y el agrupamiento de AChR. Anteriormente no se sabía cómo activa la agrina el receptor de MuSK, ya que la agrina no se une directamente a este receptor. Los inventores han descubierto que la activación del receptor de MuSK por la
- 15 agrina en realidad está potenciada por biglicano. Este descubrimiento se basa, al menos en parte, en su descubrimiento de que el biglicano se une directamente al receptor de MuSK; el biglicano induce directamente la fosforilación de tirosina de MuSK; el biglicano potencia la fosforilación de MuSK inducida por agrina; y el biglicano potencia el agrupamiento de AChR inducido por agrina. Además, los inventores han demostrado que los miotubos de ratones deficientes en biglicano muestran una respuesta defectuosa a la agrina, en particular las células son defectuosas en el agrupamiento de AChR inducido por agrina, que además se ha demostrado que se corrigió mediante la adición de biglicano al medio de cultivo de la miotubos. Por lo tanto, se demostró claramente que la ausencia de biglicano en las células da como resultado una deficiencia en el agrupamiento de AChR inducido por
- 20 agrina, que puede corregirse mediante la adición de biglicano a las células. El papel del biglicano en la mediación de la formación de la unión neuromuscular, en particular, la diferenciación postsináptica, se ve respaldado por el hecho de que el biglicano se une al  $\alpha$ -dístroglicano (mostrado en el presente documento), y que  $\alpha$ -y  $\beta$ -dístroglicanos interaccionan con los componentes de la membrana postsináptica. Por ejemplo, la agrina se une a  $\alpha$ -dístroglicano (véase la figura 1 y "Antecedentes de la invención") y el  $\beta$ -dístroglicano se une a la proteína rapsina asociada a AChR. Además, el agrupamiento de AChR inducido por agrina disminuye notablemente en las células musculares que expresan niveles reducidos de dístroglicano, lo que demuestra aún más el papel del dístroglicano en las membranas postsinápticas. Por lo tanto, en el presente documento se demostró que el biglicano desempeña un papel importante en la formación de las uniones neuromusculares, tanto interaccionando con el receptor de la agrina MuSK como interaccionando con  $\alpha$ -dístroglicano. Es probable que el biglicano desempeñe un papel funcional y estructural en la organización de las especializaciones postsinápticas.
- 25
- 30 Además, dado que los DAPC también se encuentran en el cerebro, se ha encontrado agrina en placas seniles en cerebros de sujetos con enfermedad de Alzheimer y deficiencias neuronales periféricas y centrales en algunos pacientes que carecen de distrofina, también se cree que el biglicano participa en la formación de sinapsis.
- 35
- 40 Por lo tanto, los resultados descritos en el presente documento indican que el biglicano desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática de la célula muscular, al menos en parte mediante la interacción con  $\alpha$ -dístroglicano y los sarcoglicanos en el DAPC; en la formación de la unión neuromuscular, al menos en parte participando en el agrupamiento de AChR inducido por agrina y la activación de MuSK; y también probablemente en la formación de sinapsis. Basándose en al menos en estos hallazgos, la invención proporciona composiciones y procedimientos de diagnóstico, tratamiento y/o prevención de enfermedades o afecciones asociados con un DAPC disfuncional, una estructura celular inestable, un defecto en las uniones neuromusculares o en las sinapsis. Dichas enfermedades incluyen, en particular, distrofias musculares, tales como de Duchenne, de la cintura y extremidades, otras miopatías, trastornos neuromusculares y trastornos neurológicos.
- 45
- 50 Además, en vista de la amplia distribución tisular de los DAPC y los dístroglicanos, es probable que el proteoglicano de la divulgación desempeñe un papel en la regulación de la señalización a través de la membrana citoplásmica y/o en el mantenimiento de la integridad de las membranas citoplásmicas de células distintas de las células musculares. Por ejemplo, el dístroglicano u otros componentes del DAPC son abundantes en el cerebro, el riñón y el corazón (véase "Antecedentes de la invención"). Por lo tanto, la invención proporciona, más generalmente, composiciones, procedimientos de diagnóstico y terapéuticos para enfermedades o trastornos asociados con una anomalía de un complejo de proteína de membrana con el que interacciona la proteína de la invención, por ejemplo, el DAPC o el receptor de MuSK.
- 55
- 60 Basado en al menos el hecho de que se sabe que el dístroglicano es un receptor utilizado por los microorganismos para entrar en las células, por ejemplo, los virus de la fiebre de Lassa y de la fiebre de coriomeningitis, tales composiciones de la invención pueden usarse para tratar y/o prevenir infecciones por tales microorganismos. Sin querer limitarse a un mecanismo de acción específico, la terapéutica del biglicano puede obstaculizar o inhibir la unión del microorganismo a dístroglicano.
- 65 Se ha demostrado que tanto el biglicano humano (descrito, por ejemplo, en Fischer y col., como "proteoglicano pequeño óseo" J. Biol. Chem. 264: 4571 (1996); registro en Genbank n.º J04599; SEQ ID NO: 9) como DAG-125

aislado del órgano eléctrico *Torpedo* interaccionan con los componentes del DAPC. En base a las homologías de secuencia entre las dos proteínas y actividades biológicas similares (descritas adicionalmente en el presente documento), se cree que el biglicano humano (SEQ ID NO: 9) puede ser el ortólogo humano del *Torpedo* DAG-125. Como alternativa, el ortólogo humano del *Torpedo* DAG-125 puede ser una proteína altamente relacionada con el biglicano humano. Con fines de claridad, con el término "biglicano" tal como se usa en el presente documento se pretende incluir el biglicano humano (SEQ ID NO: 9) y *Torpedo* DAG-125, así como homólogos de estos proteoglicanos.

#### Definiciones

Por comodidad, a continuación se proporciona el significado de ciertos términos y frases empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

"GAG" se refiere a glucosaminoglicanos, que se usan de forma intercambiable en el presente documento con "mucopolisacáridos", cadenas largas de polisacáridos no ramificadas compuestas de unidades repetidas de disacáridos. Uno de los dos azúcares es siempre un aminoazúcar (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina). Los glucosaminoglicanos están unidos covalentemente a un residuo de serina de una proteína central, para formar una molécula de proteoglicano.

El término "glicano" se usa de forma intercambiable en el presente documento con el término "polisacárido" y "oligosacárido".

El término "glicoproteína" se refiere a una proteína que contiene uno o más grupos carbohidrato unidos covalentemente a la cadena polipeptídica. Normalmente, una glicoproteína contiene de 1 % a 60 % de carbohidrato en peso en forma de numerosas cadenas de oligosacáridos ramificadas, relativamente cortas, de composición variable. A diferencia de las glicoproteínas, los proteoglicanos son mucho más grandes (hasta millones de dalton) y contienen entre 90 % y 95 % de carbohidratos en peso en forma de largas cadenas de glucosaminoglicanos no ramificadas.

El término "proteoglicano de la invención" se refiere a una molécula de proteoglicano que tiene una o más de las características y actividades biológicas del biglicano. En consecuencia, un proteoglicano preferente de la invención incluye un proteoglicano que tiene una o más de las siguientes características: un peso molecular entre 100 y 150 kDa o una movilidad aparente de 125 kDa, como se determina en un gel de acrilamida SDS; una o más cadenas laterales de glucosaminoglicano; un peso molecular del núcleo entre 35 y 40 kDa, preferentemente aproximadamente 37 kDa; una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1-6 y 9 o variante de la misma; una de las más actividades biológicas de biglicano, según se indica más adelante, bajo la definición correspondiente. En una realización, el proteoglicano de la invención es un SLRP, por ejemplo, biglicano humano. Un proteoglicano preferente de la invención es *Torpedo* DAG-125 o un ortólogo de mamífero, preferentemente humano, del mismo. Otro proteoglicano preferente de la invención es biglicano, por ejemplo, biglicano humano que tiene la SEQ ID NO: 9. El término "proteoglicano de la invención" incluye además porciones del proteoglicano de tipo salvaje, siempre que estas porciones tengan al menos una actividad biológica de una proteína biglicano. En consecuencia, el término "proteoglicano de la invención" incluye moléculas que consisten solo en el núcleo (es decir, parte de proteína de la molécula), o de las cadenas laterales de GAG, porciones de las mismas y/o combinaciones de las mismas.

El término "biglicano" se refiere a proteoglicanos que tienen al menos una actividad biológica de biglicano humano o de *Torpedo* DAG-125. Los biglicanos preferentes incluyen *Torpedo* DAG-125 (que comprende la SEQ ID NO: 1-3), biglicano humano (SEQ ID NO: 9), así como homólogos de los mismos. Los homólogos preferentes son proteoglicanos o proteínas o péptidos que tienen al menos aproximadamente un 70 % de identidad, al menos aproximadamente un 75 % de identidad, al menos aproximadamente un 80% de identidad, al menos aproximadamente un 85% de identidad, al menos aproximadamente un 90% de identidad, al menos aproximadamente un 95 % de identidad e, incluso más preferentemente, al menos aproximadamente un 98 o 99 % de identidad. Homólogos todavía más preferentes son aquellos que tienen un cierto porcentaje de homología (o identidad) con el biglicano humano o *Torpedo* DAG-125 y tienen al menos una actividad biológica de estos proteoglicanos. El término biglicano no se limita al biglicano de longitud completa, sino que incluye también porciones que tienen al menos una actividad de biglicano.

El término "biglicano humano" se refiere al proteoglicano descrito en Fischer y col., J. Biol. Chem. 264: 4571 (1989), que tiene el número de registro en GenBank J04599 y la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9. Una secuencia de ADNc que codifica la proteína de biglicano humana se expone en la SEQ ID NO: 7 y su marco de lectura abierto como SEQ ID NO: 8.

El término "núcleo de biglicano" se refiere a un biglicano que no incluye las cadenas de GAG.

El término "biglicano proteoglicano" o "biglicano PG" se refiere a un biglicano que tiene al menos una cadena de GAG.

El término "ácido nucleico de biglicano" se refiere a un ácido nucleico que codifica un biglicano proteoglicano, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la SEQ ID NO: 9.

5 Con una "actividad biológica de biglicano" se pretende hacer referencia a uno o más de: la capacidad de mantener la integridad de una membrana plasmática; la capacidad de estabilizar los DAPC en las membranas plasmáticas; la capacidad de unirse a uno o más componentes de los DAPC; por ejemplo, unión a  $\alpha$ -dístroglicano, unión a un componente de sarcoglicano, tal como,  $\alpha$ -sarcoglicano o  $\gamma$ -sarcoglicano; unión a MuSK; estimulación de la formación de uniones neuromusculares, tal como estimulando la diferenciación postsináptica; potenciación del agrupamiento de AChR, por ejemplo, el agrupamiento AChR inducido por agrina; fosforilación de componentes del DAPC, por ejemplo, sarcoglicanos; estimulación de la fosforilación de MuSK o la potenciación de la fosforilación de MuSK  
10 inducida por agrina.

15 Un "agente terapéutico biglicano" es un compuesto que puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad que está asociada con una membrana citoplasmática anormal, por ejemplo, una membrana inestable; un DAPC anormal; unión neuromuscular anormal; sinapsis anormal; agrupamiento anormal de AChR; o activación anormal de MuSK. Un biglicano terapéutico puede ser un agonista o un antagonista de una o más de las actividades biológicas de biglicano. Un agente terapéutico puede ser cualquier tipo de compuesto, que incluye una proteína o un derivado de la misma, por ejemplo, un proteoglicano, un ácido nucleico, un glicano o una molécula pequeña orgánica o sintética.

20 El término "anormal" se usa indistintamente en el presente documento con "aberrante" y se refiere a una molécula o actividad que difiere de la molécula o actividad de tipo salvaje o normal.

25 El término "DAPC" se refiere a "complejo de proteína asociado a distrofina", un complejo de membrana, expuesto en la Figura 1, que comprende distrofina, alfa-y beta $\alpha$ -dístroglicanos, y el complejo transmembrana de sarcoglicano.

Los "sarcoglicanos" salen en diferentes formas, incluidos los alfa-, beta-, gamma-, delta- y épsilon-sarcoglicanos. Ciertos sarcoglicanos son específicos para ciertos tejidos, por ejemplo, alfa y delta-sarcoglicanos son específicos del músculo esquelético.

30 Las "proteínas asociadas a la distrofina" incluyen proteínas o glicoproteínas, tal como alfa $\alpha$ -dístroglicano, distrobrevina, sarcospan y las sintrofinas.

El término "AChR" se refiere al receptor de acetilcolina.

35 El término "SLRP" se refiere a un pequeño proteoglicano de repetición rico en leucina.

El término "MASC" se refiere al componente de especificidad asociado a células musculares.

40 El término "RATL" se refiere al enlazador transmembrana asociado a rapsina.

El término "HSPG" se refiere a proteoglicanos de heparán sulfato.

45 El término "MuSK" usado en el presente documento indistintamente con "quinasa específica muscular" se refiere a una proteína tirosina quinasa, que se expresa en músculos normales y desnervados, así como en otros tejidos, incluyendo corazón, bazo, ovario o retina (véase Valenzuela, D., y col., 1995, Neuron 15: 573-584). Como alternativa, la tirosina quinasa se ha denominado "Dmk" para "quinasa muscular desnervada". Por lo tanto, los términos MuSK y Dmk pueden usarse indistintamente. La proteína parece estar relacionada con la familia Trk de tirosina quinasas, y se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos n.º 5,814,478.

50 La expresión "molécula activadora de MuSK" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que es capaz de inducir la fosforilación del receptor MuSK en el contexto de una célula muscular diferenciada. Una de tales moléculas activadoras es la agrina, como se describe en los Ejemplos expuestos en el presente documento.

55 Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida utilizada como base para una comparación de secuencia; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, como un segmento de una secuencia de ADNc o gen de longitud completa proporcionada en una lista de secuencias, tal como una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 7 u 8, o puede comprender una  
60 secuencia completa de ADNc o gen. En general, una secuencia de referencia tiene al menos 20 nucleótidos de longitud, frecuentemente al menos 25 nucleótidos de longitud y a menudo al menos 50 nucleótidos de longitud. Puesto que dos polinucleótidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia de polinucleótidos completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) puede comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más)  
65 polinucleótidos se llevan a cabo normalmente comparando las secuencias de los dos polinucleótidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de

comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótidos contiguos en el que una secuencia de polinucleótido se puede comparar con una secuencia de referencia de al menos 20 nucleótidos contiguos y en el que la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) del por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, mediante la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, el que resulta en el mayor porcentaje de homología de la ventana de comparación) generado por los diversos procedimientos. La expresión "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos son idénticas (es decir, nucleótido por nucleótido) sobre la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las se da una base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. La expresión "identidad sustancial" tal como se usa en el presente documento denota una característica de una secuencia de polinucleótido, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 85 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente, al menos del 90 al 95 por ciento de identidad de secuencia, más habitualmente al menos un 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótidos, frecuentemente en una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, en el que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia de polinucleótido que puede incluir deleciones o adiciones que sumen un 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia en la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia de mayor tamaño, por ejemplo, un segmento de la secuencia de polinucleótido de biglicano de longitud completa.

Según se aplica a polipéptidos, la expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias de péptidos, cuando están alineadas de manera óptima, mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos un 80 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente, al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferentemente, al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, un 99 por ciento de identidad de secuencia). Preferentemente, las posiciones de los residuos que no son idénticas difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos hacen referencia a la capacidad de intercambio de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina y isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas de hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amidas es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos preferentes para la sustitución conservadora de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

"Molécula pequeña" como se usa en el presente documento, se refiere a una composición, que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 5 kD y, lo más preferentemente, de menos de aproximadamente 4 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas (que contienen carbono) o inorgánicas. Muchas compañías farmacéuticas tienen bibliotecas extensas de mezclas químicas y/o biológicas, a menudo extractos de hongos, bacterias o algas, que pueden cribarse con cualquiera de los ensayos de la invención para identificar compuestos que modulen la bioactividad de un proteoglicano de la invención.

Un "mioblasto" es una célula que, al fusionarse con otros mioblastos, da lugar a miotubos que, en última instancia, se convierten en fibras musculares esqueléticas. El término se usa a veces para todas las células reconocibles como precursores inmediatos de las fibras de músculo esquelético. Como alternativa, el término está reservado para aquellas células posmitóticas capaces de fusionarse, otras se denominan posibles mioblastos.

"Miofibrilla" es un orgánulo cilíndrico largo de músculo estriado, compuesto por conjuntos regulares de filamentos gruesos y delgados, y que constituye el aparato contráctil.

Un "miotubo" es una célula multinucleada alargada (tres o más núcleos) que contiene algunas miofibrillas localizadas periféricamente. Se forman *in vivo* o *in vitro* mediante la fusión de mioblastos y, en última instancia, se convierten en fibras musculares maduras que tienen núcleos localizados en la periferia y la mayor parte de su citoplasma lleno de miofibrillas. De hecho, no hay una distinción muy clara entre miotubos y las fibras musculares propiamente dichas.

"Utrofina" (proteína asociada a distrofina) es un homólogo autosómico de la distrofina (de tamaño 395 kD) localizado cerca de la unión neuromuscular en el músculo adulto, aunque en ausencia de distrofina (es decir, en la distrofia muscular de Duchenne), la utrofina también se localiza en la cara citoplasmática del sarcolema.

5 Como se usa en el presente documento, el término "transfección" significa la introducción de un ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, en una célula receptora mediante transferencia génica mediada por ácido nucleico. El término "transducción" se usa generalmente en el presente documento cuando la transfección con un ácido nucleico es por administración viral del ácido nucleico. "Transformación", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso en el que se cambia el genotipo de una célula como resultado de la captación celular de ADN o  
10 ARN exógeno y, por ejemplo, la célula transformada expresa una forma recombinante de un polipéptido o, en el caso de la expresión antisentido del gen transferido, se altera la expresión de una forma natural de la proteína recombinante.

15 Como se usa en el presente documento, el término "transgén" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se ha introducido en una célula. También se dice que las células hijas que derivan de una célula en la que se ha introducido un transgén contienen el transgén (a menos que se haya delecionado). Un transgén puede codificar, por ejemplo, un polipéptido, parcial o totalmente heterólogo, es decir, extraño, al animal o célula transgénica en el que se introduce, o es homólogo a un gen endógeno del animal o célula transgénica en el que se introduce, pero que está diseñado para insertarse o se inserta en el genoma del animal de forma tal que altere el genoma de la célula en la  
20 que se inserta (por ejemplo, se inserta en un lugar que difiere del gen natural). Como alternativa, un transgén también puede estar presente en un episoma. Un transgén puede incluir una o más secuencias reguladoras de la transcripción y cualquier otro ácido nucleico, (por ejemplo, intrón), que pueda ser necesario para la expresión óptima de una secuencia codificante seleccionada.

25 Como se usa en el presente documento, el término "vector" hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector preferente es un episoma, es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extracromosómica. Los vectores preferentes son aquellos capaces de replicarse de forma autónoma y/o de expresar los ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos operativamente se denominan en el presente documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en  
30 forma de "plásmidos" que se refieren, generalmente, a bucles de ADN bicatenario circular que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector utilizada con mayor frecuencia. No obstante, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión que sirven funciones equivalentes y que se convierten en  
35 conocidas en la técnica posteriormente en el presente documento.

"Derivado de" como se usa esta frase en el presente documento indica una secuencia de péptido o nucleótido seleccionada dentro de una secuencia dada. Una secuencia peptídica o nucleotídica derivada de una secuencia citada puede contener un pequeño número de modificaciones con respecto a la secuencia original, en la mayoría de  
40 los casos representando deleción, reemplazo o inserción de menos de aproximadamente 15 %, preferentemente menos de aproximadamente 10 % y, en muchos casos, menos de aproximadamente 5 % de residuos de aminoácidos o pares de bases presentes en la secuencia original. En el caso de los ADN, una molécula de ADN también se considera derivada de otra si las dos son capaces de hibridarse de forma selectiva entre sí.

45 Los términos "quimérico", "fusión" y "compuesto" se usan para indicar una proteína, dominio peptídico o secuencia nucleotídica o molécula que contiene al menos dos porciones componentes que son mutuamente heterólogas en el sentido de que, de lo contrario, no se encuentran directamente (covalentemente) unidos en la naturaleza. Más específicamente, las porciones componentes no se encuentran en el mismo polipéptido o gen continuo en la naturaleza, al menos no en el mismo orden u orientación o con la misma separación presente en la proteína  
50 quimérica o dominio compuesto. Tales materiales contienen componentes derivados de al menos dos proteínas o genes diferentes o de al menos dos porciones no adyacentes de la misma proteína o gen. Las proteínas compuestas y las secuencias de ADN que las codifican, son recombinantes en el sentido de que contienen al menos dos porciones constituyentes que, de otro modo, no se encuentran directamente unidas (covalentemente) juntas en la naturaleza.

55 El término "modular" se refiere a inhibir o estimular.

Los términos "activar una membrana postsináptica" se refieren a la estimulación de la transferencia de una señal en la unión neuromuscular, generalmente, de una célula nerviosa a una célula muscular. La activación generalmente  
60 incluye la estimulación del agrupamiento de AChR en la membrana celular en la unión neuromuscular; y/o la fosforilación de MuSK. La activación da como resultado la inducción de la diferenciación postsináptica.

El término "tratar" con respecto a un sujeto, se refiere a mejorar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno del sujeto. El tratamiento puede ser curar la enfermedad o afección o mejorarla, pero reduciendo al menos ciertos  
65 síntomas de la misma.

## Compuestos de la divulgación

La divulgación proporciona compuestos para su uso en el mantenimiento de la integridad de las membranas de las células plasmáticas, en particular, compuestos que estabilizan los complejos proteicos asociados a la distrofina (DAPC) en estas membranas, evitando así la desintegración de las membranas. La divulgación también proporciona compuestos que estimulan la formación de la unión neuromuscular, tal como estimulando la diferenciación de la membrana postsináptica y, más generalmente, compuestos que estimulan la formación de sinapsis.

En una realización particular, el compuesto se une a uno o más componentes del DAPC. El compuesto preferentemente se une a  $\alpha$ -dístroglicano y/o a un componente sarcoglicano, tal como  $\alpha$ -sarcoglicano. En una realización aún más preferente, el compuesto de la divulgación se une tanto al  $\alpha$ -dístroglicano como a un componente del complejo de sarcoglicano, por ejemplo, seleccionado entre el grupo que consiste en  $\alpha$ -sarcoglicano,  $\gamma$ -sarcoglicano y  $\delta$ -sarcoglicano. El componente del sarcoglicano al que se une el compuesto de la divulgación es, preferentemente,  $\alpha$ -sarcoglicano. En general, el compuesto de la divulgación entra en contacto con uno o más componentes del DAPC, por ejemplo, para estabilizar de este modo el complejo y reducir la desestabilización de la membrana plasmática resultante de un complejo DAPC anormal, tal como los observados en las distrofias musculares.

Todavía en una realización aún más preferente, el compuesto de la divulgación se une a una región de  $\alpha$ -dístroglicano que es diferente de la región a la que se unen la agrina, la laminina y el perlecán (véase la Figura 1). La unión de los compuestos de la divulgación no requiere la presencia de cadenas laterales de glucosilo en el  $\alpha$ -dístroglicano. Más preferentemente, los compuestos de la divulgación se unen a la parte C-terminal de alfa-dístroglicano, preferentemente a aproximadamente los aminoácidos 345 a 891, más preferentemente a aproximadamente los aminoácidos 1-750, aproximadamente los aminoácidos 30-654, aproximadamente los aminoácidos 345-653 o aproximadamente los aminoácidos 494-653 del alfa  $\alpha$ -dístroglicano. Por lo tanto, un compuesto preferente de la divulgación se une a una región que consiste esencialmente en los 150 aminoácidos C-terminales del  $\alpha$ -dístroglicano, es decir, los aminoácidos 494-653.

Otros compuestos de la divulgación se unen al receptor tirosina quinasa MuSK. Dichos compuestos se pueden unir a MuSK y/o a  $\alpha$ -dístroglicano y/o a un componente del complejo de sarcoglicano, por ejemplo,  $\alpha$ -sarcoglicano.

Preferentemente, los compuestos se unen específicamente a una o más de las moléculas citadas anteriormente, es decir, no se unen de manera significativa o a un nivel detectable a otras moléculas para producir un efecto indeseable en la célula. Los compuestos se unen, preferentemente, con una constante de disociación de  $10^{-6}$  o menos, y aún más preferentemente con una constante de disociación de  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$  o  $10^{-13}$  M o menos. La constante de disociación puede determinarse de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la materia.

Los ensayos de unión para determinar el nivel de unión de un compuesto a un componente del DAPC o a MuSK para identificar miembros de la biblioteca de compuestos que se unen a estas moléculas son conocidos en la técnica y también se describen adicionalmente en el presente documento. También se conocen procedimientos para preparar componentes del DAPC o MuSK para usar en tales ensayos. Dichos componentes se pueden aislar de tejido o se pueden preparar de forma recombinante o sintética. Sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos están disponibles públicamente, por ejemplo, en GenBank, o en publicaciones.

Otros compuestos preferentes de la divulgación tienen una o más actividades biológicas de biglicano, además de, o en lugar de, ser capaces de unir uno o más componentes del DAPC y/o MuSK. Por ejemplo, un compuesto de la divulgación puede estimular la formación de la unión neuromuscular, en particular, la diferenciación de la membrana postsináptica, incluyendo la inducción del agrupamiento de AChR y/o estimulando la fosforilación de la tirosina inducida por agrina de MusK.

El compuesto de la divulgación puede ser una proteína o derivado de la misma, en particular un proteoglicano, un ácido nucleico, tal como un ácido nucleico que codifica un proteoglicano de la invención, un glicano, un peptidomimético o derivado del mismo, o una molécula orgánica pequeña. En general, el compuesto puede ser cualquier tipo de molécula con la condición de que el compuesto tenga las características requeridas, por ejemplo, unión a  $\alpha$ -sarcoglicano y/u otros componentes del DAPC.

En una realización preferida, el compuesto de la divulgación es un proteoglicano que tiene un peso molecular de aproximadamente 100 kDa a aproximadamente 150 kDa, preferentemente de aproximadamente 110 kDa a aproximadamente 140 kDa, y, lo más preferentemente, de aproximadamente 120 a aproximadamente 130 kDa, según se determina, por ejemplo, mediante migración en un gel de acrilamida SDS. El núcleo del proteoglicano de la divulgación tiene un peso molecular de aproximadamente 25 a aproximadamente 45 kDa, preferentemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 kDa y, lo más preferentemente, de aproximadamente de 37 kDa. Los fragmentos o porciones de estos proteoglicanos también están dentro del alcance de la divulgación. El proteoglicano contiene, preferentemente, una o más cadenas laterales de glucosaminoglicanos, tales como una cadena lateral de mucopolisacáridos, por ejemplo, heparán, condroitina o dermatán. Las cadenas laterales preferidas consisten en

sulfato de condroitina, por ejemplo, 4-sulfato (sulfato de condroitina de tipo A) y 6-sulfato (sulfato de condroitina tipo C). Se puede usar cualquier cadena lateral en la divulgación siempre que el proteoglicano tenga al menos una bioactividad de biglicano.

- 5 En una realización aún más preferente, el proteoglicano de la divulgación comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos en su núcleo: IQAIEFEDL (SEQ ID NO: 1); LGLGFNEIR (SEQ ID NO: 2); y TSYHGISLFNNPVNYWDVL (SEQ ID NO: 3) o secuencias de aminoácidos relacionadas con las mismas, tales como secuencias de aminoácidos del ortólogo de mamífero de la proteína *Torpedo* a partir de la cual se obtuvieron estas secuencias de aminoácidos. El proteoglicano contiene, preferentemente, las tres de estas secuencias o secuencias relacionadas con el mismo. Por ejemplo, el proteoglicano de la divulgación puede comprender una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos, que son parte del biglicano humano: IQAIELEDL (SEQ ID NO: 4); LGLGHNQIR (SEQ ID NO: 5); y AYYNGISLFNNVPYWEVQ (SEQ ID NO: 6).

15 Aunque la composición que incluye *Torpedo* DAG-125 y los procedimientos que usan el mismo están dentro del alcance de la divulgación, las composiciones y procedimientos preferentes son los relacionados con mamíferos, incluidos vertebrados, homólogos de *Torpedo* DAG-125, denominados en el presente documento ortólogos de *Torpedo* DAG-125. Los ortólogos preferentes de *Torpedo* DAG-125 son ortólogos humanos, de roedores, murinos, caninos, felinos, ovinos y bovinos. Como se muestra en el presente documento, es muy probable que el DAG-125 de mamífero sea biglicano, sin embargo, también puede ser una molécula relacionada con biglicano y, por ejemplo, también con decorina (véase más adelante), pero en realidad es una proteína no descrita anteriormente. Por lo tanto, la invención también proporciona composiciones que comprenden el ortólogo de mamífero de *Torpedo* DAG-125, tal como el ortólogo humano de *Torpedo* DAG-125.

25 Un ortólogo de mamífero de *Torpedo* DAG-125 se puede aislar rastreando bibliotecas con sondas que contienen secuencias de nucleótidos que codifican una o más de las SEQ ID NO 1-3. Numerosos otros procedimientos están disponibles para clonar el ortólogo de mamífero de *Torpedo* DAG-125. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos frente *Torpedo* DAG-125 y usarse para explorar bibliotecas de expresión en mamíferos. La identificación de las proteínas clonadas como ortólogos de mamífero de *Torpedo* DAG-125 puede establecerse realizando los mismos ensayos biológicos que los descritos en los Ejemplos que emplean *Torpedo* DAG-125.

30 Por lo tanto, el proteoglicano de la invención también puede ser un miembro de la familia de los proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP), también denominados "proteoglicanos de dermatán-sulfato pequeños o no agregantes" debido a su incapacidad para interactuar con hialuronano o debido a su tipo de glucosaminoglicanos, respectivamente. Los SLRP se organizan en tres clases basadas en su organización proteica y genómica. Todos los SLRP se caracterizan por un dominio central que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR) flanqueadas en ambos lados por pequeños grupos de cisteínas. Los SLRP se describen, por ejemplo, en Iozzo y col., (1998) Ann. Rev. Biochem. 67:609, incorporado específicamente en el presente documento por referencia.

40 Los núcleos de proteína de SLRP van desde ~35-45 kD con una o dos cadenas de GAG unidas en el extremo N-terminal. La estructura general del núcleo de proteína SLRP consiste en una matriz en tándem de 6-10 repeticiones ricas en leucina (LRR) flanqueadas por dominios con cisteínas unidas por disulfuro conservadas (figura 5C). Dependiendo de la extensión de la glicosilación y del número de cadenas de GAG, el peso molecular nativo oscila entre ~100-250 kD. Sobre la base de su homología de secuencia, Iozzo, *citado anteriormente*, ha propuesto que los SLRP se agrupan en tres clases que consisten en: 1) biglicano y decorina; 2) fibromodulina, lumicán, keratocán, PREPLP y osteoadherina; y 3) epificán y osteoglicina. La característica más convincente del núcleo de la proteína SLRP son los LRR. Dichas repeticiones (24aa cada una en los SLRP) median las interacciones proteína-proteína en una amplia variedad de contextos intracelulares, transmembrana y extracelulares (Kobe y Deisenhofer, (1994) Trends Biochem. Sci. 19: 415-21). El sitio de unión a neurotrofina en trkB, por ejemplo, es un LRR (Windisch y col., (1995) Biochemistry 34: 11256-63). Se cree que las repeticiones tienen una estructura general de una hélice  $\alpha$ , seguida de una lámina beta en una matriz antiparalela, aunque el análisis de secuencias ha sugerido que este orden podría invertirse en los SLRP (Hocking y col., (1998) Matrix Biol. 17: 1-19). Es probable que los residuos conservados de cada repetición dicten su estructura secundaria, mientras que los aminoácidos intermedios determinan la especificidad de la unión del ligando.

55 Los SLRP preferentes para su uso en la divulgación incluyen SLRP de clase I, tales como biglicano y decorina. Las secuencias de aminoácidos parciales de DAG-125, el proteoglicano *Torpedo* que se demostró que se unía a alfa  $\alpha$ -distroglicano (véanse los Ejemplos) muestra una fuerte homología con el biglicano humano (véase la Figura 5B): se encontró una identidad del 78 % en un total de secuencia de 37 aminoácidos de longitud. Biglicano de roedores, cerdos y humanos son > 95 % idénticos. La decorina y el biglicano de seres humanos son solo un 55 % idénticos. Tal homología es consistente con decorina y biglicano en que ambas tienen funciones compartidas y únicas. Por lo tanto, aunque *Torpedo* DAG-125 tiene una secuencia de aminoácidos que se asemeja más a la del biglicano humano, basándose en la similitud de estructura y función entre biglicano y decorina, este último proteoglicano y sus derivados también pueden usarse para poner en práctica la invención.

65 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los genes y proteínas de biglicano y decorina de diversas especies están disponibles públicamente, como en GenBank. Por ejemplo, el biglicano humano se puede encontrar bajo el

número de registro en GenBank J04599 (hPGI humano que codifica el proteoglicano pequeño de hueso I (biglicano), descrito en Fisher y col., (1989) J. Biol. Chem. 264: 4571; SEQ ID No: 7-9) y M65154; el biglicano de vaca se puede encontrar con el número de registro en GenBank L07953; el biglicano de rata se puede encontrar con el número de registro en GenBank U17834, el biglicano de ratón se puede encontrar con el número de registro en GenBank L20276 y X53928; el biglicano de oveja se puede encontrar con el número de registro en GenBank AF034842; la decorina humana se puede encontrar con el número de registro en GenBank M14219; la decorina de conejo se puede encontrar con el número de registro en GenBank I47020; la decorina de pollo se puede encontrar con el número de registro en GenBank P28675; la decorina de caballo se puede encontrar con el número de registro en GenBank AF038; la decorina bovina se puede encontrar con el número de registro en GenBank P21793; la decorina ovina se puede encontrar con el número de registro en GenBank AF125041; y la decorina de rata se puede encontrar con el número de registro en GenBank Q01129. Las secuencias de biglicano y decorina y otros SLRP pueden encontrarse en GenBank.

La decorina y el biglicano tienen una y dos cadenas de glucosaminoglicano (GAG), respectivamente. Su composición es específica del tejido y se puede regular a varios niveles (Hocking y col., (1998) Matrix Biol 17: 1-19). Por ejemplo, el GAG de biglicano de la piel y el cartílago es predominantemente sulfato de dermatán, mientras que el biglicano sintetizado en el hueso es un proteoglicano de sulfato de condroitina. Las cadenas laterales de sulfato de heparán no se han notificado. Tanto el núcleo de proteína como el tipo de célula contribuyen a la glicosilación distintiva de estos SLRP.

Otros proteoglicanos o núcleos de los mismos de la invención incluyen proteínas de fusión. Por ejemplo, el biglicano o una porción del mismo se puede fusionar a una porción de inmunoglobulina. Como alternativa, la proteína de fusión es una combinación entre dos o más porciones de proteoglicanos de la divulgación, por ejemplo, una porción de una molécula de biglicano fusionada a una porción de una molécula de decorina (véanse los ejemplos).

Las porciones y fragmentos de los proteoglicanos de la invención también están dentro del alcance de la invención. Una porción normalmente tiene al menos cinco, 10, 15 o 20 aminoácidos de longitud. Las porciones preferidas son aquellas que son suficientes para ejercer una actividad biológica, tal como la interacción con un componente de DAPC. Las porciones pueden comprender o consistir en uno o más dominios específicos de una proteína. Los dominios de biglicano y decorina incluyen dos regiones ricas en cisteína (incluidas en los 40-50 aminoácidos en N- y C-terminal del biglicano maduro) y repeticiones ricas en leucina (LRR). La "región LRR" se refiere a la región de biglicano que contiene las repeticiones y consiste esencialmente en los aminoácidos 81-314. Cada repetición individual se denomina en el presente documento "LRR". Se cree que las LRR median las interacciones proteína: proteína y, por lo tanto, pueden ser suficientes para estabilizar los DAPC y las membranas postsinápticas. Basado al menos en la observación de que tanto la decorina como el biglicano se unen a MuSK y que la región LRR en ambas proteínas es muy similar, se cree que las LRR están implicadas en la mediación de la interacción de biglicano (y decorina) con MuSK y pueden participar en la mediación de la fosforilación de MuSK.

Otro biglicano preferente de la divulgación consiste en una porción de biglicano que es capaz de unirse a un sarcoglicano. Se ha demostrado que el dominio de unión del alfa-sarcoglicano del biglicano humano se localiza en el dominio N-terminal de la proteína biglicano madura, es decir, los aminoácidos 38-80, y, más específicamente, los aminoácidos 38-58 de SEQ ID NO: 9. Las cadenas de GAG no son necesarias para unirse al alfa-sarcoglicano. También se ha demostrado que el dominio rico en cisteína en C-terminal media en la interacción con gamma-sarcoglicano. En consecuencia, los biglicanos preferentes de la divulgación incluyen porciones de biglicano que consisten en el dominio N-terminal o C-terminal rico en cisteína, es decir, los aminoácidos 38-80 y 315-368 de SEQ ID NO: 9. Las combinaciones de ciertos dominios de biglicano también están dentro del alcance de la divulgación. Por lo tanto, los fragmentos preferentes consisten en al menos aproximadamente 30 aminoácidos, al menos aproximadamente 40 aminoácidos, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos. Las porciones cortas de los proteoglicanos de la divulgación se denominan "mini-proteoglicanos de la divulgación". Por ejemplo, un fragmento de núcleo de biglicano de aproximadamente 20, 30 o 40 aminoácidos se denomina "mini-biglicano".

El biglicano humano consiste en 368 aminoácidos (SEQ ID NO: 9), de los cuales los aminoácidos 1-19 constituyen un péptido señal (número de acceso en GenBank NP\_001702 y Fisher y col., *citado anteriormente*). Por lo tanto, biglicano sin un péptido señal consiste en los aminoácidos 20-368 de SEQ ID NO: 9. La proteína madura de biglicano consiste en los aminoácidos 38-368 de SEQ ID NO: 9, ya que los aminoácidos 1-37, siendo un pre-péptido, se escinden durante el procesamiento. Los aminoácidos 38-80 corresponden a la región rica en cisteína N-terminal. Aproximadamente los aminoácidos 81-314 corresponde a la región de repetición rica en leucina, que contiene 10 repeticiones de aproximadamente 24 o 23 aminoácidos. El marco de lectura abierto en el ADNc que codifica biglicano humano corresponde a los nucleótidos 121-1227 de SEQ ID NO: 7 y se representa como SEQ ID NO: 8. La secuencia de nucleótidos que codifica una forma madura de biglicano consiste en los nucleótidos 232-1227 de SEQ ID NO: 7.

Además de agonistas, la divulgación también proporciona antagonistas de biglicano. Un antagonista puede ser, por ejemplo, una porción del proteoglicano de tipo salvaje de la divulgación que inhibe la acción del proteoglicano de tipo salvaje, tal como inhibiendo competitivamente la unión del proteoglicano de tipo salvaje a una proteína diana tal como un componente de un DAPC. Por lo tanto, un antagonista puede ser un mutante negativo dominante.

El proteoglicano puede ser una forma madura del núcleo de proteoglicano, es decir, privado del péptido señal, o el proteoglicano de longitud completa con el péptido señal.

5 Los proteoglicanos preferentes de la invención están codificados por secuencias de nucleótidos que son al menos aproximadamente 70 %, preferentemente al menos aproximadamente el 80 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente 98 %, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 99 % idénticos a la secuencia de nucleótidos de un SLRP, por ejemplo, biglicano, u ortólogo del mismo, o porción del mismo.

10 Los ácidos nucleicos preferentes de la divulgación incluyen aquellos que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 70 %, preferentemente al menos aproximadamente un 80 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente 98 %, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 99 % idénticos a la secuencia de nucleótidos de un SLRP, por ejemplo, biglicano (por ejemplo, SEQ ID NO: 7 u 8 que codifica biglicano humano) o DAG-125 u ortólogo del mismo, una porción del mismo. En una realización, el ácido nucleico codifica un polipéptido que contiene una o más de las SEQ ID NO: 1-3 o SEQ ID NO: 4-6 o 9.

20 Otro aspecto de la divulgación proporciona un ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con un ácido nucleico que codifica biglicano, por ejemplo, que tiene una o más de las SEQ ID NO: 1 a 6 o 9, o una complementaria de la misma. Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN, por ejemplo, 6,0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado de 2,0 x SSC a 50 °C, son conocidas por los expertos en la técnica o pueden ser encontrado en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar de una baja rigurosidad 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 en la etapa de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variar, o la temperatura de la concentración de sal puede mantenerse constante mientras que la otra variable cambia. En una realización preferida, un ácido nucleico de la presente invención se unirá a una de las SEQ ID NO 1 a 6 o complementaria de la misma o ácido nucleico que codifica un SLRP en condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo a aproximadamente 2,0 x SSC y aproximadamente 40 °C. En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico de la presente invención hibridará con una secuencia de nucleótidos que codifica una de las SEQ ID NO: 1 a 6 o 9, tal como un ácido nucleico que tiene SEQ ID NO: 7 u 8, o una complementaria de la misma en condiciones de rigurosidad alta.

35 Los procedimientos para preparar compuestos de la divulgación son bien conocidos en la técnica. Para un compuesto de la divulgación que es una proteína o un derivado de la misma, el compuesto puede aislarse de un tejido o el compuesto puede producirse de forma recombinante o sintética. El aislamiento de la proteína de un tejido se describe en los Ejemplos. Las proteínas o proteoglicanos de la invención aislados de tejido tienen, preferentemente, al menos aproximadamente un 70 %, preferentemente al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 98 % y, de la forma más preferente, al menos aproximadamente un 99 % de pureza. En consecuencia, los compuestos preferentes contienen menos de aproximadamente 1 %, e incluso más preferentemente menos de aproximadamente 0,1 % de material del que se extrajo el compuesto.

50 La proteína de la divulgación también se puede producir de forma recombinante, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Normalmente, un gen que codifica la proteína se inserta en un plásmido o vector, y la construcción resultante se transfecta a continuación en células apropiadas, en las que la proteína se expresa a continuación y a partir de la cual la proteína se purifica finalmente.

55 En consecuencia, la presente divulgación se refiere además a procedimientos de producción de las proteínas objeto. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica una proteína de interés se puede cultivar en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión de la proteína. La proteína puede secretarse, mediante la inclusión de una secuencia señal de secreción, y aislarse a partir de una mezcla de células y medio que contiene la proteína. Como alternativa, la proteína puede retenerse citoplasmáticamente y las células se cosechan, se lisan y se aísla la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Las proteínas se pueden aislar del medio de cultivo celular, células huésped o ambos usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación por inmunofinidad con anticuerpos específicos para epítomos particulares de la proteína.

65 Por lo tanto, una secuencia de codificación para una proteína de la presente divulgación puede usarse para producir una forma recombinante de la proteína mediante procesos celulares microbianos o eucariotas. La unión de la secuencia de polinucleótidos a una construcción génica, tal como un vector de expresión, y la transformación o transfección en huéspedes, ya sean eucariotas (levaduras, aviares, insectos o mamíferos) o procariotas (células

bacterianas), son procedimientos estándar.

Los vehículos de expresión para la producción de una proteína recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados para la expresión de las presentes proteínas de fusión incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

Existen varios vectores para la expresión de proteínas recombinantes en levadura. Por ejemplo, YEP24, YIP5, YEP51, YEP52, pYES2 e YRP17 son vehículos de clonación y expresión útiles en la introducción de construcciones genéticas en *S. cerevisiae* (véase, por ejemplo, Broach y col., (1983) en *Experimental Manipulation of Gene Expression*, ed. M. Inouye Academic Press, pág. 83, incorporado en el presente documento como referencia). Estos vectores pueden replicarse en *E. coli* debido a la presencia del ori de pBR322 y en *S. cerevisiae* debido al determinante de la replicación del plásmido de 2 micrómetros de levadura. Además, pueden usarse marcadores de resistencia a fármacos, tales como ampicilina.

La proteína puede producirse en células eucariotas, por ejemplo, células de mamífero, células de levadura, células de insectos (sistema de baculovirus) o en células procariotas. No obstante, si la proteína es un proteoglicano, es preferible expresarlo en una célula del mismo tipo que la que normalmente produce ese proteoglicano particular. Esto asegura que los tipos correctos de cadena(s) lateral(es) de glucosa están unidos al núcleo (es decir, proteína) del proteoglicano. En particular, cuando se usa biglicano en la invención, es preferible que el biglicano contenga las cadenas laterales apropiadas de GAG. Por ejemplo, cuando se utiliza biglicano en el contexto de células musculares, es preferible producir biglicano en células musculares, por ejemplo, células musculares C2. El biglicano también se puede producir en células *Torpedo*, por ejemplo, células del órgano eléctrico de *Torpedo*.

Las células que pueden usarse para producir un compuesto de la divulgación, por ejemplo, un proteoglicano puede modificarse adicionalmente para aumentar el nivel y/o la actividad de una enzima que cataliza modificaciones postraduccionales, por ejemplo, glicosilaciones o sulfonaciones. Por ejemplo, una célula puede transformarse o cotransfectarse con una construcción de expresión que codifica una sulfotransferasa, por ejemplo, una condroitina sulfotransferasa, por ejemplo, una condroitin-6-sulfotransferasa (C6ST; Fukuta y col., (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 18575), o una sulfotransferasa implicada en el sistema nervioso (NSIST), descrito en Nastuk y col., (1998) *J. Neuroscience* 18: 7167.

Como alternativa, puede producirse un núcleo de proteína de un proteoglicano en un procariota, que da como resultado una proteína sin cadenas laterales de glucosa y las cadenas laterales apropiadas pueden añadirse más tarde, tal como mediante química sintética. En aún otra realización, se produce un proteoglicano en un tipo de célula eucariótica y la proteína puede despojarse de sus cadenas laterales, antes de añadir las cadenas laterales apropiadas. Los procedimientos para agregar sintéticamente cadenas laterales de glicano a una proteína son conocidos en la técnica.

En una realización preferida, se produce una proteína recombinante de la divulgación, tal como biglicano o decorina, usando un sistema basado en vaccinia, como se describe en Krishnan y col., (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 10945 y en Hocking y col., (1996) *J. Biol. Chem.* 271:19571. La infección de las células musculares con este vector que codifica biglicano o decorina, por ejemplo, da como resultado la producción de biglicano o decorina con cadenas de GAG específicas para el músculo. Los estudios biofísicos, tal como el difracción circular ultravioleta lejano, demostraron que estas proteínas recombinantes conservan su estructura nativa. En una realización aún más preferente, estas proteínas recombinantes se marcan con epítipo, como se describe adicionalmente en el presente documento, lo que facilita la coimmunoprecipitación y los estudios de unión.

Por ejemplo, se puede producir un proteoglicano de la divulgación en una célula eucariótica usando el sistema de expresión del bacteriófago T7/virus vaccinia. Un virus vaccinia recombinante, vBGN4 que codifica el proteoglicano de la invención, por ejemplo, la proteína biglicano madura, puede expresarse como una proteína de fusión de polihistidina bajo el control del promotor del fago T7 y expresarse, por ejemplo, en células HT-1080 y células UMR106, como se describe en Hocking y col., (1996) *J Biol Chem* 271: 19571-7.

Se pueden obtener líneas celulares inmortalizadas, por ejemplo, líneas celulares musculares, tales como líneas celulares negativas para biglicano, como se describe en Jat y col., *PNAS* (1991) 88: 5096-100; Noble y col., (1992) *Brain Pathology* 2: 39-46. En una realización, se usa un ratón transgénico H-2K<sup>b</sup>/tsA58. Este ratón es un heterocigoto que alberga un gen de inmortalización termolábil (el mutante tsA58 del antígeno T grande de SV40) bajo el control de un promotor inducible por interferón (este ratón está disponible en Charles River). Cuando las células que contienen este gen se cultivan, proliferan indefinidamente a 33 °C en presencia de interferón. No obstante, cuando la temperatura se eleva a 39 °C (a cuya temperatura el antígeno tsA58 no es funcional) y se elimina el interferón, las células dejan de dividirse.

Este procedimiento se ha utilizado para cultivar una amplia variedad de tipos celulares, incluidos astrocitos, osteoclastos, red trabecular y células epiteliales del colon (Chambers y col., (1993) *PNAS* 90: 5578-82; Groves y col., (1993) *Dev. Biol.* 159:87-104; Whitehead y col., (1993) *PNAS* 90: 587-91; Noble y col., (1995) *Transgenic Res.*

- 4:215-25; Tamm y col., (1999) Invest. Ophthamol. Vis. Sci. 40: 1392-403. Esta técnica es muy adecuada para la producción de líneas celulares musculares. Por ejemplo, en un estudio solo se obtuvieron 65 líneas de células musculares separadas de animales con edades comprendidas entre recién nacidos y cuatro semanas (Morgan y col., (1994) Dev. Biol. 162 486-98). Estas líneas se mantuvieron durante más de 80 generaciones.
- 5 Sorprendentemente, no solo formaron miotubos cuando se cambiaron a condiciones no permisivas en cultivo, sino que también formaron músculo cuando se implantaron en ratones huésped. D. Glass y col., también usaron el procedimiento transgénico H-2K<sup>b</sup>/tsA58 para producir una línea de células musculares MuSK<sup>-/-</sup> (Sugiyama y col., (1997) J. Cell Biol. 139: 181-91).
- 10 Para producir líneas celulares inmortalizadas condicionalmente, los ratones que tienen una mutación específica, por ejemplo, una deficiencia en biglicano o MuSK, se pueden cruzar con ratones transgénicos H-2K<sup>b</sup>/tsA58 heterocigotos. Los cruces son sencillos, ya que solo se necesita una copia del gen para una actividad completa. Las células musculares de animales neonatales se pueden cultivar en placas y cultivar en condiciones permisivas (33 °C con interferón). Las células proliferativas se pueden clonar y las muestras de cada línea se cambian a la temperatura
- 15 no permisiva y se prueba su capacidad para formar miotubos. Las líneas celulares de tipo salvaje; decorina<sup>-/-</sup>; biglicano<sup>-/-</sup>; y decorina<sup>-/-</sup> biglicano<sup>-/-</sup> son ejemplos de líneas celulares que se pueden obtener utilizando esta técnica.

- En una realización adicional, el compuesto de la divulgación es un glicano o polisacárido. De hecho, en ciertas aplicaciones, puede ser que en ciertos casos, el núcleo de un proteoglicano pueda no ser necesario para la actividad deseada, tal como para estabilizar el DAPC al poner en contacto uno o más componentes del mismo. Por ejemplo, en el presente documento se ha demostrado que las cadenas laterales de GAG de biglicano son necesarias para su interacción con  $\alpha$ -distroglicano, lo que indica que es probable que la interacción esté mediada por las cadenas laterales de GAG.
- 20
- 25 Los compuestos de la divulgación también pueden ser peptidomiméticos o moléculas orgánicas pequeñas, que se pueden preparar, por ejemplo, basándose en la estructura del proteoglicano.

- Aunque el procedimiento preferente para tratar sujetos con un biglicano es mediante la administración del biglicano al sujeto (basado al menos en la eficacia del biglicano cuando se añade a cultivos celulares, como se describe en los Ejemplos), los proteoglicanos de la invención también pueden producirse en un sujeto, mediante técnicas de terapia génica. Por lo tanto, por ejemplo, un sujeto puede recibir una inyección en un músculo (por ejemplo, cuando el sujeto tiene una distrofia muscular) de un vector que codifica una proteína o proteoglicano de la divulgación de manera que el vector sea capaz de entrar en las células musculares y expresarse allí. Como alternativa, el vector puede ser un vector viral, que está provisto con la cápside viral y el virus infecta las células, por ejemplo, las células musculares, y, por lo tanto, liberan el vector. Los procedimientos y vectores para terapia génica son bien conocidos en la técnica. Los procedimientos ilustrativos se exponen a continuación.
- 30
- 35

- Los vectores de expresión en mamífero preferentes 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 de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamífero adecuados para la transfección de células eucarióticas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a fármacos en células tanto procariotas como eucariotas. Como alternativa, los derivados de virus, tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) se pueden usar para la expresión transitoria de proteínas en células eucarióticas. Los ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluidos retrovirus) se pueden encontrar a continuación en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica. Los diversos procedimientos empleados en la preparación de los plásmidos y la transformación de organismos huésped son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados para células procariotas y eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> Ed., ed. de Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser deseable expresar las proteínas de fusión recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1), y vectores derivados de pBlueBac (tales como el pBlueBac III que contiene gal).
- 40
- 45
- 50
- 55

- En todavía otras realizaciones, las construcciones de expresión sujeto se obtienen mediante inserción del gen objeto en vectores virales, incluidos retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adenoasociados y virus -1 de herpes simple, o plásmidos recombinantes bacterianos o eucarióticos. Como se describe con mayor detalle a continuación, tales realizaciones de las construcciones de expresión objeto están específicamente contempladas para su uso en diversos protocolos de terapia génica *in vivo* y *ex vivo*.
- 60

- Los vectores de retrovirus y los vectores de virus adenoasociados se conocen generalmente como el sistema de administración de genes recombinantes de elección para la transferencia de genes exógenos *in vivo*, particularmente en seres humanos. Estos vectores proporcionan una administración eficiente de genes en las células y los ácidos nucleicos transferidos se integran de forma estable en el ADN cromosómico del huésped. Un requisito previo
- 65

importante para el uso de retrovirus es garantizar la seguridad de su uso, particularmente con respecto a la posibilidad de propagación de virus de tipo salvaje en la población celular. El desarrollo de líneas celulares especializadas (denominadas "células empaquetadoras") que producen solo retrovirus con replicación defectuosa ha aumentado la utilidad de los retrovirus para la terapia génica y los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para su uso en la transferencia génica con fines de terapia génica (para una revisión véase Miller, A.D. (1990) Blood 76:271). Por lo tanto, se puede construir un retrovirus recombinante en el que parte de la secuencia de codificación retroviral (gag, pol, env) ha sido reemplazada por ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la presente invención que hace que la replicación del retrovirus sea defectuosa. El retrovirus con replicación defectuosa se empaqueta luego en viriones que se pueden usar para infectar una célula diana mediante el uso de un virus auxiliar mediante técnicas estándar. Se pueden encontrar protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con tales virus en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. y col., (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.10-9.14 y otros manuales estándar de laboratorio. Los ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de líneas de virus de empaquetamiento adecuadas para preparar sistemas retrovirales ecotrópicos y anfotrópicos incluyen SYMBOL 121 \f "Symbol"Crip, SYMBOL 121 \f "Symbol"Cre, SYMBOL 121 \f "Symbol"2 y SYMBOL 121 \f "Symbol"Am. Los retrovirus se han utilizado para introducir diversos genes en muchos tipos de células diferentes, que incluyen células neuronales, células epiteliales, células endoteliales, linfocitos, mioblastos, hepatocitos, células de médula ósea, *in vitro* y/o *in vivo* (véase, por ejemplo, Eglitis y col., (1985) Science 230:1395-1398; Danos y Mulligan, (1988) PNAS USA 85:6460-6464; Wilson y col., (1988) PNAS USA 85:3014-3018; Armentano y col., (1990) PNAS USA 87:6141-6145; Huber y col., (1991) PNAS USA 88:8039-8043; Ferry y col., (1991) PNAS USA 88:8377-8381; Chowdhury y col., (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem y col., (1992) PNAS USA 89:7640-7644; Kay y col., (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai y col., (1992) PNAS USA 89:10892-10895; Hwu y col., (1993) J. Immunol. 150:4104-4115; la patente de Estados Unidos n.º 4.868.116; la patente de Estados Unidos n.º 4.980.286; solicitud de PCT WO 89/07136; solicitud de PCT WO 89/02468; solicitud de PCT WO 89/05345; y solicitud de PCT WO 92/07573).

Además, se ha demostrado que es posible limitar el espectro de infección de retrovirus y, en consecuencia, de vectores basados en retrovirus, modificando las proteínas de empaquetamiento virales en la superficie de la partícula viral (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO93/25234, el documento WO94/06920 y el documento WO94/11524). Por ejemplo, las estrategias para la modificación del espectro de infección de vectores retrovirales incluyen: acoplar anticuerpos específicos para antígenos de superficie celular a la proteína env viral (Roux y col., (1989) PNAS USA 86:9079-9083; Julan y col., (1992) J. Gen Virol 73:3251-3255; y Goud y col., (1983) Virology 163:251-254); o acoplando ligandos de superficie celular a las proteínas env virales (Neda y col., (1991) J. Biol. Chem. 266:14143-14146). El acoplamiento puede ser en forma de reticulación química con una proteína u otra variedad (por ejemplo, lactosa para convertir la proteína env en una asialoglicoproteína), así como generando proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas monocatenarias de fusión anticuerpo/env). Esta técnica, si bien es útil para limitar o, de otro modo, dirigir la infección a ciertos tipos de tejidos, también se puede usar para convertir un vector ecotrópico en un vector anfotrópico.

Otro sistema de administración de genes víricos útil en la presente divulgación utiliza vectores derivados de adenovirus. El genoma de un adenovirus se puede manipular de manera que codifique un producto genético de interés, pero se inactiva en términos de su capacidad de replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal (véase, por ejemplo, Berkner y col., (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld y col., (1991) Science 252:431-434; y Rosenfeld y col., (1992) Cell 68:143-155). Los vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 dl324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7 etc.) son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en ciertas circunstancias porque no son capaces de infectar células que no se dividen y pueden usarse para infectar una amplia variedad de tipos de células, incluyendo el epitelio de las vías respiratorias (Rosenfeld y col., (1992) citado anteriormente), células endoteliales (Lemarchand y col., (1992) PNAS USA 89:6482-6486), hepatocitos (Herz y Gerard, (1993) PNAS USA 90:2812-2816) y células musculares (Quantin y col., (1992) PNAS USA 89:2581-2584). Además, la partícula del virus es relativamente estable y susceptible de purificación y concentración, y, como anteriormente, puede modificarse para afectar al espectro de infectividad. Adicionalmente, el ADN adenoviral introducido (y ADN extraño contenido en él) no está integrado en el genoma de una célula huésped pero permanece episomal, evitando posibles problemas que pueden aparecer como resultado de la mutagénesis por inserción en situaciones en las que el ADN introducido se integra en el genoma del huésped (por ejemplo, ADN retroviral). Además, la capacidad de transporte del genoma adenoviral para ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases) en relación con otros vectores de administración génica (Berkner y col., citado anteriormente; Haj-Ahmand y Graham (1986) J. Virol. 57:267). La mayoría de los vectores adenovirales con replicación defectuosa actualmente en uso y, por lo tanto, favorecidos por la presente invención, se eliminan para todos o partes de los genes E1 y E3 virales, pero retienen tanto como 80 % del material genético adenoviral (véase, por ejemplo, Jones y col., (1979) Cell 16:683; Berkner y col., citado anteriormente; y Graham y col., en Methods in Molecular Biology, E.J. Murray, Ed. (Humana, Clifton, NJ, 1991) vol. 7. pág. 109-127). La expresión del gen quimérico insertado puede estar bajo control de, por ejemplo, el promotor E1A, el promotor tardío principal (MLP) y las secuencias líder asociadas, el promotor E3 viral o secuencias promotoras añadidas exógenamente.

Todavía otro sistema de vector viral útil para la administración de los genes quiméricos sujeto es el virus adenoasociado (AAV). El virus adenoasociado es un virus defectuoso de origen natural que requiere otro virus, tal

como un adenovirus o un virus del herpes, como virus auxiliar para una replicación eficiente y un ciclo de vida productivo. (Para una revisión, véase Muzyczka y col., *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* (1992) 158:97-129). También es uno de los pocos virus que puede integrar su ADN en células que no se dividen y muestra una alta frecuencia de integración estable (véase, por ejemplo, Flotte y col., (1992) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356; Samulski y col., (1989) *J. Virol.* 63:3822-3828; y McLaughlin y col., (1989) *J. Virol.* 62:1963-1973). Los vectores que contienen tan solo 300 pares de bases de AAV se pueden empaquetar y pueden integrar. El espacio para ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4.5 kb. Un vector AAV, tal como el descrito en Tratschin y col., (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 se puede usar para introducir ADN en las células. Se han introducido diversos ácidos nucleicos en diferentes tipos de células usando vectores AAV (véase, por ejemplo, Hermonat y col., (1984) *PNAS USA* 81:6466-6470; Tratschin y col., (1985) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Wondisford y col., (1988) *Mol. Endocrinol.* 2:32-39; Tratschin y col., (1984) *J. Virol.* 51:611-619; y Flotte y col., (1993) *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790).

Otros sistemas de vectores virales que pueden tener aplicación en la terapia génica se han derivado del virus del herpes, el virus vaccinia y varios virus ARN. En particular, los vectores del virus del herpes pueden proporcionar una estrategia única para la persistencia del gen recombinante en las células del sistema nervioso central y el tejido ocular (Pepose y col., (1994) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2662-2666).

Además de los procedimientos de transferencia viral, tales como los ilustrados anteriormente, también se pueden emplear procedimientos no víricos para provocar la expresión de una proteína en el tejido de un animal. La mayoría de los procedimientos no virales de transferencia de genes se basan en los mecanismos normales utilizados por las células de mamíferos para la captación y el transporte intracelular de macromoléculas. En realizaciones preferentes, los sistemas de administración génica no virales de la presente invención se basan en rutas endocíticas para la captación del gen por la célula diana. Los sistemas de administración génica de ejemplo de este tipo incluyen sistemas derivados de liposomas, conjugados de poli-lisina y envolturas víricas artificiales.

En una realización representativa, un gen que codifica una proteína de interés puede quedar atrapado en liposomas que llevan cargas positivas sobre su superficie (por ejemplo, lipofectinas) y (opcionalmente) que están marcados con anticuerpos contra antígenos de superficie celular del tejido diana (Mizuno y col., (1992) *No Shinkei Geka* 20:547-551; la publicación PCT WO91/06309; solicitud japonesa de patente 1047381; y publicación europea de patente EP-A-43075). Por ejemplo, la lipofección de células musculares, neuronales o cardíacas puede llevarse a cabo utilizando liposomas marcados con anticuerpos monoclonales contra antígenos específicos asociados a tejidos (Mizuno y col., (1992) *Neurol. Med. Chir.* 32:873-876).

En aún otra realización ilustrativa, el sistema de administración de genes comprende un anticuerpo o ligando de superficie celular que está reticulado con un agente de unión a genes tal como poli-lisina (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO93/04701, WO92/22635, WO92/20316, WO92/19749 y WO92/06180). Por ejemplo, cualquiera de las construcciones génicas sujeto se puede usar para transfectar células específicas in vivo usando un vehículo de polinucleótido soluble que comprende un anticuerpo conjugado con un polícatión, por ejemplo, poli-lisina (véase la patente de Estados Unidos 5.166.320). También se apreciará que la administración eficaz de las construcciones de ácido nucleico sujeto a través de endocitosis mediada puede mejorarse usando agentes que potencian el escape del gen de las estructuras endosómicas. Por ejemplo, pueden usarse adenovirus enteros o péptidos fusogénicos del producto del gen HA de la gripe como parte del sistema de administración para inducir una rotura eficaz de los endosomas que contienen ADN Mulligan y col., (1993) *Science* 260:926; Wagner y col., (1992) *PNAS USA* 89:7934; y Christiano y col., (1993) *PNAS USA* 90:2122).

Los ácidos nucleicos que codifican proteínas de biglicano también se pueden administrar a un sujeto como ADN "desnudo", como se ha descrito, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.679.647 y patentes relacionadas de Carson y col., en el documento WO 90/11092 y Felgner y col., (1990) *Science* 247: 1465.

En entornos clínicos, los sistemas de administración de genes se pueden introducir en un paciente por cualquiera de una serie de procedimientos, cada uno de los cuales es familiar en la técnica. Por ejemplo, una preparación farmacéutica del sistema de administración de genes se puede introducir sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, y la transducción específica de la construcción en las células diana ocurre predominantemente a partir de la especificidad de la transfección proporcionada por el vehículo administración génica, la expresión de tipo de célula o de tipo de tejido debido a las secuencias reguladoras de la transcripción que controlan la expresión del gen o una combinación de los mismos. En otras realizaciones, la administración inicial del gen recombinante es más limitada, siendo la introducción en el animal bastante localizada. Por ejemplo, el vehículo de administración de genes puede introducirse mediante catéter (véase la patente de Estados Unidos 5,328,470) o mediante inyección estereotáctica (por ejemplo, Chen y col., (1994) *PNAS USA* 91: 3054-3057).

El gen que codifica el proteoglicano de la divulgación puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. Estos son bien conocidos en la técnica.

Los procedimientos para determinar si un compuesto tiene una actividad biológica de una proteína de biglicano se describen en los Ejemplos. Una actividad biológica de una proteína de biglicano se refiere a uno o más de: la capacidad de mantener la integridad de una membrana plasmática; la capacidad de estabilizar los DAPC en las

membranas plasmáticas; la capacidad de unirse a uno o más componentes de los DAPC; por ejemplo, unión a  $\alpha$ -dístroglicano, unión a un componente de sarcoglicano, tal como  $\alpha$ -sarcoglicano; fosforilación de  $\alpha$ -sarcoglicano; unión a MuSK; estimulación de la formación de uniones neuromusculares, tal como estimulando la diferenciación postsináptica; estimulando el agrupamiento de AChR; estimulación de la fosforilación por MuSK y potenciación de la fosforilación de MuSK inducida por agrina. Dichos procedimientos pueden adaptarse adicionalmente para la cribado en bibliotecas de compuestos para identificar compuestos que tienen una o más de las actividades descritas anteriormente.

La descomposición de las membranas citoplásmicas, por ejemplo, la presencia de "membranas permeables" puede determinarse mediante ensayos que miden la liberación de creatina quinasa o la absorción del colorante azul de Evans, como se ha descrito, por ejemplo, en Tinsley y col., (1996) Nature 384: 349 and Straub y col., (1997) J. Cell Biol. 139: 375).

Los compuestos de la divulgación también se pueden analizar en diversos modelos animales, en particular, ratones mdx, que son negativos para distrofina (véanse los ejemplos).

Procedimientos de tratamiento

Aspectos generales:

La divulgación proporciona procedimientos terapéuticos y profilácticos de tratamiento de trastornos que incluyen trastornos musculares, neuromusculares y neurológicos. Los procedimientos terapéuticos están destinados a eliminar o al menos reducir al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno y, preferentemente, curar la enfermedad o trastorno. Los procedimientos profilácticos incluyen aquellos destinados a prevenir la aparición de una enfermedad o trastorno, es decir, un procedimiento que está destinado a combatir la aparición de la enfermedad o trastorno.

Como se describe en el presente documento, se demostró que el biglicano se une a  $\alpha$ -dístroglicano y a sarcoglicanos y, por lo tanto, funciona como un enlace entre varios componentes de DAPC. Además, se encontró que los niveles de biglicanos eran altos en las células musculares de ratones que carecían de distrofina (ratones mdx, que son un modelo de distrofia muscular). Dado que se sabe que la ausencia de distrofina en las células musculares desestabiliza la membrana citoplásmica, la regulación por aumento del biglicano en las células musculares negativas para distrofina puede ser un mecanismo compensatorio de la ausencia de distrofina. En consecuencia, la invención proporciona procedimientos para prevenir y tratar enfermedades o trastornos que están asociados con la inestabilidad o la organización de la membrana plasmática, en particular, una inestabilidad resultante de un DAPC anormal en la membrana plasmática. Dado que el DAPC se encuentra en la membrana de las células musculares, las enfermedades que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen enfermedades del músculo, tales como distrofias musculares y atrofia muscular.

Además, dado que los DAPC también se encuentran en otros tipos de células, la divulgación también proporciona procedimientos para tratar enfermedades asociadas con cualquier DAPC anormal. Por ejemplo, los DAPC están presentes en el cerebro, y dado que, además, se ha encontrado agrina en placas seniles en pacientes con enfermedad de Alzheimer, las enfermedades neurológicas también pueden tratarse o prevenirse de acuerdo con los procedimientos de la invención. Una indicación adicional de que los trastornos neurológicos pueden tratarse o prevenirse de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento se basa en la observación de que los pacientes con distrofia muscular a menudo también padecen un trastorno del sistema nervioso periférico y central. En consecuencia, aproximadamente un tercio de los pacientes con distrofia muscular de Duchenne tienen una afección mental, en particular, retraso mental. Por lo tanto, se cree que la distrofina y, por consiguiente, los DAPC, desempeñan un papel en el sistema nervioso.

Los pacientes con distrofia muscular de Duchenne también tienen problemas en el diafragma, lo que indica un papel de la distrofina y, posiblemente, de los DAPC en los diafragmas. Por lo tanto, la terapéutica de la divulgación también encontraría una aplicación en trastornos asociados con anomalías en el diafragma.

Cabe señalar que las enfermedades que pueden tratarse o prevenirse incluyen no solo aquellas en las que el biglicano es anormal, sino más generalmente cualquier enfermedad o afección que esté asociada con un defecto que pueda mejorarse o curarse con biglicano. En particular, las enfermedades que se caracterizan por un defecto o una anomalía en cualquier componente del DAPC o componente asociado con el mismo, que de este modo dan lugar a, por ejemplo, una membrana plasmática inestable, pueden tratarse o prevenirse de acuerdo con los procedimientos de la invención, siempre que el proteoglicano de la invención pueda curar, al menos parcialmente, el defecto resultante del componente deficiente. En particular, las enfermedades que se pueden tratar de acuerdo con el procedimiento de la divulgación incluyen cualquier enfermedad asociada con un DAPC inestable, que puede hacerse más estable por la presencia de un proteoglicano de la invención.

Además, dado que se ha demostrado que el biglicano se une a MuSK y lo fosforila, un receptor que es conocido porque participa en la estimulación inducida por agrina de la formación de la unión neuromuscular, en particular, la

diferenciación postsináptica de la membrana, para potenciar el agrupamiento de AChR inducido por agrina y corregir un defecto en el agrupamiento de AChR inducido por agrina en los miotubos de ratones negativos para biglicano mediante su adición a los miotubos, la invención también proporciona procedimientos para prevenir y tratar enfermedades o trastornos de las uniones neuromusculares, tales como trastornos neuromusculares. Lo que es más interesante, se ha demostrado que el biglicano añadido de forma exógena es capaz de corregir un agrupamiento de AChR inducida por agrina defectuoso en los miotubos de ratones negativos para biglicano.

Enfermedades y trastornos de ejemplo:

Las enfermedades o trastornos que se caracterizan por una desestabilización o una organización inadecuada de la membrana plasmática de tipos de células específicos incluyen distrofias musculares (DM), un grupo de miopatías degenerativas genéticas caracterizadas por debilidad y atrofia muscular sin afectación del sistema nervioso. Los tres tipos principales son pseudohipertróficos (Duchenne, Becker), cintura y extremidades y facioescapulohumeral. Por ejemplo, las distrofias musculares y las atrofiaciones musculares se caracterizan por una descomposición de la membrana de la célula muscular, es decir, se caracterizan por membranas permeables, que se cree que son el resultado de una mutación en un componente del DAPC, es decir, la distrofina. También se sabe que las mutaciones en los sarcoglicanos producen distrofias musculares y membranas permeables. En consecuencia, la divulgación proporciona procedimientos para tratar o prevenir enfermedades asociadas con mutaciones en distrofina y/o en sarcoglicanos u otros componentes de los DAPC, en particular distrofias musculares.

Las anomalías de la distrofina son responsables tanto de la distrofia muscular de Becker (DMB) más leve como de la distrofia muscular de Duchenne (DMD). En la DMB se produce distrofina, pero es anormal en cuanto a tamaño y/o cantidad. El paciente está de leve a moderadamente débil. En la DMD no se produce proteína y el paciente está confinado a una silla de ruedas antes de los 13 años y generalmente muere antes de los 20 años.

Otro tipo de distrofia que puede tratarse según los procedimientos de la divulgación incluye la distrofia muscular congénita (DMC), una enfermedad muscular muy discapacitante de inicio clínico temprano, que es la causa más frecuente de la hipotonía neonatal severa. Sus manifestaciones se notan al nacer o en los primeros meses de vida y consisten en hipotonía muscular, a menudo asociada con retrasos en los hitos motores, contracturas severas y tempranas y deformidades articulares. La creatina quinasa sérica se eleva, hasta 30 veces los valores normales, en la etapa temprana de la enfermedad y luego disminuye rápidamente. Los cambios histológicos en las biopsias musculares consisten en una gran variación en el tamaño de las fibras musculares, algunas fibras necróticas y regeneradoras, marcado aumento del tejido de colágeno endomisial y ausencia de características ultraestructurales específicas. El diagnóstico de la DMC se ha basado en el cuadro clínico y los cambios morfológicos en la biopsia muscular, pero no se puede establecer con certeza, ya que otros trastornos musculares pueden presentar características clínico-patológicas similares. Dentro del grupo de enfermedades clasificadas como DMC, se han individualizado diversas formas. Las dos formas más frecuentes son la occidental y la japonesa, estando esta última asociada con trastornos mentales graves y, generalmente, se conoce como distrofia muscular congénita de Fukuyama (DMCF).

Una forma de distrofia muscular congénita (DMC) se ha caracterizado recientemente como causada por mutaciones en el gen de la cadena 2 de la laminina. La laminina es una proteína que se asocia con DAPC. Por lo tanto, la invención también proporciona procedimientos para tratar enfermedades que están asociadas con moléculas anormales que normalmente se asocian con DAPC.

Otras distrofias musculares dentro del alcance de la divulgación incluyen la distrofia muscular de la cintura y extremidades (DMCE), que representa una clase de trastornos clínica y genéticamente heterogéneos. Estas distrofias se heredan como rasgos autosómicos dominantes o recesivos. Una forma autosómica dominante, DMCE1A, se asignó a 5q31-q33 (Speer, M. C. y col., Am. J. Hum. Genet. 50:1211, 1992; Yamaoka, L. Y. y col., Neuromusc. Disord 4:471, 1994), mientras que seis genes implicados en las formas autosómicas recesivas se mapearon en 15q15.1 (LGMD2A) (Beckmann, J. S. y col., C. R. Acad. Sci. Paris 312:141, 1991), 2p16-p13 (LGMD2B) (Bashir, R. y col., Hum. Mol. Genet. 3:455, 1994), 13q 12 (LGMD2C) (Ben Othmane, K. y col., Nature Genet. 2:315, 1992; Azibi, K. y col., Hum. Mol. Genet. 2:1423, 1993), 17q12-q21.33 (LGMD2D) (Roberds, S. L. y col., Cell 78:625, 1994; McNally, E. M., et. al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 91:9690, 1994), 4q12 (LG1MD2E) (Lim, L. E., et. al., Nat. Genet. 11:257, 1994; Bonnemann, C. G. y col., Nat. Genet. 11:266, 1995), y más recientemente a 5q33-q34 (LGMD2F) (Passos-Bueno, M. R., et. al., Hum. Mol. Genet. 5:815, 1996). Los pacientes con DMCE2C, 2D y 2E tienen una deficiencia de componentes del complejo de sarcoglicano como resultado de mutaciones en los genes que codifican gamma, alfa y beta-sarcoglicano, respectivamente. El gen responsable de la DMCE2A se ha identificado como la calpaína específica del músculo, mientras que los genes responsables de la DMCE1A, 2B y 2F aún se desconocen.

Aún otros tipos de distrofias musculares que pueden tratarse según los procedimientos de la divulgación incluyen la miopatía distal de Welander (MDW), que es una miopatía autosómica dominante con inicio en etapas tardías del, caracterizada por una lenta progresión de la debilidad muscular distal. El trastorno se considera una enfermedad modelo para las miopatías distales hereditarias. La enfermedad está relacionada con el cromosoma 2p13. Otra distrofia muscular es la miopatía de Miyoshi, que es una distrofia muscular distal que está causada por mutaciones

en el gen recientemente clonado de la disferlina, símbolo del gen DYSF (Weiler y col., (1999) Hum Mol Genet 8: 871-7). Aún otras distrofias incluyen la miopatía hereditaria distal, la hipotonía congénita benigna, la enfermedad del núcleo central, la miopatía nemalínica y la miopatía miotubular (centronuclear).

5 Otras enfermedades que pueden tratarse o prevenirse de acuerdo con los procedimientos de la divulgación incluyen aquellas caracterizadas por atrofia tisular, por ejemplo, atrofia muscular, distinta de la atrofia muscular que resulta de distrofias musculares, siempre que la atrofia se detenga o se ralentice tras el tratamiento con un agente terapéutico de la divulgación. Además, la invención también proporciona procedimientos para invertir las atrofas tisulares, por ejemplo, atrofas musculares. Esto se puede lograr, por ejemplo, proporcionando al tejido atrofiado un agente terapéutico de la divulgación, tal como DAG-125 o su ortólogo de mamífero, o biglicano.

15 Las atrofas musculares pueden ser el resultado de la desnervación (pérdida de contacto del músculo con su nervio) debido a un traumatismo nervioso; neuropatía degenerativa, metabólica o inflamatoria (por ejemplo, síndrome de GuillianBarre), neuropatía periférica o daño a los nervios causado por toxinas ambientales o drogas. En otra realización, la atrofia muscular es el resultado de la desnervación debida a una neuropatía motora. Dichas neuropatías motoras incluyen, pero sin limitación: enfermedad de la neurona motora del adulto, incluida la esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig); atrofas musculares espinales infantiles y juveniles, y neuropatía motora autoinmune con bloqueo de la conducción multifocal. En otra realización, la atrofia muscular resulta de un desuso crónico. Dicha atrofia por desuso puede ser el resultado de afecciones, incluyendo, pero sin limitación: parálisis debido a ictus, lesión de la médula espinal; inmovilización esquelética por traumatismo (tal como, fractura, esquinco o dislocación) o reposo prolongado en cama. En aún otra realización, la atrofia muscular es el resultado de estrés metabólico o insuficiencia de nutrientes, incluyendo, pero sin limitación, la caquexia debido al cáncer y otras enfermedades crónicas, ayuno o rhabdmiolisis, trastornos endocrinos, tales como, pero sin limitación, trastornos de la glándula tiroides y diabetes.

25 Dado que la atrofia y la necrosis del tejido muscular a menudo van acompañadas de fibrosis del tejido afectado, la inversión o la inhibición de la atrofia o necrosis también pueden dar lugar a una inhibición o inversión de la fibrosis.

30 Además, los agentes terapéuticos de la divulgación pueden ser útiles en el tratamiento de miopatías adquiridas (tóxicas o inflamatorias). Las miopatías que se producen como consecuencia de una enfermedad inflamatoria del músculo, incluyen, pero sin limitaciones, polimiositis y dermatomiositis. Las miopatías tóxicas pueden deberse a agentes, incluyendo, pero sin limitaciones, adiodarona, cloroquina, clofibrato, colchicina, doxorubicina, etanol, hidroxicloquina, organofosfatos, perihexilina y vincristina.

35 Las distrofias neuromusculares dentro del alcance de la divulgación incluyen distrofia miotónica. La distrofia miotónica (DM; o enfermedad de Steinert) es una enfermedad neuromuscular autosómica dominante que es la forma más frecuente de distrofia muscular que afecta a los adultos. El cuadro clínico en la DM está bien establecido, pero es excepcionalmente variable (Harper, P. S., Myotonic Dystrophy, 2ª ed., W. B. Saunders Co., London, 1989). Aunque generalmente se considera una enfermedad del músculo, con miotonía, debilidad progresiva y emaciación, la DM se caracteriza por anomalías en otros varios sistemas. Los pacientes con DM a menudo sufren defectos en la conducción cardíaca, afectación del músculo liso, hipersomnia, cataratas, respuesta anormal a la glucosa y, en varones, calvicie prematura y atrofia testicular (Harper, P. S., Myotonic Dystrophy, 2ª ed., W. B. Saunders Co., London, 1989). La forma más leve, que en ocasiones es difícil de diagnosticar, se ve en la mediana edad o en la vejez y se caracteriza por cataratas con poca o ninguna afectación muscular. La forma clásica, que muestra miotonía y debilidad muscular, con mayor frecuencia tiene inicio en la vida adulta temprana y en la adolescencia. La forma más grave, que es congénita, se asocia con hipoplasia muscular generalizada, retraso mental y alta mortalidad neonatal. Esta enfermedad y el gen afectado se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos n.º 5.955.265.

50 Otra enfermedad neuromuscular es la atrofia muscular espinal ("AME"), que es la segunda enfermedad neuromuscular más frecuente en niños después de la distrofia muscular de Duchenne. La AME se refiere a un trastorno neuromuscular debilitante que afecta principalmente a lactantes y niños pequeños. Este trastorno está causado por la degeneración de las neuronas motoras inferiores, también conocidas como las células del asta anterior de la médula espinal. Las neuronas motoras inferiores normales estimulan la contracción de los músculos. La degeneración neuronal reduce la estimulación, lo que provoca la atrofia del tejido muscular (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.882.868).

60 Las distrofias y miopatías musculares descritas anteriormente son trastornos del músculo esquelético. No obstante, la divulgación también se refiere a trastornos de la musculatura lisa, por ejemplo, miopatías cardíacas, incluyendo miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada y miocardiopatía restrictiva. Al menos ciertos músculos lisos, por ejemplo, el músculo cardíaco, son ricos en sarcoglicanos. Las mutaciones en los sarcoglicanos pueden dar como resultado una inestabilidad del sarcolema a nivel del miocardio (véase, por ejemplo, Melacini (1999) Muscle Nerve 22: 473). Por ejemplo, los modelos animales en los que un sarcoglicano está mutado muestran elevación de la creatina quinasa cardíaca. En particular, se ha demostrado que los ratones defectuosos en delta-sarcoglicano (Sgcd) desarrollan miocardiopatía con áreas focales de necrosis como rasgo histológico característico en el músculo cardíaco y esquelético. Los animales también mostraron una ausencia del complejo sarcoglicano -sarcospan (SG-

SSPN) en las membranas esqueléticas y cardíacas. La pérdida del complejo SG-SSPN del músculo liso vascular se asoció con irregularidades de la vasculatura coronaria. Por lo tanto, la alteración del complejo SG-SSPN en el músculo liso vascular altera la función vascular, lo que inicia la miocardiopatía y exacerba la distrofia muscular)Coral-Vazquez y col., (1999) Cell 98: 465).

5 De manera similar a los ratones negativos para delta-sarcoglicanos, los ratones que carecían de gamma-sarcoglicano mostraron cambios pronunciados de los músculos distróficos en los primeros años de vida (Hack y col., (1998) J Cell Biol 142: 1279). A las 20 semanas de edad, estos ratones desarrollaron miocardiopatía y murieron prematuramente. Además, los mionúcleos apoptóticos eran abundantes en el músculo esquelético que carecía de sarcoglicano gamma, lo que sugiere que la muerte celular programada contribuye a la degeneración de miofibrillas. La tinción vital con colorante azul Evans reveló que los músculos que carecían de gamma-sarcoglicano desarrollaban alteraciones de la membrana como las observadas en el músculo deficiente en distrofina. También se demostró que la pérdida de gamma-sarcoglicano producía una reducción secundaria de sarcoglicanos beta y delta con retención parcial de sarcoglicanos alfa y épsilon, lo que indica que los sarcoglicanos beta, gamma y delta funcionan como una unidad. Dado que los otros componentes del complejo de la membrana citoplásmica eran funcionales, el complejo podría estabilizarse mediante la presencia de un agente terapéutico de la invención.

Además de los modelos animales, ciertas miocardiopatías en seres humanos se han relacionado con mutaciones en distrofina, distroglicanos o sarcoglicanos. Por ejemplo, la distrofina se ha identificado como el gen responsable de la miocardiopatía dilatada ligada al cromosoma X (Towbin J.A. (1998) Curr Opin Cell Biol 10: 131, y referencias en el mismo). En este caso, el gen de la distrofina contenía una mutación en 5' que da como resultado miocardiopatía sin miopatía esquelética clínicamente aparente (Bies y col., (1997) J Mol Cell Cardiol 29: 3175).

Además, también se encontró miocardiopatía en sujetos que tienen distrofia muscular de Duchenne (asociada a una distrofina mutada) u otros tipos de distrofias musculares, tales como distrofia muscular de la cintura y las extremidades. Por ejemplo, la miocardiopatía dilatada estaba presente en un caso autosómico dominante y en tres pacientes autosómicos recesivos o esporádicos o avanzados, de los cuales se encontró que dos tenían deficiencia de alfa sarcoglicano. Dos de estos tres pacientes y otros tres casos mostraron anomalías en el ECG que se sabe que son características de las distrofinopatías. Se encontró una fuerte asociación entre la ausencia de sarcoglicano alfa y la presencia de miocardiopatía dilatada. En seis casos autosómicos dominantes hubo alteraciones de la conducción auriculoventricular (AV), cuya gravedad aumentaba con la edad y en presencia concomitante de debilidad muscular. En algunos de estos pacientes fue necesario implantar un marcapasos (véase van der Kooi (1998) Corazón 79: 73).

Los agentes terapéuticos de la divulgación también se pueden usar para tratar o prevenir la miocardiopatía, por ejemplo, miocardiopatía dilatada, de origen viral, por ejemplo, el resultado de una infección por enterovirus, por ejemplo, un virus Coxsackie B3. Se ha demostrado que la proteasa 2A de virus Coxsackie purificado escinde la distrofina *in vitro* y durante la infección por virus Coxsackie de miocitos cultivados y en corazones de ratones infectados, lo que lleva a una alteración de la función de la distrofina (Badorff y col., (Badorff y col., (1999) Nat Med 5: 320. La escisión de la distrofina da como resultado la alteración de las glucoproteínas asociadas a la distrofina alfa sarcoglicano y beta-distroglicano. Por lo tanto, la miocardiopatía podría prevenirse o invertirse mediante la administración de un agente terapéutico de la invención a un sujeto que ha sido infectado con un virus que causa miocardiopatía, por ejemplo, mediante la alteración de la distrofina o una proteína asociada a la misma. La administración de la terapéutica podría reestabilizar o reorganizar la membrana citoplásmica de las células cardíacas afectadas.

Por lo tanto, los agentes terapéuticos de la divulgación también pueden usarse para prevenir o tratar trastornos del músculo liso, tales como miopatías cardíacas, y para detener la atrofia y/o necrosis del tejido del músculo liso cardíaco. El tratamiento también se puede usar para promover la supervivencia de los miocitos.

Los trastornos neurológicos que pueden tratarse según los procedimientos de la divulgación incluyen polimiositis y trastornos neurogénicos. Otra enfermedad neurológica que se puede tratar es la enfermedad de Alzheimer.

Otras enfermedades que pueden tratarse según los procedimientos de la divulgación incluyen aquellas en las que el proteoglicano de la invención está presente a niveles anormales o tiene una actividad anormal, con relación a la de sujetos normales. Por ejemplo, una enfermedad o trastorno podría estar causada por un nivel más bajo de biglicano, que da como resultado, por ejemplo, membranas citoplásmicas inestables. Como alternativa, una enfermedad o trastorno podría ser el resultado de un nivel o actividad anormalmente altos de biglicano, que da como resultado, por ejemplo, sobreestimulación de MuSK o sobreagrupamiento de AChR (véase a continuación).

Aún otras enfermedades o trastornos incluyen aquellos que están asociados con una interacción anormal entre un proteoglicano de la invención y otra molécula (distinta de las de DAPC o MuSK), por ejemplo, un factor del complemento, tal como C1q. Por ejemplo, se ha demostrado que C1q interacciona con biglicano (Hocking y col., (1996) J. Biol. Chem. 271: 19571). También se sabe que la unión de C1q a las superficies celulares participa en una serie de actividades biológicas, incluyendo el aumento de la fagocitosis y la estimulación de la producción de superóxido. Por lo tanto, dado que el biglicano se une a C1q, el biglicano u otro proteoglicano o núcleo del mismo,

de la invención podría usarse para inhibir la unión de C1q a su receptor en las superficies celulares para inhibir una o más de tales actividades biológicas. Además, los compuestos de la invención que inhiben la interacción entre C1q u otro componente del complemento y una superficie celular también pueden usarse para inhibir la necrosis mediada por el complemento de las células y tejidos que contienen tales células. Los procedimientos divulgados son procedimientos para prevenir o inhibir infecciones de células por microorganismos, por ejemplo, virus. Por ejemplo, se ha demostrado que el distroglicano es un receptor a través del cual ciertos microorganismos entran en las células eucariotas (Science (1998) 282: 2079). Por lo tanto, administrando a un sujeto un agente terapéutico de la invención que ocupa el sitio en moléculas de distroglicano a las que se une el microorganismo, puede inhibirse la entrada del microorganismo en la célula. Este procedimiento puede usarse, por ejemplo, para prevenir o inhibir la infección por el virus de la fiebre Lassa y de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), así como la infección por otros arenavirus, incluyendo Oliveros y Mobala. Se demostró que el alfa-distroglicano soluble bloquea la infección tanto por LCMV como por LFV (Science (1998) 282: 2079).

Además de los cultivos celulares, por ejemplo, establecidos a partir de pacientes que tienen, por ejemplo, una distrofia muscular, se pueden usar diversos modelos animales para seleccionar el agente terapéutico más apropiado para tratar una enfermedad. En particular, pueden usarse para identificar un agente terapéutico para prevenir o tratar una distrofia muscular o una miocardiopatía asociada con un componente del DAPC mutado o ausente, o ratones que tienen versiones mutadas de estas proteínas, o que tienen mutaciones nulas en los genes que codifican estas proteínas. Por ejemplo, se pueden usar ratones que tienen un sarcoglicano alterado, tal como delta-sarcoglicano. Dichos ratones se describen, por ejemplo, en Coral-Vazquez y col., (1999) Cell 98: 465. Como alternativa, se pueden usar ratones deficientes en distrofina (ratones mdx) o en sarcoglicanos alfa o gamma. Tales ratones se han descrito en el presente documento y en la literatura. Se pueden fabricar otros ratones de acuerdo con procedimientos conocidos en la materia. En una realización ilustrativa para identificar agentes terapéuticos, se administran diferentes agentes terapéuticos a ratones deficientes en delta-sarcoglicano y el efecto de los agente terapéuticos se evalúa estudiando la función cardíaca. Otro modelo animal que se puede usar para este fin es el hámster cardiomiopático que no expresa delta-sarcoglicano debido a una delección genómica. Esta rata es un modelo animal para la miocardiopatía autosómica recesiva y se describe con más detalle en Sakamoto y col., FEBS Lett 1999 (1999) 44: 124.

#### Dosis eficaz y administración de composiciones terapéuticas

Las enfermedades o trastornos descritos anteriormente pueden tratarse o mejorarse en un sujeto administrando al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de la divulgación. Dependiendo de si la enfermedad está causada por niveles o actividad más altos o por niveles o actividad más bajos de biglicano, se administra un agonista o un antagonista de biglicano terapéutico a un sujeto que tiene la enfermedad. Aunque un experto en la materia podrá predecir qué agente terapéutico administrar para tratar cualquiera de las enfermedades de la divulgación, se pueden realizar pruebas para determinar el agente terapéutico apropiado que se debe administrar. Tales pruebas pueden usar, por ejemplo, modelos animales de la enfermedad. Como alternativa, en casos en los que las enfermedades se deben a una mutación en, por ejemplo, biglicano, Se pueden realizar pruebas para determinar el efecto de la mutación. Esto permitirá la determinación de qué tipo de agente terapéutico se debe administrar a un sujeto que tenga este tipo de mutación.

El agente terapéutico también puede ser un compuesto que modula, es decir, inhibe o estimula, la expresión de biglicano u ortólogo de mamífero del mismo, o biglicano. Dichos compuestos pueden identificarse como se describe adicionalmente en el presente documento.

Otra forma de administrar un agente terapéutico de la divulgación a un sujeto es preparando células que expresan y secretan el proteoglicano de interés, insertando las células en una matriz y administrando esta matriz al sujeto en el lugar deseado. Por lo tanto, las células modificadas genéticamente de acuerdo con la presente invención también pueden estar encapsuladas, por ejemplo, utilizando materiales y procedimientos biocompatibles convencionales, antes de la implantación en el organismo huésped o paciente para la producción de una proteína terapéutica. Véase, por ejemplo, Hguyen y col., Tissue Implant Systems and Methods for Sustaining viable High Cell Densities within a Host, patente de Estados Unidos n.º 5.314.471 (Baxter International, Inc.); Uludag y Sefton, 1993, J Biomed. Mater. Res. 27(10):1213-24 (HepG2 cells/hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate membranes); Chang y col., 1993, Hum Gene Ther 4(4):433-40 (mouse Ltk-cells expressing hGH/immunoprotective perm-selective alginate microcapsules; Reddy y col., 1993, J Infect Dis 168(4):1082-3 (alginate); Tai y Sun, 1993, FASEB J 7(11): 1061-9 (mouse fibroblasts expressing hGH/alginate-poly-L-lysine-alginate membrane); Ao y col., 1995, Transplanataion Proc. 27(6):3349, 3350 (alginate); Rajotte y col., 1995, Transplantation Proc. 27(6):3389 (alginate); Lakey y col., 1995, Transplantation Proc. 27(6):3266 (alginate); Korbutt y col., 1995, Transplantation Proc. 27(6):3212 (alginate); Dorian y col., patente de Estados Unidos n.º 5.429.821 (alginate); Emerich y col., 1993, Exp Neurol 122(1):37-47 (células PC12 encapsuladas en polímero); Sagen y col., 1993, J Neurosci 13(6):2415-23 (células de cromafina bovina encapsuladas en una membrana de polímero semipermeable e implantadas en el espacio subaracnoideo espinal de rata); Aebischer y col., 1994, Exp Neurol 126(2): 151-8 (células PC12 de rata encapsuladas con polímeros implantadas en monos; véase también; Aebischer, documento WO 92/19595); Savelkoul y col., 1994, J Immunol Methods 170(2):185-96 (hibridomas encapsulados que producen anticuerpos; líneas celulares transfectadas encapsuladas que expresan diversas citocinas); Winn y col., 1994, PNAS USA 91(6):2324-8 (células BHK

modificadas genéticamente que expresan el factor de crecimiento nervioso humano encapsulado en un dispositivo polimérico de inmunoaislamiento y trasplantado en ratas); Emerich y col., 1994, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 18(5):935-46 (células PC12 encapsuladas en polímero implantadas en ratas); Kordower y col., 1994, PNAS USA 91(23):10898-902 (células BHK modificadas por ingeniería encapsuladas en polímero que expresan hNGF implantadas en monos) y Butler y col., documento WO 95/04521 (dispositivo encapsulado). A continuación, las células pueden introducirse en forma encapsulada en un huésped animal, preferentemente un mamífero y, más preferentemente, un sujeto humano que lo necesita. Preferentemente, el material de encapsulación es semipermeable, lo que permite la liberación al huésped de las proteínas secretadas producidas por las células encapsuladas. En muchas realizaciones, la encapsulación semipermeable hace que las células encapsuladas estén aisladas inmunológicamente del organismo huésped en el que se introducen las células encapsuladas. En esas realizaciones, las células que se van a encapsular pueden expresar uno o más proteoglicanos de la especie huésped y/o a partir de proteínas virales o proteínas de especies distintas de la especie huésped.

Como alternativa, el agente terapéutico es un ácido nucleico que codifica el núcleo de un proteoglicano de la divulgación. Por lo tanto, un sujeto que lo necesite, puede recibir una dosis de vector viral que codifica la proteína de interés, que puede estar dirigido específicamente a un tejido específico, por ejemplo, un tejido distrófico. El vector puede administrarse en forma desnuda o puede administrarse como una partícula viral (descrita adicionalmente en el presente documento). Con este fin, se han desarrollado varias técnicas para la modificación del tejido y las células diana *in vivo*. Se han desarrollado varios vectores virales, como los descritos anteriormente, que permiten la transfección y, en algunos casos, la integración del virus en el huésped. Véase, por ejemplo, Dubensky y col., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7529-7533; Kaneda y col., (1989) Science 243,375-378; Hiebert y col., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3594-3598; Hatzoglu y col., (1990) J. Biol. Chem. 265, 17285-17293 y Ferry, y col., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8377-8381. El vector puede administrarse por inyección, por ejemplo, por vía intravascular o intramuscular, inhalación u otro modo parenteral. También se pueden usar procedimientos de administración no virales, tales como la administración del ADN a través de complejos con liposomas o mediante inyección, catéter o biolística.

En aún otra realización, las células se obtienen de un sujeto, modificado *ex vivo* e introducido en el mismo sujeto o en otro diferente. Los procedimientos adicionales de administración de los compuestos terapéuticos se exponen a continuación.

#### Toxicidad:

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos de la divulgación pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>. Se prefieren los compuestos que exhiben índices terapéuticos altos. Aunque pueden usarse proteínas que exhiben efectos secundarios tóxicos, deben tomarse precauciones a la hora de diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al lugar o tejido afectado para minimizar el potencial daño a las células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y los estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. En particular, cuando el agente terapéutico se administra para potenciar el agrupamiento de AChR, es deseable establecer la dosis que dará como resultado la estimulación, si se desea, o la inhibición, si se desea. Las pruebas pueden continuar con pruebas médicas. Las dosis de tales compuestos están, preferentemente, dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE<sub>50</sub> con poca o nula toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración usada. Para cualquier compuesto usado en el procedimiento de la invención, puede estimarse una dosis terapéuticamente eficaz inicialmente partiendo de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la CI<sub>50</sub> (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Tal información se puede usar después para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

#### Composiciones farmacéuticas:

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente divulgación se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Por lo tanto, los compuestos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para administración mediante, por ejemplo, inyección, inhalación o insuflación (ya sea a través de la boca o de la nariz) o administración oral, bucal, parenteral o rectal.

Para dicha terapia, los compuestos de la divulgación pueden formularse para diversas cargas de administración, incluyendo administración sistémica y tópica o localizada. Generalmente, las técnicas y formulaciones se pueden

encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA. Para administración sistémica, se prefiere la inyección, incluyendo intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para la inyección, los compuestos de la divulgación se pueden formular en soluciones líquidas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank o solución de Ringer. Además, los compuestos pueden formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. También se incluyen las formas liofilizadas.

Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse por procedimientos bien conocidos en la materia. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden estar en forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o elixires o se pueden presentar como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de usar. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de acción, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o de propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según corresponda.

Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo. Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formulados de forma convencional. Para la administración mediante inhalación, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente divulgación se administran convenientemente en forma de una presentación en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, usando un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, o dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula la cual administra una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse de modo que contenga una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Los compuestos se pueden formular para su administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes de usar.

Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases para supositorio convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también se pueden formular en forma de una preparación depot. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

La administración sistémica también puede ser por vía transmucosal o transdérmica. Para la administración transdérmica o transmucosal, se usan penetrantes adecuados de la barrera que se desea atravesar. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la materia e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, sales biliares y derivados de ácido fusídico. Además, se pueden usar detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosal se puede realizar mediante nebulizadores nasales o usando supositorios. Para la administración tópica, los oligómeros de la invención se formulan en ungüentos, bálsamos, geles o cremas como se conoce generalmente en la materia. Se puede usar una solución de lavado localmente para tratar una lesión o inflamación para acelerar la cicatrización.

En entornos clínicos, un sistema de administración génica para el gen terapéutico que codifica un proteoglicano de la invención se puede introducir en un paciente por cualquiera de una serie de procedimientos, cada uno de los cuales es familiar en la técnica. Por ejemplo, una preparación farmacéutica del sistema de administración de genes se puede introducir sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, y la transducción específica de la

proteína en las células diana se produce predominantemente a partir de la especificidad de la transfección proporcionada por el vehículo de administración génica, la expresión de tipo de célula o de tipo de tejido debido a las secuencias reguladoras de la transcripción que controlan la expresión del gen receptor o una combinación de los mismos. En otras realizaciones, la administración inicial del gen recombinante es más limitada, siendo la introducción en el animal bastante localizada. Por ejemplo, el vehículo de administración génica puede introducirse mediante catéter (véase la patente de Estados Unidos 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (por ejemplo, Chen y col., (1994) PNAS USA 91: 3054-3057). Un gen que codifica un proteoglicano de la invención puede administrarse en una construcción de terapia génica mediante electroporación usando técnicas descritas, por ejemplo, por Dev y col., ((1994) Cancer Treat Rev 20:105-115).

Un modo preferente de administrar ADN a las células musculares incluye el uso de vectores de virus adenoasociados recombinantes, como los descritos en la patente de Estados Unidos n.º 5.858.351. Como alternativa, los genes se han administrado al músculo mediante inyección directa de ADN plasmídico, tal como se describe en Wolff y col., (1990) Science 247:1465-1468; Acsadi y col., (1991) Nature 352:815-818; Barr y Leiden (1991) Science 254:1507-1509. No obstante, este modo de administración generalmente da como resultado niveles de expresión sostenidos pero generalmente bajos. Se espera que niveles de expresión bajos pero sostenidos sean eficaces para practicar los procedimientos de la invención.

La preparación farmacéutica de la construcción o compuesto de terapia génica de la divulgación puede consistir esencialmente en el sistema de administración génica en un diluyente aceptable o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que el vehículo o compuesto de administración génica está incluido. Como alternativa, cuando el sistema de administración génica completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede comprender una o más células que producen el sistema de administración génica.

Las composiciones pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, papel de aluminio de metal o plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones de administración.

#### Procedimientos diagnósticos

Basado al menos en la observación de que el biglicano se une a al menos un componente de los DAPC, los complejos proteicos que son cruciales para mantener la integridad de las membranas plasmáticas, la divulgación proporciona procedimientos de diagnóstico para determinar si un sujeto tiene o es probable que desarrolle una enfermedad o afección que se caracteriza por, o está asociada con, inestabilidad de la membrana plasmática, en particular, DAPC anormales o inestables, tales como distrofias musculares. Además, se ha observado en un modelo animal para la distrofia muscular, que carece de distrofina, que la cantidad del proteoglicano biglicano es elevada y, por lo tanto, se cree que es un mecanismo compensatorio.

Además, basado al menos en la observación de que el biglicano se une y fosforila MuSK y potencia la fosforilación de MuSK inducida por agrina y que el biglicano estimula el agrupamiento de AChR mediado por agrina, la divulgación también proporciona procedimientos de diagnóstico para determinar si un sujeto tiene o es probable que desarrolle una enfermedad o afección que se caracteriza por sinapsis o uniones neuromusculares anormales, por ejemplo, enfermedades neurológicas o neuromusculares.

En consecuencia, la identificación de niveles o actividad anormales del proteoglicano de la divulgación en un sujeto indicaría que el sujeto tiene, o es probable que desarrolle, una enfermedad o afección relacionada con DAPC anormales o inestables. Las enfermedades se pueden caracterizar por niveles elevados de proteoglicano de la invención, por ejemplo, si la célula compensa la falta de otro componente de DAPC o molécula que se asocia con el mismo, por ejemplo, como se observa en ratones negativos para distrofina. Como alternativa, un nivel o actividad altos de proteoglicano de la divulgación puede al menos ser parte de la causa de la enfermedad.

Además, un nivel o actividad elevada de un proteoglicano de la divulgación podría estar asociado con, o ser al menos en parte, la causa de enfermedades neurológicas o neuromusculares, por ejemplo, sobreestimando el agrupamiento de AChR y/o activando MuSK.

También es probable que las enfermedades estén causadas o estén asociadas con un nivel o actividad menor de proteoglicano de la divulgación que pueda, por ejemplo, hacer que los DAPC sean más inestables que aquellos en las células de sujetos que tienen una cantidad o actividad normal del proteoglicano de la divulgación. En consecuencia, un nivel o actividad menor del proteoglicano de la divulgación en las células de un sujeto daría como resultado membranas permeables.

Un nivel o actividad menor del proteoglicano de la divulgación también podría dar como resultado un agrupamiento de AChR insuficiente y/o una activación de MuSK insuficiente, dando como resultado sinapsis o uniones neuromusculares anormales. Tales situaciones pueden, por lo tanto, dar como resultado enfermedades neurológicas

o neuromusculares, y producir, por ejemplo, atrofia de los tejidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ensayo de diagnóstico" se refiere al uso específico de los procedimientos descritos en el presente documento para identificar a un individuo predispuesto a una enfermedad, tal como un trastorno muscular, un trastorno neuromuscular o un trastorno neurológico. Dichos ensayos de diagnóstico son particularmente útiles como ensayos de diagnóstico prenatal, que se pueden usar para determinar si un feto está predispuesto a uno o más de estos trastornos. Para el diagnóstico prenatal, por ejemplo, se puede obtener una muestra mediante biopsia de tejido muscular del feto o mediante biopsia de la placenta de la madre embarazada.

En una realización, el procedimiento comprende determinar el nivel o la actividad biológica de un proteoglicano de la divulgación relativa a la de sujetos no afectados, o determinar si el proteoglicano o gen que lo codifica contiene una mutación o cadenas laterales de glicano anormales.

Una muestra de paciente puede ser cualquier célula, tejido o fluido corporal, pero, preferentemente, es tejido muscular, líquido cefalorraquídeo, sangre o una fracción de sangre, tal como suero o plasma. Como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a una muestra obtenida de un sujeto, que puede ser un sujeto humano. En general, una muestra de tejido, que puede obtenerse, por ejemplo, mediante biopsia de músculo o placenta de un individuo sospechoso de estar predispuesto a un trastorno, es una muestra adecuada. En muchos casos, es útil preparar la muestra como una sección de tejido, que puede examinarse mediante análisis histológico. Como alternativa, las proteínas o ácidos nucleicos se pueden extraer de una muestra y se pueden examinar usando procedimientos tales como electroforesis en gel y procedimientos de "transferencia" apropiados, que son bien conocidos en la materia y se describen con detalle a continuación.

Se puede obtener una muestra de un sujeto normal o de un sujeto de ensayo, que se sospecha que está predispuesto a sufrir un trastorno, tal como un trastorno muscular, neuromuscular o neurológico, y se está examinando la expresión o localización alterada del proteoglicano de la invención. o la expresión alterada del ARNm que codifica el proteoglicano de la invención.

Una muestra obtenida de un sujeto normal puede usarse como una muestra de "control", que es útil para la comparación con una muestra obtenida de un sujeto de ensayo. Una muestra de control puede ser, por ejemplo, una muestra de músculo o una muestra de placenta, que se obtiene de un individuo de edad y sexo compatible que no exhibe y no está predispuesto a sufrir un trastorno, tal como un trastorno muscular, neuromuscular o neurológico. Una muestra de control muestra un nivel de expresión y un patrón de expresión del proteoglicano de la invención y un nivel de expresión del ARNm de proteoglicano que es característico de la población humana en general y no se desvía significativamente de los niveles normales de expresión o patrón de localización esperados para una persona en la población. Cabe esperar que, después de que se haya examinado un número estadísticamente significativo de muestras de control, se determine que una cantidad de expresión del proteoglicano de la divulgación por unidad de muestra será normal para una muestra de control. Como se usa en el presente documento, una cantidad "normal" de proteoglicano de la invención en una muestra de control significa una cantidad que está dentro de un intervalo esperado para una persona que no está predispuesta a sufrir un trastorno, por ejemplo, un trastorno muscular, neuromuscular o neurológico.

La expresión alterada del proteoglicano de la divulgación en una muestra obtenida de un sujeto de ensayo se puede identificar cualitativamente comparando visualmente, por ejemplo, fotomicrografías de una muestra de control teñida inmunohistoquímicamente con la muestra obtenida del sujeto de ensayo. Como alternativa, la expresión alterada de proteoglicano de la invención se puede medir cuantitativamente usando, por ejemplo, análisis densitométrico. La expresión alterada de proteoglicano de la proteína de divulgación también puede determinarse usando procedimientos de electroforesis en gel y, si se desea, análisis de inmunotransferencia. Tales procedimientos son bien conocidos en la técnica.

En el procedimiento de diagnóstico de la presente divulgación se obtiene una muestra de biopsia muscular de un individuo que se va a analizar. Normalmente, un individuo que se va a analizar de acuerdo con los ensayos de diagnóstico de la divulgación es un individuo que está en riesgo de sufrir un trastorno, por ejemplo, un trastorno muscular, neuromuscular o neurológico, por ejemplo, una persona de una familia en riesgo o una persona que muestra uno o más síntomas de tales trastornos. En el caso de trastornos musculares o neuromusculares, se pueden obtener muestras de músculo de pacientes mediante biopsia quirúrgica. El sitio de la biopsia puede ser cualquier músculo esquelético sospechoso de ser distrófico. Sin embargo, los grupos musculares alrededor del hombro y la cintura pélvica son los más afectados y es probable que sean el sitio de biopsia más frecuente. Dichas muestras de músculo se analizan en cuanto a la presencia y/o actividad biológica del proteoglicano de la divulgación y también se pueden analizar mediante tinción de anticuerpos para determinar los niveles de distrofina, las proteínas asociadas a distrofina. Para garantizar que el control y los extractos experimentales contengan cantidades sustancialmente similares de proteína, los extractos se separan por electroforesis y se tiñen, por ejemplo, con azul de Coomassie.

Los procedimientos para la determinación de niveles de distrofina y proteínas asociadas a distrofina se llevan a cabo

mediante técnicas convencionales. Dichas técnicas se divulgan, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.ºs. 187.063; 5.260.209; y 5.308.752, el número de publicación internacional WO 89/06286 también desvela tales técnicas convencionales, así como la secuencia nucleica que codifica la distrofina.

5 También se puede determinar la localización alterada del proteoglicano de la divulgación en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "localización" se refiere al patrón de depósito del proteoglicano de la divulgación en una muestra. La localización del proteoglicano de la invención también puede determinarse cualitativa o cuantitativamente. La localización "alterada" se refiere a un patrón de depósito del proteoglicano de la invención en una muestra que es diferente del patrón de localización observado en una muestra de control.

10 El nivel de expresión del ARNm que codifica el proteoglicano de la invención puede determinarse y puede usarse para identificar a un individuo que está predispuesto a un trastorno, tal como un trastorno muscular, neuromuscular o neurológico. Los procedimientos para determinar el nivel de expresión del ARNm de proteoglicano en una muestra son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, análisis de transferencia de tipo Northern, que se puede usar para determinar si el ARNm del proteoglicano se expresa a un nivel normal en una muestra de ensayo. El análisis de transferencia de tipo Northern también puede usarse para determinar si el ARNm de proteoglicano que se expresa en una célula es un transcrito de longitud completa. Por ejemplo, una muestra de ARN obtenida de una muestra de tejido se puede poner en contacto con una sonda de ácido nucleico que hibrida con el ARNm que codifica el proteoglicano de la divulgación. Un experto en la materia sabrá que la sonda puede ser una sonda de ADN o ARN y puede prepararse a partir de un ADNc que codifica el proteoglicano o puede sintetizarse como un oligonucleótido. Además, el experto en la materia reconocería que dicha hibridación debería realizarse en condiciones rigurosas, que pueden determinarse empíricamente (véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)), que se incorpora en el presente documento por referencia). Los procedimientos para aislar el ARN total intacto y el ARNm + poli A y para realizar el análisis de transferencia de tipo Northern son bien conocidos en la materia (Sambrook y col., 1989).

25 Un procedimiento sensible para determinar el nivel de expresión de ARNm que codifica el proteoglicano de la divulgación en una muestra es la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), que es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, H. A. Erlich, PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification (Stockton Press, 1989)). El procedimiento de RT-PCR es particularmente útil para examinar una muestra que no proporciona una señal detectable mediante análisis de transferencia de tipo Northern. Debido a las etapas de amplificación implicadas en el análisis de PCR, se puede identificar un ARNm de proteoglicano raro en una muestra.

30 Los procedimientos para determinar los niveles de proteoglicanos de la divulgación pueden usar, por ejemplo, anticuerpos que se unen al proteoglicano de la invención. Se puede usar un anticuerpo en conexión con un ensayo convencional para la determinación de los niveles de antígeno en un tejido de interés, por ejemplo, tejido muscular. Cualquier procedimiento que permita la determinación de los niveles de proteína presentes en el tejido muscular en función de la unión del anticuerpo es útil en conexión con la presente divulgación. Los procedimientos preferentes incluyen transferencia de tipo Western, análisis inmunocitoquímico y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

35 Para los ensayos que requieren matriz extracelular solubilizada (por ejemplo, ELISA y transferencia de tipo Western), la cantidad de músculo obtenida por biopsia debería ser suficiente para permitir la extracción del proteoglicano de la divulgación en una cantidad suficiente para el análisis. En una realización ilustrativa, el tejido muscular se homogeniza mediante rotura mecánica usando un aparato tal como un homogeneizador de vidrio accionado manualmente o accionado por motor, un homogeneizador de mezcladora de cuchilla Waring, o una sonda ultrasónica. La homogeneización se puede llevar a cabo, por ejemplo, en un tampón que tenga un pH de aproximadamente 11 o 12, como se describe adicionalmente en los Ejemplos. El tampón puede comprender además inhibidores de proteasa, por ejemplo, PMSF 1 mM, benzamidina 0,75 mM, 1 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml de pepstatina A. La incubación se lleva a cabo a continuación, por ejemplo, en hielo durante 2 horas. Después de la centrifugación, la matriz extracelular solubilizada de esta manera puede luego procesarse por procedimientos convencionales para su uso, por ejemplo, en transferencia de tipo Western o en formatos analíticos ELISA.

40 Los componentes solubilizados de la matriz extracelular, preparados como se ha descrito anteriormente, pueden analizarse mediante transferencia de tipo Western separando primero los componentes en un gel de poliacrilamida con SDS al 3-12 % (Laemmli (1970) Nature 227, 680), seguido de transferencia a un soporte sólido, tal como una membrana de nitrocelulosa, formando una réplica exacta de la separación de proteínas original, pero dejando las proteínas transferidas accesibles para su posterior estudio. Este soporte sólido que lleva los componentes proteicos transferidos se denomina inmunotransferencia. La detección de las proteínas transferidas se puede lograr mediante el uso de colorantes proteicos generales, tales como negro de Amido o azul brillante de Coomassie. Los anticuerpos que son específicos del proteoglicano de la invención pueden marcarse con un grupo indicador detectable y usarse para teñir la proteína transferida al soporte sólido. Como alternativa, los anticuerpos no marcados específicos del proteoglicano de la invención se incuban con una inmunotransferencia en condiciones apropiadas para la unión. La unión específica de estos anticuerpos a la muestra de tejido muscular puede detectarse mediante el uso de

anticuerpos secundarios marcados mediante técnicas convencionales.

Los procedimientos de la presente divulgación también se pueden poner en práctica en un formato de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). En este formato, los anticuerpos contra el proteoglicano de la divulgación se adsorben sobre un soporte sólido, en la mayoría de los casos una placa de microtitulación de poliestireno. Después de recubrir el soporte con anticuerpo y lavarlo, se agrega una muestra solubilizada. El proteoglicano de la divulgación, si está presente, se unirá a los anticuerpos adsorbidos. A continuación, se agrega un conjugado que también se unirá al proteoglicano de interés. Un conjugado puede ser una molécula de anticuerpo que se une al proteoglicano de la divulgación y a la que se une covalentemente una enzima. Después de la adición de un sustrato cromogénico para la enzima, la intensidad de los productos de reacción coloreados generados será proporcional a la cantidad de enzima conjugada y, por lo tanto, indirectamente a la cantidad de proteoglicano unido de la divulgación. Dado que la intensidad del color desarrollado es proporcional a la cantidad de proteoglicano de la presente divulgación, la determinación de la intensidad del color producido por una serie estándar de concentraciones de proteoglicano de la divulgación permitirá el cálculo de la cantidad de proteoglicano de la divulgación en una muestra desconocida. Existen muchas variaciones de este ensayo, como se describe en Voller, A., Bidwell, D. E. y Bartlett, A., *The Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA): A guide with abstracts of microplate applications*, Dynatech Laboratories, Alexandria, Va. (1979).

Como alternativa, las muestras de tejido (por ejemplo, muestras de biopsia humana) se pueden analizar para determinar la presencia de los componentes del complejo DAPC usando anticuerpos monoclonales o policlonales en una técnica inmunohistoquímica, tal como el procedimiento de tinción con inmunoperoxidasa. Además, las técnicas de inmunofluorescencia se pueden utilizar para examinar muestras de tejido humano. En un protocolo típico, los portaobjetos que contienen secciones de criostato de muestras de biopsia de tejido congeladas y no fijadas se secan al aire y luego se incuban con una preparación de anticuerpo contra el proteoglicano (anticuerpo primario) de la divulgación en una cámara humidificada a temperatura ambiente. Los portaobjetos se colocan en capas con una preparación de anticuerpo marcado con fluorescencia dirigido contra el anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios marcados también son útiles para la detección. El patrón de tinción y las intensidades dentro de la muestra se pueden determinar mediante microscopía óptica fluorescente.

La divulgación también proporciona un procedimiento de cribado de diagnóstico prenatal usando un tejido tal como placenta o músculo fetal, en el que el procedimiento de cribado es útil para identificar a un individuo predispuesto a sufrir un trastorno, tal como un trastorno muscular, neuromuscular o neurológico.

En realizaciones preferentes, los procedimientos para determinar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, tal como un trastorno muscular, neuromuscular o neurológico, se caracteriza por que comprende la detección, en una muestra de tejido o en células del sujeto, de la presencia o ausencia de una alteración genética caracterizada por al menos uno de (i) una alteración que afecta la integridad de un gen que codifica un proteoglicano de la divulgación o

(ii) la expresión errónea de un gen que codifica un proteoglicano de la invención. Para ilustración, tales alteraciones genéticas pueden detectarse determinando la existencia de al menos uno de (i) una delección de uno o más nucleótidos de un gen que codifica un proteoglicano de la divulgación,

(ii) una adición de uno o más nucleótidos a un gen que codifica un proteoglicano de la divulgación

(iii) una sustitución de uno o más nucleótidos de un gen que codifica un proteoglicano de la divulgación,

(iv) una reordenación cromosómica grande de un gen que codifica un proteoglicano de la divulgación,

(v) una alteración grande en el nivel de un transcrito de ARN mensajero de un gen que codifica un proteoglicano de la invención,

(vii) modificación aberrante de un gen que codifica un proteoglicano de la divulgación, tal como el patrón de metilación del ADN genómico, (vii) la presencia de un patrón de corte y empalme de tipo no salvaje de un

transcrito de ARN mensajero de un gen que codifica un proteoglicano de la divulgación, (viii) un nivel de proteoglicano de tipo no salvaje de la divulgación, (ix) pérdida alélica de un gen que codifica un proteoglicano de la divulgación y/o (x) modificación postraduccional inadecuada de un proteoglicano de la divulgación, tal como la presencia de cadenas laterales de glucosaminoglicano anormales. Tal como se expone a continuación, la presente divulgación proporciona un gran número de técnicas de ensayo para detectar alteraciones en un gen que codifica un proteoglicano de la divulgación. Estos procedimientos incluyen, aunque sin limitaciones, procedimientos que implican análisis de secuencia, hibridación de transferencia de tipo Southern, mapeo de sitios de enzimas de restricción y procedimientos que implican la detección de ausencia de apareamiento de nucleótidos entre el ácido nucleico a analizar y una sonda. Estos y otros procedimientos se describen con más detalle más adelante.

Las enfermedades o trastornos específicos, por ejemplo, enfermedades o trastornos genéticos, están asociados con variantes alélicas específicas de regiones polimórficas de ciertos genes, que no codifican necesariamente una proteína mutada. Por lo tanto, la presencia de una variante alélica específica de una región polimórfica de un gen, tal como un polimorfismo de un solo nucleótido ("SNP"), en un sujeto puede hacer que el sujeto sea susceptible de desarrollar una enfermedad o trastorno específico. Se pueden identificar regiones polimórficas en genes, por ejemplo, un gen que codifica un proteoglicano de la invención, determinando la secuencia de nucleótidos de genes

en poblaciones de individuos. Si se identifica una región polimórfica, por ejemplo, SNP, se puede determinar la relación con una enfermedad específica estudiando poblaciones específicas de individuos, por ejemplo, individuos que desarrollaron una enfermedad específica, tal como un trastorno muscular, neuromuscular o neurológico. Una región polimórfica puede localizarse en cualquier región de un gen, por ejemplo, exones, en regiones codificantes o no codificantes de exones, intrones y región promotora.

Es probable que los genes que codifican proteoglicanos de la divulgación comprendan regiones polimórficas, cuyos alelos específicos pueden estar asociados con enfermedades o afecciones específicas o con una mayor probabilidad de desarrollar dichas enfermedades o afecciones. Por lo tanto, la invención proporciona procedimientos para determinar la identidad del alelo o variante alélica de una región polimórfica de un gen que codifica un proteoglicano de la invención en un sujeto, para determinar de ese modo si el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con una variante alélica específica de una región polimórfica.

En una realización de ejemplo, se proporciona una composición de ácido nucleico que comprende una sonda de ácido nucleico que incluye una región de secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridar con una secuencia sentido o antisentido de un gen que codifica un proteoglicano de la invención o mutantes naturales de los mismos, o secuencias flanqueantes en 5' o 3' o secuencias intrónicas asociadas de forma natural con los genes de proteoglicanos sujeto o mutantes naturales de los mismos. El ácido nucleico de una célula se vuelve accesible para la hibridación, la sonda se pone en contacto con el ácido nucleico de la muestra y se detecta la hibridación de la sonda con el ácido nucleico de la muestra. Dichas técnicas pueden usarse para detectar alteraciones o variantes alélicas a nivel genómico o de ARNm, incluyendo delecciones, sustituciones, etc., así como para determinar los niveles de transcrito de ARNm.

Un procedimiento de detección preferente es la hibridación alelo específica usando sondas que se superponen a la mutación o sitio polimórfico y que tienen aproximadamente 5, 10, 20, 25 o 30 nucleótidos alrededor de la mutación o región polimórfica. En una realización preferente de la invención, varias sondas capaces de hibridarse específicamente con variantes alélicas, tales como polimorfismos de un solo nucleótido, están unidas a un soporte en fase sólida, por ejemplo, un "chip". Los oligonucleótidos se pueden unir a un soporte sólido mediante diversos procesos, incluyendo litografía. Por ejemplo, un chip puede contener hasta 250.000 oligonucleótidos. El análisis de detección de mutaciones que usa estos chips que comprenden oligonucleótidos, también denominadas "matrices de sondas de ADN" se describe, por ejemplo, en Cronin y col., (1996) *Human Mutation* 7:244. En una realización, un chip comprende todas las variantes alélicas de al menos una región polimórfica de un gen. A continuación, el soporte de fase sólida se pone en contacto con un ácido nucleico de ensayo y se detecta la hibridación con las sondas específicas. En consecuencia, la identidad de numerosas variantes alélicas de uno o más genes se puede identificar en un experimento de hibridación simple.

En determinadas realizaciones, la detección de la alteración comprende utilizar la sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.683.195 y 4.683.202), tal como PCR de anclaje o RACE PCR, o, como alternativa, en una reacción en cadena de ligasa (LCR) (véase, por ejemplo, Landegran y col., (1988) *Science* 241:1077-1080; y Nakazawa y col., (1994) *PNAS* 91:360-364), el último de los cuales puede ser particularmente útil para detectar mutaciones puntuales en el gen (véase Abravaya y col., (1995) *Nuc Acid Res* 23:675-682). En una realización ilustrativa, el procedimiento incluye los pasos de (i) recoger una muestra de tejido o célula de un paciente, (ii) aislar ácido nucleico (por ejemplo, genómico, ARNm o ambos) de las células de la muestra, (iii) poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que hibridan específicamente con el gen de interés (es decir, que codifica el proteoglicano de interés) en condiciones tales que se produzca la hibridación y amplificación del gen (si está presente) y (iv) detectar la presencia o la ausencia de un producto de amplificación o detectar el tamaño del producto de amplificación y comparar la longitud con una muestra de control. Se prevé que pueda ser deseable usar PCR y/o LCR para usar como etapa de amplificación preliminar junto con cualquiera de las técnicas usadas para detectar mutaciones descritas en el presente documento.

Los procedimientos de amplificación alternativos incluyen: replicación de secuencia autosostenida (Guatelli, J.C. y col., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh, D.Y. y col., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi, P.M. y col., 1988, *Bio/Technology* 6:1197) o cualquier otro procedimiento de amplificación de ácido nucleico, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico, si dichas moléculas están presentes en números muy bajos.

En aún otra realización, se puede usar cualquiera de diversas reacciones de secuenciación conocidas en la materia para secuenciar directamente un gen de interés y detectar mutaciones comparando la secuencia del gen de muestra con la secuencia de tipo salvaje (control) correspondiente. Las reacciones de secuenciación de ejemplo incluyen las basadas en técnicas desarrolladas por Maxam y Gilbert (*Proc. Natl Acad Sci USA* (1977) 74:560) o Sanger (Sanger y col., (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci* 74:5463). También se contempla que cualquiera de diversos procedimientos de secuenciación automatizada pueda utilizarse cuando se realicen los ensayos en cuestión. (*Biotechniques* (1995) 19: 448), incluida la secuenciación por espectrometría de masas (véase, por ejemplo, la publicación de PCT WO 94/16101; Cohen y col., (1996) *Adv Chromatogr* 36:127-162; y Griffin y col., (1993) *Appl Biochem Biotechnol* 38:147-

159). Para un experto en la materia, será evidente, para ciertas realizaciones, en la reacción de secuenciación solo es necesario determinar la aparición de una, dos o tres de las bases de ácido nucleico. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una pista A o similar, por ejemplo, cuando se detecta solo un ácido nucleico.

5 En una realización adicional, se puede usar protección frente a los agentes de escisión (tales como una nucleasa, hidroxilamina o tetraóxido de osmio y con piperidina) para detectar bases mal apareadas en heterodúplex de ARN/ARN o ARN/ADN o ADN/ADN (Myers, y col., (1985) Science 230:1242). En general, la técnica de la materia de "escisión por apareamiento incorrecto" comienza proporcionando heterodúplex formados hibridando ARN o ADN (marcados) que contienen la secuencia de tipo salvaje con ARN o ADN potencialmente mutante obtenidos a partir de una muestra de tejido. Los dúplex bicatenarios se tratan con un agente que escinde las regiones monocatenarias del dúplex, tales como las que existirán debido a apareamientos erróneos de pares de bases entre las cadenas de control y de la muestra. Por ejemplo, los dúplex de ARN/ADN pueden tratarse con ARNasa y los híbridos ADN/ADN se tratan con nucleasa S1 para digerir enzimáticamente las regiones mal apareadas. En otras realizaciones, los dúplex de ADN/ADN o ARN/ADN pueden tratarse con hidroxilamina o tetraóxido de osmio y con piperidina para digerir las regiones mal apareadas. Después de la digestión de las regiones mal apareadas, el material resultante se separa por tamaño en geles de poliacrilamida desnaturalizantes para determinar el sitio de la mutación. Véase, por ejemplo, Cotton y col., (1988) Proc. Natl Acad Sci USA 85:4397; Saleeba y col., (1992) Methods Enzymol. 217:286-295. En una realización preferida, el ADN o ARN de control puede marcarse para la detección.

20 En aún otra realización, la reacción de escisión de apareamientos erróneos usa una o más proteínas que reconocen pares de bases mal apareadas en ADN bicatenario (denominadas enzimas "reparación de apareamientos erróneos de ADN") en sistemas definidos para detectar y mapear mutaciones puntuales en ADNc obtenidas a partir de muestras de células. Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* escinde A en apareamientos erróneos G/A y la timidina ADN glucosilasa de células HeLa escinde T en apareamientos erróneos G/T (Hsu y col., (1994) Carcinogenesis 15:1657-1662). Según una realización de ejemplo, una sonda basada en una secuencia que codifica un proteoglicano de la invención, por ejemplo, una secuencia de tipo salvaje, se hibrida con un ADNc u otro producto de ADN de una o más células de ensayo. El dúplex se trata con una enzima de reparación de apareamientos erróneos de ADN, y los productos de escisión, en caso de haberlos, se pueden detectar a partir de protocolos de electroforesis o similares. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.459.039.

30 En otras realizaciones, las alteraciones en la movilidad electroforética se usarán para identificar mutaciones o la identidad de la variante alélica de una región polimórfica en los genes. Por ejemplo, el polimorfismo de conformación de una sola cadena (SSCP) puede usarse para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y de tipo salvaje (Orita y col., (1989) Proc Natl. Acad. Sci USA 86:2766, véase también Cotton (1993) Mutat Res 285:125-144; y Hayashi (1992) Genet Anal Tech Appl 9:73-79). Los fragmentos de ADN monocatenarios de los ácidos nucleicos de muestra y de control se desnaturalizarán y se permitirá su renaturalización. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos monocatenarios varía según la secuencia, la alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección de incluso un único cambio de base. Los fragmentos de ADN pueden marcarse o detectarse con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede mejorarse mediante el uso de ARN (en lugar de ADN), en el que la estructura secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. En una realización preferida, el presente procedimiento utiliza el análisis de heterodúplex para separar moléculas heterodúplex bicatenarias sobre la base de los cambios en la movilidad electroforética (Keen y col., (1991) Trends Genet 7:5).

45 Los ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales o la identidad de la variante alélica de una región polimórfica incluyen, aunque sin limitaciones, hibridación selectiva de oligonucleótidos, amplificación selectiva o extensión selectiva del cebador. Por ejemplo, pueden prepararse cebadores de oligonucleótidos en los que la mutación conocida o diferencia de nucleótidos (por ejemplo, en variantes alélicas) se coloca centralmente y luego se hibrida con ADN diana en condiciones que permiten la hibridación solo si se encuentra una coincidencia perfecta (Saiki y col., (1986) Nature 324:163); Saiki y col., (1989) Proc. Natl Acad. Sci USA 86:6230). Dichas técnicas de hibridación de oligonucleótidos específica de alelo pueden usarse para analizar una mutación o región polimórfica por reacción cuando los oligonucleótidos se hibridan con ADN diana amplificado por PCR o una serie de diferentes mutaciones o regiones polimórficas cuando los oligonucleótidos se unen a la membrana hibridante y se hibridan con el ADN diana marcado.

55 Sin embargo, otras técnicas que pueden usarse para detectar una mutación de un alelo específico incluyen las siguientes: amplificación selectiva por PCR como se describe en Gibbs y col., (1989) Nucleic Acids Res. 17:2437-2448, Prossner (1993) Tibtech 11:238 y Gasparini y col., (1992) Mol. Cell Probes 6:1; ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA), como se ha descrito, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 4,998,617 y en Landegren, U. y col., Science 241:1077-1080 (1988), la patente de Estados Unidos n.º 5.593.826, Tobe y col., (1996) Nucleic Acids Res 24: 3728. Se pueden usar otras técnicas para detectar un polimorfismo de un solo nucleótido. Se divulgan ejemplos de tales técnicas, por ejemplo, en Mundy, C. R. patente de Estados Unidos n.º 4,656,127; Cohen, D. y col., (patente francesa 2,650,840; solicitud de PCT. n.º WO91/02087); Genetic Bit Analysis o GBA™, descrito por Goelet, P. y col., (solicitud de patente N.º 92/15712). Komher, J. S. y col., Nucl. Acids. Res. 17:7779-7784 (1989); Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18:3671 (1990); Syvanen, A. -C., y col., Genomics 8:684-692 (1990); Kuppawamy, M. N. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1143-1147 (1991); Prezant, T. R. y col., Hum. Mutat.

1:159-164 (1992); Ugozzoli, L. y col., GATA 9:107-112 (1992); Nyren, P. y col., Anal. Biochem. 208:171-175 (1993)).

5 Para las mutaciones que producen la terminación prematura de la traducción de proteínas, la prueba de truncamiento de proteínas (PTT) ofrece un enfoque de diagnóstico eficiente ((Roest, et. al., (1993) Hum. Mol. Genet. 2:1719-21; van der Luijt, et. al., (1994) Genomics 20:1-4).

10 Los procedimientos descritos en el presente documento pueden realizarse, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico preempaquetados que comprenden al menos un ácido nucleico sonda, conjunto de cebadores; y/o reactivo de anticuerpo descrito en la presente memoria, que se pueden usar de forma conveniente, por ejemplo, en entornos clínicos para diagnosticar pacientes que presentan síntomas o antecedentes familiares de una enfermedad o enfermedad que implica un proteoglicano de la invención (véase a continuación).

15 Se puede utilizar cualquier tipo de célula o tejido en los diagnósticos que se describen a continuación. En una realización preferente se obtiene un fluido corporal, por ejemplo, sangre, del sujeto para determinar la presencia de una mutación o la identidad de la variante alélica de una región polimórfica de un gen que codifica un proteoglicano de interés. Se puede obtener un fluido corporal, por ejemplo, sangre, mediante técnicas conocidas (por ejemplo, venopunción). Como alternativa, los ensayos de ácidos nucleicos se pueden realizar en muestras secas (por ejemplo, cabello o piel). Para el diagnóstico prenatal, se pueden obtener muestras de ácido nucleico fetal a partir de sangre materna como se describe en la solicitud de patente internacional n.º WO91/07660 de Bianchi. Como  
20 alternativa, se pueden obtener amniocitos o vellosidades coriónicas para realizar pruebas prenatales.

25 También se pueden realizar procedimientos de diagnóstico *in situ* directamente sobre las secciones de tejido (fijas y/o congeladas) del tejido del paciente obtenido a partir de biopsias o resecciones, de manera que no es necesaria la purificación del ácido nucleico. Los reactivos de ácido nucleico pueden usarse como sondas y/o cebadores para tales en el lugar procedimientos (véase, por ejemplo, Nuovo, G.J., 1992, PCR in situ Hybridization: Protocols and Applications, Raven Press, NY).

30 Además de los procedimientos que se centran principalmente en la detección de una secuencia de ácido nucleico, los perfiles también se pueden evaluar en dichos esquemas de detección. Los perfiles de huellas dactilares pueden generarse, por ejemplo, utilizando un procedimiento de visualización diferencial, análisis de tipo Northern y/o RT-PCR.

35 Los anticuerpos dirigidos contra proteoglicanos de tipo salvaje o mutante de la divulgación o variante alélica de los mismos, que se han descrito anteriormente, también se pueden usar en diagnósticos y pronósticos de enfermedades. Dichos procedimientos de diagnóstico se pueden usar para detectar anomalías en el nivel de expresión del proteoglicano de la divulgación, o anomalías en la estructura y/o localización tisular, celular o subcelular del proteoglicano. Las diferencias estructurales pueden incluir, por ejemplo, diferencias en el tamaño, electronegatividad o antigenicidad del proteoglicano mutante de la divulgación con respecto al proteoglicano normal. La proteína del tipo de tejido o de célula a analizar se puede detectar o aislar fácilmente usando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitaciones, análisis de transferencia de tipo Western. Para una explicación detallada de los procedimientos para llevar a cabo el análisis de transferencia de tipo Western, véase Sambrook y col., 1989, citado anteriormente, en el capítulo 18. Los procedimientos de detección y aislamiento de proteínas empleados en el presente documento también pueden ser tales como los descritos en Harlow y Lane, por ejemplo, (Harlow, E. y Lane, D., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).  
45

50 Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante técnicas de inmunofluorescencia que emplean un anticuerpo marcado con fluorescencia (véase a continuación) acoplado con detección microscópica ligera, citometría de flujo o detección fluorimétrica. Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) útiles en la presente invención pueden, además, usarse además histológicamente, como en microscopia de inmunofluorescencia de inmunoelectrones, para detección *in situ* de proteoglicanos. La detección *in situ* se puede llevar a cabo eliminando una muestra histológica de un paciente y aplicando a la misma un anticuerpo marcado de la presente invención. El anticuerpo (o fragmento) se aplica, preferentemente, superponiendo el anticuerpo (o fragmento) marcado en una muestra biológica. Mediante el uso de dicho procedimiento, es posible determinar no solo la presencia de un proteoglicano de la divulgación, sino también su distribución en el tejido examinado. Usando la presente divulgación, un experto en la materia percibirá fácilmente que cualquiera de una amplia variedad de procedimientos histológicos (tales como procedimientos de tinción) puede modificarse para lograr dicha detección *in situ*.  
55

60 A menudo, se usa un soporte o portador de fase sólida como soporte capaz de unirse a un antígeno o un anticuerpo. Soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble en cierta medida o insoluble para los fines de la presente divulgación. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Por lo tanto, la configuración de soporte puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Como alternativa, la superficie puede ser plana, tal como una lámina, tira de ensayo, etc. Los soportes preferentes incluyen perlas de  
65

poliestireno. Los expertos en la materia conocerán muchos otros vehículos adecuados para unir anticuerpo o antígeno, o podrán determinar el mismo mediante el uso de experimentación rutinaria.

5 Un medio para marcar un anticuerpo que se une específicamente a un proteoglicano de la divulgación es mediante unión a una enzima y uso en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", Diagnostic Horizons 2:1-7, 1978, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Voller, y col., J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978); Butler, Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, (ed.) Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL, 1980; Ishikawa, y col., (eds.) Enzyme Immunoassay, Kigaku Shoin, Tokyo, 1981). La enzima que está unida al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, preferentemente un sustrato cromogénico, de tal manera que produzca un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que pueden usarse para marcar de manera detectable el anticuerpo incluyen, aunque sin limitaciones, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. La detección se puede lograr mediante procedimientos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también se puede realizar por comparación visual de la extensión de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de forma similar.

20 La detección también puede realizarse usando cualquiera de diversos otros inmunoensayos. Por ejemplo, marcando radiactivamente los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, es posible detectar péptidos mutantes o de tipo salvaje del gen de huellas digitales mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986). El isótopo radioactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o por autorradiografía.

30 También es posible marcar el anticuerpo con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado fluorescentemente se expone a la luz de la longitud de onda adecuada, su presencia puede detectarse después debido a la fluorescencia. Entre los compuestos de marcaje fluorescente más usados se encuentran isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

35 El anticuerpo también puede marcarse de forma detectable usando metales emisores de fluorescencia, tales como <sup>152</sup>Eu, u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales se pueden unir al anticuerpo utilizando grupos quelantes de metales, como ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

40 El anticuerpo también se puede marcar de manera detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado con quimioluminiscencia se determina después detectando la presencia de luminiscencia que se produce durante el trascurso de una reacción química. Ejemplos de compuestos marcados quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

45 Asimismo, se puede usar un compuesto bioluminiscente para marcar el anticuerpo de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en los sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes importantes con fines de marcaje son luciferina, luciferasa y acurina.

50 Además, se entenderá que puede usarse cualquiera de los procedimientos anteriores para detectar alteraciones en un gen o producto génico o variantes polimórficas para controlar el curso del tratamiento o terapia.

#### Métodos de cribado

55 La divulgación proporciona además procedimientos para identificar agentes que modulan la integridad de la membrana, en particular, modulando la estabilidad del DAPC y agentes que modulan la formación de la unión neuromuscular, tal como modulando la diferenciación postsináptica. Por lo tanto, la divulgación proporciona procedimientos para identificar agentes que modulan la actividad de un proteoglicano de la invención, por ejemplo, DAG-125 o proteoglicano que tiene actividad similar. El agente puede ser un agonista de una actividad biológica de un proteoglicano de la divulgación o el agente puede ser un antagonista de un proteoglicano de la divulgación. Un agente agonista será de interés para su uso en tratamientos profilácticos y terapéuticos de enfermedades o trastornos, por ejemplo, caracterizado por un DAPC inestable o una formación inapropiada de una diferenciación postsináptica. Un agente antagonista será de interés para su uso en tratamientos profilácticos y terapéuticos de enfermedades o trastornos, por ejemplo, caracterizado por una unión neuromuscular hiperactiva, por ejemplo, en situaciones en las que existe un exceso del proteoglicano de la divulgación. En consecuencia, la invención proporciona procedimientos de cribado para identificar agentes terapéuticos. Un agente terapéutico de la divulgación puede ser cualquier tipo de compuesto, incluyendo una proteína, un péptido, un proteoglicano, un polisacárido, un peptidomimético, una molécula pequeña y un ácido nucleico. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un gen, un

ácido nucleico antisentido, una ribozima o una molécula triple.

Los agonistas preferentes incluyen compuestos, tales como proteoglicanos, que imitan al menos una actividad biológica de un proteoglicano de la divulgación, por ejemplo, la capacidad de unirse a uno o más componentes de un DAPC, tal como alfa $\alpha$ -dístroglicano, o la capacidad para estimular la fosforilación de MuSK y/o el agrupamiento de AChR. Otros agonistas preferentes incluyen compuestos que son capaces de aumentar la producción del proteoglicano de la divulgación en una célula, por ejemplo, compuestos capaces de regular por aumento la expresión del gen que codifica el proteoglicano y compuestos que son capaces de potenciar una actividad de un proteoglicano de la divulgación y/o la interacción de un proteoglicano de la divulgación con otra molécula, tal como un componente de un DAPC o MuSK.

Los antagonistas preferentes incluyen compuestos que son proteínas negativas dominantes, que, por ejemplo, son capaces de unirse a alfa-sarcoglicano, pero no de estabilizar los DAPC, tal como compitiendo con el proteoglicano endógeno de la divulgación. Otros antagonistas preferentes incluyen compuestos que disminuyen o inhiben la producción de un proteoglicano de la divulgación en una célula y compuestos que son capaces de regular por disminución la expresión de un gen que codifica un proteoglicano de la divulgación y compuestos que son capaces de regular por disminución una actividad de un proteoglicano de la divulgación y/o su interacción con otra molécula, tal como alfa-sarcoglicano. En otra realización preferente, un antagonista es una forma modificada de un alfa $\alpha$ -dístroglicano u otra molécula capaz de unirse al proteoglicano de tipo salvaje de la divulgación, que es capaz de interactuar con el proteoglicano de la divulgación, pero que no tiene actividad biológica, por ejemplo, que no estabiliza los DAPC.

La divulgación también proporciona procedimientos de cribado para identificar agentes terapéuticos que son capaces de unirse a un proteoglicano de la divulgación, por ejemplo, por ejemplo, un proteoglicano de tipo salvaje de la invención o una forma mutada de la misma, y de ese modo modular la actividad biológica de un proteoglicano de la divulgación, o degrada, o hace que el proteoglicano de la divulgación se degrade. Por ejemplo, dicho agente terapéutico puede ser un anticuerpo o un derivado del mismo que interacciona específicamente con un proteoglicano de la divulgación (ya sea de tipo salvaje o mutado).

Por lo tanto, la divulgación proporciona procedimientos de cribado para identificar compuestos agonistas y antagonistas, que comprende seleccionar compuestos que son capaces de interactuar con un proteoglicano de la divulgación o con una molécula que interacciona con un proteoglicano de la divulgación, tal componente de un DAPC o MuSK, y/o compuestos que son capaces de modular la interacción de un a proteoglicano de la divulgación con otra molécula, tal como un componente de un DAPC o MuSK. En general, una molécula que es capaz de interactuar con un proteoglicano de la divulgación se denomina en el presente documento "pareja de unión a proteoglicano" o "pareja de unión a PT" y puede ser un componente de un DAPC, por ejemplo, un dístroglicano o un sarcoglicano, o MuSK.

Los compuestos de la divulgación se pueden identificar usando diversos ensayos dependiendo del tipo de compuesto y la actividad del compuesto que se desee. A continuación se exponen al menos algunos ensayos que pueden usarse para identificar agentes terapéuticos de la divulgación. Está dentro de la experiencia en la materia diseñar ensayos adicionales para identificar agente terapéuticos.

#### *Ensayos sin células*

Se pueden usar ensayos sin células para identificar compuestos que son capaces de interactuar con un proteoglicano de la divulgación o pareja unión del mismo, para modificar de ese modo la actividad del proteoglicano de la invención o su pareja de unión. Tal compuesto puede, por ejemplo, modificar la estructura de un proteoglicano de la divulgación o pareja de unión del mismo y, de ese modo, afectar a su actividad. Los ensayos sin células también se pueden usar para identificar compuestos que modulan la interacción entre un proteoglicano de la divulgación y una pareja de unión a PT, tal como un componente de un DAPC. En una realización preferida, los ensayos sin células para identificar tales compuestos consisten esencialmente en una mezcla de reacción que contiene un proteoglicano de la divulgación y un compuesto de ensayo o una biblioteca de compuestos de ensayo con o sin una pareja de unión. Un compuesto de ensayo puede ser, por ejemplo, un derivado de una pareja de unión a PT, por ejemplo, un péptido diana biológicamente inactivo o una molécula pequeña.

Estos ensayos pueden realizarse con una molécula de proteoglicano completa de la divulgación. Como alternativa, los ensayos de cribado se pueden realizar con porciones de los mismos, tales como el núcleo solamente, uno o más dominios de LLR, las cadenas de glucosaminoglicano solamente, o porciones de las mismos, o combinaciones de estas porciones. Estos pueden prepararse como se ha establecido anteriormente.

En consecuencia, un ensayo de cribado de ejemplo de la presente divulgación incluye las etapas de poner en contacto un proteoglicano de la divulgación o fragmento funcional del mismo o una pareja de unión a PT con un compuesto de ensayo o biblioteca de compuestos de ensayo y detectar la formación de complejos. Para fines de detección, la molécula puede marcarse con un marcador específico y el compuesto de ensayo o la biblioteca de compuestos de ensayo marcados con un marcador diferente. La interacción de un compuesto de ensayo con un

proteoglicano de la divulgación o fragmento del mismo o pareja de unión PT puede detectarse después determinando el nivel de los dos marcadores después de una etapa de incubación y una etapa de lavado. La presencia de dos marcadores después de la etapa de lavado es indicativa de una interacción.

5 También se puede identificar una interacción entre moléculas utilizando BIA (análisis de interacción biomolecular, Pharmacia Biosensor AB) en tiempo real que detecta resonancia de plasmón superficial (SPR), un fenómeno óptico. La detección depende de los cambios en la concentración de masa de las macromoléculas en la interfaz biospecífica y no requiere ningún marcaje de los interactuantes. En una realización, se puede inmovilizar una biblioteca de compuestos de ensayo sobre una superficie del sensor, por ejemplo, que forma una pared de una celda de micro flujo. A continuación, se hace fluir de forma continua una solución que contiene el proteoglicano de la divulgación, fragmento funcional del mismo, análogo o pareja de unión a PT sobre la superficie del sensor. Un cambio en el ángulo de resonancia, como se muestra en una grabación de señal, indica que se ha producido una interacción. Esta técnica se describe adicionalmente, por ejemplo, en BIA technology Handbook by Pharmacia.

15 Otro ensayo de cribado de ejemplo de la presente invención incluye las etapas de (a) formar una mezcla de reacción que incluye: (i) un proteoglicano de la divulgación, (ii) una pareja de unión a PT (por ejemplo, alfa-sarcoglicano) y (iii) un compuesto de ensayo; y (b) detectar la interacción del proteoglicano de la divulgación y la proteína de unión a PT. El proteoglicano de la invención y la pareja de unión a PT pueden producirse de forma recombinante, purificarse a partir de una fuente, por ejemplo, plasma, o sintetizarse químicamente, como se describe en el presente documento. Un cambio estadísticamente significativo (potenciación o inhibición) en la interacción del proteoglicano de la divulgación y la proteína de unión a PT en presencia del compuesto de ensayo, con respecto a la interacción en ausencia del compuesto de ensayo, indica un potencial agonista (mimético o potenciador) o antagonista (inhibidor) de una bioactividad para el compuesto de ensayo. Los compuestos de este ensayo se pueden poner en contacto simultáneamente. Como alternativa, un proteoglicano de la divulgación se puede poner en contacto primero con un compuesto de ensayo durante un período de tiempo apropiado, después de lo cual se agrega la pareja de unión a PT a la mezcla de reacción. La eficacia del compuesto puede evaluarse generando curvas de respuesta a la dosis a partir de los datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de ensayo. Además, también se puede realizar un ensayo de control para proporcionar un valor basal para la comparación. En el ensayo de control, el proteoglicano aislado y purificado de la invención o la pareja de unión se añade a una composición que contiene la pareja de unión a PT o el proteoglicano de la divulgación y la formación de un complejo se cuantifica en ausencia del compuesto de ensayo.

La formación de complejos entre un proteoglicano de la divulgación y una pareja de unión a PT puede detectarse mediante diversas técnicas. La modulación de la formación de complejos puede cuantificarse usando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable, tales como proteoglicanos marcados radiactivamente, marcados con fluorescencia o marcados enzimáticamente de la divulgación o parejas de unión a PT, mediante inmunoensayo o mediante detección cromatográfica.

Normalmente, será deseable inmovilizar el proteoglicano de la divulgación o su pareja de unión para facilitar la separación de complejos de las formas que no están en complejo de una o ambas proteínas, así como para acomodar la automatización del ensayo. La unión de un proteoglicano de la divulgación a una pareja de unión a PT puede realizarse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Los ejemplos incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En una realización, se puede proporcionar una proteína de fusión que añade un dominio que permite que la proteína se una a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/ACE-2 (GST/proteoglicano de la invención) se pueden adsorber sobre perlas de glutatión-sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que después se combinan con la pareja de unión a PT, por ejemplo, una pareja de unión a PT marcado con <sup>35</sup>S y el compuesto de ensayo y la mezcla se incuban en condiciones que conducen a la formación del complejo, por ejemplo, en condiciones fisiológicas para la sal y el pH, aunque se pueden desear condiciones ligeramente más rigurosas. Después de la incubación, las perlas se lavan para eliminar cualquier marcador no unido y la matriz inmovilizada y el radiomarcador se determinaron directamente (por ejemplo, perlas colocadas en centelleo) o en el sobrenadante después de que los complejos se disocian posteriormente. Como alternativa, los complejos pueden disociarse de la matriz, separarse mediante SDS-PAGE y el nivel de proteoglicano de la divulgación o pareja de unión a PT encontrado en la fracción de perlas se cuantifica a partir del gel usando técnicas electroforéticas estándar, tales como las descritas en los ejemplos adjuntos.

Otras técnicas para inmovilizar proteínas en matrices también están disponibles para su uso en el ensayo objeto. Por ejemplo, el proteoglicano de la invención o su pareja de unión aún puede inmovilizarse utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. Por ejemplo, las moléculas de proteoglicanos biotiniladas pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) usando técnicas bien conocidas en la materia (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL), e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos revestidos con estreptavidina (Pierce Chemical). Como alternativa, los anticuerpos reactivos con el proteoglicano de la divulgación pueden derivatizarse a los pocillos de la placa y el proteoglicano de la invención atrapado en los pocillos mediante conjugación de anticuerpos. Al igual que anteriormente, las preparaciones de una proteína de unión a PT y un compuesto de ensayo se incuban en los pocillos que presentan proteoglicanos de la placa y se puede cuantificar la cantidad de complejo atrapado en el pocillo. Los procedimientos de ejemplo para detectar tales complejos, además

de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados por GST, incluyen inmunodetección de complejos que usan anticuerpos reactivos con la pareja de unión a PT o que son reactivos con proteína y compiten con la pareja de unión; así como ensayos ligados a enzimas que dependen de la detección de una actividad enzimática asociada con la pareja de unión, ya sea una actividad intrínseca o extrínseca. En el caso de esta última, la enzima puede conjugarse químicamente o proporcionarse como una proteína de fusión con la pareja de unión a PT. Para ilustración, la pareja de unión a PT puede reticularse químicamente o fusionarse genéticamente con peroxidasa de rábano picante y la cantidad de polipéptido atrapado en el complejo puede evaluarse con un sustrato cromogénico de la enzima, por ejemplo, tetrahidrocloruro de 3,3'-diamino-benzadina o 4-cloro-1-naftol. Asimismo, se puede proporcionar una proteína de fusión que comprende el polipéptido y la glutatión-S-transferasa, y se puede cuantificar la formación del complejo detectando la actividad de GST usando 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (Habig y col., (1974) J Biol Chem 249:7130).

Para los procesos que se basan en la inmunodetección para cuantificar una de las proteínas atrapadas en el complejo, pueden usarse anticuerpos contra el proteoglicano de la invención. Como alternativa, la proteína a detectar en el complejo puede "marcarse con epítipo" en forma de una proteína de fusión que incluye, además de la secuencia del núcleo del proteoglicano de la invención, un segundo polipéptido para el que los anticuerpos están disponibles fácilmente (por ejemplo, de fuentes comerciales). Por ejemplo, las proteínas de fusión de GST descritas anteriormente también pueden usarse para la cuantificación de la unión usando anticuerpos contra el resto de GST. Otros marcadores de epítipos útiles incluyen los epítipos myc (por ejemplo, véase Ellison y col., (1991) J Biol Chem 266: 21150-21157), que incluye una secuencia de 10 residuos de c-myc, así como el sistema pFLAG (International Biotechnologies, Inc.) o el sistema pEZZ-proteína A (Farmacia, NJ).

Los ensayos sin células también se pueden usar para identificar compuestos que interactúan con un proteoglicano de la invención y modulan una actividad de un proteoglicano de la divulgación. En consecuencia, en una realización, un proteoglicano de la divulgación se pone en contacto con un compuesto de ensayo y se monitoriza la actividad catalítica del proteoglicano de la divulgación. En una realización, se determina la capacidad del proteoglicano de la divulgación para unirse a una pareja de unión. La afinidad de unión de un proteoglicano de la divulgación a una pareja de unión se puede determinar de acuerdo con procedimientos conocidos en la materia.

#### 30 *Ensayos basados en células*

Los ensayos basados en células pueden usarse, en particular, para identificar compuestos que modulan la expresión de un gen que codifica un proteoglicano de la divulgación, modulan la traducción del ARNm que codifica un proteoglicano de la divulgación, modulan la modificación postraduccional de la proteína del núcleo del proteoglicano o que modulan la estabilidad del ARNm o proteína. En consecuencia, en una realización, una célula que es capaz de producir un proteoglicano de la divulgación, por ejemplo, una célula muscular, se incuba con un compuesto de ensayo y se mide y compara la cantidad de proteoglicano de la divulgación producida en el medio celular y se compara con el producido a partir de una célula que no se ha puesto en contacto con el compuesto de ensayo. La especificidad del compuesto frente al proteoglicano de la divulgación puede confirmarse mediante diversos análisis de control, por ejemplo, midiendo la expresión de uno o más genes de control.

Los ensayos basados en células también pueden basarse en un sistema de gen indicador que detecta si dos moléculas interactúan o no, por ejemplo, el sistema clásico de dos híbridos, que puede realizarse en células de levadura o de mamífero.

Los compuestos que pueden analizarse incluyen moléculas pequeñas, proteínas y ácidos nucleicos. En particular, este ensayo puede usarse para determinar la eficacia de moléculas antisentido o ribozimas que se unen al ARN que codifica el proteoglicano de la divulgación. En otra realización, el efecto de un compuesto de ensayo sobre la transcripción de un gen que codifica un proteoglicano se determina mediante experimentos de transfección usando un gen indicador unido operativamente al menos a una porción del promotor de un gen que codifica un proteoglicano de la divulgación. Se puede aislar una región promotora de un gen, por ejemplo, de una biblioteca genómica según los procedimientos conocidos en la materia. Los promotores de genes que codifican proteoglicanos, por ejemplo, biglicano, están disponibles públicamente, por ejemplo, en GenBank. El gen indicador puede ser cualquier gen que codifique una proteína que sea fácilmente cuantificable, por ejemplo, el gen de la luciferasa o CAT, bien conocidos en la técnica.

Esta invención además atañe a agentes nuevos identificados mediante los ensayos de cribado descritos en lo que antecede y usos de los mismos para tratamientos tal y como se describe en el presente documento.

#### 60 *Ensayos para identificar compuestos que modulan la fosforilación*

Se demostró que el biglicano fosforila alfa-sarcoglicano y MuSK. En consecuencia, los compuestos que estimulan la fosforilación de estos compuestos pueden ejercer al menos parte de la actividad del biglicano en la estabilización de las membranas de las células musculares o en la potenciación de las membranas postsinápticas. Por lo tanto, también dentro del alcance de la divulgación están los procedimientos para identificar tales compuestos. En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto una célula, por ejemplo, una célula muscular, con un

compuesto, y controlar el nivel de fosforilación de un componente DAPC, tal como alfa-sarcoglicano, o MuSK, en el que un nivel más alto de fosforilación en relación con el de una célula no tratada indica que el compuesto estimula la fosforilación. Tales ensayos también pueden realizarse *in vitro* utilizando extractos de células o proteínas purificadas. Por ejemplo, el procedimiento puede comprender poner en contacto un sarcoglicano purificado o MuSK y un extracto celular de células activadas con biglicano (es decir, células en contacto con biglicano) o una quinasa en presencia de un compuesto de ensayo y controlar si la presencia del compuesto de ensayo previene o estimula la fosforilación.

Ejemplos de usos adicionales de los proteoglicanos de la divulgación

Los proteoglicanos, o el núcleo de los mismos, de la divulgación, también pueden usarse como suplemento para un cultivo celular o tisular (por ejemplo, un sistema para el crecimiento de órganos). Cualquier tipo de célula puede beneficiarse de estos suplementos. La cantidad de compuesto a añadir a los cultivos se puede determinar en experimentos a pequeña escala, mediante, por ejemplo, incubación de las células u órganos con cantidades crecientes de un compuesto específico de la divulgación. Las células preferentes incluyen células eucariotas, por ejemplo, células musculares o células neuronales.

Otros tejidos preferentes incluyen tejido atrófico. Por lo tanto, dicho tejido puede incubarse *in vitro* con una cantidad efectiva de un compuesto de la divulgación para invertir la atrofia del tejido. En una realización, se obtiene tejido atrófico de un sujeto, se cultiva el tejido *ex vivo* con un compuesto de la divulgación en una cantidad y durante un tiempo suficiente para invertir la atrofia del tejido y el tejido se puede volver a administrar a continuación en el mismo sujeto o en un sujeto diferente.

Como alternativa, los compuestos de la divulgación se pueden agregar a cultivos *in vitro* de células o tejidos obtenidos de un sujeto que tiene una distrofia muscular, u otra enfermedad que puede tratarse con un compuesto de la divulgación, para mejorar su crecimiento o supervivencia *in vitro*. La capacidad para mantener células, tales como células cerebrales o células musculares de sujetos que tienen una distrofia muscular u otra enfermedad, es útil, para, por ejemplo, desarrollar terapias para tratar la enfermedad.

Kits de la divulgación

La divulgación proporciona kits para pruebas de diagnóstico o con fines terapéuticos.

Los materiales para realizar los ensayos de diagnóstico de la presente divulgación pueden estar disponibles en un kit y venderse, por ejemplo, a hospitales, clínicas y médicos. Un kit para detectar la expresión y/o localización alterada del proteoglicano de la divulgación, por ejemplo, puede contener un reactivo, tal como anticuerpo, que se une al proteoglicano de la divulgación y, si se desea, un segundo anticuerpo marcado, una solución adecuada tal como un tampón para realizar, por ejemplo, una reacción inmunohistoquímica y una muestra de control conocida para comparar con la muestra de ensayo.

También se puede preparar un kit para detectar la expresión alterada de ARNm que codifica el proteoglicano de la divulgación en una muestra obtenida de un individuo, por ejemplo, un individuo sospechoso de estar predispuesto a un trastorno, por ejemplo, un trastorno muscular, neuromuscular o neurológico. Tal kit puede contener, por ejemplo, uno o más de los siguientes reactivos: un reactivo tal como una sonda de oligonucleótidos que se hibrida con ARNm que codifica el proteoglicano de la divulgación, soluciones adecuadas para extraer ARNm de una muestra de tejido o para realizar la reacción de hibridación y una muestra de ARNm de control para compararla con la muestra de ensayo, y una serie de muestras de ARNm de control útiles, por ejemplo, para construir una curva estándar.

Dichos kits de ensayo de diagnóstico son particularmente útiles porque los kits pueden contener una cantidad predeterminada de un reactivo que puede ponerse en contacto con una muestra de ensayo en condiciones estandarizadas para obtener un nivel óptimo de unión específica del reactivo a la muestra. La disponibilidad de procedimientos estandarizados para identificar a un individuo predispuesto a un trastorno, por ejemplo, distrofia muscular, permitirá una mayor precisión y exactitud de los procedimientos de diagnóstico.

Los kits para fines terapéuticos o preventivos pueden incluir un procedimiento terapéutico y opcionalmente un procedimiento para administrar el tampón terapéutico o necesario para solubilizar el agente terapéutico.

La presente divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera.

La práctica de la presente divulgación empleará, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la materia. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la literatura. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed., ed. de Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis y col., patente de Estados Unidos n.º: 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames y S. J.

Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu y col., eds.),  
 5 Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

## Ejemplos

- 10 **Ejemplo 1: Caracterización de una proteína de unión a distroglicano, DAG-125**
- Este ejemplo describe la identificación de una proteína de unión a distroglicano, denominada DAG-125.
- 15 Con el fin de identificar nuevas parejas de unión a distroglicano, se desarrolló un ensayo de superposición de transferencia de ligando como sigue. Fracciones de membrana postsinápticas y no sinápticas de órgano eléctrico de *Torpedo* se prepararon como se ha descrito anteriormente (Bowe, y col., (1994) Neuron. 12: 1173). Todo el la manipulación membranas y proteínas se realizó a 4 °C.
- 20 Las proteínas de membrana se separaron mediante SDS-PAGE (5-15 % de gel de gradiente) y se transfirieron a nitrocelulosa. Para detectar las proteínas de unión a distroglicano, la nitrocelulosa se aclaró y se bloqueó durante 3 horas en solución salina equilibrada de Hank que contenía CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, seroalbúmina bovina al 1 %, leche desecada desgrasada al 1 %, DDT 1 mM, HEPES 10 mM, a pH 7,4, y después se incubó durante la noche en el mismo tampón que contenía fragmentos de distroglicanos marcados con <sup>35</sup>S-metionina producidos mediante transcripción/traducción *in vitro* de la siguiente manera.
- 25 Los fragmentos de ADN que codifican DG<sub>1-891</sub> and DG<sub>345-891</sub> (se describe la secuencia de alfa-distroglicano, por ejemplo, en Ibraghimov -BeskrovnayaHum (1993) Mol Genet 2: 1651) se clonaron en el vector *in vitro* pMGT desarrollado por A. Ahn (Ahn y Kunkel (1995) J Cell Biol. 128: 363). Plásmidos de expresión *in vitro* utilizados en este estudio (incluyendo DG<sub>1-750</sub>, DG<sub>776-891</sub>, y DG<sub>345-653</sub>) se prepararon mediante subclonación basada en PCR de estos insertos. Los cebadores de PCR incluyeron sitios de restricción para volver a unir en el sitio EcoRI de pMGT. Los fragmentos de la proteína de distroglicano se generaron mediante transcripción/traducción *in vitro* usando el sistema de reticulocitos acoplado Promega TNT T7 según las instrucciones del fabricante. Para que la proteína se use en el ensayo de superposición de transferencia de ligando, la mezcla de reacción contenía <sup>35</sup>S-metionina (sin metionina no marcada). Después de la incubación durante 2 horas, la mezcla de reacción se hizo pasar sobre columnas de desalación de Bio-Spin (Bio-Rad, Hercules, CA) para eliminar los aminoácidos y las sales no incorporados.
- 30 Después de la incubación de las transferencias con las proteínas traducidas *in vitro*, las transferencias se aclararon y se secaron y los fragmentos de distroglicano unidos se visualizaron por autorradiografía. Para detectar la presencia de distroglicano en la muestra de SDS-PAGE, se realizó un ensayo de superposición de transferencia de agrina esencialmente como se describe en O'Toole, y col., (1996) PNAS 93:7369. En resumen, la nitrocelulosa se aclaró y se bloqueó durante 3 horas en medio esencial mínimo tamponado con HEPES complementado con seroalbúmina bovina al 1 % y suero de caballo al 10 %. A continuación, se incubó durante 4 horas en este tampón que contenía agrina de rata recombinante (isoforma A<sub>0</sub>B<sub>0</sub>, preparado como se describe en O'Toole y col., *citado anteriormente*), seguido de una segunda capa que contiene 1 µg/ml de anticuerpo anti-agrina <sup>125</sup>I-Mab-131 (Stressgen Laboratories, Victoria, BC). El anticuerpo anti-agrina unido se visualizó por autorradiografía.
- 35 Los resultados se muestran en la Figura 2. Los carriles 1 y 2 indican que ciertos fragmentos de distroglicano se unían a un polipéptido altamente glicosilado de aproximadamente 125 kD, que se denominó DAG-125 (por "glicoproteína asociada a distroglicano, 125 kDa"). Como se muestra en la Figura 2A, el dominio extracelular de distroglicano (carril 1: DG<sub>1-750</sub>) se unió a DAG-125, mientras que la porción intracelular de distroglicano (carril 2: DG<sub>776-891</sub>) no.
- 40 Los carriles 3 y 4 de la Figura 2 muestran que DAG-125 está enriquecido en las membranas sinápticas en comparación con las no sinápticas.
- 45 Para solubilizar DAG-125, las membranas sinápticas se centrifugaron a 100.000 x g durante 1 hora (h) y se resuspendieron en ddH<sub>2</sub>O. El pH se ajustó a 11,0 o 12,0 (como se indica) con NaOH y las membranas se agitaron durante 1 hora. El material insoluble se eliminó mediante centrifugación a 100.000 x g durante 1 hora. El extracto alcalino se neutralizó con Tris HCl 10 mM y se ajustó a pH 7,4. El DAG-125 permaneció soluble en estas condiciones según lo determinado por la resistencia a la granulación durante una segunda centrifugación. Los carriles 5-7 de la figura 2 muestran que DAG-125 es una proteína de membrana periférica que se puede extraer de la membrana sináptica mediante tratamiento alcalino. Las membranas sinápticas se extrajeron a pH 12 y se analizaron las fracciones insoluble (carril 6) y soluble (carril 7). Más del 90 % de DAG-125 se solubiliza con un tratamiento de pH 12,0. Por lo tanto, es probable DAG-125 sea una proteína de membrana periférica, ya que se
- 50  
55  
60  
65

elimina de las membranas mediante tratamiento alcalino.

**Ejemplo 2: Asociación entre  $\alpha$ -dístroglicano y DAG-125**

5 Este ejemplo demuestra que DAG-125 se asocia con en  $\alpha$ -dístroglicano traducido *in vitro*, la proteína de fusión GST- $\alpha$ -dístroglicano producida en bacterias y  $\alpha$ -dístroglicano nativo en solución.

10 DAG-125 se solubilizó mediante tratamiento alcalino, y se neutralizó, como se ha descrito anteriormente, y se incubó con matrices de columna y dístroglicano recombinante o nativo como se indica en la figura 3. El material de entrada y los eluidos de las perlas se analizaron mediante ensayo de superposición de transferencia de ligandos para determinar la presencia de DAG-125 ( $^{35}\text{S}$ -DG345-653 como sonda) o  $\alpha$ -dístroglicano nativo (superposición agrina, véase el Ejemplo 1).

15 La Figura 3A muestra DAG-125 incubado con perlas de agarosa conjugadas con Ig de cabra anti-ratón en presencia o ausencia de polipéptido dístroglicano traducido *in vitro* (DG<sub>345-750</sub>) y/o anticuerpo monoclonal anti-dístroglicano (NCL- $\beta$ -DG; Novocastra, Newcastle-on-Tyne, Reino Unido). Los resultados indican que DAG-125 coprecipitó con dístroglicano más anticuerpo anti-dístroglicano (carril 5), pero no se precipitó en ausencia de uno o ambos (carriles 2-4). Por lo tanto, DAG-125 se une al péptido dístroglicano traducido *in vitro* DG345-750.

20 La figura 3B muestra DAG-125 incubado con perlas de glutatión-sefarosa que se habían preincubado con GST producida en bacterias o con una proteína de fusión GST-dístroglicano producida en bacterias (GST-DG<sub>345-653</sub>). Se produjo una proteína de fusión de glutatión S-transferasa (GST) y los aminoácidos 345-653 de dístroglicano usando subclonación basada en PCR para introducir la secuencia de codificación de dístroglicano en el vector de expresión de proteína bacteriana pGEX-1 T (Pharmacia, Piscataway, NJ). El plásmido de expresión bacteriana resultante, pGST-DG<sub>345-653</sub>, se introdujo a continuación en la cepa BL21 de *E. coli* y la proteína de fusión expresada recuperada de la fracción citoplasmática según las instrucciones del fabricante. La proteína de control (GST) se obtuvo usando pGEX-1 T. Los resultados muestran que DAG-125 se coprecipitó con la proteína de fusión de dístroglicano (carril 3), pero no con GST sola (carril 2). Por lo tanto, DAG-125 se une al péptido 345-653 de alfa-dístroglicano producido en bacterias.

30 La Figura 3C muestra DAG-125 y  $\alpha$ -dístroglicano nativo. Los extractos alcalinos de membranas de órgano eléctrico *Torpedo* contienen tanto DAG-125 como  $\alpha$ -dístroglicano. Este extracto se aplicó a columnas de agarosa conjugadas con un anticuerpo de control o con un anticuerpo monoclonal de dístroglicano anti-*Torpedo* (MAb3B3; Bowe, M. A., y col., (1994) *Neuron*. 12: 1173). Los resultados muestran que el  $\alpha$ -dístroglicano nativo y DAG-125 se coprecipitaban mediante el anticuerpo de dístroglicano anti-*Torpedo*, Mab3B3, (carriles 3 y 6), pero no por el anticuerpo de control (carriles 2 y 5). Las transferencias Western indican que Mab3B3 no reconoce DAG-125 (véase Bowe, M. A., y col., 1994, *Neuron*. 12: 1173-1180).

40 Por lo tanto, la figura 3 muestra que DAG-125 coprecipita con el alfa-dístroglicano traducido *in vitro*, la proteína GST-alfa-dístroglicano producida en bacterias y con alfa-dístroglicano nativo.

**Ejemplo 3: Localización del dominio de unión DAG-125 de  $\alpha$ -dístroglicano**

45 Este ejemplo describe que el dominio de unión a DAG-125 de  $\alpha$ -dístroglicano está contenido en un dominio carboxilo terminal de aproximadamente 150 aminoácidos de la proteína.

50 Para determinar la región de  $\alpha$ -dístroglicano que interacciona con DAG-125, se preparó un panel de fragmentos de dístroglicanos mediante traducción *in vitro* (Figura 4) y la capacidad de cada uno para unirse a DAG-125 se analizó usando el ensayo de superposición de transferencia de ligando. La figura 4, que muestra los resultados, indica que DAG-125 se une al carboxilo-terminal de un tercio de  $\alpha$ -dístroglicano. También es posible una pequeña contribución del tercio medio de  $\alpha$ -dístroglicano. El ectodominio de  $\beta$ -dístroglicano no parece contribuir a la unión de DAG-125. Además, estos fragmentos se produjeron en condiciones en las que los polipéptidos no están glicosilados. Por lo tanto, las cadenas laterales de carbohidratos en el dístroglicano no son necesarias para su unión a DAG-125.

55 Por lo tanto, el principal dominio de unión está contenido en la región de aproximadamente 150 aminoácidos del dístroglicano. La ubicación de este dominio y la falta de un requisito de hidratos de carbono indican que el sitio de unión del  $\alpha$ -dístroglicano para el biglicano es distinto del que participa en la asociación con agrina, laminina y perlecán.

60 **Ejemplo 4: Identificación de DAG-125 como biglicano o un proteoglicano relacionado con el mismo**

Estos ejemplos demuestran que DAG-125 es un biglicano o una proteína relacionada con el mismo.

65 Se encontró que el DAG-125 purificaba de forma conjunta con membranas postsinápticas, pero que, sin embargo, era insoluble en todos los detergentes no iónicos analizados, incluyendo Triton X-100 y *n*-octil-P-D-glucopiranosido, que eficientemente extraen  $\alpha/\beta$ -dístroglicano de estas membranas (Bowe, y col., (1994) *Neuron*. 12: 1173; Deyst, y

col., (1995) J Biol Chem. 270: 25956-9). Incluso sin detergente, aproximadamente el 50 % de DAG-125 se pudo extraer a pH 11 y se logró una solubilización casi completa mediante un tratamiento corto con pH 12 (véase la figura 2A). De manera importante, DAG-125 permaneció soluble cuando se devolvió a pH neutro. Basándose en estas propiedades y en los hallazgos de que DAG-125 se une a columnas de heparina y sulfato de condroitina, se desarrolló el siguiente protocolo de purificación.

Las fracciones de membrana ricas en postsináptica se preextrajeron primero con n-octil-D-glucopiranosido 25 mM para eliminar las proteínas solubles en detergente. A continuación, se solubilizó DAG-125 mediante extracción alcalina (pH 12,0), como se describe en el Ejemplo 1. El extracto alcalino se diluyó en tampón SEN (Tris HCl 20 mM, NaCl 100 mM, 23 µg/ml de aprotinina, 0,5 µg/ml de leupeptina, benzamidina 5 mM, 0,7 µg/ml de pepstatina A, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM, 0,02 % de azida, 0,1 % de Tween 20, pH 7,6) y se centrifugó de nuevo para eliminar cualquier proteína que precipite tras la neutralización. El extracto permaneció en tampón SEN durante el resto de la purificación, modificando solo la concentración de NaCl como se indica. El extracto se pasó por una columna MAb3B3 (Bowe, y col., (1994) Neuron. 12: 1173) para eliminar el  $\alpha$ -dístroglicano. El flujo de la columna MAb3B3 se hizo pasar a través de una columna de lectina-agarosa combinada no unión a DAG-125 (aglutinina de cacahuete y aglutinina Ulex europea I, Vector Labs, Burlingame, CA) como un segundo preaclarado. El flujo continuo se aplicó a continuación a una columna de sulfato de condroitina-agarosa (CS-agarosa). La columna de CS-agarosa se preparó acoplado sulfato de condroitina B (Sigma, St. Louis, MO; # C-3788) a -aminohexil-agarosa (Sigma) activada con N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (Sigma). Después de la incubación con el flujo de la columna de lectina, la columna de CS se lavó extensamente y se eluyó con un gradiente de NaCl 0,1-2,0 M. DAG-125 eluyó en NaCl 0,3-0,65 M. Estas fracciones se combinaron, se diluyeron a NaCl 0,3 M y se aplicaron a una columna de heparina-agarosa (Sigma # H-0402). La columna se lavó y se eluyó con un gradiente de NaCl 0,3-2 M. DAG-125 eluyó en NaCl 0,6-0,85 M. Estas fracciones se combinaron, se concentraron mediante precipitación con etanol (pureza final de DAG-125 de aproximadamente 30 %), se redisolviéron en tampón de muestra SDS-PAGE, se separaron en un gel de gradiente de 5-15 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Una parte de la membrana de PVDF se analizó para DAG-125 mediante superposición de transferencia y el resto se tiñó transitoriamente con Ponceau S. Dos regiones ("U" y "L"; véase la Figura 5A) de la banda DAG-125 en la tinción membrana teñida con Ponceau membrana se escindieron y digirieron con tripsina. Los péptidos liberados se analizaron mediante HPLC usando una columna C8 y detección UV. Los perfiles de columna fueron virtualmente idénticos, lo que indica que la banda polidispersa se debe a la presencia de una única proteína glucosilada heterogéneamente.

Se recogieron tres péptidos del digerido con tripsina como fracciones del análisis de HPLC y se sometieron a degradación de Edman automatizada, como se ha descrito previamente (Bowe, y col., (1994) Neuron. 12: 1173). Las secuencias obtenidas se compararon con bases de datos públicas. La alineación de los péptidos DAG-125 de Torpedo para la secuencia deducida de biglicano humano (aminoácidos 241-249; 258-266; y 330-348) se muestran en la Figura 5B. El biglicano humano se describe en Fisher y col., (1989), *infra* y su secuencia de aminoácidos se exponen en la SEQ ID NO: 9. Todos los fragmentos de péptido DAG-125 fueron altamente homólogos al biglicano de mamífero, con una identidad global del 76 % (figura 5B). Por lo tanto, DAG-125 es un ortólogo de *Torpedo* de biglicano de mamífero o un homólogo cercano del mismo.

El biglicano humano, producido en el sistema vaccinia, como se describe a continuación, también se observó que se unía al alfa-dístroglicano. La unión fue menos fuerte que con DAG-125 de Torpedo, lo que probablemente refleje el hecho de que el biglicano producido en este sistema es una mezcla de biglicano central y biglicano proteoglicano. No obstante, esto respalda aún más el ortólogo de *Torpedo* de biglicano de mamífero o un homólogo cercano del mismo.

La estructura de dominio del biglicano humano se muestra en la figura 5C. El biglicano es uno de una familia de pequeñas proteínas con repeticiones ricas en leucina (Hocking y col., (1998) Matrix Biol. 17: 1). Consiste en un pre-pro-péptido que no está presente en el polipéptido maduro. Este dominio es seguido por una secuencia única corta con dos sitios de unión a sulfato de condroitina (mostrados como perlas apiladas en la figura). Hay dos pares y un par de cisteínas unidas por disulfuro en los dominios amino y carboxilo terminales, respectivamente. Finalmente, la mayor parte de la proteína está compuesta por 10 (u 11, dependiendo de la clasificación de la región dentro del par de cisteína carboxilo terminal) repeticiones ricas en leucina. La posición de los tres péptidos de *Torpedo* relativos a la secuencia humana se indica mediante líneas horizontales.

#### **Ejemplo 5:** Las cadenas de sulfato de condroitina de biglicano son necesarias para la unión de biglicano a $\alpha$ -dístroglicano

El biglicano de mamífero a menudo se sustituye por sulfato de condroitina. Para determinar si el biglicano de Torpedo es también un proteoglicano de sulfato de condroitina y si la glucosilación es importante para su unión a  $\alpha$ -dístroglicano, DAG-125 se digirió con diversas glucosidasas y glucosaminoglucanasas y los productos se analizaron mediante superposición de transferencia de ligando de  $\alpha$ -dístroglicano con <sup>35</sup>S-DG345-653.

Los tratamientos enzimáticos se llevaron a cabo en proteínas de membrana sináptica de órgano eléctrico de *Torpedo* a 37 °C durante la noche. Las enzimas, la concentración final, el proveedor y los números de catálogo se enumeran en la Tabla I. Todas las reacciones se realizaron en los inhibidores de proteasa presentes en el tampón

SEN, con la adición de EDTA 1 mM, N-etilmaleimida 10 mM y seroalbúmina de ratón al 0,8 %. Las condroitinasas (todas las formas) se tamponaron con Tris-acetato 100 mM (pH 8,0). La hialuronidasa y la queratanasa se tamponaron con acetato de sodio 50 mM (pH 5,0). Las heparinasas (I, II y III), la condro-4-sulfatasa y la condro-6-sulfatasa se tamponaron con NaPO<sub>4</sub> 10 mM (pH 7,4). N-glucanasa, O-glucanasa, neuraminidasa,  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa, P-N-acetilglucoasaminidasa se tamponaron con Tris HCl 50 mM (pH 7,3). Los tratamientos de control incluyeron tampones e inhibidores de proteasa sin enzimas adicionales.

Los resultados se muestran en la Figura 6 y en la Tabla I.

10

<b>Tabla I</b>				
Enzima	¿Inhibe la unión?	Enzima (Unidades/ml)	Fuente conc.	N.º de cat.
Chondroitinasa ABC	+	0,5	Sigma	C-2905
Chondroitinasa ABC + ZnCl <sub>2</sub> 5 mM	-	0,5	Sigma	C-2905
Chondroitinasa ABC, libre de proteasas+		0,5	Sigma	C-3667
Chondroitinasa ABC, libre de proteasas+		0,5	Roche	1080717
Chondroitinasa AC	+	0,5	Sigma	C-2780
Chondroitinasa B	+/-	25	Sigma	C-8058
Heparinasa I	-	25	Sigma	H-2519
Heparinasa II	-	5	Sigma	H-3812
Heparinasa III (Heparitinasa)	-	5	Sigma	H-8891
Condro-4-sulfatasa	+/-	0,5	Sigma	C-2655
Condro-6-sulfatasa	-	0,5	Sigma	C-2655
Queratanasa	-	0,02	Roche	982954
$\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa	-	2	Sigma	A-9763
$\beta$ -N-acetilglucoasaminidasa	-	8	Sigma	A-2264
N-Glicanasa	-	15	Genzyme	N-Gly-1
O-Glicanasa	-	0,03	Genzyme	B2950
Neuraminidasa	-	1	Genzyme	NSS-1

15

Los resultados indican que la eliminación de las cadenas laterales de sulfato de condroitina abolía la unión a  $\alpha$ -dístroglicano. La condroitinasa B (específica para el sulfato de dermatano) tuvo un efecto mucho menor en comparación con las condroitinasas que eliminaron el sulfato de condroitina A y C. Ningún otro tratamiento con glucosidasa o glucosaminoglicanasa tuvo un efecto detectable sobre la unión de  $\alpha$ -dístroglicano (véase la Tabla I). Varias líneas de evidencia indican que los efectos de la digestión con condroitinasa se deben a la actividad condroitinasa y no a las proteasas contaminantes: 1) las digestiones se realizaron en un cóctel de inhibidores de la proteasa; 2) se observó el mismo resultado con cuatro preparaciones diferentes de condroitinasa, incluidas dos que se purificaron por afinidad para eliminar las proteasas; y 3) el efecto se previno mediante la adición de Zn<sup>2+</sup> 5 mM, un inhibidor de condroitinasa pero no de proteasas.

20

Para investigar más a fondo las propiedades de unión del biglicano, se investigó la unión de  $\alpha$ -dístroglicano al biglicano derivado de una diversa fuentes, así como a la decorina, un pequeño proteoglicano rico en leucina que es aproximadamente un 50 % idéntico al biglicano.

25

El biglicano (o decorina) se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul brillante de Coomassie para la proteína (carriles 1-5 de la figura 7) o ensayo de superposición de transferencia para la unión a dístroglicano (carriles 6-10 de la figura 7): carriles 1,6: extracto alcalino de membranas sinápticas de *Torpedo* (1  $\mu$ g de proteína total, de las cuales se estima que el biglicano es < 2 %); carriles 2, 7: lisado de bacterias no inducidas; carriles 3, 8: lisado de bacterias inducidas que expresan el biglicano humano recombinante (QE-Bgn; banda prominente a ~37kD *-flecha*); carriles 4, 9: biglicano purificado a partir de cartílago articular bovino (4  $\mu$ g; Sigma); carriles 5, 10: decorina purificada de cartílago articular bovino (4  $\mu$ g; Sigma). Los resultados indican que el biglicano o la decorina presente en el órgano eléctrico se une a dístroglicano con mucha más fuerza que el biglicano o la decorina purificados del cartílago articular (compárese la tinción de Coomassie con la superposición de dístroglicano).

35

El biglicano humano recombinante se produjo de la siguiente manera. P16, un plásmido de clonación que consiste en Bluescript que contiene un ADNc que codifica biglicano humano (SEQ ID NO: 9) proporcionado por Larry Fisher (Instituto Nacional de Investigación Dental, Institutos Nacionales de Salud) (Fisher y col., (1989), citado anteriormente). La secuencia que codifica el péptido maduro secretado (aminoácidos 1-343) se amplificó por PCR y se subclonó en el vector de expresión bacteriana pQE9 (Qiagen, Valencia, CA). El plásmido resultante, pQE-biglicano, añade la secuencia MRGSHHHHHGS (SEQ ID NO: 10) al extremo amino. La proteína recombinante se produjo en la cepa M15 de *E. coli* [pREP4]. Las bacterias no inducidas proporcionan la proteína de control. Las bacterias inducidas o no inducidas se aislaron mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón de muestra de SDS-PAGE para su análisis por superposición de transferencia de ligando. Por lo tanto, el biglicano expresado en bacterias, que no contiene cadenas laterales de sulfato de condroitina, no se unió al  $\alpha$ -dístroglicano (figura 7), lo que concuerda con un requisito de cadenas de sulfato de condroitina. El biglicano purificado a partir de cartílago articular se unió a  $\alpha$ -dístroglicano de forma débil, incluso a una carga > 100 veces mayor que la utilizada para el análisis de biglicano de *Torpedo*. Estos hallazgos indican que se requieren cadenas específicas de sulfato de condroitina para

45

mediar la unión de  $\alpha$ -dístroglicano al biglicano.

Por lo tanto, el biglicano de las membranas sinápticas de *Torpedo* se sustituye por cadenas de sulfato de condroitina, que son predominantemente sulfato de condroitina A y/o C, y la sustitución del biglicano por sulfato de condroitina es necesaria para la unión a dístroglicano.

**Ejemplo 6:** El biglicano se une a los componentes del sarcoglicano

Este ejemplo describe que el núcleo de biglicano se une a los sarcoglicanos alfa y gamma y que el proteoglicano biglicano también se une a gamma-sarcoglicano, y que la decorina no se pudo unir a ninguno de los sarcoglicanos (no se observó un nivel detectable de unión).

La unión de biglicano y decorina a los diferentes componentes del sarcoglicano del DAPC se investigó mediante el ensayo de superposición utilizando sarcoglicanos humanos producidos de forma recombinante, en proteoglicano biglicano (núcleo y cadenas laterales), núcleo de biglicano (sin cadenas laterales), proteoglicano decorina (núcleo y cadenas laterales, núcleo de decorina (sin cadenas laterales), un híbrido entre el núcleo de biglicano y de decorina (el "híbrido" con cadenas laterales) y la fracción de la membrana de órgano eléctrico *Torpedo* (TEOM). El híbrido contenía los primeros 30 aminoácidos del biglicano humano (dominio rico en cisteína) y la porción restante de la molécula de biglicano se intercambió con la de la decorina. Los sarcoglicanos fueron producidos mediante transcripción y traducción in vitro usando un kit Promega TNT, como se describe en Ahn y Kunkel (1995) J. Cell Biol. 128: 363. El polipéptido y proteoglicano del núcleo de biglicano y decorina se produjeron de forma recombinante por la infección con virus vaccinia de células de osteosarcoma de rata, tal como se describe en Hocking y col., (1996) J. Biol. Chem. 271:19571. En resumen, la secuencia de ADNc que codifica la proteína del núcleo maduro del biglicano humano ligada a un casete de fusión de polihistidina bajo el control del promotor T7 se insertó en el vector pBGN4. Se insertó una región no traducida del virus de la encefalomiocarditis aguas abajo del promotor T7 para facilitar la unión del ribosoma independiente de la caperuza y, de ese modo, aumentar la eficacia de la traducción hasta 10 veces. El casete de fusión codifica la secuencia señal de insulina canina (INS), seis residuos de histidina consecutivos (POLYHIS) y el sitio de reconocimiento del factor Xa (Xa). Se generó un virus vaccinia recombinante, vBGNA, que codifica la construcción BGN4 regulada por T7, mediante un acontecimiento de recombinación homóloga entre el virus vaccinia de tipo salvaje y las secuencias flanqueantes de timidina quinasa en el plásmido, pBGN4. Hay dos aminoácidos adicionales entre la secuencia de polihistidina y el sitio del Factor Xa y dos aminoácidos adicionales entre el sitio del Factor Xa y el inicio de la secuencia de la proteína del núcleo maduro del biglicano. Por lo tanto, el vector contiene de 5' a 3': EMC UTR-INS-POLYHIS- [Glu-Ser] -Xa- [Leu-Glu] -biglicano maduro desprovisto de la secuencia señal de biglicano y la secuencia de propéptido). El biglicano que se produce con este sistema es una mezcla que contiene proteoglicano biglicano y biglicano desprovisto de cadenas de glucosaminoglicanos ("biglicano central").

Los ensayos de superposición se realizaron como se ha descrito anteriormente para DAG-125.

Los resultados que se muestran como las figuras 8 A-C, indican lo siguiente:  $\alpha$ -sarcoglicano se une al núcleo de biglicano y al híbrido;  $\gamma$ -sarcoglicano se une al núcleo de biglicano, a proteoglicano biglicano y muy débilmente al híbrido; y  $\delta$ -sarcoglicano se une al núcleo de biglicano muy débilmente.

Por lo tanto, el biglicano se une a -sarcoglicano a través de su péptido central. Además, dado que el híbrido se une a -sarcoglicano, pero la decorina no se une a él, la unión del biglicano al  $\alpha$ -sarcoglicano se produce a través de los 30 aminoácidos N-terminales del biglicano, es decir, la región que incluye la región rica en cisteína, pero no hay repeticiones ricas en leucina. Además, los resultados indican que la glucosilación de sarcoglicano no es necesaria para su unión a biglicano.

También se demostró que el biglicano humano se unía al sarcoglicano alfa y gamma nativo en solución. Esto se demostró aislando alfa-y gamma-sarcoglicano humano nativo mediante extracción con detergente de miotubos de ratón cultivados, incubando los extractos con biglicano central humano recombinante biglicano preparado como se ha descrito anteriormente y, a continuación, inmunoprecipitando los complejos resultantes se inmunoprecipitaron con anticuerpos para alfa-sarcoglicano (laboratorios de vectores). A continuación, los inmunoprecipitados se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y se sometieron a transferencia de tipo Western con anticuerpos contra biglicano. El anticuerpo anti-biglicano se generó contra una proteína de fusión de biglicano producida en bacterias. Los resultados que se muestran en la figura 8D, muestran que los sarcoglicanos nativos alfa y gamma se unen al biglicano.

**Ejemplo 7:** El biglicano se expresa en regiones sinápticas y no sinápticas y está regulado por aumento en el músculo dístrófico

En informes anteriores se ha demostrado que el ARNm de biglicano y la proteína se expresan en el músculo (Bianco, y col., (1990) J. Histochem Cytochem. 38: 1549; Bosse,y col., (1993) J. Histochem. Cytochem. 41: 13). Como el biglicano que se usó en los ejemplos descritos anteriormente se obtuvo a partir de membranas sinápticas, se investigó si el biglicano también se expresa en la unión neuromuscular.

Las secciones congeladas de músculo de ratón adulto normal se marcaron doblemente con  $\alpha$ -bungarotoxina (Bgtx; para localizar AChR) y con anticuerpos contra biglicano. Las secciones de criostato (10  $\mu$ m) del músculo de la pata de ratones de tipo salvaje (C57 BL) recién congelados se montaron en portaobjetos, se fijaron y se trataron con condroitinasa, esencialmente como se describe en (Bianco, P., y col., 1990, J Histochem Cytochem. 38:1549). Los anticuerpos primarios fueron anti-biglicano (LF-106; proporcionados generosamente por L. Fisher) diluidos en PBS que contenía 5 % de BSA, 1 % de suero normal de cabra o de caballo y 0,1 % de Triton X-100. La incubación en anticuerpos primarios o suero no inmunitario de control continuó durante la noche a 4 °C. Excepto donde se indica, todas las etapas posteriores se realizaron a temperatura ambiente. Los anticuerpos unidos se detectaron con Ig anti-conejo marcada con Cy3 (Jackson Laboratories, West Grove, PA). Para el doble marcado, las secciones se fijaron primero durante 5 minutos en formaldehído al 1 %, se aclararon y se incubaron en  $\alpha$ -bungarotoxina conjugada con fluoresceína (Molecular Probes, Eugene OR) durante 1 hora. A continuación, las secciones se lavaron, se fijaron, se trataron con condroitinasa y se tiñeron para biglicano, tal como se ha descrito anteriormente. Las secciones se secaron al aire, se montaron en Citifluor (Ted Pella, Redding, CA) y se examinaron en un microscopio Nikon Eclipse. Las imágenes se adquirieron en una cámara CCD enfriada utilizando el software IP Lab Spectrum y después se importaron a Adobe Photoshop.

Los resultados que se muestran en la figura 9, indican que la inmunoreactividad de biglicano se distribuye en toda la periferia de las miofibras y las sinapsis y que también se concentra en algunas uniones neuromusculares.

Dado que el biglicano se une a un componente del DAPC, se investigó si su expresión estaba alterada o no en un modelo de ratón de distrofia muscular en el que la distrofina está ausente, es decir, el ratón *mdx*. Se investigaron ratones adultos que contenían fibras musculares casi exclusivamente regeneradas que sobreviven debido a la compensación de utrofina (Grady, y col., (1997) Cell 90: 729). Las secciones congeladas de músculo normal y *mdx* de ratones de 6 semanas de edad se montaron en los mismos portaobjetos y se inmunotñeron para biglicano, tal como se ha descrito anteriormente. La inmunotinción reveló que el nivel de biglicano expresado en músculo *mdx* es elevado en comparación con los animales de control (Figura 10). Estas observaciones aumentan la posibilidad de que el biglicano pueda ser parte del mecanismo compensatorio que permite la supervivencia de las fibras musculares negativas para distrofina.

#### 30 **Ejemplo 8: El biglicano se une al ectodominio de MuSK**

Este ejemplo demuestra que biglicano se une a otros componentes de la membrana sináptica, en particular, el ectodominio de MuSK.

El biglicano *Torpedo* (DAG-125) se solubilizó mediante extracción alcalina y se neutralizó, como se describe en el Ejemplo 1 y se incubó con perlas de proteína A-agarosa y con IgG humana (HlgG) o con proteínas de fusión Fc humanas que contenían los ectodominios de MuSK humana recombinante (Glass y col., (1996) Cell; y Donzuela y col., (1995) Neuron), TIE-2, o TRK para las coprecipitaciones. Los resultados que se muestran en la figura 11, indican que el biglicano *Torpedo* se une al ectodominio de MuSK, pero no a IgG, ni a los dos ectodominios de receptores tirosina quinasa no relacionados TIE-2 y TRK. También se demostró que MuSK solubilizada a partir de membranas musculares se une al biglicano *Torpedo*. También se demostró que la decorina se unía a MuSK.

Por lo tanto, DAG-125 se une a MuSK.

#### 45 **Ejemplo 9: Las preparaciones de biglicano potencian el agrupamiento de AChR en los miotubos**

Este ejemplo demuestra que el biglicano potencia el agrupamiento de AChR inducido por agrina.

Los miotubos primarios de pollo se incubaron durante 20 horas con núcleo de biglicano recombinante (sin GAG) con o sin la adición de 1 unidad (aproximadamente 10 pM) de la isoforma 12-4-8 de agrina de rata recombinante. Los cultivos incubados en 1 nM de biglicano + agrina aumentaron el agrupamiento de AChR en un promedio de 50 % con respecto a los cultivos incubados en 1 unidad de agrina solamente. Las concentraciones más altas de biglicano no tuvieron ningún efecto o posiblemente inhibieron el agrupamiento inducido por agrina. En otro ejemplo, también se descubrió que las preparaciones exógenas enriquecidas con biglicano (aproximadamente un 30 % de pureza) potencian el agrupamiento de AChR inducido por agrina cuando se aplica a miotubos de pollo cultivados.

Por lo tanto, el biglicano (aumento del 50 %) potencia el agrupamiento de AChR inducido por agrina cuando está presente a aproximadamente  $10^{-9}$  M (es decir, aproximadamente 1,4 nM). A concentraciones más altas ( $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M, es decir, aproximadamente 140nM) el biglicano inhibe el agrupamiento de AChR inducido por agrina. Esto se demostró en miotubos de pollo de tipo salvaje, que se prepararon tal como se describe en Nastuk y col., 1991 (Neuron 7: 807-818), usando biglicano central o de proteoglicano recombinante humano, producido por el sistema vaccinia, descrito anteriormente. Por lo tanto, hay un efecto bifásico del biglicano sobre el agrupamiento de AChR inducido por agrina.

#### 65 **Ejemplo 10: Biglicano y decorina inducen la fosforilación de tirosina de MuSK**

El cultivo de miotubos de pollo con agrina dio como resultado, como se esperaba, la estimulación de la fosforilación de MuSK. Se observó que la estimulación de miotubos de pollo con proteoglicano biglicano humano, decorina-proteoglicano, núcleo de biglicano y núcleo de decorina (por separado) también inducen la fosforilación de tirosina de MusK sobre las células musculares. La fosforilación se determinó mediante inmunoprecipitación y transferencia de tipo Western usando un anticuerpo anti-fosfotirosina. El biglicano y decorina proteoglicano se produjeron mediante el sistema vaccinia descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 12.

De manera similar al agrupamiento de AChR inducido por agrina, la fosforilación de MuSK inducida por agrina también se mostró bifásica: el núcleo de biglicano humano puede potenciar (a 1,4 nM) o inhibir (a 140 nM) la fosforilación de MuSK inducida por agrina en miotubos C2C12 cultivados.

**Ejemplo 11:** Los miotubos cultivados de ratones biglicano<sup>-/-</sup> muestran una respuesta defectuosa a agrina

El papel del biglicano en la mediación del agrupamiento de AChR inducido por agrina se demostró adicionalmente mediante el uso de ratones defectuosos en biglicano (ratones macho biglicano<sup>-/-</sup>).

Los ratones biglicano<sup>-/-</sup> los ratones fueron generados por Marian Young en el NIH. El genotipado de PCR de los ratones se realizó en ADN genómico usando pares de cebadores específicos para los alelos de biglicano mutantes y de tipo salvaje (Xu y col., (1998) Nat.Genet. 20:78). Los productos de PCR de ratón de tipo salvaje (macho; +/o), un heterocigoto (hembra; +/-) y un defectivo (macho;-/o) se muestran en la Figura 13A.

UN *Bgn* hembra (+/-) se apareó con un *Bgn* macho (+/o) y se establecieron cultivos y primarios de cada cachorro macho en la camada resultante. El genotipo de cada cachorro se determinó como se describe en el párrafo anterior. Los cultivos de miotubo derivados de cada ratón se trataron después con o sin agrina recombinante 4,8 durante 18 horas. La agrina 4.8 es una variante sometida alternativamente a corte y empalme, que tiene un inserto de cuatro aminoácidos en el sitio Y y un inserto de ocho aminoácidos en el sitio Z (véase, por ejemplo, Iozzo R.I (1998) Ann. Rev. Biochem. 67:609 y Firms y col., (1993) Neuron 11:491). A continuación, se marcaron con rodamina - bungarotoxina para visualizar los AChR. Como se muestra en la Figura 13B, el agrupamiento de AChR inducido por agrina en los miotubos del biglicano<sup>-/-</sup> se reducen en gran medida en comparación con los de los controles de camada de tipo salvaje. Por lo tanto, estos resultados proporcionan pruebas fuertes y directas del papel de biglicano en el agrupamiento de AChR inducido por agrina.

La figura 13C muestra una cuantificación del agrupamiento de AChR. Los agrupamientos de AChR y los miotubos se contaron en un mínimo de 10 campos para cultivos tratados con (AGRINA) o sin (Con) agrina recombinante 4.8.

**Ejemplo 12:** Recuperación de la respuesta a agrina en ratones biglicano<sup>-/-</sup> mediante la adición de biglicano recombinante

Este ejemplo muestra que la respuesta defectuosa del agrupamiento de AChR en ratones biglicano<sup>-/-</sup> en respuesta a agrina se pueden rescatar mediante la adición de núcleo de biglicano humano recombinante exógeno.

Esto se demostró añadiendo 1,4 nM (0,05 microgramos/ml) de biglicano central humano recombinante, producido en el sistema vaccinia descrito anteriormente, a los cultivos de miotubos biglicano<sup>-/-</sup> descritos en el Ejemplo 11. El agrupamiento de AchR se midió como se determina en el Ejemplo 11.

Los resultados que se presentan en la figura 13B, indican que la adición de núcleo de biglicano restaura la respuesta de los miotubos de biglicano<sup>-/-</sup> a la agrina.

Por lo tanto, este experimento demuestra la importancia del biglicano en el agrupamiento de AChR inducido por agrina. Además, dado que este ejemplo se realizó con biglicano central, es decir, sin cadenas laterales de proteoglicano, este ejemplo demuestra que el núcleo es particularmente importante para la diferenciación postsináptica inducida por agrina. Esto demuestra además que el biglicano afecta a una célula simplemente poniendo en contacto la célula con biglicano.

**Ejemplo 13:** La creatina quinasa sérica está elevada en ratones defectivos para biglicano

Se analizaron los niveles séricos de creatina quinasa (CK) de cuatro ratones (dos machos, dos hembras) de 16 semanas de edad. Como se muestra en la figura 15, los niveles de CK de los ratones defectivos para biglicano son aproximadamente 10 veces mayores que los de los ratones de tipo salvajes. Los sueros de otros tres ratones hembra de tipo salvaje tenían niveles de CK similares a los de estos machos de tipo salvaje.

Por lo tanto, aunque los ratones biglicano<sup>-/-</sup> no muestran anomalías macroscópicas (Xu y col., (1998) Nat. Genet. 20:78), la expresión de distrofina y utrofina no es muy anormal y las sinapsis también parecen extremadamente normales, tienen un nivel anormalmente alto de CK, en relación con los animales de tipo salvaje. Tales elevaciones son un sello distintivo del daño de las células musculares, como el que se observa en la distrofia muscular (Emery (1993), Duchenne Muscular Dystrophy Oxford Monographs on Medical Genetics. Oxford: New York. Oxford Univ.

Press). Además, estos ratones presentan membranas permeables, según la absorción de Evans Blue, y muestran signos de muerte y regeneración de las células musculares a juzgar por la presencia de miofibras con núcleos localizados centralmente en el adulto. Por lo tanto, estos resultados indican que es probable que la membrana plasmática de la célula muscular se vea comprometida en estos animales. Estas observaciones, junto con la restauración del agrupamiento de AChR inducido por agrina en miotubos de ratones biglicano<sup>-/-</sup> mediante la adición de biglicano, sugieren fuertemente que la ausencia de biglicano o la presencia de un biglicano defectuoso da como resultado una membrana muscular y/o nerviosa defectuosa que puede restaurarse mediante la adición de biglicano exógeno.

10 **Ejemplo 14:** El núcleo de biglicano estimula la fosforilación de tirosina dependiente de MuKD de alfa-sarcoglicano y un componente del DAPC de 35 kD en los miotubos

Este ejemplo demuestra que el biglicano induce la fosforilación de la tirosina de los componentes del DAPC y, por lo tanto, tiene una función de señalización.

15 El biglicano humano se preparó usando el sistema de vaccinia descrito anteriormente. Se incubaron miotubos de tipo salvaje o miotubos defectuosos en MuSK durante 30 minutos en presencia de 1 microgramo/ml (27 nM) de una mezcla de formas de proteoglicano central de biglicano humano. Los cultivos se extrajeron con detergente y el alfa-sarcoglicano se inmunoprecipitó, se separó mediante SDS-PAGE, se transfirió y se aplicaron sondas de anticuerpo anti-fosfotirosina o MIgG. Los resultados que se presentan en la figura 15, muestran que la fosforilación de tirosina del alfa-sarcoglicano aumenta en presencia de biglicano en células de tipo salvaje, pero no en miotubos defectuosos en MuSK. Además, se observó que un componente de DAPC de 35 kD no identificado también se fosforilaba en las células de tipo salvaje pero no en los miotubos defectuosos en MuSK. Además, los resultados muestran que el biglicano es capaz de una función de señalización, en ausencia de agrina.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Fallon, Justin  
McKechnie, Beth  
Rafii, Michael  
Creely, Hklliary  
Bowe, Mark  
Ferri, Raymond

35 <120> Biglicano y terapéuticas relacionadas y procedimientos de uso

<130> BUV-006.01

<150> 60/166.253

40 <151> 18-11-1999

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.0

45 <210> 1

<211> 1685

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50 <220>

<221> CDS

<222> (121)..(1227)

55 <400> 1



ES 2 658 066 T3

cca ttc atg atg aac gat gag gaa gct tcg ggc gct gac acc tca ggc  
264

Pro Phe Met Met Asn Asp Glu Glu Ala Ser Gly Ala Asp Thr Ser Gly

35

40

45

gtc ctg gac ccg gac tct gtc aca ccc acc tac agc gcc atg tgt cct  
312

Val Leu Asp Pro Asp Ser Val Thr Pro Thr Tyr Ser Ala Met Cys Pro

50

55

60

ttc ggc tgc cac tgc cac ctg cgg gtg gtt cag tgc tcc gac ctg ggt  
360

Phe Gly Cys His Cys His Leu Arg Val Val Gln Cys Ser Asp Leu Gly

65

70

75

80

ctg aag tct gtg ccc aaa gag atc tcc cct gac acc acg ctg ctg gac  
408

Leu Lys Ser Val Pro Lys Glu Ile Ser Pro Asp Thr Thr Leu Leu Asp

85

90

95

ctg cag aac aac gac atc tcc gag ctc cgc aag gat gac ttc aag ggt  
456

Leu Gln Asn Asn Asp Ile Ser Glu Leu Arg Lys Asp Asp Phe Lys Gly

100

105

110

ctc cag cac ctc tac gcc ctc gtc ctg gtg aac aac aag atc tcc aag  
504

Leu Gln His Leu Tyr Ala Leu Val Leu Val Asn Asn Lys Ile Ser Lys

115

120

125

atc cat gag aag gcc ttc agc cca ctg cgg aag ctg cag aag ctc tac  
552

Ile His Glu Lys Ala Phe Ser Pro Leu Arg Lys Leu Gln Lys Leu Tyr

ES 2 658 066 T3

130	135	140
atc tcc aag aac cac ctg gtg gag atc ccg ccc aac cta ccc agc tcc		
600		
Ile Ser Lys Asn His Leu Val Glu Ile Pro Pro Asn Leu Pro Ser Ser		
145	150	155
ctg gtg gag ctc cgc atc cac gac aac cgc atc cgc aag gtg ccc aag		
648		
Leu Val Glu Leu Arg Ile His Asp Asn Arg Ile Arg Lys Val Pro Lys		
	165	170
gga gtg ttc agc ggg ctc cgg aac atg aac tgc atc gag atg ggc ggg		
696		
Gly Val Phe Ser Gly Leu Arg Asn Met Asn Cys Ile Glu Met Gly Gly		
	180	185
aac cca ctg gag aac agt ggc ttt gaa cct gga gcc ttc gat ggc ctg		
744		
Asn Pro Leu Glu Asn Ser Gly Phe Glu Pro Gly Ala Phe Asp Gly Leu		
	195	200
aag ctc aac tac ctg cgc atc tca gag gcc aag ctg act ggc atc ccc		
792		
Lys Leu Asn Tyr Leu Arg Ile Ser Glu Ala Lys Leu Thr Gly Ile Pro		
210	215	220
aaa gac ctc cct gag acc ctg aat gaa ctc cac cta gac cac aac aaa		
840		
Lys Asp Leu Pro Glu Thr Leu Asn Glu Leu His Leu Asp His Asn Lys		
225	230	235
atc cag gcc atc gaa ctg gag gac ctg ctt cgc tac tcc aag ctg tac		
888		
Ile Gln Ala Ile Glu Leu Glu Asp Leu Leu Arg Tyr Ser Lys Leu Tyr		

ES 2 658 066 T3

245	250	255
agg ctg ggc cta ggc cac aac cag atc agg atg atc gag aac ggg agc		
936		
Arg Leu Gly Leu Gly His Asn Gln Ile Arg Met Ile Glu Asn Gly Ser		
260	265	270
ctg agc ttc ctg ccc acc ctc cgg gag ctc cac ttg gac aac aac aag		
984		
Leu Ser Phe Leu Pro Thr Leu Arg Glu Leu His Leu Asp Asn Asn Lys		
275	280	285
ttg gcc agg gtg ccc tca ggg ctc cca gac ctc aag ctc ctc cag gtg		
1032		
Leu Ala Arg Val Pro Ser Gly Leu Pro Asp Leu Lys Leu Leu Gln Val		
290	295	300
gtc tat ctg cac tcc aac aac atc acc aaa gtg ggt gtc aac gac ttc		
1080		
Val Tyr Leu His Ser Asn Asn Ile Thr Lys Val Gly Val Asn Asp Phe		
305	310	315
tgt ccc atg ggc ttc ggg gtg aag cgg gcc tac tac aac ggc atc agc		
1128		
Cys Pro Met Gly Phe Gly Val Lys Arg Ala Tyr Tyr Asn Gly Ile Ser		
325	330	335
ctc ttc aac aac ccc gtg ccc tac tgg gag gtg cag ccg gcc act ttc		
1176		
Leu Phe Asn Asn Pro Val Pro Tyr Trp Glu Val Gln Pro Ala Thr Phe		
340	345	350
cgc tgc gtc act gac cgc ctg gcc atc cag ttt ggc aac tac aaa aag		
1224		

ES 2 658 066 T3

Arg Cys Val Thr Asp Arg Leu Ala Ile Gln Phe Gly Asn Tyr Lys Lys

355

360

365

tag aggcagctgc agccaccgcg gggcctcagt gggggctctct ggggaacaca  
1277

gccagacatc ctgatgggga ggcagagcca ggaagctaag ccagggccca gctgcgtcca  
1337

accagcccc ccacctcagg tccctgacct cagctcgatg ccccatcacc gcctctcct  
1397

ggctcccaag ggtgcaggtg ggcgcaaggc ccggcccca tcacatgttc ccttggcctc  
1457

agagctgccc ctgctctccc accacagcca cccagaggca ccccatgaag cttttttctc  
1517

gttcaactccc aaaccaagt gtccaaagct ccagtcctag gagaacagtc cctgggtcag  
1577

cagccaggag gcggtccata agaatgggga cagtgggctc tgccagggt gccgcacctg  
1637

tccagaacaa catgttctgt tctcctcct catgcatttc cagccttg  
1685

<210> 2

<211> 368

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Trp Pro Leu Trp Arg Leu Val Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gln Ala  
1 5 10 15

Leu Pro Phe Glu Gln Arg Gly Phe Trp Asp Phe Thr Leu Asp Asp Gly  
20 25 30

Pro Phe Met Met Asn Asp Glu Glu Ala Ser Gly Ala Asp Thr Ser Gly  
35 40 45

10

ES 2 658 066 T3

Val Leu Asp Pro Asp Ser Val Thr Pro Thr Tyr Ser Ala Met Cys Pro  
50 55 60

Phe Gly Cys His Cys His Leu Arg Val Val Gln Cys Ser Asp Leu Gly  
65 70 75 80

Leu Lys Ser Val Pro Lys Glu Ile Ser Pro Asp Thr Thr Leu Leu Asp  
85 90 95

Leu Gln Asn Asn Asp Ile Ser Glu Leu Arg Lys Asp Asp Phe Lys Gly  
100 105 110

Leu Gln His Leu Tyr Ala Leu Val Leu Val Asn Asn Lys Ile Ser Lys  
115 120 125

Ile His Glu Lys Ala Phe Ser Pro Leu Arg Lys Leu Gln Lys Leu Tyr  
130 135 140

Ile Ser Lys Asn His Leu Val Glu Ile Pro Pro Asn Leu Pro Ser Ser  
145 150 155 160

Leu Val Glu Leu Arg Ile His Asp Asn Arg Ile Arg Lys Val Pro Lys  
165 170 175

Gly Val Phe Ser Gly Leu Arg Asn Met Asn Cys Ile Glu Met Gly Gly  
180 185 190

Asn Pro Leu Glu Asn Ser Gly Phe Glu Pro Gly Ala Phe Asp Gly Leu  
195 200 205

Lys Leu Asn Tyr Leu Arg Ile Ser Glu Ala Lys Leu Thr Gly Ile Pro  
210 215 220

Lys Asp Leu Pro Glu Thr Leu Asn Glu Leu His Leu Asp His Asn Lys  
225 230 235 240

ES 2 658 066 T3

Ile Gln Ala Ile Glu Leu Glu Asp Leu Leu Arg Tyr Ser Lys Leu Tyr  
 245 250 255

Arg Leu Gly Leu Gly His Asn Gln Ile Arg Met Ile Glu Asn Gly Ser  
 260 265 270

Leu Ser Phe Leu Pro Thr Leu Arg Glu Leu His Leu Asp Asn Asn Lys  
 275 280 285

Leu Ala Arg Val Pro Ser Gly Leu Pro Asp Leu Lys Leu Leu Gln Val  
 290 295 300

Val Tyr Leu His Ser Asn Asn Ile Thr Lys Val Gly Val Asn Asp Phe  
 305 310 315 320

Cys Pro Met Gly Phe Gly Val Lys Arg Ala Tyr Tyr Asn Gly Ile Ser  
 325 330 335

Leu Phe Asn Asn Pro Val Pro Tyr Trp Glu Val Gln Pro Ala Thr Phe  
 340 345 350

Arg Cys Val Thr Asp Arg Leu Ala Ile Gln Phe Gly Asn Tyr Lys Lys  
 355 360 365

REIVINDICACIONES

1. Biglicano para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección asociada a un complejo anormal de proteína asociada a distrofina (DAPC) en células de un sujeto, en donde dicha afección se selecciona del grupo que consiste en (i) una enfermedad neuromuscular; (ii) esclerosis lateral amiotrófica; (ii) atrofia muscular espinal; (iv) una distrofia muscular; y (v) atrofia muscular.
2. Biglicano para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección, **caracterizado por** una unión neuromuscular anormal en un sujeto, en donde la afección es una enfermedad neuromuscular.
3. Un procedimiento para determinar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una afección asociada a un DAPC anormal o a sinapsis o uniones neuromusculares anormales, que comprende determinar el nivel o la actividad de biglicano, en donde la presencia de un nivel y/o una actividad anormales de biglicano en el tejido de un sujeto indica que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una afección asociada a un DAPC anormal o a uniones neuromusculares anormales; en donde dicha afección se selecciona del grupo que consiste en (i) una enfermedad neuromuscular; (ii) esclerosis lateral amiotrófica; (ii) atrofia muscular espinal; (iv) una distrofia muscular; y (v) atrofia muscular.
4. El biglicano para su uso de las reivindicaciones 1 o 2, o el procedimiento de la reivindicación 3, en donde el biglicano no comprende cadenas laterales de glucosaminoglicano (GAG).
5. El biglicano para su uso de las reivindicaciones 1 o 2, o el procedimiento de la reivindicación 3, en donde el biglicano comprende cadenas laterales de glucosaminoglicano (GAG).
6. Un ácido nucleico que codifica un biglicano para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección asociada a un complejo de proteína asociado a distrofina anormal (DAPC) en las células de un sujeto, en donde dicha afección se selecciona del grupo que consiste en (i) una enfermedad neuromuscular; (ii) esclerosis lateral amiotrófica; (ii) atrofia muscular espinal; (iv) una distrofia muscular; y (v) atrofia muscular.
7. El biglicano o el ácido nucleico para su uso o el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-6, en donde la afección se caracteriza por la descomposición de las membranas de las células musculares.
8. El biglicano o el ácido nucleico para su uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-6, en donde la afección es esclerosis lateral amiotrófica o atrofia muscular espinal.
9. El biglicano o el ácido nucleico para su uso o el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-7, en donde la afección es una distrofia muscular.
10. El biglicano o el ácido nucleico para su uso o el procedimiento de la reivindicación 9, en donde la distrofia muscular se selecciona del grupo que consiste en distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular congénita, distrofia muscular de la cintura y extremidades y distrofia miotónica.
11. El biglicano o el ácido nucleico para su uso o el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-7, en donde la afección es una atrofia muscular.
12. El biglicano para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la afección es caquexia.
13. Un procedimiento para identificar un agente que modula la interacción entre  $\alpha$ -distroglicano y biglicano, que comprende poner en contacto un péptido  $\alpha$ -distroglicano con biglicano o una porción del mismo suficiente para unirse a  $\alpha$ -distroglicano y un compuesto de ensayo en condiciones en las cuales el péptido  $\alpha$ -distroglicano y el biglicano interaccionan en ausencia del compuesto de ensayo, en donde una diferencia en el nivel de unión entre el péptido  $\alpha$ -distroglicano y el biglicano en presencia del compuesto de ensayo con respecto a la ausencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un agente que modula la interacción entre  $\alpha$ -distroglicano y biglicano.
14. Un procedimiento para identificar un agente que modula la interacción entre  $\alpha$ -sarcoglicano y biglicano, que comprende poner en contacto un péptido  $\alpha$ -distroglicano con biglicano o una porción del mismo suficiente para unirse al péptido  $\alpha$ -distroglicano y un compuesto de ensayo en condiciones en las cuales el péptido  $\alpha$ -distroglicano y el biglicano interaccionan en ausencia del compuesto de ensayo, en donde una diferencia en el nivel de unión entre el péptido  $\alpha$ -sarcoglicano y el biglicano en presencia del compuesto de ensayo con respecto a la ausencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un agente que modula la interacción entre  $\alpha$ -sarcoglicano y biglicano.
15. Un procedimiento para identificar un agente que modula la interacción entre MuSK y biglicano, que comprende poner en contacto biglicano con MuSK o una porción del mismo suficiente para unirse a biglicano y un compuesto de ensayo en condiciones en las cuales el biglicano y MuSK interaccionan en ausencia del compuesto de ensayo, en

donde una diferencia en el nivel de unión entre el biglicano y MuSK en presencia del compuesto de ensayo con respecto a la ausencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un agente que modula la interacción entre biglicano y MuSK.

5 16. Un procedimiento para identificar un compuesto que modula la fosforilación de alfa-sarcoglicano o MuSK por biglicano en una célula, que comprende poner en contacto una célula que comprende alfa-sarcoglicano o MuSK con biglicano y un compuesto y determinar el nivel de fosforilación de alfa-sarcoglicano o MuSK, respectivamente, en donde una diferencia en el nivel de fosforilación de alfa-sarcoglicano o MuSK en presencia con respecto a la ausencia del compuesto indica que el compuesto modula la fosforilación de alfa-sarcoglicano o MuSK por biglicano.

10 17. El biglicano o el ácido nucleico para su uso o el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el biglicano comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 90 % a una porción de biglicano y que tiene al menos una actividad biológica de biglicano.

15 18. El biglicano o el ácido nucleico para su uso o el procedimiento de la reivindicación 17, en donde la porción de biglicano es uno o más motivos de repetición de 24 aminoácidos en la repetición rica en leucina (LRR) del biglicano humano que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```
mwplwrlvsl lalsqalpfe qrgfwdftld dgpffmndee asgadtsgvl dpdsvtptys
amcpfgchch lrvvqcsdlg lksvpkeisp dtllldlqnn diselrkddf kglqhlyalv
lvnnkiskih ekafsplrkl qklyisknhl veippnlpss lvelrihdnr irkvpkgvfs
glrnmnciem ggnplensgf epgafdglkl nylriseakl tgipkdlpet lnelhldhnk
iqaieledll rysklyrlgl ghnqirmien gslsflptlr elhldnnkla rvpsglpdlk
llqvvylyhsn nitkvgvndf cpmgfgvkra yyngislfnn pvywvqpa tfrcvtdrla
iqfgnykk
```

20 19. El biglicano o el ácido nucleico para su uso o el procedimiento de la reivindicación 18, en donde el biglicano comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una o más LLR de biglicano humano que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```
mwplwrlvsl lalsqalpfe qrgfwdftld dgpffmndee asgadtsgvl dpdsvtptys
amcpfgchch lrvvqcsdlg lksvpkeisp dtllldlqnn diselrkddf kglqhlyalv
lvnnkiskih ekafsplrkl qklyisknhl veippnlpss lvelrihdnr irkvpkgvfs
glrnmnciem ggnplensgf epgafdglkl nylriseakl tgipkdlpet lnelhldhnk
iqaieledll rysklyrlgl ghnqirmien gslsflptlr elhldnnkla rvpsglpdlk
llqvvylyhsn nitkvgvndf cpmgfgvkra yyngislfnn pvywvqpa tfrcvtdrla
iqfgnykk
```

25 20. El biglicano o el ácido nucleico para su uso o el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 5-19, en donde el biglicano se une a alfa-distroglicano.

30 21. El biglicano o el ácido nucleico para su uso o el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el biglicano se une a un alfa-sarcoglicano y/o a gamma-sarcoglicano.

35 22. El biglicano o el ácido nucleico para su uso o el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el biglicano estimula la fosforilación del alfa-sarcoglicano sobre una membrana celular.

23. El procedimiento, biglicano o el ácido nucleico de cualquier reivindicación anterior, en donde el biglicano comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

```
mwplwrlvsl lalsqalpfe qrgfwdftld dgpffmndee asgadtsgvl dpdsvtptys
amcpfgchch lrvvqcsdlg lksvpkeisp dtllldlqnn diselrkddf kglqhlyalv
lvnnkiskih ekafsplrkl qklyisknhl veippnlpss lvelrihdnr irkvpkgvfs
glrnmnciem ggnplensgf epgafdglkl nylriseakl tgipkdlpet lnelhldhnk
iqaieledll rysklyrlgl ghnqirmien gslsflptlr elhldnnkla rvpsglpdlk
llqvvylyhsn nitkvgvndf cpmgfgvkra yyngislfnn pvywvqpa tfrcvtdrla
iqfgnykk
```

40 24. El procedimiento, biglicano o el ácido nucleico de las reivindicaciones 1-25, en donde el biglicano comprende una

secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácidos:

```
mwplwrlvsl lalsqalpfe qrgfwdftld dgpffmmndee asgadtsgvl dpdsvtptys
amcpfgchch lrvvqcsdlg lksvpkeisp dtllldlqnn diselrkddf kglqhlyalv
lvnnkiskih ekafsplrkl qklyisknhl veippnlpss lvelrihdnr irkvpkgvfs
glrnmnciem ggnplensgf epgafdglkl nylriseakl tgipkdlpet lnelhldhnk
iqaieledll rysklyrlgl ghnqirmien gslsflptlr elhldnnkla rvpsglpdlk
llqvvyhlsn nitkvgvndf cpmgfgvkra yyngislfnn pvpywevqpa tfrcvtdrla
iqfgnykk
```

- 5 25. El procedimiento, biglicano o el ácido nucleico de cualquier reivindicación anterior, en donde el biglicano comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a los aminoácidos 20-365 de:

```
mwplwrlvsl lalsqalpfe qrgfwdftld dgpffmmndee asgadtsgvl dpdsvtptys
amcpfgchch lrvvqcsdlg lksvpkeisp dtllldlqnn diselrkddf kglqhlyalv
lvnnkiskih ekafsplrkl qklyisknhl veippnlpss lvelrihdnr irkvpkgvfs
glrnmnciem ggnplensgf epgafdglkl nylriseakl tgipkdlpet lnelhldhnk
iqaieledll rysklyrlgl ghnqirmien gslsflptlr elhldnnkla rvpsglpdlk
llqvvyhlsn nitkvgvndf cpmgfgvkra yyngislfnn pvpywevqpa tfrcvtdrla
iqfgnykk
```

- 10 26. El procedimiento, biglicano o el ácido nucleico de cualquier reivindicación anterior, en donde el biglicano comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a los aminoácidos 38-365 de:

```
mwplwrlvsl lalsqalpfe qrgfwdftld dgpffmmndee asgadtsgvl dpdsvtptys
amcpfgchch lrvvqcsdlg lksvpkeisp dtllldlqnn diselrkddf kglqhlyalv
lvnnkiskih ekafsplrkl qklyisknhl veippnlpss lvelrihdnr irkvpkgvfs
glrnmnciem ggnplensgf epgafdglkl nylriseakl tgipkdlpet lnelhldhnk
iqaieledll rysklyrlgl ghnqirmien gslsflptlr elhldnnkla rvpsglpdlk
llqvvyhlsn nitkvgvndf cpmgfgvkra yyngislfnn pvpywevqpa tfrcvtdrla
iqfgnykk
```

- 15 27. El procedimiento, biglicano o el ácido nucleico de cualquier reivindicación anterior, en donde el biglicano comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a los aminoácidos 38-365 de:

```
mwplwrlvsl lalsqalpfe qrgfwdftld dgpffmmndee asgadtsgvl dpdsvtptys
amcpfgchch lrvvqcsdlg lksvpkeisp dtllldlqnn diselrkddf kglqhlyalv
lvnnkiskih ekafsplrkl qklyisknhl veippnlpss lvelrihdnr irkvpkgvfs
glrnmnciem ggnplensgf epgafdglkl nylriseakl tgipkdlpet lnelhldhnk
iqaieledll rysklyrlgl ghnqirmien gslsflptlr elhldnnkla rvpsglpdlk
llqvvyhlsn nitkvgvndf cpmgfgvkra yyngislfnn pvpywevqpa tfrcvtdrla
iqfgnykk
```

- 20 28. El biglicano para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la distrofia muscular se selecciona del grupo que consiste en distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular congénita, distrofia muscular de la cintura y las extremidades, distrofia miotónica y cardiomiopatía.

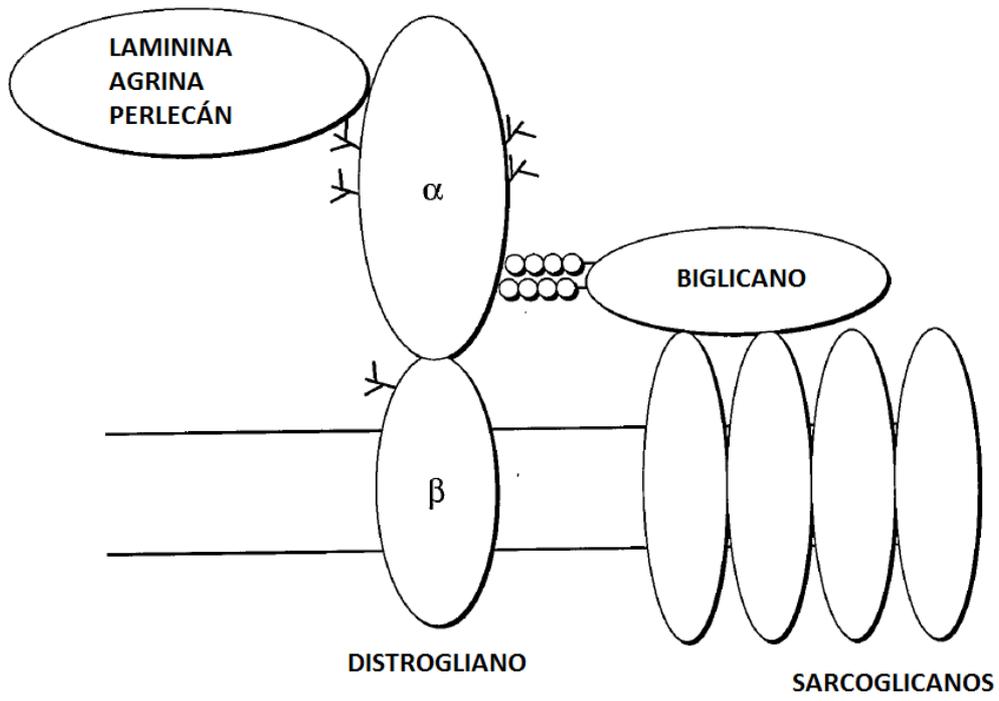


Fig. 1

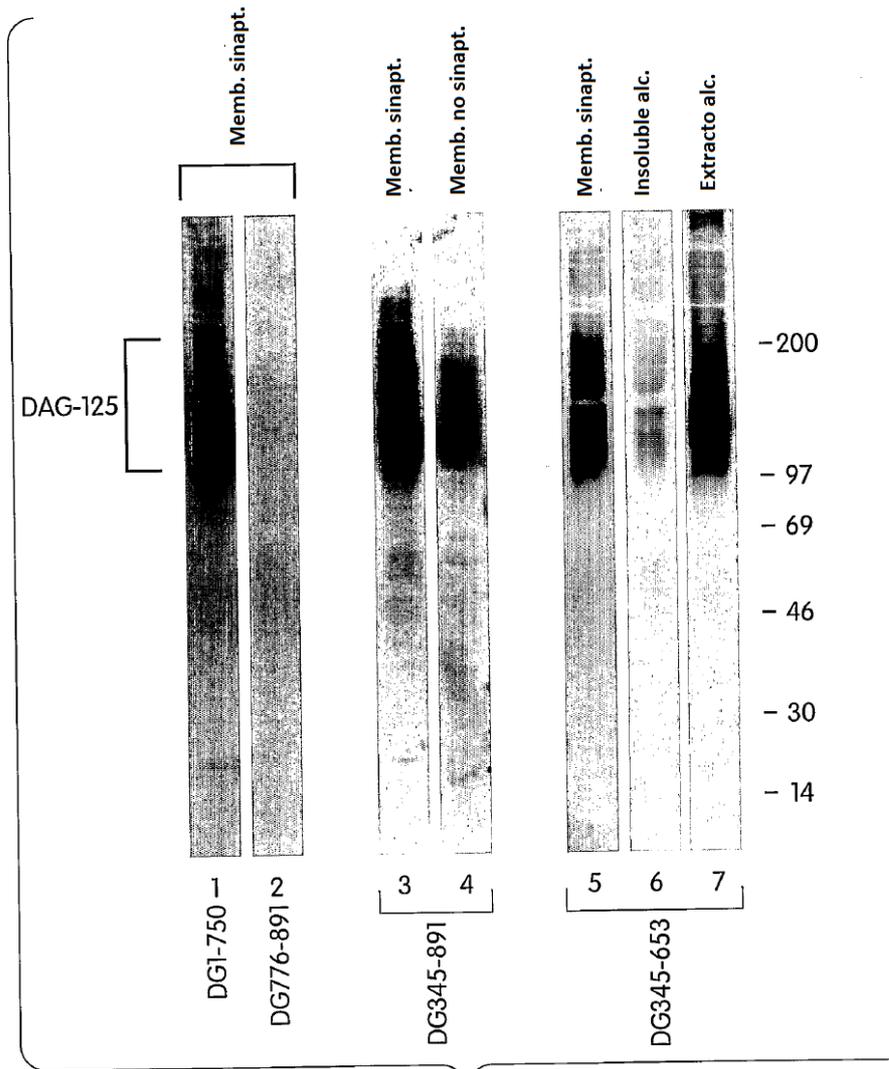
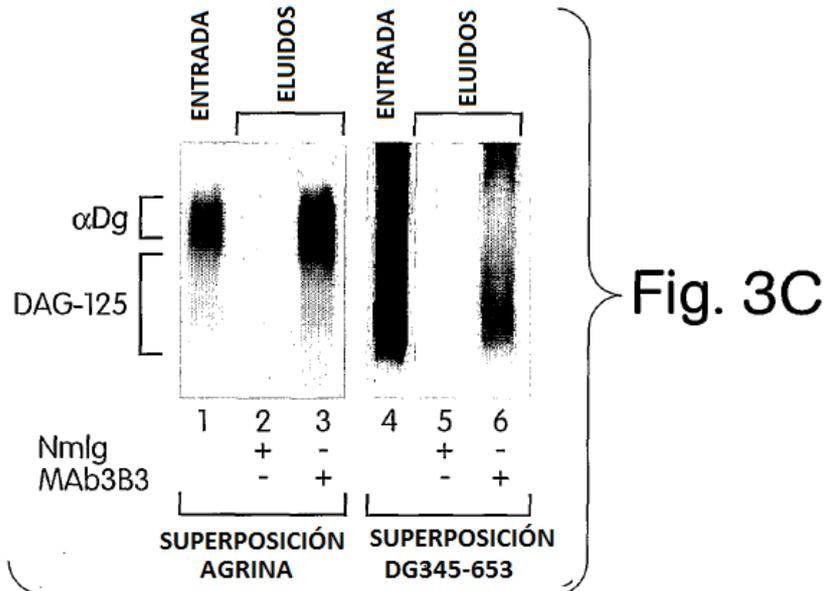
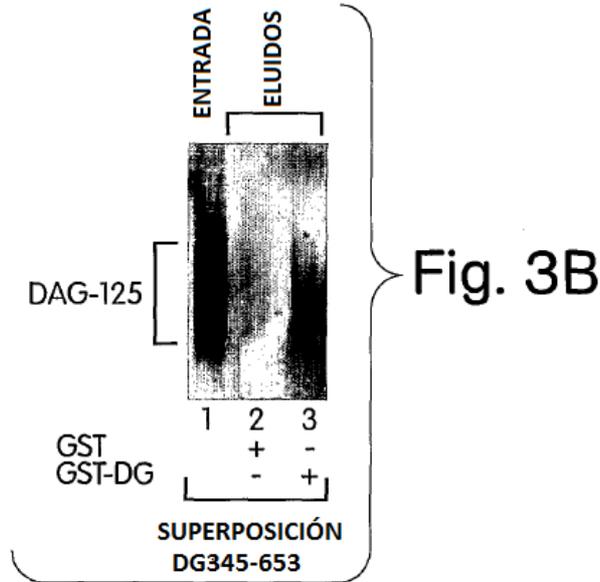
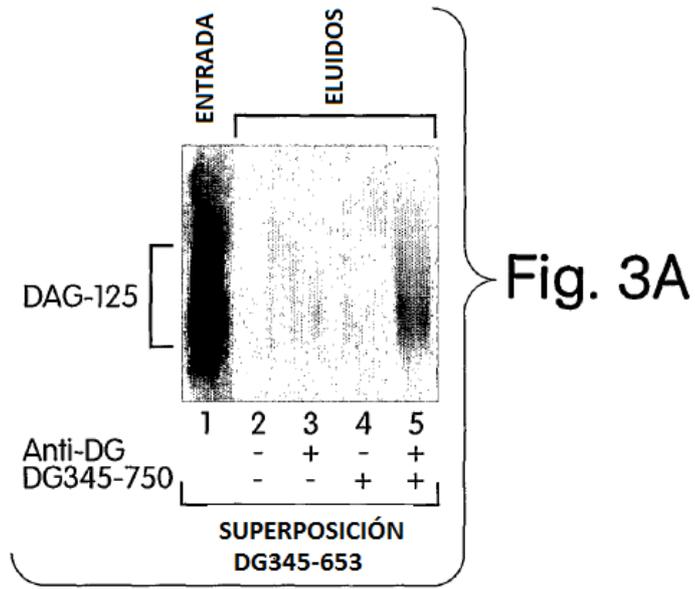


Fig. 2



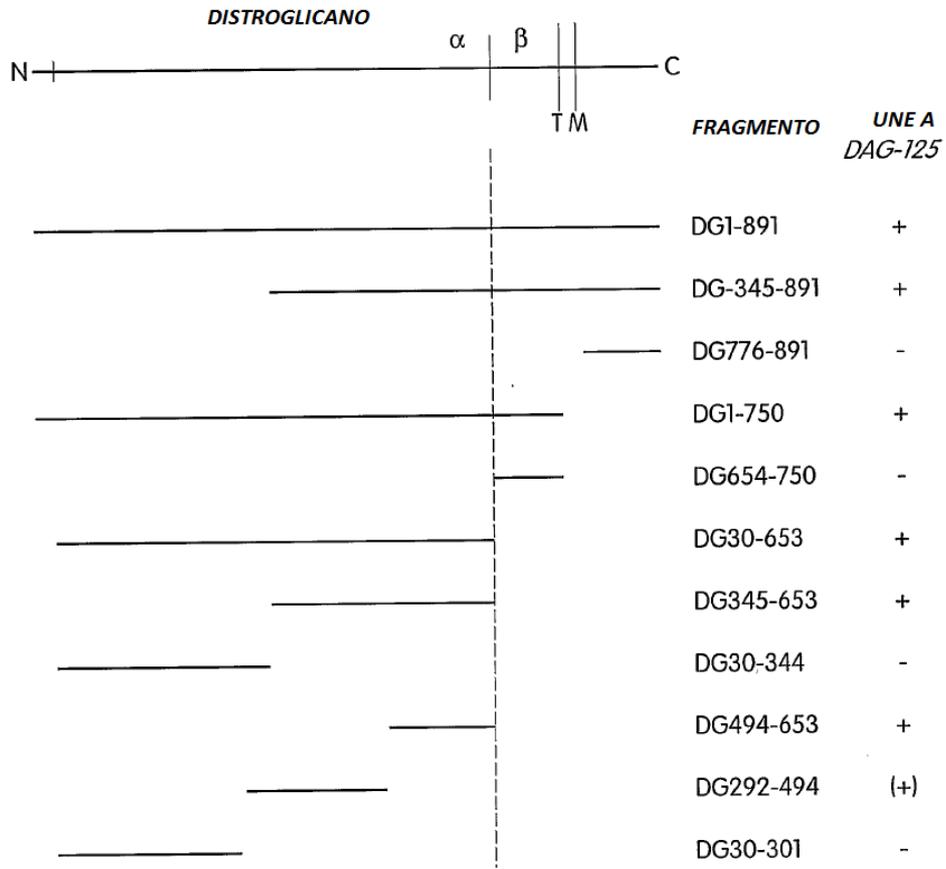


Fig. 4

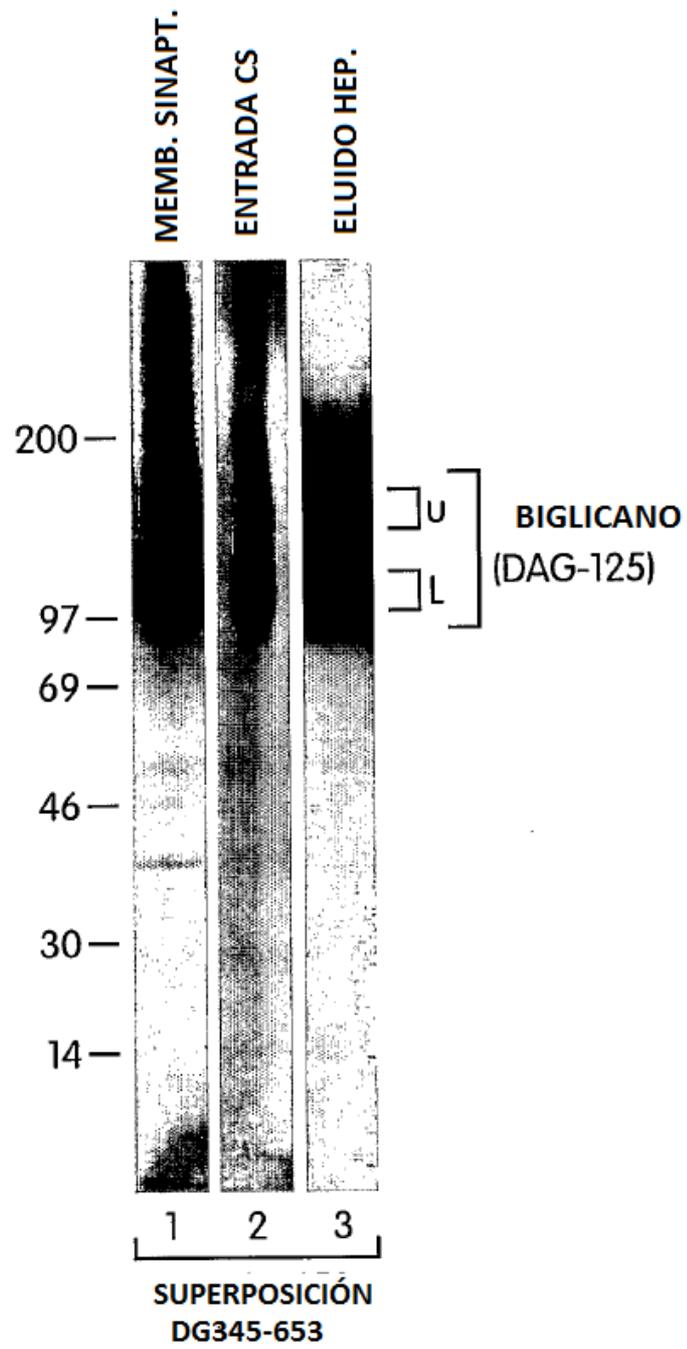


Fig. 5A

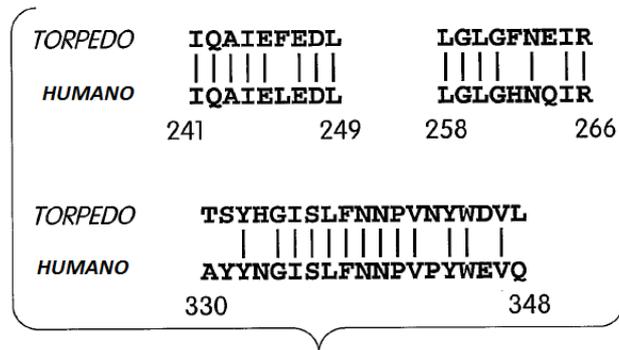


Fig. 5B

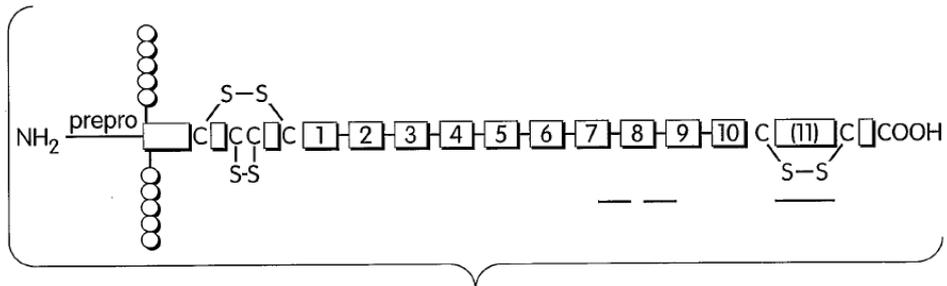


Fig. 5C

**Extracto alc.**



**Sin enzima**  
**ABC CAsa**  
**AC CAsa**  
**B CAsa**

**Fig. 6**

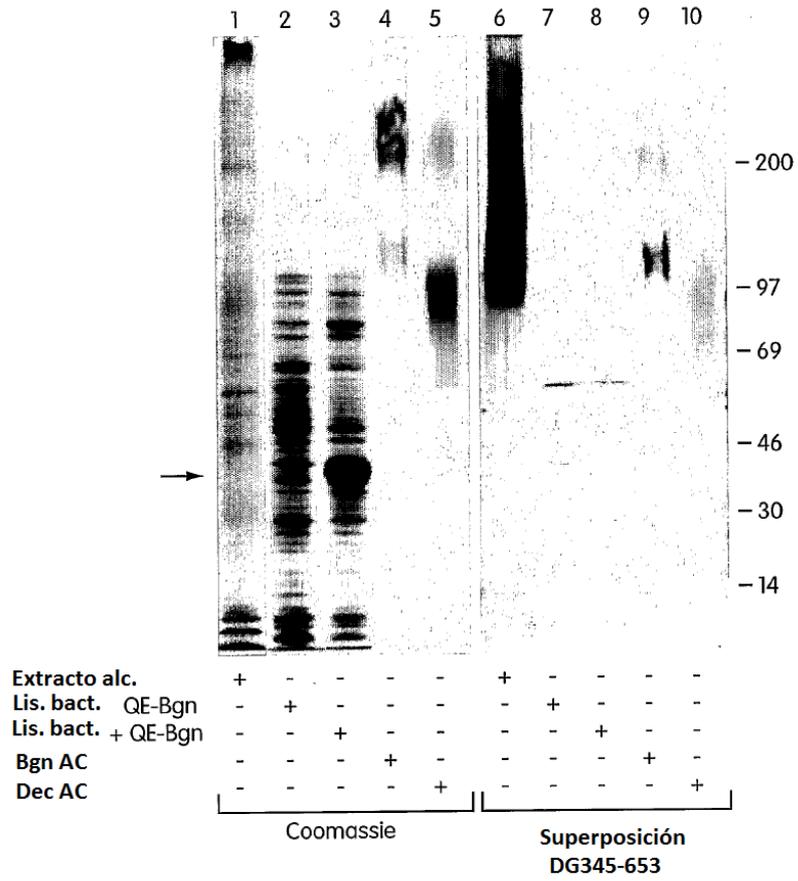


Fig. 7



SUPERPOSICIÓN DE 35S-ALFA-SARC.

Fig. 8A

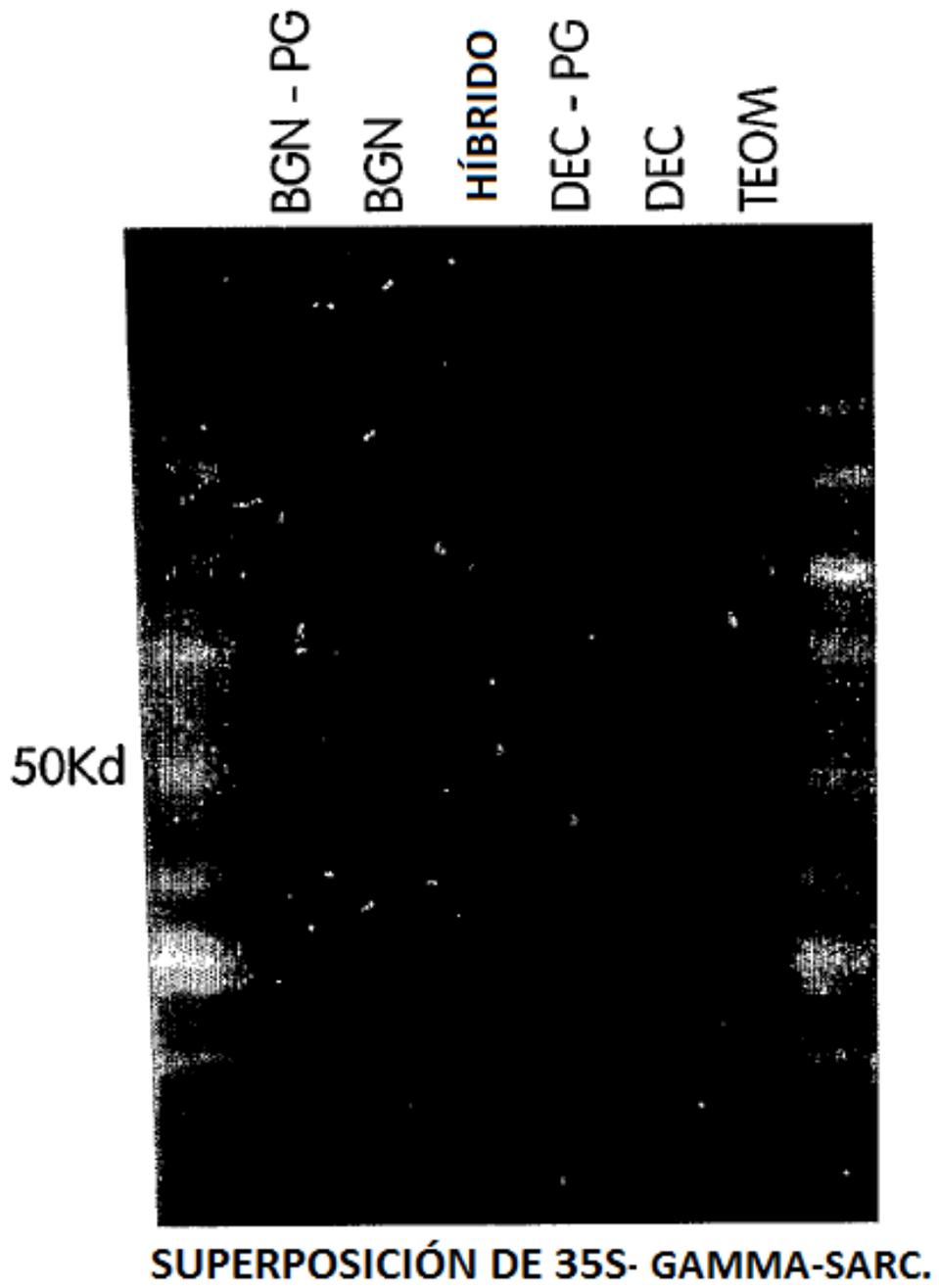


Fig. 8B

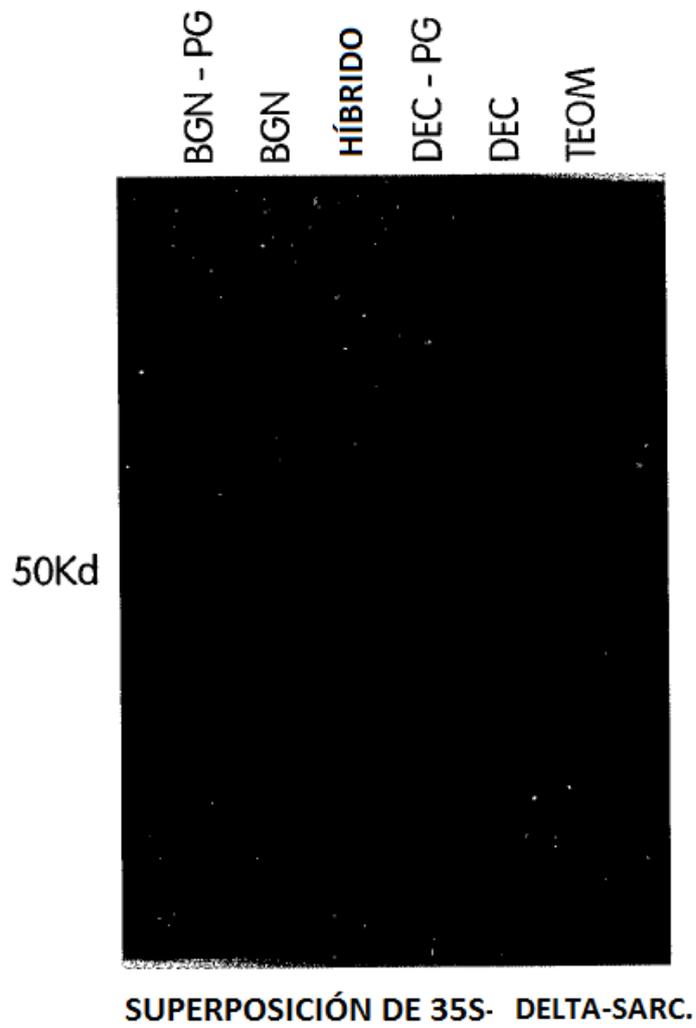


Fig. 8C

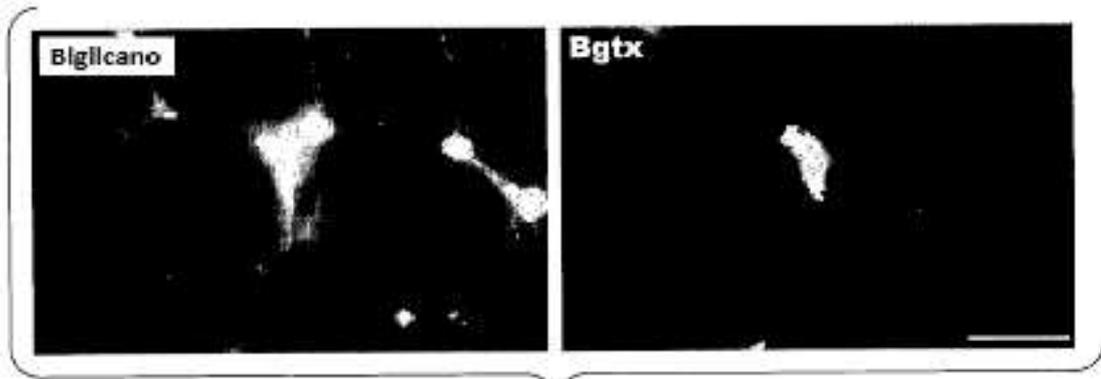


Fig. 9

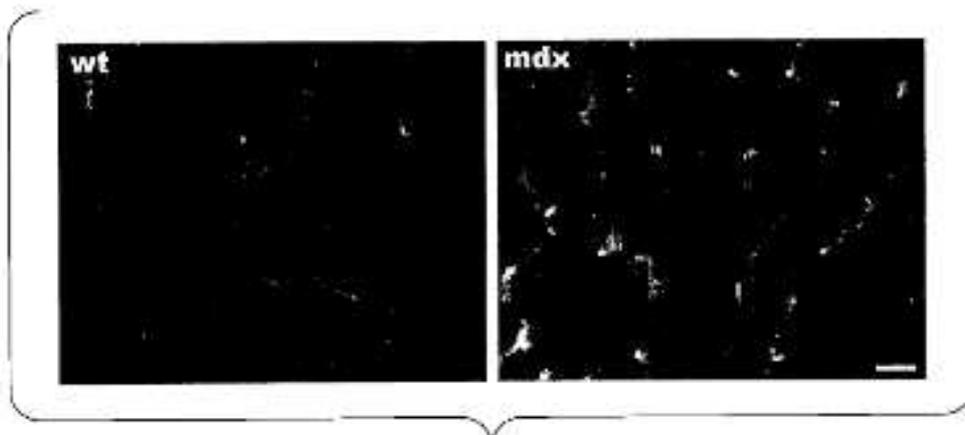
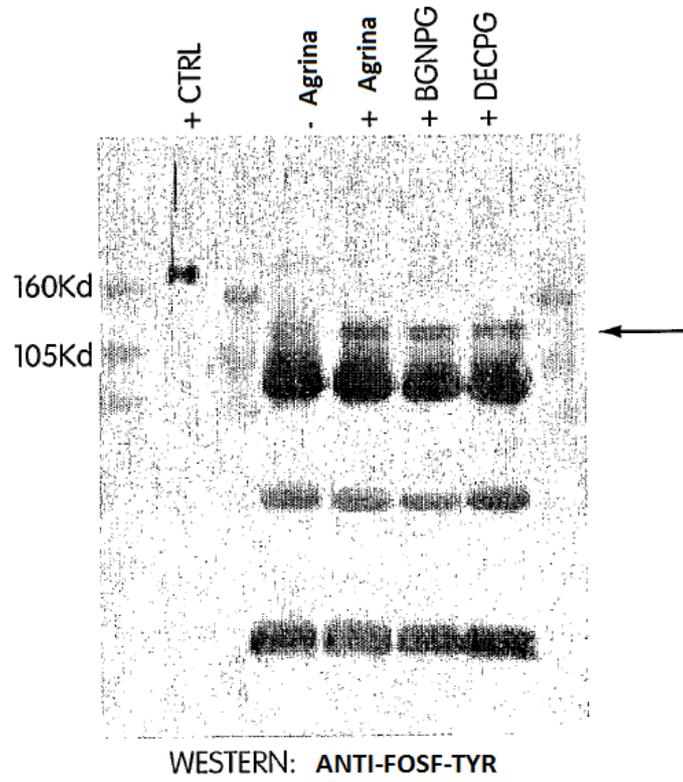


Fig. 10



Fig. 11



WESTERN: ANTI-FOSF-TYR

Fig. 12

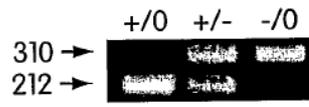


Fig. 13A

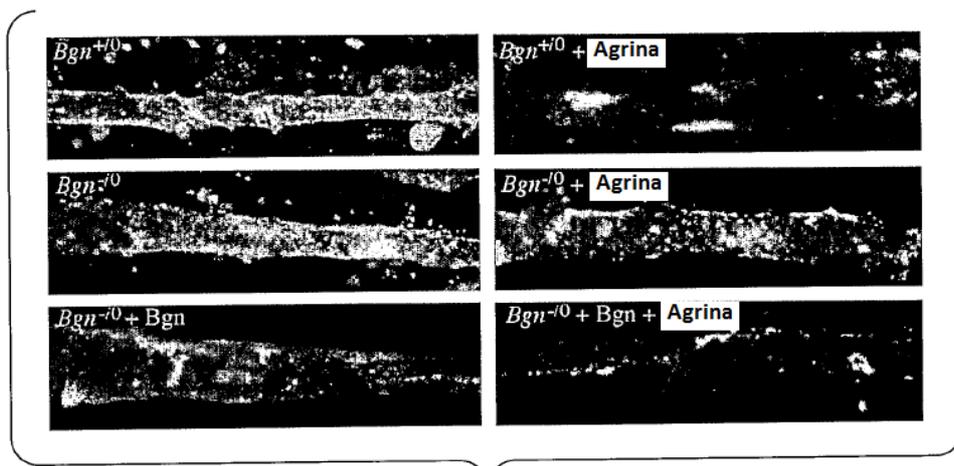


Fig. 13B

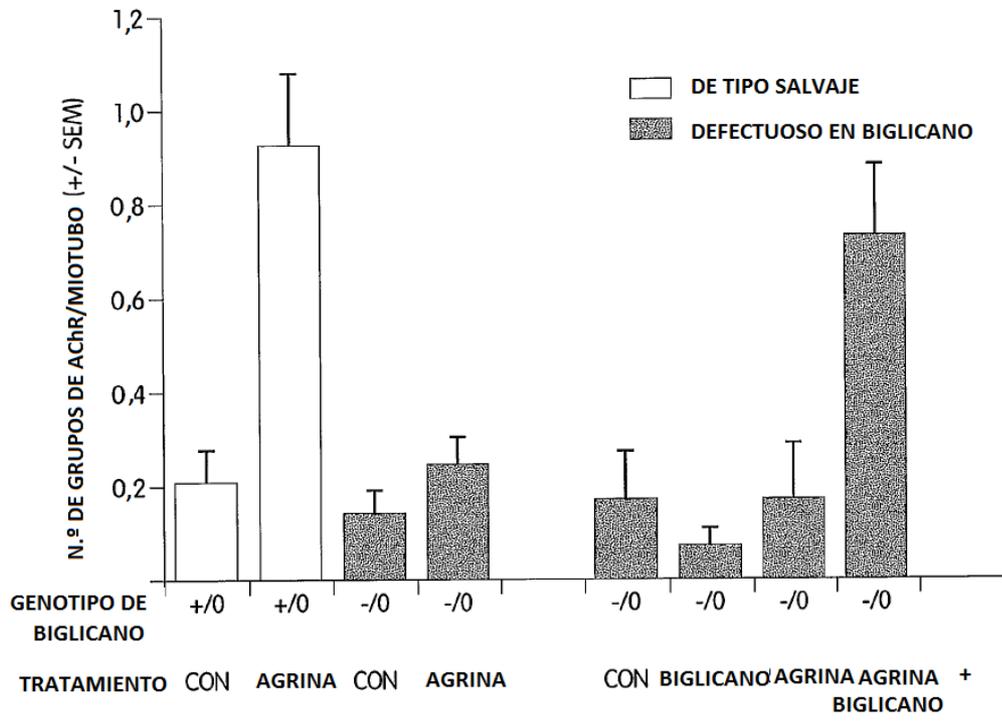


Fig. 13C

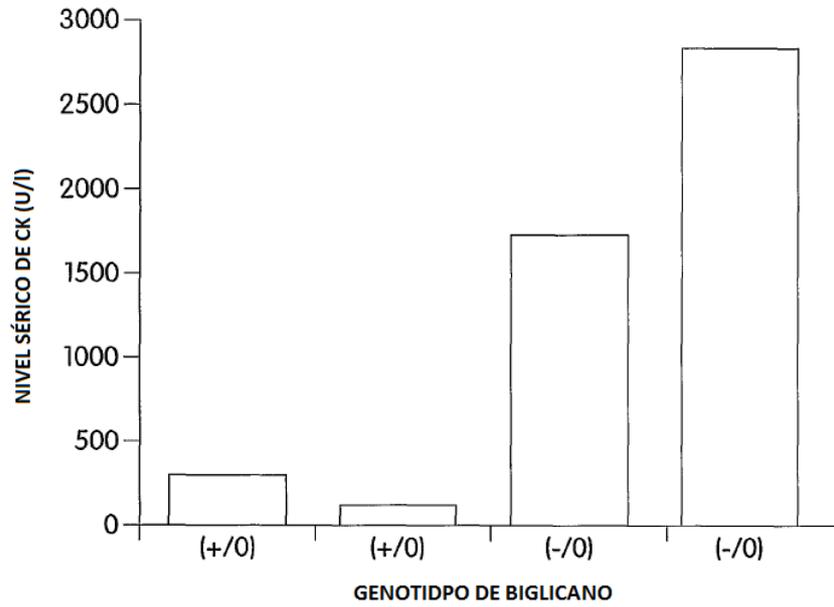


Fig.14

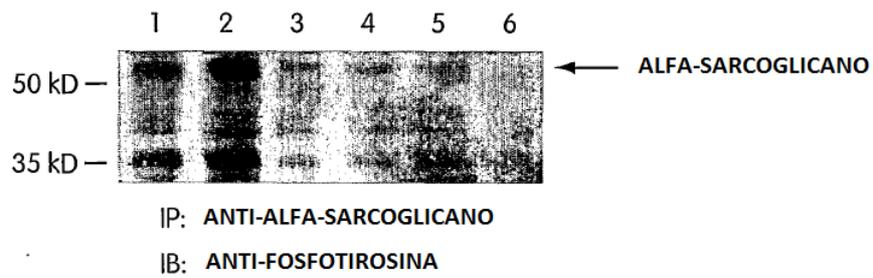


Fig.15