

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 621**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/861** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2015 PCT/EP2015/064703**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15197869**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2015 E 15731377 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 3044319**

54 Título: **Tratamiento sistémico eficaz de patologías distróficas**

30 Prioridad:

**27.06.2014 EP 14174848**

**24.04.2015 WO PCT/EP2015/058964**

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

**29.08.2018**

73 Titular/es:

**GENETHON (50.0%)**

**1 bis rue de l'Internationale**

**91002 Evry, FR y**

**ROYAL HOLLOWAY AND BEDFORD NEW**

**COLLEGE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DICKSON, GEORGE;**

**VOIT, THOMAS;**

**MOULLIER, PHILIPPE y**

**LE GUINER, CAROLINE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

Observaciones:

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

ES 2 679 621 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

Tratamiento sistémico eficaz de patologías distróficas

- 5 La presente divulgación proporciona un producto de terapia génica eficaz para enfermedades distróficas, especialmente en seres humanos y en perros, definido por la secuencia que codifica la microdistrofina, el vehículo de administración y la ruta de administración a usar.

Antecedentes de la invención

- 10 La distrofia muscular de Duchenne (DM) es la enfermedad degenerativa muscular progresiva más frecuente, que afecta aproximadamente a uno en 3500 a 5000 nacimientos masculinos. La DMD está causada por deleciones o mutaciones en el gen que codifica la distrofina, localizado en el cromosoma X. La distrofina se requiere para el ensamblaje del complejo distrofina-glucoproteína, y proporciona un enlace mecánico y funcional entre el citoesqueleto de la fibra muscular y la matriz extracelular. La ausencia de distrofina funcional provoca degeneración de la fibra, inflamación, necrosis y reemplazamiento de músculo con tejido cicatricial y adiposo, dando como resultado una debilidad muscular progresiva y muerte prematura debido a insuficiencia respiratoria y cardíaca entre la segunda y cuarta década de vida (Moser, H., Hum Genet, 1984. 66(1): págs. 17-40).

- 20 Una forma más leve de la enfermedad denominada distrofia muscular de Becker (DMB) se distingue de la DMD por la aparición tardía, la posterior dependencia de soporte en silla de ruedas y una esperanza de vida más larga. La DMB está causada por mutaciones que conservan el marco de lectura y las partes más críticas del gen, que lleva a una proteína distrofina truncada pero aún funcional (Muntoni E et al, Lancet Neurol, 2003).

- 25 No hay cura para el tratamiento eficaz disponible para la DMD (Rodino-Klapac, L.R. et al., Curr Neurol Neurosci Rep, 2013. 13(3): p. 332) o la DMB. Las terapias convencionales se limitan a tratamientos sintomáticos, que parcialmente alivian los signos y los síntomas, pero no se dirigen directamente al mecanismo de la enfermedad ni revierten el fenotipo.

- 30 Actualmente hay varias estrategias terapéuticas que se están desarrollando para la DMD, incluyendo terapia génica *in vivo*, terapia de trasplante celular, rescate farmacológico de mutaciones sin sentido de DMD y estrategias de salto de exón para reparar el marco de lectura del gen de DMD. Todas estas estrategias tienen que superar problemas, que incluyen el direccionamiento de los diferentes grupos musculares, la optimización de la administración, la expresión a largo plazo del transgén y la posible respuesta inmunológica (Jamin et al., Expert Opin Biol Ther, 2014).

- 35 El gen de la distrofina es el gen más largo conocido en el genoma y es demasiado largo como para ajustarlo dentro de los sistemas de vectores de terapia génica conocidos. Por lo tanto, a día de hoy, hay esencialmente dos estrategias de terapia génica para DMD con vectores víricos: i) expresión constitutiva de oligonucleótidos antisentido para promover el salto del exón, que es susceptible solo de determinadas mutaciones y (ii) expresión constitutiva de un ADNc que codifica una proteína distrofina funcional de tamaño reducido ("microdistrofina" también conocida como "minidistrofina").

- 45 Ambas estrategias, el uso de pequeñas secuencias antisentido o el uso de microdistrofina, abordan el principal obstáculo para el uso de vectores de AAV en la terapia génica de DMD, que es su capacidad de empaquetamiento. Los vectores de AAV pueden acomodar aproximadamente 4,7 kb mientras que el tamaño del ADNc de la distrofina de tipo silvestre es de aproximadamente 14 kb. Para solucionar este problema, una serie de estudios han desarrollado genes de distrofina parcialmente delecionados pero altamente funcionales, que se pueden empaquetar con éxito dentro de vectores de AAV y que han demostrado que mejoran, aunque no normalizan por completo, el fenotipo distrófico en modelos animales.

- 50 El modelo de ratón *mdx* se usa comúnmente para ensayar nuevas construcciones que codifican microdistrofinas. Sin embargo, este modelo tiene inconvenientes debido a que el ratón *mdx* presenta una forma menos severa de la enfermedad, sin reacciones inmunológicas. El otro modelo animal es el perro GRMD, que se considera más fiable para predecir el potencial terapéutico de un producto de terapia génica en seres humanos (Kornegay et al., Mamm Genome, 2012).

- 55 Entre todas las secuencias de microdistrofina propuestas, Foster H. et al. (Mol Ther, 2008. 16(11): p. 1825-32) compararon en ratones dos configuraciones diferentes de genes de microdistrofina,  $\Delta$ AB/R3-R18/ $\Delta$ CT y  $\Delta$ R4-R23/ $\Delta$ CT, bajo el control de un promotor específico de músculo (Spc5-12) vector de AAV recombinante (rAAV2/8). Se documentó que la optimización por codón de la microdistrofina en humanos mejoraba la transferencia génica y las funciones del músculo en el modelo de ratón *mdx*. La inyección intravenosa de  $3 \cdot 10^{11}$  gv total de rAAV/8 permitió la transferencia génica cardíaca y la expresión de la distrofina marcada en el músculo esquelético y en el diafragma.

- 65 En relación con los perros CXMDj, Ohshima S. et al. (Mol Ther, 2009. 17(1): p. 73-80) documentaron la administración en perros de un rAAV8 que codifica una microdistrofina M3 bajo el control de un promotor de CMV mediante perfusión del miembro, es decir, inyección intravenosa bajo presión.

Zhang Y. et al. (Hum Mol Genet, 2013, 22(18): p. 3720-29) estudiaron la terapia génica dual de AAV9 ( $5 \cdot 10^{12}$  gv total) en ratones DMD. Mediante recombinación homóloga, los vectores duales de AAV inyectados a través de la vena de la cola reconstituyeron un nNOS que se une a la microdistrofina que contiene las repeticiones de distrofina R16 y R17.

5 De manera similar, Odom G. et al. (Mol Ther, 2011, 19(1): págs. 36-45) demostraron la reconstitución de un casete de expresión que codifica una minidistrofina  $\Delta$ H2-R19 tras una coadministración intravascular de dos vectores de rAAV6 ( $2 \cdot 10^{12}$  gv total) que comparten una región recombinogénica homóloga central.

10 Wang B. et al. (J Orthop Res. 2009; 27(4): págs 421-6) desvelaron la inyección intraperitoneal (i.p.) de  $3 \cdot 10^{11}$  gv total de vectores rAAV1 ratones neonatos (dKO y *mdx*). Estos vectores de AAV codifican la microdistrofina  $\Delta$ 3990 colocada bajo el control del promotor de MCK o CMV.

15 Koppnati et al. (Gene therapy. 2010; 17(11): págs 1355-62) documentaron la transferencia génica *in utero* en el ratón *mdx* mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de  $6,4 \cdot 10^{11}$  gv total de vector de rAAV8 que codifica una microdistrofina de cánido colocada bajo el control del promotor de CMV.

20 Schinkel et al. (Human Gene therapy. 2012; 23(6): págs 566-75) documentaron la terapia génica cardíaca en el ratón *mdx* mediante inyección intravenosa (IV) de  $10^{12}$  gv total de vector de rAAV9 que codifica una microdistrofina colocada bajo el control del promotor de CMV o el promotor MLC0.26 específico cardíaco.

25 Gregorevic et al. (Mol. Therapy 2008; 16(4): págs 657-64) documentaron la terapia génica muscular en el ratón *mdx* mediante inyección intravenosa de  $10^{13}$  gv total de vector de rAAV6 que codifica la microdistrofina  $\Delta$ R4-R23/ $\Delta$ CT colocada bajo el control del promotor de CMV.

Shin et al. (Gene Therapy 2011; 18(9): págs 910-19) documentaron la terapia génica cardíaca en el ratón *mdx* mediante inyección intravenosa de  $3,10^{12}$  gv total de vector de rAAV9 que codifica una microdistrofina (h $\Delta$ CS2) colocada bajo el control del promotor de CMV.

30 Shin et al. (J. of Gene Medicine 2008; 10(4): pág 449) compara la eficacia de administración en ratones de rAAV8 que codifica la microdistrofina  $\Delta$ CS2 colocada bajo el control del promotor CMV, mediante inyección subcutánea o inyección intravenosa.

35 Colgan et al. (Mol. Therapy 2014; 22(S1): p S197) documentaron la administración génica combinada de microdistrofina y folistatina mediante inyección intravenosa de vectores rAAV6 en ratones dKO.

40 Kornegay et al. (Mol. Therapy 2010; 18(8): págs 1501-8) documentaron una única inyección intravenosa de un vector AAV9 que lleva un gen de minidistrofina humana optimizado por codón ( $\Delta$ 3990) bajo el control del promotor de CMV en perros GRMD neonatos, asociada con efectos adversos. El mismo equipo (Mol. Therapy 2012; 20(S1): p S69) más tarde observó una mejora en la fuerza muscular en perros GRMD adultos jóvenes inyectados con la misma DM colocada bajo el control de un promotor específico de músculo, sin inmunosupresión.

45 Dickinson, G. et al. (Molecular therapy, vol. 22, no. Supl. 1, S89 & 17th annual meeting of the American-Society-of-Gene-and-Cell-Therapy (ASGCT); Washington, DC, Estados Unidos; 21-24 de mayo de 2014) desvelan los resultados obtenidos tras la administración de un vector AAV2/8 que comprende una DM de cánido para perros GRMD mediante perfusión aislada en la extremidad, tal como un vector de una amplia biodistribución, y un elevado nivel de expresión sostenida de DM. Además, la extremidad tratada presentaba parámetros de mejora de recambio muscular, fibrosis y fuerza muscular. En el contexto de la DMD, una solución terapéutica valiosa sería un producto de terapia génica que tuviese las siguientes características:

- 50
- Un producto que se puede administrar por vía sistémica, a una dosis razonable (es decir, una transferencia génica adecuada en los tejidos diana) y posiblemente mediante una única inyección;
  - Un producto que tiene una toxicidad aceptable a esa dosis, y especialmente no induce una respuesta inmunológica adversa frente a la proteína distrofina;
  - 55 - Un producto que tiene un tropismo satisfactorio, es decir, una amplia transferencia génica sobre grandes territorios de músculos esqueléticos, pero también en diafragma y miocardio;
  - Un producto capaz de mejorar la enfermedad distrófica en seres humanos.

60 En la práctica, los informes previos han revelado que es una tarea muy desafiante y varios intentos han fracasado: Los estudios que usaron vectores de AAV2/6 que codifican una microdistrofina ( $\Delta$ R4-R23/ $\Delta$ CT) específica de humanos pero no optimizada por codón, bajo un promotor de CMV dieron como resultado la expresión limitada y la destrucción eventual de las fibras musculares de perro *CXMDj* inyectado mediante el sistema inmunológico a las 6 semanas tras la interrupción de la inmunosupresión, 22 semanas después de la inyección intramuscular inicial (Wang, Z. et al., Mol Ther, 2007, 15: págs. 1160-66).

65

Los ensayos clínicos basados en la inyección intramuscular de vectores AAV2/5 que codifican una microdistrofina ( $\Delta R3-R21/\Delta CT$ ) específica de humanos pero no optimizada por codón, bajo un promotor de CMV, dieron como resultado una expresión transgénica muy limitada y una respuesta inmunológica inapropiada (Mendell, JR et al., N Engl J Med, 2010,363(15): págs. 1429-37; Bowles, DE. et al., Mol Ther, 2012. 20(2): págs. 443-55).

Por lo tanto, existe una necesidad en la materia de un tratamiento eficaz de patologías distróficas en seres humanos, que incluya beneficios sistémicos en términos de supervivencia, puntuación clínica global, y funciones digestivas, cardíacas y/o respiratorias.

Breve resumen de la invención

La presente divulgación se centra en aliviar o curar la devastadora distrofia muscular de Duchenne (DMD) expresando un polipéptido de distrofina más corto pero funcional denominado microdistrofina.

Por primera vez, la presente divulgación ofrece un producto de terapia génica prometedor, una microdistrofina de secuencia optimizada, encapsulada en una cápsida de AAV8, para el tratamiento de enfermedades distróficas. Tras la administración intravenosa sistémica de una única dosis, no solo se expresa altamente la microdistrofina en múltiples músculos, sino que también da como resultado una mejora en la patología del músculo y mejores medidas de resultados clínicos.

De hecho, los resultados tan buenos obtenidos en un modelo de perro, en términos de rescate muscular, digestivo, respiratorio y cardíaco, correlacionados con una vida prolongada en buenas condiciones, nunca se han documentado hasta ahora en relación con este tipo de patología.

#### Definiciones

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

"Sobre" o "aproximadamente" tal como se usan en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretenden abarcar variaciones de  $\pm$  el 20 % o  $\pm$  el 10 %, más preferentemente  $\pm$  el 5 %, incluso más preferentemente  $\pm$  el 1 % y aún más preferentemente  $\pm$  el 0,1 % del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

Intervalos: a lo largo de la presente divulgación, se pueden presentar diversos aspectos de la invención en formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, la descripción de un intervalo debería considerar que la descripción de un intervalo tiene específicamente desvelados todos los posibles subintervalos así como valores numéricos dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debería considerar que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene específicamente desvelados los subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

"Aislado" significa alterado o retirado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente de forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico separado parcialmente o completamente de los materiales que coexisten en su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislada pueden existir en forma sustancialmente purificada, o pueden existir en un ambiente no natural tal como, por ejemplo, una célula hospedadora.

En el contexto de la presente invención, se usan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos que se dan con frecuencia. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a citosina, "G" se refiere a guanina, "T" se refiere a timina, y "U" se refiere a uridina.

Salvo que se especifique otra cosa, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ADNc también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede en alguna versión contener un intrón(es).

"Que codifica" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para funcionar como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen bien una secuencia definida o nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de las mismas. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción de ARNm que se corresponde con ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la hebra codificante, cuya secuencia de nucleótidos

es idéntica a la secuencia de ARNm y normalmente se proporciona en los listados de secuencias, y la hebra no codificante, usada como el molde para la transcripción de un gen o ADNc, se pueden denominar como que codifican la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

5 El término "polinucleótido" tal como se usa en el presente documento se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por lo tanto, los ácidos nucleicos y los polinucleótidos tal como se usan en el presente documento son intercambiables. Un experto en la materia tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que se pueden hidrolizar en "nucleótidos" monómeros. Los nucleótidos monómeros se pueden hidrolizar en nucleósidos. Tal como se usa en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen por cualquiera de los medios disponibles en la materia, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico a partir de una biblioteca recombinante o un genoma celular, usando la tecnología habitual de clonación y PCR y similares, y por medios sintéticos.

15 Tal como se usa en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido", y "proteína" se usan de forma intercambiable, y se refieren a un compuesto que comprende restos de aminoácidos unidos de forma covalente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se establecen limitaciones en el número máximo de aminoácidos que puede comprender la secuencia de la proteína o del péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Tal como se usa en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la materia como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la materia como proteínas, de las cuales hay muchos tipos. "Polipéptidos" incluye, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de los mismos.

"Idéntico" se refiere a la similitud de secuencia o a la identidad de secuencia entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en ambas de las dos secuencias comparadas está ocupado por la misma base o subunidad de monómero de aminoácidos, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas o idénticas en esa posición. El porcentaje de homología/identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes compartidas por las dos secuencias divididas entre el número de posiciones comparadas X 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias coinciden, entonces las dos secuencias son idénticas al 60 %. En general, se hace una comparación cuando las dos secuencias se alinean para dar la máxima homología/identidad.

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que se puede usar para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la materia que incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por lo tanto, el término "vector" incluye un plásmido que se replica de forma autónoma o un virus. También debería de interpretarse que el término incluye compuestos no plásmidos y no víricos que facilitan la transferencia de ácido nucleico en células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas, y similares. Los ejemplos de vectores víricos incluyen, pero sin limitación, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de retrovirus y similares.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión unidas de manera operativa a una secuencia de nucleótidos que se va a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; se pueden administrar otros elementos para la expresión por la célula hospedadora o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos aquellos conocidos en la materia, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociado) que incorporan el polinucleótido recombinante.

El término "promotor" tal como se usa en el presente documento se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria de síntesis de la célula, o introducida en la maquinaria de síntesis, requerida para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótido.

Tal como se usa en el presente documento, el término "promotor/secuencia reguladora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico, que se requiere para la expresión de un producto génico unido de forma operativa al promotor/secuencia reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser una secuencia de promotor del núcleo y en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia de potenciador y otros elementos reguladores, que se requieren para la expresión del producto génico. El promotor/secuencia reguladora puede, por ejemplo, ser uno, que expresa el producto génico de una forma específica de tejido.

Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une de forma operativa con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, provoca que se produzca el producto génico en una célula en la mayoría o en todas las condiciones fisiológicas de la célula.

5 Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une de forma operativa con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, provoca que se produzca el producto génico en una célula sustancialmente solo cuando un inductor que se corresponde con el promotor está presente en la célula.

10 Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une de forma operativa con un polinucleótido codificado o especificado por un gen, provoca que se produzca el producto génico en una célula preferentemente si la célula es una célula del tipo de tejido que se corresponde con el promotor. El término "anómalo" cuando se usa en el ámbito de los organismos, tejidos, células o componentes de las mismas, se refiere a aquellos organismos, tejidos, células o componentes de las mismas que difieren en al menos una característica observable o detectable (por ejemplo, edad, tratamiento, momento del día, etc.) de aquellos organismos, tejidos, células o componentes de las mismas que presentan la respectiva característica "normal" (esperada). Las características, que son normales o esperadas para un tipo de célula o de tejido, pueden ser anómalas para un tipo de célula o de tejido diferente.

20 Los términos "paciente", "sujeto", "individuo", y similares se usan de forma intercambiable en el presente documento, y se refieren a cualquier animal o células del mismo, bien *in vitro* o *in situ*, susceptible a los métodos descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones no limitantes, el paciente, sujeto o individuo es un ser humano.

25 Una "enfermedad" es un estado de salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasis y en donde si la enfermedad no mejora, entonces la salud del animal continúa deteriorándose. Por el contrario, un "trastorno" en un animal es un estado de salud en el que el animal es capaz de mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud de animal es menos favorable del que lo sería en ausencia del trastorno. Si no se trata, un trastorno no provoca necesariamente un descenso adicional en el estado de salud del animal.

30 Una enfermedad o trastorno se "alivia" o se "mejora" si la gravedad de un síntoma de la enfermedad o del trastorno, la frecuencia con la que el paciente experimenta tal síntoma, o ambos, se reduce. Esto también incluye detener la progresión de la enfermedad o del trastorno. Una enfermedad o trastorno se "cura" si la gravedad de un síntoma de la enfermedad o del trastorno, la frecuencia con la que el paciente experimenta tal síntoma, o ambos, se elimina.

35 Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta signos de patología, con el fin de disminuir o eliminar estos signos.

40 Tal como se usa en el presente documento, "tratar una enfermedad o un trastorno" significa reducir la frecuencia o la gravedad de al menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno experimentado por un sujeto. Enfermedad y trastorno se usan de forma intercambiable en el presente documento en el ámbito de tratamiento.

45 Una "cantidad eficaz" de un compuesto es esa cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al que se le administra el compuesto. La frase "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que es suficiente o eficaz para prevenir o tratar (retrasar o evitar la aparición de, prevenir la progresión de, inhibir, disminuir o invertir) una enfermedad o afección, incluyendo aliviar síntomas de tales enfermedades. Una "cantidad eficaz" de un vehículo de administración es aquella cantidad suficiente como para unirse de forma eficaz o administrar un compuesto.

#### Descripción detallada de la invención

50 La presente solicitud desvela una composición que comprende un producto de terapia génica para su uso en el tratamiento de una enfermedad distrófica en un sujeto, en donde:

- el producto de terapia génica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una microdistrofina funcional;
- 55 - la composición se administra por vía sistémica.

La presente invención se refiere a una composición que comprende un producto de terapia génica para su uso en el tratamiento de una enfermedad distrófica en seres humanos, en donde:

- 60 - el producto de terapia génica comprende un vector de virus adenoasociado (AAV) que es un vector AAV2/8 y que tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 1;
- la composición es para su administración por vía sistémica mediante inyección intravascular;
- la enfermedad distrófica es la distrofia muscular de Duchenne (DMD).

65

Típicamente, un producto de terapia génica está hecho de 2 componentes:

- La secuencia de ácido nucleico recombinante encapsulada que define el casete de expresión que proporciona beneficio(s) terapéutico(s) una vez se expresa en la célula/tejido diana; y
- La cápside vírica que permite la transferencia génica adecuada y, en cierta medida, el tropismo tisular.

De acuerdo con un aspecto, el producto de terapia génica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una microdistrofina funcional.

En el marco de la divulgación, microdistrofina se refiere a un péptido o proteína, que es más corta que la distrofina natural o de tipo silvestre. En el contexto de la divulgación, los términos "microdistrofina" y "minidistrofina" tienen el mismo significado. En el resto de la divulgación, se usará el término "microdistrofina", así como las abreviaturas "MD" o "μDis".

Una microdistrofina "funcional" significa que el correspondiente péptido o proteína es capaz de realizar al menos algunas de las funciones de la proteína distrofina de tipo silvestre y es capaz de aliviar, al menos parcialmente, uno o más de los síntomas asociados con la ausencia de una distrofina natural, especialmente la degeneración de fibras, inflamación, necrosis, reemplazamiento de músculo con tejido cicatricial y adiposo, debilidad muscular, insuficiencia digestiva, respiratoria y cardíaca, así como muerte prematura.

La estructura de la distrofina está bien documentada (véase la Figura 1) y se han desvelado los fragmentos de la misma (Athanasopoulos et al., Gene Ther 2004 Suppl 1:S109-21). Como se entenderá en la materia, un fragmento activo es una parte o partes de una secuencia de longitud completa que conserva la función biológica de la secuencia de longitud completa.

La distrofina de longitud completa se caracteriza por diferentes dominios:

- Un dominio en N-terminal que se une a actina;
- 4 dominios bisagra (H1 a H4);
- 24 repeticiones de tipo espectrina o dominios en bastón (1 a 24);
- Un dominio rico en cisteína;
- Un dominio en C-terminal.

De acuerdo con un aspecto, la microdistrofina tiene al menos un dominio que carece, ventajosamente de al menos una repetición de tipo espectrina.

De acuerdo con un aspecto particular, la microdistrofina tiene la configuración  $\Delta R4-R23/\Delta CT$ , que comprende 4 repeticiones de tipo espectrina, es decir las repeticiones de tipo espectrina 1, 2, 3 y 24 tal como se muestra en la Figura 1. De forma más precisa, esta secuencia comprende las delecciones de dominios en bastón 4-23 y los exones 71-78 del dominio CT de distrofina, y contiene los tres últimos aminoácidos del exón 79 de distrofina seguidos por tres codones de parada.

Tal microdistrofina anotada  $\Delta R4-R23/\Delta CT$  o MD1 tiene, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, 4 o 7.

En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica la microdistrofina funcional, también llamada ORF por "*open reading frame*" (marco de lectura abierta), es un ADNc. Sin embargo, por ejemplo, se puede usar ADN o ARN monocatenario o bicatenario.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden secuencias de ácido nucleico que son más cortas que el ADNc de la distrofina de tipo silvestre.

Cuando se usa en el contexto de los vectores de AAV, que pueden acomodar aproximadamente 4,7 kb, la secuencia de ácido nucleico que codifica la microdistrofina funcional, así como todas las secuencias requeridas para su adecuada expresión, no deberían superar esta capacidad de empaquetamiento.

En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica la microdistrofina funcional no supera las 4500, 4000 pb, preferentemente las 3900, 3800, 3700, 3600 o incluso las 3500 pb.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la microdistrofina funcional es ventajosamente de origen humano pero también puede ser de un primate no humano, de un cánido, de una rata o una secuencia de murino. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico se origina en el organismo al que se administrará (por ejemplo, una secuencia humana en seres humanos).

65

De acuerdo con otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha microdistrofina se optimiza para su uso en seres humanos. Preferentemente, esta secuencia optimizada se modifica tal como sigue:

- La secuencia se modifica para incluir una secuencia de Kozak consenso antes del codón de iniciación AUG en el ARNm, para potenciar la iniciación de la traducción.
- La secuencia se optimiza basándose en las frecuencias de ARN de transferencia en seres humanos y el contenido en GC está aumentado para promover la estabilidad del ARN. Como resultado y en un caso específico, la optimización por codón para seres humanos ventajosamente lleva a la modificación del 63 % de los codones y al aumento del contenido en GC a más del 60 %. Esto, por supuesto, depende de la secuencia de microdistrofina original (antes de la optimización) y del hospedador diana.

De acuerdo con un aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica una microdistrofina funcional se corresponde con los nucleótidos 586 a 4185 de la secuencia SEQ ID NO: 1 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 5. De acuerdo con un aspecto, dicha secuencia puede ser un ácido nucleico aislado que codifica una microdistrofina que tiene homología o identidad sustancial (el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o incluso el 99 %) con los péptidos desvelados en el presente documento, especialmente de la secuencia SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, o incluso la SEQ ID NO: 7.

Preferentemente, la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico aislado que codifica un péptido de la invención es "sustancialmente homóloga/idéntica", es decir, es aproximadamente el 60 % homóloga, más preferentemente aproximadamente el 70 % homóloga, incluso más preferentemente aproximadamente el 80 % homóloga, más preferentemente aproximadamente el 90 % homóloga, incluso más preferentemente, aproximadamente el 95 % homóloga, e incluso más preferentemente aproximadamente el 97 %, el 98 % o incluso el 99 % homóloga a una secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico aislado que codifica la microdistrofina funcional, especialmente de la secuencia SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o incluso la SEQ ID NO: 8.

De acuerdo con la invención, la secuencia de nucleótidos contenida en un vector de expresión de acuerdo con la invención es de la secuencia SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, la composición comprende un plásmido o un vector. De acuerdo con un aspecto específico, el ácido nucleico aislado se inserta en el vector. En breve resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos se logra típicamente uniendo de forma operativa un ácido nucleico o partes del mismo a un promotor, e incorporando la construcción en un vector de expresión. Los vectores a usar son adecuados para la replicación y, opcionalmente, la integración en células eucariotas. Los vectores típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

En un aspecto, la composición comprende un vector de expresión, que es un vector vírico. Son de particular interés los vectores de expresión cuya capacidad de empaquetamiento no permite la acomodación del gen de distrofina (de tipo silvestre), incluyendo el ADNc de distrofina (de tipo silvestre).

De acuerdo con la invención, el vector vírico que contiene la construcción de expresión es un vector de virus adenoasociado (AAV) tal como se define mediante las reivindicaciones. Los vectores de virus adenoasociados (AAV) han llegado a ser poderosas herramientas de administración génica para el tratamiento de diversos trastornos. Los vectores de AAV poseen una serie de características que los hace idealmente adecuados para terapia génica, incluyendo una ausencia de patogenicidad, inmunogenicidad moderada y la capacidad para transducir células postmitóticas y tejidos de una forma estable y eficaz. La expresión de un gen particular contenido en un vector de AAV se puede dirigir de forma específica a uno o más tipos de células eligiendo la combinación apropiada de serotipo de AAV, promotor y método de administración.

En una realización, la secuencia codificante está contenida en un vector de AAV tal como se define mediante las reivindicaciones. Se conocen más de 100 serotipos de AAV de origen natural. Existen muchas variantes naturales en la cápside de AAV, que permiten la identificación y el uso de AAV con propiedades específicamente adecuadas para patologías distróficas. Los virus AAV se pueden modificar genéticamente usando técnicas convencionales de biología molecular, haciendo posible optimizar estas partículas para la administración a células específicas de secuencias de ácido nucleico, para minimizar la inmunogenicidad, para ajustar la estabilidad y la durabilidad de la partícula, para la degradación eficaz, para la administración precisa al núcleo.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el uso de vectores de AAV es un modo común de administración exógena de ADN dado que no es relativamente tóxico, proporciona una transferencia génica eficaz y se puede optimizar fácilmente para fines específicos. Entre los serotipos de AAV aislados a partir de seres humanos o de primates no humanos (PNH) y bien caracterizados, el serotipo 2 humano es el primer AAV que se desarrolló como un vector de transferencia génica. Otros serotipos de AAV usados actualmente incluyen AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 y AAV12. Además, las variantes no naturales modificadas genéticamente y los AAV quiméricos también son útiles.

Los fragmentos deseables de AAV para el ensamblaje en vectores incluyen las proteínas cap, incluyendo vp1, vp2, vp3 y regiones hipervariables, las proteínas rep, incluyendo rep 78, rep 68, rep 52 y rep 40 y las secuencias que codifican estas proteínas. Estos fragmentos se pueden utilizar fácilmente en una variedad de sistemas vectoriales y de células hospedadoras.

5 Tales fragmentos se pueden usar solos, en combinación con otras secuencias o fragmentos del serotipo de AAV, o en combinación con elementos de otros AAV u otras secuencias víricas que no sean de AAV. Tal como se usa en el presente documento, los serotipos de AAV artificiales incluyen, sin limitación, AAV con una proteína de la cápside que no es de origen natural. Tal cápside artificial se puede generar mediante cualquier técnica adecuada, usando  
10 una secuencia seleccionada de AAV (por ejemplo, un fragmento de una proteína de la cápside vp1) en combinación con secuencias heterólogas que se pueden obtener a partir de un diferente serotipo de AAV seleccionado, partes no contiguas del mismo serotipo de AAV, de una fuente vírica que no sea AAV, o de una fuente no vírica. Un serotipo de AAV artificial puede ser, sin limitación, una cápside quimérica de AAV, una cápside recombinante de AAV, o una cápside "humanizada" de AAV. Por lo tanto, los AAV ejemplares o los AAV artificiales, incluyen AAV2/8 (documento US 7.282.199), AAV2/5 (disponible del National Institute of Health), AAV2/9 (documento WO2005/033321), AAV2/6 (documento US 6.156.303), y AAVrh8 (WO2003/042397), entre otros. En un aspecto, los vectores útiles en las composiciones y en los métodos descritos en el presente documento contienen, como mínimo, las secuencias que codifican una cápside de un serotipo de AAV seleccionado, por ejemplo, una cápside de AAV8 o un fragmento del mismo. En otro aspecto, los vectores útiles contienen, como mínimo, secuencias que codifican una proteína rep de un serotipo de AAV seleccionado, por ejemplo, proteína rep de AAV8 o un fragmento del mismo. Opcionalmente, tales vectores pueden contener tanto proteínas cap como rep de AAV. En vectores en los que se proporcionan tanto rep como cap de AAV, las secuencias de rep de AAV y de cap de AAV pueden ser de un serotipo de origen, por ejemplo, todas de origen de AAV8. Como alternativa, se pueden usar vectores en los que las secuencias rep son de un serotipo de AAV, que difiere del que proporciona las secuencias de cap. En un aspecto, las secuencias rep y cap se expresan a partir de fuentes separadas (por ejemplo, vectores separados, o una célula hospedadora y un vector). En otro aspecto, estas secuencias rep se fusionan en marco a secuencias cap de un serotipo AAV diferente para formar un vector de AAV quimérico, tal como AAV2/8 (documento US 7.282.199).

De acuerdo con la invención, la composición comprende un vector AAV2/8.

En los vectores de AAV descritos en el presente documento, el genoma de AAV puede ser o bien un ácido nucleico monocatenario (ss, del inglés *single stranded*) o una molécula de ácido nucleico bicatenario (ds, del inglés *double stranded*) / autocomplementario (sc, del inglés *self complementary*).

De acuerdo con la invención, la secuencia de ácido nucleico que codifica la microdistrofina funcional se inserta entre las secuencias de ITR (« Repetición Terminal Invertida ») del AAV, es decir:

- nucleótidos 1 a 128 de la secuencia SEQ ID NO: 1 (secuencias 5'ITR);
- nucleótidos 4511 a 4640 de la secuencia SEQ ID NO: 1 (secuencias 3'ITR).

Las partículas de virus recombinantes se pueden obtener mediante cualquier método conocido para un experto en la materia, por ejemplo, mediante cotransfección de células HEK 293, mediante el sistema del virus del herpes simple y mediante el sistema de baculovirus. Los títulos del vector normalmente se expresan como genomas víricos por ml (gv/ml).

En un aspecto, el vector de expresión comprende secuencias reguladoras, especialmente una secuencia de promotor. Tales promotores pueden ser promotores naturales o sintéticos (artificiales), inducibles o constitutivos.

En un aspecto, el promotor es un promotor ubicuo o que tiene una baja especificidad de tejido. Como ejemplo, el vector de expresión puede llevar fosfoglicerato cinasa 1 (PGK), EF1,  $\beta$ -actina, promotor de CMV.

En un aspecto preferido, la secuencia del promotor se elige con el fin de dirigir de forma adecuada la expresión de la secuencia de ácido nucleico colocada bajo su control, en términos de nivel de expresión, pero también de especificidad de tejido. En un aspecto, el vector de expresión comprende un promotor específico del músculo. Tal promotor permite una fuerte expresión en los músculos esqueléticos, y posiblemente en el músculo cardíaco así como en el diafragma. Los ejemplos de promotores adecuados conocidos por el experto en la materia son, por ejemplo, el promotor de desmina, el promotor de la creatina cinasa muscular (MCK), el promotor de CK6 y el promotor Syn. De acuerdo con la invención, el promotor es el promotor sintético C5-12 (spC5-12) tal como se muestra en las secuencias SEQ ID NO: 1 (nucleótidos 215 a 537), que permite una fuerte expresión en los músculos esquelético y cardíaco.

Un listado no exhaustivo de otras posibles secuencias reguladoras es:

- una señal de poliadenilación, por ejemplo, el poliA del gen de interés, el poliA de SV40 o de hemoglobina beta (HBB2), ventajosamente en 3' de la secuencia que codifica la microdistrofina funcional; La poli A del SV40 se

desvela en las secuencias SEQ ID NO: 1 (nucleótidos 4223 a 4353) y la SEQ ID NO: 2 (nucleótidos 4226 a 4356);

- secuencias para la estabilización del transcrito, por ejemplo, intrón 1 de hemoglobina (HBB2);
- secuencias de potenciador;
- secuencias diana de miARN, que pueden inhibir la expresión de la secuencia que codifica la distrofina funcional en tejidos no diana, en los que no se desea dicha expresión, por ejemplo donde puede ser tóxico. Preferentemente, el correspondiente miARN no está presente en los músculos esqueléticos, y posiblemente no en el diagrama ni en el corazón.

De acuerdo con la invención, el producto de terapia génica comprende un vector de expresión, es decir, un vector AAV2/8 que lleva la secuencia SEQ ID NO: 1.

De acuerdo con la presente divulgación, la composición comprende al menos dicho un producto de terapia génica, y posiblemente otras moléculas activas (otros productos de terapia génica, moléculas químicas, péptidos, proteínas...), dedicadas al tratamiento de la misma enfermedad o de otra enfermedad.

De acuerdo con una realización específica, dicha composición no comprende ningún agente inmunosupresor.

La presente divulgación, entonces, proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un ácido nucleico o vector descrito en el presente documento. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico (el ácido nucleico o vector) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos o de Europa u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales y seres humanos. El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares.

La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, formulaciones de liberación sostenida y similares. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma de administración adecuada al sujeto.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos habituales tales como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

En una realización, la composición de acuerdo con la invención es adecuada para la administración en seres humanos. La composición preferentemente está en forma líquida, ventajosamente una composición salina, más ventajosamente una solución salina tamponada con fosfato (PBS) o una solución de Ringer-Lactato.

La cantidad de agente terapéutico (es decir, un ácido nucleico o un vector) de la invención que será eficaz en el tratamiento de enfermedades distróficas se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, se pueden utilizar de manera opcional ensayos *in vivo* y/o *in vitro* para ayudar a predecir los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración, del peso y de la seriedad de la enfermedad, y se debería decidir de acuerdo con el juicio del médico y de las circunstancias de cada paciente.

La administración adecuada debería de permitir la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de producto de terapia génica a los tejidos diana, especialmente a los músculos esqueléticos posiblemente a los músculos lisos (por ejemplo, esófago), al diafragma y al corazón. En el contexto de la invención, cuando el producto de terapia génica es un vector vírico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una microdistrofina funcional, tal como se define mediante las reivindicaciones, la dosis terapéutica se define como la cantidad de partículas víricas (gv para genomas víricos) que contienen la secuencia de microdistrofina, administrada por kilogramo (kg) del sujeto.

Las vías de administración disponibles son tópica (local), entérica (efecto en todo el sistema, pero administrado a través del tracto gastrointestinal (GI), o parenteral (acción sistémica, pero administrada mediante otras vías que no sean el tracto GI). La vía de administración preferida de las composiciones desveladas en el presente documento es parenteral, que incluye la administración intramuscular (es decir, en el músculo) y la administración sistémica (es decir, en el sistema circulatorio). En este contexto, el término "inyección" (o "perfusión" o "infusión") abarca la administración intravascular, en particular intravenosa (IV), y la administración intramuscular (IM). Las inyecciones normalmente se realizan usando jeringas o catéteres.

El método de administración de acuerdo con la invención es la administración sistémica. La inyección sistémica abre la vía a una inyección del cuerpo completo, con el fin de alcanzar la totalidad de los músculos del cuerpo del sujeto, incluyendo el corazón y el diafragma y, entonces, lograr el tratamiento de estas enfermedades sistémicas y aún incurables. En determinadas realizaciones, la administración sistémica comprende la administración de la composición al sujeto de manera que la composición sea accesible a través del cuerpo del sujeto.

De acuerdo con la invención, la administración sistémica tiene lugar mediante la inyección de la composición en un vaso sanguíneo, es decir, administración intravascular (intravenosa o intraarterial). De acuerdo con una realización, la composición se administra mediante inyección intravenosa, a través de una vena periférica.

La administración sistémica típicamente se realiza en las siguientes condiciones:

- un caudal de entre 1 a 10 ml/min, ventajosamente entre 1 a 5 ml/min, por ejemplo, 3 ml/min;
- el volumen total inyectado puede variar entre 1 y 20 ml, preferentemente 5 ml de preparación de vector por kg del sujeto. El volumen inyectado no debería suponer más del 10 % del volumen sanguíneo total, preferentemente aproximadamente el 6 %.

Cuando se administra por vía sistémica, la composición preferentemente se administra con una dosis menor o igual que  $10^{15}$  gv/kg o incluso  $10^{14}$  gv/kg, ventajosamente entre  $10^{12}$  gv/kg y  $10^{14}$  gv/kg, más ventajosamente entre  $5 \cdot 10^{12}$  gv/kg y  $10^{14}$  gv/kg, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o  $9 \cdot 10^{13}$  gv/kg. También se puede contemplar una dosis más baja de, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o  $9 \cdot 10^{12}$  gv/kg con el fin de evitar la posible toxicidad y/o reacciones inmunológicas. Como es sabido por el experto en la materia, se prefiere una dosis tan baja como sea posible que dé resultados satisfactorios en términos de eficacia.

En una realización específica, el tratamiento comprende una única administración de la composición.

Tal como se ilustra en los ejemplos siguientes, no se cree que la administración del producto de terapia génica de acuerdo con la invención se asocie con reacciones inmunológicas adversas. Por lo tanto, y de acuerdo con una realización, dicha administración no se combina con ningún tratamiento inmunosupresor extra o adicional (inmunosupresión).

En un aspecto, la presencia del producto de terapia génica y/o la expresión de la microdistrofina funcional, así como los beneficios terapéuticos asociados, se observan durante hasta 1 mes, o 3 meses, o 6 meses, o incluso 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o incluso la vida completa del sujeto.

De acuerdo con la invención, el sujeto es un ser humano.

"Enfermedad distrófica" se refiere a una enfermedad vinculada a un defecto en el gen de la distrofina. Este defecto puede ser deleciones o mutaciones que llevan a un bajo nivel de expresión o ausencia de expresión, la introducción de un codón de parada prematuro en el marco de lectura abierta, o la producción de una proteína inactiva. De acuerdo con la invención, la enfermedad distrófica es la distrofia muscular de Duchenne (DMD) causada por mutaciones en el gen de la distrofina. Dichas mutaciones pueden dar como resultado la ausencia de un bajo nivel de expresión de distrofina o en la producción de una proteína parcialmente o completamente inactiva, posiblemente trunca.

Los sujetos que podrían beneficiarse de las composiciones de la invención incluyen pacientes, tal como se define en las reivindicaciones, diagnosticados con distrofia muscular o en riesgo de desarrollar tal distrofia muscular. Un sujeto a tratar, entonces, se puede seleccionar basándose en la identificación de mutaciones o deleciones en el gen de la distrofina mediante cualquier método conocido para el experto en la materia, que incluye, por ejemplo, la secuenciación del gen de la distrofina, y/o mediante la evaluación del nivel de expresión o actividad de la distrofina mediante cualquier método conocido para el experto en la materia. Por lo tanto, dichos sujetos incluyen tanto sujetos que ya presentan síntomas de una enfermedad distrófica como sujetos en riesgo de desarrollar dicha enfermedad. En un aspecto, dichos sujetos incluyen sujetos que ya presentan síntomas de una enfermedad distrófica. En otro aspecto, dichos sujetos son pacientes ambulatorios y pacientes no ambulatorios tempranos.

Dichas composiciones están especialmente destinadas a la terapia génica, para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (DMD).

Un primer objetivo de la invención es proporcionar un tratamiento seguro (no tóxico). Un objetivo adicional es proporcionar un tratamiento eficaz que permita posponer, ralentizar o evitar el desarrollo de la enfermedad, y posiblemente mejorar el fenotipo del paciente que se puede controlar fácilmente a nivel clínico.

5 En un sujeto, la composición según la invención se puede usar:

- para mejorar la función muscular. Son de particular interés los músculos esqueléticos, pero también el músculo cardíaco y el diafragma;
- para mejorar la forma de andar;
- 10 - para mejorar la función cardíaca;
- para mejorar la función respiratoria;
- para mejorar la función digestiva; y/o
- para prolongar la supervivencia, más generalmente, para mejorar la calidad y la esperanza de vida.

15 De acuerdo con un aspecto, la divulgación se refiere a un método para mejorar la función muscular, la forma de andar, la función digestiva, la función cardíaca y/o la función respiratoria y/o para prolongar la supervivencia, ventajosamente sin efectos adversos (respuesta inmunológica celular y/o humoral), que comprende la administración, a un sujeto que lo necesite, de una cantidad terapéutica de un producto de terapia génica tal como se desvela anteriormente.

20 Ventajosamente, dichas mejoras se observan durante hasta 1 mes tras la administración, o 3 meses o 6 meses o 9 meses, más ventajosamente durante hasta 1 año tras la administración, 2 años, 5 años, 10 años o incluso durante la vida completa del sujeto.

25 En una realización, dichas mejoras dan como resultado una reducción en la gravedad de los síntomas y/o en la frecuencia y/o en la aparición retardada, en donde dichos síntomas se eligen dentro del grupo que consiste en caídas frecuentes, incapacidad para andar, disfagia, cardiomiopatía, hipersalivación, motricidad reducida (correr, saltar a la pata coja, saltar), anomalías respiratorias, pseudohipertrofia, hiperlordosis lumbar y rigidez muscular.

30 Se puede evaluar una mejora de dichas funciones basándose en los métodos conocidos en la materia, por ejemplo:

- evaluación del porcentaje de fibras musculares que expresan la proteína distrofina;
- pruebas de andar;
- evaluación de la fuerza mediante medidas de dinamómetro;
- 35 - evaluación de la función motora de una extremidad concreta mediante medidas de la función motora;
- evaluación de la actividad global usando un control de movimiento;
- evaluación de la forma de andar mediante registro con acelerómetro en 3 ejes;
- evaluación de la función cardíaca mediante ecocardiograma, análisis Doppler y análisis por seguimiento de marcas (*Speckle tracking*);
- 40 - evaluación de la función respiratoria mediante evaluación de la cinética del diafragma;
- evaluación de las funciones vitales, especialmente las funciones cardíaca, respiratoria y digestiva, mediante seguimiento clínico;
- evaluación de la calidad y esperanza de vida mediante puntuación clínica.

45 Tal como se ilustra en los ejemplos, el tratamiento reivindicado permite la mejora del estado clínico y de diversos parámetros desvelados anteriormente en comparación con un sujeto no tratado.

De acuerdo con un aspecto, se describe un método de tratamiento de una enfermedad distrófica que comprende la administración a un sujeto del producto de terapia génica tal como se desvela anteriormente, en donde:

- 50 - al menos el 30 % de las fibras musculares, ventajosamente el 40 %, más ventajosamente al menos el 50% de las fibras musculares expresan la proteína distrofina; y/o
- se mantiene una puntuación clínica a un nivel que se corresponde con al menos el 50 % de la puntuación de un sujeto sano, ventajosamente al menos el 60 % o incluso el 70 %.

55 Ventajosamente, dichos efectos se observan durante hasta 1 mes tras la administración, o 3 meses o 6 meses o 9 meses, más ventajosamente durante hasta 1 año tras la administración, 2 años, 5 años, 10 años o incluso más, durante toda la vida del sujeto.

60 Tal como se conoce en la materia, el nivel de expresión de distrofina en los músculos se determina fácilmente por el experto en la materia, ventajosamente mediante inmunohistoquímica, por ejemplo, mediante inmunotinción de biopsias musculares con un anticuerpo anti-distrofina tal como se desvela anteriormente. El cálculo de puntuaciones clínicas es también habitual para el experto en la materia. Tal como se detalla anteriormente en relación con los perros, esta puntuación se puede calcular basándose en la disfagia, en la respiración, en la hipersalivación y en la actividad global. Con respecto a los pacientes, Bushby y Connor, por ejemplo, han enumerado medidas de resultados clínicos para ensayos en distrofia muscular de Duchenne (Clin Investig (Lond). 2011; 1(9): 1217-1235).

65

La práctica de la presente invención emplea, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro del alcance del experto en la materia. Dichas técnicas se explican por completo en las referencias, tales como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", cuarta edición (Sambrook, 2012); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Culture of Animal Cells" (Freshney, 2010); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1997); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller y Calos, 1987); "Short Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 2002); "Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting", (Babar, 2011); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 2002). Estas técnicas se aplican a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención y, como tales, se pueden considerar en la realización y puesta en práctica de la invención. Las técnicas particularmente útiles para realizaciones particulares se tratarán en las posteriores secciones.

#### Ejemplos experimentales

La invención se describe adicionalmente en detalle en referencia a los siguientes ejemplos experimentales y a las figuras adjuntas. Estos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos.

Los resultados presentados a continuación se han obtenido en el modelo de perro GRMD (siglas de *Golden Retriever Muscular Dystrophy*, distrofia muscular en Golden Retriever). Es el mejor modelo animal para patologías distróficas, con el fin de evaluar el potencial de un producto de terapia génica, en términos de eficacia (dosis terapéutica, estabilidad, toxicidad, ...) pero también de respuesta inmunológica, antes de los ensayos clínicos.

Figura 1: Esquema de la distrofina de longitud completa (A), de diversas microdistrofinas (B) y de la construcción de expresión (C).

Figura 2: Plan de estudio - Esquema general del tratamiento sistémico en perros GRMD.

Figura 3:

A/ Biopsias musculares obtenidas 3 meses después de la administración del vector rAAV2/8-SPc5.12-cMD mediante administración sistémica intravenosa en el perro GRMD2 (ICI).

a/ m. bíceps femoral antes de la inyección

b/ perro sano

c / m. extensor radial del carpo derecho:

el 82 % de cMD + fibras (cMD detectado en el 82 % de las fibras) 2,8 gv/gd (genoma del vector por genoma diploide)

d/ m. extensor común de los dedos derecho:

el 59 % de cMD + fibras (cMD detectado en el 59 % de las fibras) 4,1 gv/gd

c / m. extensor radial del carpo izquierdo:

el 62 % de cMD + fibras (cMD detectado en el 62 % de las fibras) 6,2 gv/gd

f / m. extensor común de los dedos izquierdo:

el 66 % de cMD + fibras (cMD detectado en el 66 % de las fibras) 2,6 gv/gd

B/ Biopsias musculares obtenidas 8 meses después de la administración del vector rAAV2/8-SPc5.12-cMD mediante administración sistémica intravenosa en el perro GRMD2 (ICI):

a/ m. bíceps femoral derecho:

el 58 % de cMD + fibras (cMD detectado en el 58 % de las fibras) 1,0 gv/gd

b/ m. bíceps femoral izquierdo:

el 56 % de cMD + fibras (cMD detectado en el 56 % de las fibras) 0,8 gv/gd

Figura 4: Datos de la puntuación clínica obtenidos en la cohorte de GRMD que ha recibido  $10^{14}$  gv/kg de vector rAAV2/8-SPc5.12-cMD por vía sistémica a la edad de 2 meses.

\* significa que el perro ya no está vivo

Figura 5: Datos del índice global de la forma de andar. Las curvas se calcularon usando el modelo construido mediante análisis discriminante y se representan los datos obtenidos para GRMD no tratados y perros sanos. Para los últimos, se muestran las curvas de centroides medias y los intervalos de confianza del 95 %.

Figura 6: Intervalo de movimiento del diafragma (IMD) controlado sobre perros GRMD tratados y no tratados. Los perros sanos presentan un valor de IMD de entre el 90 y el 110 %.

Figura 7: ELISpot de IFN $\gamma$  que usa grupos de péptidos de  $\mu$ Dis de cánido (cinética de PBMC). Los datos se obtuvieron en el perro GRMD 2 (ICI) que ha recibido  $10^{14}$  gv/kg de vector rAAV2/8-SPc5.12-cMD por vía sistémica a la edad de 2 meses.

Figura 8: Detección de anticuerpos IgG anti-distrofina mediante análisis por transferencia de Western en suero de perro inyectado. Los datos se obtuvieron en el perro GRMD 2 (ICI) que ha recibido  $10^{14}$  gv/kg de vector rAAV2/8-SPc5.12-cMD por vía sistémica a la edad de 2 meses. La reactividad de cada suero se ensayó en extractos celulares de 293 células transfectadas (o no) con un pCMV-cánido-MD ( $\mu$ Dis). Se ha ensayado el suero antes de la inyección (día 0) y después de la inyección (semana 3, mes 1,5, mes 2,5, mes 4 y mes 7,5).

Los controles positivos consistieron en el anticuerpo anti-distrofina MANEX 1011C, y un suero de cánido positivo (C+) de un perro GRMD inmunizado contra la distrofina.

### Materiales y métodos:

5

#### 1/ Animales

La evaluación de una inyección sistémica completa del vector de microdistrofina (rAAV2/8-SPc5.12-cMD) se ha realizado en el modelo de perro GRMD (Kornegay et al., Mamm Genome, 2012). Los perros macho seleccionados se genotiparon para la mutación de DMD, que consiste en un único cambio de base en el sitio de corte y empalme consenso en 3' (A>G) del intrón 6 del gen de la distrofina, que provoca un procesamiento incorrecto del ARNm.

10

Los perros se trataron tal como se muestra en la Tabla 1 a continuación (sin inmunosupresión):

Dosis	Momento del seguimiento	Nombre del perro		Fecha de la inyección	Fecha del sacrificio
1 <sup>E</sup> 14gv/kg	Largo plazo	IMAGE	μDis 1	6/11/2013	<i>Aún vivo (17 meses tras la inyección)</i>
		ICI	μDis 2	6/01/2014	<i>Aún vivo (15 meses tras la inyección)</i>
	7-8 meses tras la inyección	ICE-T	μDis 3	28/08/2013	16/04/2014
		JAFFAR	μDis 4	16/09/2014	<i>Mayo de 2015</i>
		JACADI	μDis 5	3/11/2014	<i>Julio de 2015</i>

15

Los perros control se corresponden con perros GRMD no inyectados y perros sanos.

#### 2/ Vector de microdistrofina

El vector rAAV2/8-SPc5.12-cMD codifica una distrofina de cánido (cMD) de secuencia optimizada de ARNm bajo el control de un promotor específico de músculo (SPc5.12).

20

La construcción de ADNc de cMD de secuencia optimizada de ARNm específica de cánido, incorporó delecciones de los dominios en bastón 4-23 y exones 71-78 del dominio CT de distrofina ( $\Delta$ R4-R23; Figura 1), que contiene los tres últimos aminoácidos del exón 79 de la distrofina seguido por los tres codones de parada y que incorpora el sitio de poliadenilación del SV40. Se modificó la secuencia de ADNc para incluir una secuencia de Kozak consenso. Se optimizó una secuencia de ARNm basándose en las frecuencias de ARN de transferencia en seres humanos y se aumentó el contenido en GC para promover la estabilidad del ARN. La optimización de la secuencia de ARNm de la microdistrofina (GENEART, Regensburg, Alemania) dio como resultado un aumento en GC del 48 % al 61 % en la distrofina de cánidos y también una modificación del 23,6 % de los codones. El tamaño del ADNc del gen de cMD es de 3603 pb y el tamaño del casete del transgén que contiene la repetición terminal invertida (ITR) flanqueante de este vector es 4643 pb, lo que se corresponde con el 99,2 % de las 4682 pb de la longitud del genoma de AAV2 de tipo silvestre. Las regiones no traducidas en 5' y 3' del gen de la distrofina se eliminaron para reducir el tamaño de la ITR flanqueante del casete de distrofina. La expresión estuvo bajo el control del promotor sintético específico de músculo (SPc5-12) (Wang, B., et al., Gene Ther, 2008. 15(22): págs. 1489-99).

25

30

35

Este casete de expresión (SEQ ID NO: 2 que incluye la AAV\_ITR, el promotor Spc512, el ADNc de DM de cánido y la PoliA del SV40) demostró que daba como resultado una expresión extendida y estable de distrofina tras las inyecciones intramusculares en el modelo de Duchenne *CXMDJ* basado en beagle (Koo, T., et al., J Gene Med, 2011. 13(9): págs. 497-506). Además, esta construcción mejoró la patología muscular y la reducción de las respuestas inflamatorias en el tejido muscular diana.

40

#### 3/ Preparación de rAAV2/8-SPc5.12-cMD

El vector de virus adenoasociado recombinante que contiene el ADNc de microdistrofina de cánido regulada por el promotor SPc5-12, rAAV2/8-SPc5.12-cMD, se produjo en un sistema baculovirus/Sf9. Se generaron dos lotes de baculovirus, uno que expresa los genes de AAV *rep* (que codifica la proteína Rep del AAV2) y *cap* (que codifica la

45

proteína Cap del AAV8) y el segundo que es el vector de transferencia del AAV2. Los virus se produjeron, se almacenaron y se usaron para coinfectar células SF9 en un biorreactor de un solo uso de 200 litros (Sartorius). Tras un cultivo de tres días, las células se recolectaron, se lisaron y el lisado se procesó mediante aclaración, purificación en una columna de inmunoafinidad, concentración a través de filtración por flujo tangencial, formulación, filtración estéril y relleno. La purificación se basa en un gen comercial (AVB de GE Healthcare) que lleva un anticuerpo de cadena simple que se une a AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV6 y AAV8. El proceso tiene una producción global de más del 20 %, y genera 145 unidades de 4,5 ml de producto con un título vírico  $>10^{13}$  gv/ml.

#### 4/ Administración sistémica

Se ha inyectado a los perros GRMD mediante administración sistémica con el vector del candidato terapéutico (rAAV2/8-SPc5.12-cMD). Esta cohorte piloto se administró con  $10^{14}$  gv/kg (total de alrededor de  $5 \times 10^{14}$  gv/animal). La inyección sistémica simple se realizó a través de una vena periférica, en una vena cefálica canulada, a un caudal de 3 ml/min. El volumen inyectado total fue de alrededor de 25 ml de preparación de vector (5 ml/kg), lo que representa el 6 % del volumen sanguíneo total (siendo el 10 % el límite superior recomendado), que resultó ser muy bien tolerado.

Se inyectó a los animales experimentales con 2 meses de edad y se les siguió tal como se muestra en la Tabla 1. Todos se preseleccionaron sistemáticamente para la ausencia de factores neutralizantes de AAV8 en el suero. Antes de la inyección intravenosa (IV) del vector, los perros GRMD que presentaron una profunda debilidad y/o incapacidad en la deglución se descartaron del experimento. Los regímenes inmunosupresores nunca se usaron y la única atención médica proporcionada se limitó a mantener la comodidad y el bienestar de los animales. Se obtuvieron documentos reglamentarios apropiados (ética y manejo de OGM) a su debido tiempo. Todos los procedimientos se llevan a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y aprobados por el Comité especial de Uso y Cuidado de los Animales.

#### 5/ Evaluación del tratamiento sistémico

La morbilidad y mortalidad se evalúan dos veces al día. Los animales que se encuentren muertos se someterán a una necropsia en presencia del patólogo y se tomarán muestras de tejido cuando corresponda para tratar de determinar sistemáticamente la causa de la muerte.

#### Tolerancia clínica y biológica del protocolo

En todos los perros, los parámetros clínicos del laboratorio, incluyendo electrolitos, ensayos de función renal y hepática y recuentos sanguíneos totales se controlan de forma regular tras la inyección. El estado clínico de cada perro, incluyendo las funciones cardíacas, respiratorias, digestivas, locomotoras y neurológicas, también se evalúan todas cuidadosamente y semanalmente a lo largo del protocolo.

#### Evaluación de la diseminación del vector y de la biodistribución del vector mediante Q-PCR

La diseminación del vector y la biodistribución mediante Q-PCR se realizan de forma regular hasta el sacrificio en la orina, suero, biopsias intermedias del músculo, principales músculos esqueléticos de las 4 extremidades entre flexores y extensores, corazón y diafragma, hígado, bazo, riñones, nódulos linfáticos y testículos. La extracción de ADN de rAAV a partir de los fluidos se hace usando el mini-kit de ARN vírico Qiamp (Qiagen). El rAAV se extrae a partir de 140  $\mu$ l de suero. Se usa 1/8 de la extracción (10  $\mu$ l) para el análisis por Q-PCR. La extracción de ADN genómico (ADNg) de los tejidos se hace usando el kit Gentra Puregene (Qiagen) y Tissue Lyzer II (Qiagen). La concentración de cada muestra de ADNg se determina usando un nanospectrómetro (Implen).

La PCR cuantitativa se lleva a cabo en un StepOne Plus (Applied Biosystem) usando 50 ng de ADNg por duplicado o 10  $\mu$ l de extractos de fluido. El número de copias del vector se determina usando cebadores y sondas diseñados para amplificar de forma específica el casete SPc5.12-cMD. El número de copias de ADNg se determina usando cebadores y sondas diseñadas para amplificar el gen de glucuronidasa de cánido. Para cada muestra, los valores de Ct (de *cycle threshold*, umbral de ciclo) se comparan con los obtenidos con diferentes diluciones de plásmidos estándar linearizados (que contienen o bien el casete SPc5.12-cMD o el gen de glucuronidasa de cánido). Los resultados se expresan en el genoma del vector por genoma diploide (gv/gd). Para los fluidos, solo se realiza la Q-PCR específica del transgén y los resultados se expresan en genoma del vector por  $\mu$ l de fluido extraído. La ausencia de inhibición de Q-PCR en presencia de ADNg se comprueba previamente analizando 10  $\mu$ l de extracto de fluido o 50 ng de ADNg extraído del bazo, de los testículos, del hígado, del riñón o del músculo esquelético, enriquecido con diferentes diluciones de plásmido estándar.

#### Evaluación de la expresión del transgén en diferentes tejidos mediante Q-RT-PCR

La expresión de la microdistrofina se evalúa mediante Q-RT-PCR en múltiples músculos esqueléticos, corazón y diafragma, hígado, bazo y cualquier otro tejido que presente un elevado número de copias del vector. Brevemente, el ARN total se extrae de los músculos, del hígado y del bazo con reactivo TRIzol (Invitrogen) y se trata con DNAsa I

sin RNAsa del kit sin ADN TURBO (AMbio) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa se realiza usando cebadores aleatorizados y una transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen). Para cada muestra se realiza un control negativo sin transcriptasa inversa (RT-) para cada muestra. La PCR cuantitativa se lleva a cabo en un StepOne Plus (Applied Biosystem) con ADNc diluido por duplicado. La cuantificación relativa de los mensajeros de cMD se determina usando cebadores diseñados para amplificar específicamente esta secuencia. Los resultados se normalizan mediante un análisis de Q-PCR del mensajero de cánido RPL32 (proteína ribosómica L32), conocido por expresarse de forma similar en los diferentes tejidos del perro (Peters, I.R., et al., Vet Immunol Immunopathol, 2007. 117(1-2): págs. 55-66). La ausencia de inhibición de Q-PCR en presencia de ADNc de músculo, hígado y bazo se comprueba analizando ADNc diluido enriquecido con diferentes diluciones de plásmido estándar.

Para cada muestra, los valores de Ct (de *cycle threshold*, umbral de ciclo) se comparan con los obtenidos con diferentes diluciones de plásmidos estándar (que contienen el casete de expresión de cMD o la secuencia del mensajero de cánido RPL32). Los resultados se expresan en cantidades relativas (CR):

$$CR = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct\ diana - Ct\ control\ endógeno)}$$

#### Análisis de expresión de distrofina mediante análisis por transferencia de Western

Usando un análisis por transferencia de Western, se evalúa la expresión de microdistrofina en diferentes músculos de los perros inyectados:

- En varios músculos esqueléticos, así como en el corazón y en el diafragma, muestreados en el sacrificio,
- En el hígado, bazo y cualquier otro tejido en el que se encontraría un alto nivel de números de copias de transgén, en el sacrificio.

Las proteínas totales se extraen de las muestras de tejido. Los extractos de proteínas se separan en SDS-PAGE, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Tras la tinción con rojo Ponceau, las membranas se bloquean con leche desnatada al 5 % en TBS y se hibridan con el anticuerpo anti-distrofina MANEX1011C y con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP.

#### Análisis de expresión de distrofina mediante inmunohistoquímica

Mediante inmunohistoquímica, se evalúa la expresión de microdistrofina en los músculos esqueléticos de los perros inyectados:

- En biopsias musculares intermedias,
- En todos los músculos esqueléticos, así como en el corazón y en el diafragma, muestreados en el sacrificio,
- En el hígado, bazo, testículos, riñones y nódulos linfáticos, muestreados en el sacrificio.

La expresión y la localización de la microdistrofina se evalúan mediante inmunohistoquímica. La inmunotinción del polipéptido de microdistrofina se realiza en secciones transversales de cada músculo usando el anticuerpo anti-distrofina de ratón de Novocastra (NCL-DYSB). La restauración de las proteínas asociadas con la distrofina se evalúa mediante inmunotinción de  $\beta$ -dístroglicano,  $\beta$ -sarcoglicano, gamma-sarcoglicano y utrofina, incluyendo la colocalización con laminina en la membrana del sarcolema.

#### Evaluación del patrón patológico local en los músculos

La evaluación de la patología es clave para abordar el beneficio real del producto de terapia génica a nivel de tejido diana. Usando análisis morfométricos, el patólogo certificado por el Consejo de la CE evalúa el patrón patológico en los músculos esqueléticos de los perros inyectados. Estos análisis se realizan en músculos posturales con una mayoría de fibras de tipo I (músculos de la extremidad proximal, músculos paravertebrales); en músculos locomotores con una mayoría de fibras de tipo II (flexor y extensores de los músculos de la extremidad distal); en músculos respiratorios, en diafragma, en músculos intercostales y en músculos masticatorios. El corazón también se evalúa extensamente con la dificultad específica para aprehender el diámetro de las fibras debido a una orientación no paralela.

La *fibrosis endomisial* se evalúa tras la revelación inmunohistoquímica de colágeno I (ensayo de inmunoperoxidasa) y la medición automática del porcentaje de las zonas marcadas.

La *fibrosis total* se evalúa tras la revelación inmunohistoquímica de colágeno I (ensayo de inmunoperoxidasa), en los mismos portaobjetos que en la fibrosis endomisial. También se realiza una medición automática del porcentaje de las áreas totales marcadas.

La *fibrosis perimisial* se calcula mediante la diferencia entre la fibrosis total y la fibrosis endomisial en los mismos campos de tejido muscular.

La anocitosis (variación del diámetro de las fibras) se evalúa mediante morfometría manual: determinación del diámetro de fibra mínimo en al menos 200 miofibras y seis campos por sección transversal de músculo analizada.

5 La necrosis se evalúa mediante medición de la acumulación de calcio, mediante una tinción de rojo de Alizarin. El porcentaje de áreas marcadas se mide tras el umbral manual.

La regeneración se evalúa tras la revelación inmunohistoquímica de los miotubos con un anticuerpo específico de una isoforma de cadena pesada de miosina del desarrollo (ensayo de inmunoperoxidasa). El porcentaje de áreas marcadas se mide tras el umbral manual.

10 La inflamación se evalúa tras la revelación inmunohistoquímica de linfocitos T y B y macrófagos en el mismo portaobjetos (ensayo de inmunoperoxidasa). El porcentaje de áreas marcadas se determina tras el umbral manual.

#### Evaluación del patrón patológico en los diferentes tejidos

15 Los posibles efectos secundarios adversos debido a los tejidos fuera de diana (hígado, bazo, riñón, ...) se evalúan usando la tinción de HE y los conocimientos especializados en anatomopatología en los diferentes tejidos de los perros en el sacrificio.

#### Imágenes de RMN e índices de espectroscopía de músculos esqueléticos

20 La obtención no invasiva de imágenes del músculo y los índices de espectroscopía se realizan una semana antes del sacrificio. Los perros se envían al Instituto de Miología, París (equipo de Pierre Carlier) y se someten a un escáner de resonancia magnética nuclear (RMN) 3T Siemens Trio scanner para describir de forma cuantitativa y seriada las anomalías distróficas del músculo en comparación con animales no tratados y sanos. Además de esto,  
25 se realiza una espectroscopía P31 del extensor radial del carpo a 4T en un escáner Bruker biospec. Cada medición individual se coloca en relación a los datos de referencia durante los estudios previos de RMN de la progresión de la enfermedad en grupos de perros sanos y no tratados. Thibaud, J.L., et al., Neuromuscul Disord, 2012. 22 Supl 2: págs. S85-99; Wary, C., et al., NMR Biomed, 2012. 25(10): páginas 1160-9. Se obtienen imágenes torácicas y de las extremidades pélvicas/anteriores en un escáner 3T. Las imágenes de grasas saturadas de T1, T2 y densidad de protones se adquieren tal como se describe en Thibaud, J.L., et al. (Neuromuscul Disord, 2007. 17(7): págs. 575-84). También se realiza una medición de T1 y un estudio cinético de dos horas de potenciación muscular después de la inyección de quelato de gadolinio. Se han identificado diez índices que difieren entre los perros sanos y los GRMD no tratados, que permiten la interpretación del efecto del tratamiento con terapia génica en grandes territorios musculares.

#### Evaluación funcional: clasificación clínica

40 El examen clínico también se realiza dos veces al día e incluye el consumo de alimento y agua, la actividad (comportamiento global, respuesta a estímulos externos) y aspecto físico (cara, pelaje, extremidades). Se realiza un examen completo con el peso corporal en todos los animales durante cada sacrificio.

45 El estado clínico de los animales con respecto a la enfermedad muscular se evalúa mediante una clasificación clínica hecha semanalmente tras la inyección, usando un protocolo publicado anteriormente (Rouger, K., et al., Am J Pathol, 2011. 179(5): págs. 2501-18). Esta evaluación incluye 11 criterios de locomoción y 6 aspectos relacionados al estado de salud general (que incluye disfagia, hipersalivación, actividad global y respiración). Cada aspecto se puntúa de 0 a 2, con 0 correspondiéndose con la ausencia de síntomas y 2 con la máxima gravedad. La puntuación clínica global se expresa como el porcentaje de la puntuación clínica máxima (definida como el 100 % para un perro sano) y se construye una curva de tendencia (móvil significa orden 3) para representar la evolución de la puntuación clínica. La evolución de la puntuación clínica obtenida en los perros inyectados se compara con la evolución de la puntuación clínica de los perros GRMD no inyectados.

#### Evaluación funcional: Análisis de la forma de andar (función muscular)

55 El análisis de la forma de andar cuantificado mediante Locometrix se realiza dos veces al mes. Locometrix® es un dispositivo de acelerómetro en 3D compuesto de 3 acelerómetros colocados de forma ortogonal. Esta construcción permite el registro de las aceleraciones a lo largo de los ejes dorso-ventral, craneo-caudal y medio-lateral de los perros. La velocidad, la frecuencia de la zancada, la longitud de la zancada, la regularidad, la energía total, la energía dorso-ventral, la energía craneo-caudal, la energía medio-lateral y la fuerza se pueden analizar con este dispositivo, y varios de estos índices se modifican durante la progresión de la enfermedad en perros GRMD  
60 (Barthelemy, I., et al., BMC Musculoskelet Disord, 2011. 12: pág. 75).

#### Evaluación funcional: Evaluación de la función cardíaca

65 La función cardíaca de los perros tratados se evalúa mensualmente usando el análisis de ecocardiograma y de Doppler, una estrategia sensible que permite la detección de defectos de contractilidad.

Obtención de datos:

El ecocardiograma convencional y las imágenes en Doppler del tejido (TDI, del inglés *tissue Doppler imaging*) en 2D a color se realizan en perros conscientes en posición de pie controlados por un ECG continuo, usando una unidad de ultrasonidos Vivid 7 equipada con transductores de red en fase 5-7,5 y 2-5MHz (GE, Waukesha, WI), de acuerdo con las recomendaciones del American College of Veterinary Internal Medicine (Thomas, W.P., et al., J Vet Intern Med, 1993. 7(4): págs. 247-52). Todos los datos se transfieren para el análisis fuera de línea usando un programa informático específico (Echo Pac 5.4, GE) por dos examinadores que desconocen el estado clínico de los perros. Se miden varios parámetros para la evaluación de la contractilidad del miocardio tal como se describe a continuación.

Parámetros convencionales: Se miden las dimensiones del ventrículo izquierdo (VI), la pared posterior y el grosor de la pared del septo interventricular.

Se calcula el acortamiento fraccional ventricular izquierdo y la fracción de eyección (método de Teichholz). El Doppler pulsado del flujo de entrada de la válvula mitral se utiliza para medir la relación entre la velocidad de flujo diastólico temprano y tardío (E/A).

Imagen en Doppler del tejido: La medición de las velocidades miocárdicas radiales y la tasa de estiramiento se obtienen desde una vista de eje corto a nivel de los músculos papilares en la pared posterior y una vista apical de 4 cámaras a nivel de la porción basal de las paredes septales y laterales.

Imagen por seguimiento de marcas (Speckle tracking): En una vista del eje corto, se miden los estiramientos del segmento en cada uno de los 5 segmentos predefinidos. La circunferencia media y radial se determinan calculando manualmente la media de las mediciones obtenidas. En la vista de las 4 cámaras, se miden los estiramientos longitudinales globales de manera automática con un programa que integra las mediciones derivadas del análisis de 6 segmentos detectados automáticamente. Los datos de la preinyección y de los GRMD inyectados con placebo sirven como referencia.

Evaluación funcional: evaluación de la función respiratoria

La función respiratoria se evalúa mensualmente y se hace con obtenciones radioscópicas torácicas realizadas en perros conscientes. Tras la obtención de las imágenes al final de la espiración y al final de la inspiración, se calculan 2 índices:

- el índice de retracción caudal del diafragma (IR) refleja la retracción del diafragma;
- el intervalo de movimiento del diafragma (IMD) refleja la movilidad del diafragma: se obtiene tras (i) la superposición de las 2 imágenes obtenidas al final de la inspiración y al final de la espiración, (ii) la medición de la distancia entre la localización del punto ventral del foramen de la vena cava caudal en cada imagen, (iii) la normalización de esta distancia mediante la longitud de la 13ª vértebra torácica (T13).

Estos 2 índices se correlacionan con la retracción y la movilidad del diafragma, que se modifica durante la progresión de la enfermedad en perros GRMD (Barthelemy, I., et al., Myology congress, 2011). Los resultados obtenidos en los perros GRMD se colocan en relación con los resultados obtenidos en animales no tratados no inyectados.

Seguimiento clínico de la función respiratoria:

La función respiratoria también se evalúa mediante una observación de los movimientos/ciclos respiratorios con su modificación que revela algunas anomalías respiratorias, que pueden ser las consecuencias de la debilidad del diafragma y de otros músculos respiratorios. El estado del animal con respecto a la aparición y el empeoramiento de las anomalías respiratorias se evalúan mediante examen clínico realizado de forma bimensual por un veterinario especializado. En particular, se evalúa el número y la regularidad de los movimientos/ciclos respiratorios.

Evaluación funcional: evaluación de la función digestiva

Seguimiento clínico de la función digestiva:

Tal como se ve en pacientes de DMD, la disfagia (es decir, la dificultad en la deglución) es un síntoma típico de la evolución de la enfermedad en perros GRDM, como consecuencia de la debilidad pronunciada muscular oral y faríngea (van den Engel-Hoek, J Neurol, 2013, 260(5): 1295-303).

El estado del animal con respecto a la aparición y el empeoramiento de la disfagia se evalúan mediante examen clínico realizado de forma bimensual por un veterinario especializado. En particular, se evalúa el tamaño de la lengua, la presencia de cantidades anómalas de saliva en la boca, y la capacidad del animal para comer alimento sólido o blando.

Seguimiento de las respuestas inmunológicas

Durante todo el estudio, se recogen muestras de sangre (plasma, suero y células mononucleares de sangre periférica-PBMC) de perros que participan en el estudio para controlar:

- la respuesta inmunológica humoral frente a rAAV8
- la respuesta inmunológica humoral frente a microdistrofina
- la respuesta inmunológica celular frente a rAAV8
- la respuesta inmunológica celular frente a microdistrofina
- la respuesta inmunológica inflamatoria en los momentos tempranos tras la inyección

Las muestras de sangre se manejan de acuerdo con los requisitos de bioseguridad L2 franceses y se procesan para hematología y bioquímica clínica. Las muestras de suero especializadas se obtienen regularmente para las siguientes evaluaciones inmunológicas: (i) anticuerpos anti-AAV y anti-distrofina; (ii) medición de citocinas inflamatorias mediante Luminex; (iii) activación del complemento. También se recogió sangre completa antes y después del tratamiento para el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y el posterior control de una posible respuesta inmunológica celular frente al AAV y/o el polipéptido de distrofina.

Respuestas inmunológicas humorales al vector de rAAV8:

El suero de los perros se evalúa en diferentes puntos temporales tras la inyección del vector: (i) para la presencia de IgG e IgM específicos para rAAV8 detectados mediante ELISA hecho a medida; (ii) para la capacidad de neutralización de rAAV8 revelada mediante el ensayo de neutralización hecho a medida.

Respuestas inmunológicas humorales a la distrofina:

La detección de anticuerpos IgG anti-distrofina se realiza de forma habitual mediante análisis por transferencia de Western. Brevemente, los extractos celulares que contiene proteína distrofina de cánido se someten a SDS-PAGE, y después se transfieren a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL. Tras una saturación durante toda una noche, las membrana se incuban con suero de cánido experimental de los animales inyectados. Posteriormente, la detección se realiza mediante hibridación con anticuerpo IgG anti-perro de conejo conjugado con peroxidasa, seguido por la detección de quimioluminiscencia mejorada. El control positivo consiste en anticuerpo anti-distrofina MANEX 1011C (Wolfson Center for Inherited Neuromuscular Diseases).

Las respuestas inmunológicas celulares a AAV8 y al polipéptido distrofina se evalúa tal como sigue: Brevemente, los ensayos ELISPOT de IFN- $\gamma$  se realizan con vectores de lentivirus (LV) que codifican o bien proteínas VP de AAV8 o polipéptido distrofina de cánido. Los vectores de LV se usan para transducir las PBMC. También se usa una estrategia complementaria usando una biblioteca de péptidos solapantes que abarca la secuencia de cánido del polipéptido de distrofina de cánido para estimular a los linfocitos.

Las respuestas inmunológicas inflamatorias (citocinas) se cuantifican mediante la tecnología Luminex antes y en diferentes puntos temporales tras la administración del vector mirando a IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL15, IFN y TNF.

Resultados:

Tal como se muestra en la Figura 2, los perros GRMD de 2 meses de edad se han inyectado con  $1 \times 10^{14}$  gv/kg del vector rAAV2/8-SPc5.12-cMD descrito anteriormente, mediante inyección sistémica simple a través de una vena periférica. No se detectaron efectos adversos clínicos ni bioquímicos ni hematológicos inmediatamente ni hasta varios meses después de la administración del vector.

Biopsias musculares:

Se obtuvieron biopsias intermedias de varios músculos diferentes de los perros GRMD, a los 3 y 8 meses tras la inyección sistémica.

Siguiendo la metodología descrita anteriormente, se investigó el porcentaje de fibras musculares que expresan el polipéptido distrofina, 3 meses tras la administración sistémica del vector. Los resultados para el perro GRMD 2 se muestran en la Figura 3A.

Junto con el porcentaje de fibras que expresan el transgén terapéutico, el número de genomas del vector por célula diploide (gv/gd) se indica tras seguir la metodología también descrita anteriormente. Para un promedio de 2-4 gv/gd, el porcentaje promedio de fibras que expresan distrofina se clasificó del 59 al 82 % en las biopsias (Figura 3A c/ a f), lo que se interpretó como muy alentador. Se puede notar la ausencia de infiltración celular importante y una arquitectura tisular conservada bastante notable.

8 meses después de la administración sistémica del vector, para 1 gv/gd, el porcentaje de fibras que expresan distrofina fue aproximadamente el 50 % en las biopsias (Figura 3B).

Todos los datos disponibles se compilan en la Tabla 2 a continuación:

5

Tiempo	Músculo	μDis 1 (IMAGE)		μDis 2 (ICI)		μDis 3 (ICE-T)		μDis4 (JAFFAR)		μDis 5 (JACADI)	
		% de Dis	gv/gd	% de Dis	gv/gd	% de Dis	gv/gd	% de Dis	gv/gd	% de Dis	gv/gd
Antes de la inyección 3 meses tras la inyección	Biceps femoral	<0,5%	<0,003	<0,5%	<0,003	<0,5%	<0,003	<0,5%	<0,003	<0,5%	<0,003
	Ext. radial del carpo D	62%	1,3	82%	2,8	43%	2,2	71%	3,4	81%	2,9
	Extensor común de los dedos D	68%	1,2	59%	4,1	31%	2,0	73%	4,7	23%	1,5
	Ext. radial del carpo I	40%	1,1	62%	6,2	61%	2,6	20%	1,5	12%	2,0
	Extensor común de los dedos I	40%	0,9	66%	2,6	42%	1,8	21%	1,0	11%	1,9
8 meses tras la inyección	Biceps femoral D	NP	0,5	58%	1,0	9%	1,0				
	Biceps femoral I	NP	0,9	56%	0,8	38%	1,3				
14 meses tras la inyección	Biceps femoral D	44%	1,0	44%	1,7						
	Biceps femoral I	36%	0,7	40%	1,4						

NP: no procede debido a la baja calidad de la biopsia

ES 2 679 621 T3

Además, en la siguiente tabla se muestra una cuantificación adicional de las copias del genoma del vector en los tejidos del perro GRMD 3, 7,5 meses después de la inyección:

	Tejido	gv/gd
Músculos esqueléticos de la extremidad anterior derecha	m. flexor cubital del carpo	0,16
	m. extensor común de los dedos	0,25
	m. flexos superficial de los dedos	0,12
	m. flexor radial del carpo	0,19
	m. extensor radial del carpo	0,97
	m. pectoral	1,01
	m. deltoides	1,86
Músculos esqueléticos de la extremidad anterior izquierda	m. flexor cubital del carpo	0,24
	m. extensor común de los dedos	0,56
	m. flexos superficial de los dedos	0,11
	m. flexor radial del carpo	0,13
	m. extensor radial del carpo	0,29
	m. pectoral	2,47
	m. deltoides	1,88
Músculos esqueléticos del cuerpo	m. paravertebral lumbar	0,82
	m. intercostales externos	0,35
	m. romboides cervical	1,42
	m. recto abdominal	0,68
Músculos esqueléticos de la extremidad posterior derecha	m. bíceps femoral	1,03
	m. tibial craneal	1,70
	m. semimembranoso	2,06
	m. semitendinoso	1,33
	m. glúteo superficial	0,56
	m. vasto lateral	0,46
	m. sartorio	0,80
	m. gastrocnemio lateral	0,81
	m. extensor largo de los dedos	0,53
m. grácil	0,22	
Músculos esqueléticos de la extremidad posterior izquierda	m. bíceps femoral	1,26
	m. tibial craneal	0,96
	m. semimembranoso	0,39
	m. semitendinoso	0,15
	m. glúteo superficial	1,11
	m. vasto lateral	2,19
	m. sartorio	0,30
	m. gastrocnemio lateral	0,83
	m. extensor largo de los dedos	0,25
m. grácil	0,37	
Diafragma	diafragma	1,26
Corazón	corazón (ventrículos derecho + izquierdo)	1,78
	corazón (septo + parte del nodo atrioventricular)	0,97

Tabla 3: Copias del genoma del vector hallado en los músculos de GRMD3 (7,5 meses tras la inyección).

De forma muy interesante, se observa que incluso en este punto temporal tardío, se detecta una cantidad significativa de partículas transgénicas en todos los músculos esqueléticos del cuerpo (incluso a distancia del sitio de inyección, es decir, la vena cefálica derecha), así como en el corazón y en el diafragma. Esto está a favor de una excelente biodistribución del transgén dentro del organismo completo.

Evaluación clínica:

Los datos preliminares en la evaluación clínica de los 5 perros GRMD tratados se realizó tal como se describe anteriormente frente a los otros 8 perros GRMD de la misma edad. La figura 4 muestra, a diferentes puntos temporales tras la inyección del vector, una mejora en la puntuación clínica basada esencialmente en la disfagia, en la respiración, en la hipersalivación, y en la actividad global. La puntuación del 100 % se corresponde con individuos sanos. Incluso si los resultados clínicos pueden variar entre individuos tratados en el mismo grupo (como suele ser el caso entre GRMD no tratados), estos resultados sugieren que los animales GRMD tratados presentan hasta ahora un fenotipo bastante estable, mejor que el de la mayoría de los animales no tratados. La puntuación clínica evaluada en perros tratados se mantiene a un nivel que se corresponde con al menos el 50 % de la puntuación máxima obtenida en perros sanos (100 %), estando algunos animales por encima del 70 %, mientras que la puntuación clínica de la gran mayoría de los animales no tratados rápidamente caen por debajo del 40 % o incluso menos (Figura 4).

De manera destacable, el seguimiento clínico muestra que incluso con un año de edad, los perros GRMD tratados son capaces de correr, de saltar obstáculos, de levantarse sobre sus patas traseras. Esto nunca se observó en perros GRMD no tratados, para los que la esperanza de vida es raramente de más de un año.

Los datos presentados en la Figura 4 también sostienen una mejora de las funciones cardíaca y respiratoria en perros tratados y una supervivencia prolongada en comparación con perros no tratados, junto con una mejora en la calidad de vida.

Caracterización de la forma de andar:

Tal como se ha mencionado anteriormente, la evaluación bimensual de la forma de andar se realizó usando el dispositivo Locometrix®. El acelerómetro se registró en 3 ejes: dorso-ventral (DV), medio-lateral (ML) y craneo-caudal (CC). La caracterización de la forma de andar mediante un análisis estadístico de factor discriminante de 7 variables de la forma de andar (frecuencia de la zancada, regularidad, energía total, energía craneo-caudal, energía dorso-ventral, energía medio-lateral y longitud de zancada) se muestra en la Figura 5.

Los resultados obtenidos en los perros inyectados se colocan en relación con los datos de referencia recogidos durante un estudio previo con acelerómetros en 3D de la progresión de la enfermedad en un grupo de 25 GRMD sin tratar y 9 perros normales (Barthelemy, I., et al., BMC Musculoskelet Disord, 2011. 12: pág. 75).

Los datos muestran que los perros GRMD tratados con  $\mu$ Dis desarrollaron un índice global de la forma de andar que fue muy diferente y muy mejorado al observado para los perros GRMD no tratados de la misma edad. Ellos rápidamente mejoraron sus rendimientos en la forma de andar para presentar una forma de andar muy próxima a la de los perros sanos, solo tras 3 a 4 meses tras la inyección. A partir de estos datos, parece que los perros GRMD tratados con  $\mu$ Dis presentan una forma de andar que es cercana a la de perros sanos de la misma raza.

Funciones cardíaca y respiratoria:

Las puntuaciones clínicas mostradas en la Figura 4 sostienen una mejora de la función cardíaca y respiratoria.

Más específicamente, la función respiratoria mejorada se sostiene con la Figura 6 en la que, a pesar de una variabilidad significativa entre los perros, revela valores superiores para el índice del IMD en los perros GRMD tratados, en conexión con una movilidad mejorada del diafragma.

Estos datos también corroboran el seguimiento clínico de los perros documentado en la Tabla 4 a continuación:

	Edad de aparición de anomalías respiratorias
$\mu$ Dis 1 (IMAGE)	19 meses
$\mu$ Dis 2 (ICI)	Ninguna
$\mu$ Dis 3 (ICE-T)	Ninguna
$\mu$ Dis 4 (JAFFAR)	Ninguna

	Edad de aparición de anomalías respiratorias
μDis 5 (JACADI)	Ninguna
GRMD Control 1 (JAMES)	7 meses
GRMD Control 2 (JESSY)	7 meses
GRMD Control 3 (JOSS)	6 meses
GRMD Control 4 (EBOUGE)	6 meses
GRMD Control 5 (FELIX)	4 meses
GRMD Control 6 (FIASKO)	7 meses

5 Las anomalías respiratorias en perros GRMD se caracterizan por una modificación de los movimientos/ciclos respiratorios. Como en los pacientes de DMD, estas anomalías son la consecuencia de debilidad del diafragma y otros músculos respiratorios. La Tabla 4 revela un retraso o incluso supresión en la aparición de anomalías respiratorias en los perros GRMD tratados (μDis).

Funciones digestivas:

10 La disfagia (dificultad en la deglución) es un síntoma típico de la evolución de la enfermedad en perros GRMD. Como en los pacientes de DMD, la disfagia es la consecuencia de una debilidad pronunciada muscular oral y faríngea.

15 Se ha investigado una posible ventaja del tratamiento sobre las funciones digestivas y los resultados se documentan a continuación en la Tabla 5:

	Edad de aparición de la disfagia		Gravedad
μDis 1 (IMAGE)	12 meses	10,2 meses +/-2,0 meses	Débil
μDis 2 (ICI)	12 meses		Muy débil
μDis 3 (ICE-T)	10 meses		Débil
μDis 4 (JAFFAR)	10 meses		Débil
μDis 5 (JACADI)	7 meses		Débil
GRMD Control 1 (JAMES)	8 meses	6,2 meses +/-1,3 meses	Marcada
GRMD Control 2 (JESSY)	4 meses		Grave
GRMD Control 3 (JOSS)	6 meses		Marcada
GRMD Control 4 (EBOUGE)	6 meses		Débil
GRMD Control 5 (FELIX)	6 meses		Muy débil
GRMD Control 6 (FIASKO)	7 meses		Débil

Este seguimiento clínico revela un retraso en la aparición de disfagia en los perros GRMD tratados (μDis), con síntomas menos graves.

20 Respuesta inmunológica / Toxicidad:

La detección de la proteína, 3 y 8 meses después de la inyección (Figura 3) así como las buenas puntuaciones clínicas mostradas en la Figura 4, indican la ausencia de respuestas inmunológicas adversas y deletéreas para el vector recombinante de AAV y para la microdistrofina.

25 Las biopsias del músculo (Figura 3) así como las buenas puntuaciones clínicas mostradas en la Figura 4, sostienen la ausencia de toxicidad del producto de terapia génica.

30 En términos de bioseguridad, la respuesta inmunológica celular frente a cMD se evaluó, mediante Elispot de interferón gamma usando grupos de péptidos de cMDYF sobre una cinética de PBMC (Figura 7). Cualquiera que sea

la dosis inyectada, ninguno de los animales inyectados presentó una secreción detectable de interferón gamma, lo que sugiere una ausencia de respuesta inmunológica celular frente a cMDYF.

5 La respuesta inmunológica celular frente a cMD también se evaluó mediante un análisis de inmunotransferencia de western (Figura 8). Todos los resultados disponibles se compilan en la Tabla 6 a continuación:

		Antes de la inyección	Mes +0,5	Mes +1,5	Mes +2	Mes +4	Mes +7,5
1 <sup>E</sup> 14 gv/kg	μDis 1	Nd	Nd	++	Nd	Nd	Nd
	μDis 2	Nd	+	++	++	+	Nd
	μDis 3	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	μDis 4	<i>Pendiente</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Pendiente</i>
	μDis 5	<i>Pendiente</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Pendiente</i>

10 En el presente caso, la presencia de anticuerpos anti-μdistrofina se detectó en 2 de 5 perros inyectados con 10<sup>14</sup>gv/kg del vector AAV-cMD. De importancia, esta respuesta inmunológica humoral frente a cMD es solo transitoria (intervalo máximo de detección = entre 2 semanas y 4 meses tras la inyección) y no parece estar asociada con cualquier efecto clínico deletéreo, lo que sugiere que podría tener lugar una tolerancia inmunológica en estos animales.

15 Supervivencia:

La supervivencia prolongada claramente aparece a partir de la Figura 4:

- a la edad de 8-9 meses, solo 2 de 8 perros GRMD no tratados aún están vivos. Por el contrario, todos los perros GRMD tratados aún están vivos y sanos;
- 20 - de forma general, la esperanza de vida de los perros GRMD no tratados está alrededor de los 12 meses con un estado clínico muy malo a esta edad. Por el contrario, los 2 perros GRMD tratados probados para un seguimiento a largo plazo (μDis 1 y 2) permanecen vivos después de este plazo (con una edad de 19 y 17 meses, respectivamente) y están en un buen estado clínico.

25 Dosis terapéutica:

El presente estudio revela que 10<sup>14</sup> gv/kg, una dosis relativamente baja para la administración sistémica, es una dosis apropiada en términos de eficacia y toxicidad en perros.

30 CONCLUSIONES:

35 En conjunto, estos datos funcionales se correlacionan bien con una expresión sustancial de polipéptido distrofina (>50 % de fibras que expresan microdistrofina) en biopsias intermedias del músculo. Los datos muestran el efecto terapéutico de la construcción de microdistrofina MD y sostienen que la administración sistémica puede ser beneficiosa para detener/reducir la progresión de la enfermedad. Los resultados obtenidos de esta cohorte piloto sistémica de GRMD indican que varias medidas de resultado de aspectos moleculares, patológicos y funcionales apoyan la terapia génica sistémica en humanos.

40 El presente estudio aporta la prueba del concepto de que el casete terapéutico *SPc5.12-cMD* que codifica una microdistrofina de secuencia optimizada y encapsulada en la cápside del AAV8 proporciona un beneficio clínico para el modelo de perro de la miopatía de Duchenne después de la administración intravenosa sistémica de una dosis única. El polipéptido de microdistrofina no solo se expresó de forma elevada en múltiples músculos, sino que también dio como resultado una mejora en la forma de andar y mejores medidas de resultado clínico, una supervivencia prolongada, sin respuesta inmunológica adversa. Para el conocimiento de los inventores, este es el primer informe de resultados tan alentadores y sorprendentes, especialmente en el contexto de una administración sistémica.

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> GENETHON ROYAL HOLLOWAY AND BEDFORD NEW COLLEGE

<120> TRATAMIENTO SISTÉMICO EFICAZ DE PATOLOGÍAS DISTRÓFICAS

<130> G143-B-43539 PCT

55

ES 2 679 621 T3

<150> EP14174848.3  
<151> 27/06/2014

5 <150> PCT/EP2015/058964  
<151> 24/04/2015

<160> 8

10 <170> BiSSAP 1.3

<210> 1  
<211> 4640  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> AAV\_ITR\_Spc512-human MD1

20 <400> 1

```

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccc ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg      60
tcgcccggcc tcagtgagcg agcagagcgcg cagagaggga gtggccaact ccatcactag      120
gggttccttg tagttaatga ttaaccgcc atgctactta tctacgtagc catgctctag      180
acatggctcg acagatcgag ctccaccgcg gtggcggccg tccgccctcg gcaccatcct      240
cacgacaccc aaatatggcg acgggtgagg aatggtgggg agttattttt agagcgggta      300
ggaaggtggg caggcagcag gtggtggcgc tctaaaaata actcccggga gttattttta      360
gagcggagga atggtggaca cccaaatatg gcgacggttc ctcaccgctc gccatatttg      420
ggtgtccgcc ctcgccgggg gccgcattcc tgggggcccg gcggtgctcc cgcccgcctc      480
gataaaaggc tccggggccc gcggcgcccc acgagctacc cggaggagcg ggaggcgcca      540
agctctagaa ctagtggatc ccccgggctg caggaattcg ccacatgct gtggtgggag      600
gaagtggagg actgctacga gagagaggac gtgcagaaga aaacctcac caagtgggtg      660
aacgccagt tcagcaagtt cggcaagcag cacatcgaga acctgttcag cgacctgcag      720
gatggcagga gactgctgga tctgctggag ggactgaccg gccagaagct gcccaaggag      780
aagggcagca ccagagtgca cgccctgaac aacgtgaaca aggccctgag agtgctgcag      840
aacaacaacg tggacctggt gaatatcggc agcaccgaca tcgtggacgg caaccacaag      900
ctgaccctgg gcctgatctg gaacatcatc ctgcactggc aggtgaagaa cgtgatgaag      960
aacatcatgg cgggcctgca gcagaccaac agcgagaaga tcctgctgag ctgggtgagg     1020
cagagcacca gaaactaccc ccaggtgaac gtgatcaact tcaccacctc ctggagcgac     1080

```

ES 2 679 621 T3

ggcctggccc	tgaacgccct	gatccacagc	cacagacccg	acctgttcga	ctggaacagc	1140
gtggtgtgtc	agcagagcgc	caccagaga	ctggagcacg	ccttcaacat	cgccagatac	1200
cagctgggca	tcgagaagct	gctggacccc	gaggacgtgg	acaccaccta	ccccgacaag	1260
aaaagcatcc	tgatgtatat	tacctctctg	tttcaggtgc	tgccccagca	ggtgtccatc	1320
gaggccatcc	aggaagtgga	aatgctgccc	aggcccccca	aagtgaccaa	ggaggagcac	1380
ttccagctgc	accaccagat	gcactatagc	cagcagatca	ccgtgtccct	ggcccagggc	1440
tatgagagaa	ccagcagccc	caagcccaga	ttcaagagct	acgcctacac	ccaggccgcc	1500
tacgtgacca	cctccgaccc	caccagaagc	cccttcccc	gccagcacct	ggaggcccc	1560
gaggacaaga	gcttcggcag	cagcctgatg	gagagcgaag	tgaacctgga	cagataccag	1620
accgccctgg	aggaagtgct	gtcttggtg	ctgtccgccg	aggacaccct	gcaggcccag	1680
ggcgagatca	gcaacgacgt	ggaagtggtg	aaggaccagt	tccacacca	cgagggctac	1740
atgatggatc	tgaccgcccc	ccagggcaga	gtgggcaata	tctgcagct	gggcagcaag	1800
ctgatcggca	ccggcaagct	gagcgaggac	gaggagaccg	aagtgcagga	gcagatgaac	1860
ctgctgaaca	gcagatggga	gtgcctgaga	gtggccagca	tggagaagca	gagcaacctg	1920
caccgcgtgc	tgatggacct	gcagaaccag	aagctgaagg	agctgaacga	ctggctgacc	1980
aagaccgagg	agcggaccag	aaagatggag	gaggagcccc	tgggccccga	cctggaggac	2040
ctgaagagac	aggtgcagca	gcacaaagtg	ctgcaggagg	acctggaaca	ggagcaggtg	2100
cgcgtgaaca	gcctgaccca	catggtggtc	gtggtggacg	agagcagcgg	cgaccacgcc	2160
acagccgccc	tggaagagca	gctgaaagtg	ctgggcgaca	gatgggcca	catctgccgg	2220
tggaccgagg	acagatgggt	gctgctgcag	gacatcctgc	tgaagtggca	gagactgaca	2280
gaggagcagt	gcctgtttag	cgctggctg	agcgagaagg	aggacgccgt	gaacaagatc	2340
cacaccaccg	gcttcaagga	ccagaacgag	atgctgagca	gcctgcagaa	gctggccgtg	2400
ctgaaggccg	atctggagaa	gaaaaagcag	agcatgggca	agctgtactc	cctgaagcag	2460
gacctgctgt	ccaccctgaa	gaacaagagc	gtgaccacaga	aaaccgaggc	ctggctggac	2520
aatttcgccc	ggtgctggga	caatctggtg	cagaaactgg	agaagagcac	cgcccagatc	2580
agccaggccg	tgaccaccac	ccagcccagc	ctgacacaga	ccaccgtgat	ggagaccgtg	2640
accacagtga	ccaccagggg	gcagatcctg	gtgaagcacg	cccaggagga	gctgccccct	2700
cccccccctc	agaagaagcg	gcagatcaca	gtggacaccc	tggagagact	gcaggagctg	2760
caggaagcca	ccgacgagct	ggacctgaag	ctgagacagg	ccgaagtgat	caagggcagc	2820
tggcagcctg	tgggcgatct	gctgatcgac	agcctgcagg	accacctgga	gaaagtgaag	2880
gccctgcggg	gcgagatcgc	ccccctgaag	gagaatgtga	gccacgtgaa	cgacctggcc	2940

ES 2 679 621 T3

```

agacagctga ccaccctggg catccagctg agcccctaca atctgagcac cctggaagat 3000
ctgaacaccc ggtggaaact gctgcaggtg gccgtggagg atagagtgag gcagctgcac 3060
gaggcccaca gagacttcgg ccctgcctcc cagcacttcc tgagcaccag cgtgcagggc 3120
ccctgggaga gagccatctc ccccaacaaa gtgccctact acatcaacca cgagacccag 3180
accacctgct gggaccaccc taagatgacc gagctgtacc agagcctggc cgacctgaac 3240
aatgtgcggt tcagcgccta cagaaccgcc atgaagctgc ggagactgca gaaggccctg 3300
tgcctggacc tgctgagcct gagcgcgcc tgcgacgccc tggaccagca caacctgaag 3360
cagaacgacc agcccatgga cattctgcag atcatcaact gcctgaccac catctacgat 3420
cggctggagc aggagcacia caacctggtg aacgtgcccc tgtgctgga catgtgcctg 3480
aattggctgc tgaacgtgta cgacaccggc aggaccggca gaatcagagt gctgtccttc 3540
aagaccggca tcatcagcct gtgcaaggcc cacctggagg ataagtaccg ctacctgttc 3600
aagcaggtgg ccagcagcac cggcttctgc gatcagagga gactgggcct gctgctgcac 3660
gatagcatcc agatccctag gcagctgggc gaagtggcca gctttggcgg cagcaacatc 3720
gagccctctg tgaggagctg cttccagttc gccacaaca agcccagat cgaggccgcc 3780
ctgttcctgg attggatgag gctggagccc cagagcatgg tgtggctgcc tgtgctgcac 3840
agagtggccg ccgccgagac cgccaagcac caggccaagt gcaacatctg caaggagtgc 3900
cccatcatcg gottccggta caggagcctg aagcaottca actacgacat ctgccagagc 3960
tgctttttca gggcagagt ggccaagggc cacaagatgc actaccccat ggtggagtac 4020
tgcacccccca ccacctccgg cgaggatgtg agagacttcg ccaaagtgct gaagaataag 4080
ttccggacca agcggctactt tgccaagcac cccaggatgg gctacctgcc cgtgcagacc 4140
gtgctggagg gcgacaacat ggagaccgac accatgtgat gatgagcggc cgcttccctt 4200
tagtgagggg taatgcttcg agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc 4260
acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta 4320
tttghtaacca ttataagctg caataaacia gttacaaca acaattgcat tcattttatg 4380
tttcaggttc agggggagat gtgggaggtt ttttaaagca agtaaacct ctacaaatgt 4440
ggtaaaatcc gataaggact agagcatggc tacgtagata agtagcatgg cgggttaatc 4500
attaactaca aggaaccctt agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg 4560
ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca 4620
gtgagcgagc gagcgcgcag 4640

```

<210> 2  
 <211> 4643  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> AAV\_ITR\_Spc512-canine MD1

ES 2 679 621 T3

<400> 2

gcgcgctcgc	tcgctcaactg	aggccgccccg	ggcaaagccc	gggcgtcggg	cgacctttgg	60
tcgcccggcc	tcagtgagcg	agcgagcgcg	cagagaggga	gtggccaact	ccatcactag	120
gggttccttg	tagttaatga	ttaaccggcc	atgctactta	tctacgtagc	catgctctag	180
acatggctcg	acagatcgag	ctccaccgcg	gtggcgcccg	tccgccctcg	gcaccatcct	240
cacgacaccc	aaatatggcg	acgggtgagg	aatggtgggg	agttatTTTT	agagcggtga	300
ggaaggtggg	caggcagcag	gtgttggcgc	tctaaaaata	actcccggga	gttatTTTTa	360
gagcggagga	atggtggaca	cccaaatatg	gcgacggttc	ctcaccgctc	gcatatTTTg	420
ggtgtccgcc	ctcggccggg	gccgcattcc	tgggggccccg	gcggtgctcc	cgcccgctc	480
gataaaaggc	tccggggccg	gcggcgcccc	acgagctacc	cggaggagcg	ggaggcgcca	540
agctctagaa	ctagtggatc	ccccgggctg	caggaattcg	ccaccatgct	gtggtgggag	600
gaagtggagg	actgctacga	gagagaggac	gtgcagaaga	aaaccttcac	caagtggatc	660
aacgccagtc	tcagcaagtt	cggcaagcag	cacatcgaga	acctgttcag	cgatctgcag	720
gatggcagga	gactgctgga	tctgctggag	ggactgaccg	gccagaagct	gccaaggag	780
aagggcagca	ccagagtgca	cgccctgaac	aacgtgaaca	aggccctgag	agtgtgcag	840
aagaacaacg	tggacctggt	ggatatcggc	agcaccgaca	tcgtggacgg	caaccacaag	900
ctgaccctgg	gcctgatctg	gaacatcatc	ctgcaactgg	aggtgaagaa	cgtgatgaag	960
aacatcatgg	ccggcctgca	gcagaccaac	agcgagaaga	tcctgctgag	ctgggtgagg	1020
cagagcacca	gaaactaccc	ccaggtgaac	gtgatcaact	tcaccacctc	ctggagcgac	1080
ggcctggccc	tgaacgccct	gatccacagc	cacagacccg	acctgttcga	ctggaacagc	1140
gtggtgtgtc	agcagagcgc	caccagagga	ctggagcagc	ccttcaacat	cgccaagtac	1200
cagctgggca	tcgagaagct	gctggacccc	gaggacgtgg	ccaccaccta	ccccgacaag	1260
aaaagcatcc	tgatgtatat	taccagcctg	ttccaggtgc	tgccccagca	ggtgtccatc	1320
gaggccatcc	aggaagtgga	aatgctgccc	aggcccagca	aagtgaccag	ggaggagcac	1380
ttccagctgc	accaccagat	gcactatagc	cagcagatca	ccgtgtccct	ggcccagggc	1440
tatgagagag	cccctagcag	ccccaaagccc	cggttcaaga	gctacgccta	caccagggcc	1500
gcctacgtga	ccacctccga	ccccaccaga	agccccctgc	ccagccagca	cctggagacc	1560
cctgaggata	agagcttcgg	cagaagcctg	accgagaccg	aggccaacct	ggatagctac	1620
cagaccgccc	tggaggaagt	gctgtcttgg	ctgctgtccg	ccgaggacgc	cctgcaggcc	1680
cagggcgaga	tcagcaacga	cgtggaagaa	gtgaaggagc	agttccacac	ccacgagggc	1740

ES 2 679 621 T3

tacatgatgg	acctgaccag	ccaccagggc	agagtgggca	acgtgctgca	gctgggcagc	1800
cagctgatcg	gcaccggcaa	gctgagcgag	gacgaggaga	ccgaagtgca	ggaacagatg	1860
aacctgctga	acagcagatg	ggagtgcctg	agagtggcca	gcatggagaa	gcagagcaac	1920
ctgcacaaaag	tgctgatgga	tctgcagaac	cagcagctga	aggagctgaa	cgactggctg	1980
accaagacag	aggagcggac	ccggaagatg	gagaaggagc	ccctgggccc	tgacatcgag	2040
gacctgaaga	ggcaggtgca	gcagcataag	gtcctgcagg	aggatctgga	gcaggagcag	2100
gtgcgcgtga	acagcctgac	ccacatggtg	gtcgtggtgg	acgagagcag	cggcgaccac	2160
gccacagccg	ccctggaaga	gcagctgaaa	gtgctgggcg	gcagatgggc	caatatctgc	2220
cggtggaccg	aggacagatg	ggtgctgctg	caggacatcc	tgctgaagtg	gcagagattc	2280
accgaggagc	agtgcctggt	tagcgcctgg	ctgagcgaga	aggaggacgc	cgtgaacaag	2340
atccacacca	ccggcttcaa	ggaccagagc	gaagtgctgt	ccaacctgca	gaagctggcc	2400
gtgctgaaaa	ccgacctgga	gaagaaaaag	cagaccatgg	acaagctgtg	cagcctgaac	2460
caggacctgc	tgagcgcctt	gaagaacacc	gtggtggccc	acaagatgga	ggcctggctg	2520
gataatagcg	ctcagagatg	ggataatctg	gtgcagaaac	tggagaagag	cagcgcctcag	2580
atcagccagg	ccgtgaccac	caccagccc	agcctgacac	agaccaccgt	gatggagacc	2640
gtgaccatgg	tgaccaccag	ggagcacatc	ctggtgaagc	acgcccagga	ggagctgccc	2700
cctccccccc	ctcagaagaa	gcggcagatc	atcgtggatg	ccctggagag	actgcaggag	2760
ctgcaggaag	ccaccgacga	gctggacctg	aagctgagac	aggccgaagt	gatcaagggc	2820
agctggcagc	ctgtgggcca	tctgctgata	gacagcctgc	aggaccacct	ggagaaaagtg	2880
aagccctgc	ggggcgagac	cacccccctg	aaggagaacg	tgtcctacgt	gaacgacctg	2940
gccagacagc	tgaccaccct	gggcattcag	ctgagcccct	acaacctgaa	caccctggag	3000
gatctgaaca	cccggtgga	actgctgcag	gtggccattg	aggaccggat	caggcagctg	3060
cacgaggccc	acagagactt	cggccctgct	tctcagcatt	tcctgagcac	cagcgtgcag	3120
ggcccctggg	agagagccat	cagccccaac	aaagtgcctt	actacatcaa	ccacgagacc	3180
cagaccacct	gctgggacca	ccctaagatg	accgagctgt	accagagcct	ggccgacctg	3240
aacaatgtgc	ggttcagcgc	ctacagaacc	gccatgaagc	tgccggagact	gcagaaggcc	3300
ctgtgcctgg	acctgctgtc	cctgagcgcc	gcctgcgacg	ccctggacca	gcacaacctg	3360
aagcagaacg	accagcccat	ggatatcctg	caggtgatca	actgcctgac	caccatctac	3420
gatcggctgg	agcaggagca	caacaacctg	gtgaacgtgc	ccctgtgcgt	ggacatgtgc	3480
ctgaattggc	tgctgaacgt	gtacgacacc	ggcaggaccg	gcagaatcag	agtgtgttcc	3540
ttcaagaccg	gcatcatcag	cctgtgcaag	gcccacctgg	aggataagta	ccgtacctg	3600
ttcaagcagg	tggccagcag	caccggcttc	tgcatcaga	ggagactggg	cctgctgctg	3660

ES 2 679 621 T3

cacgatagca tccagatccc taggcagctg ggcgaagtgg ccagctttgg cggcagcaac 3720  
 atcgagccct ctgtgaggag ctgcttccag ttcgccaaca acaagcccga gatcgaggcc 3780  
 gccctgttcc tggattggat gaggtggag ccccagagca tgggtgtggct gcctgtgctg 3840  
 cacagagtgg cggccgccga gaccgccaaag caccaggcca agtgcaacat ctgcaaggag 3900  
 tgccccatca tgggcttccg gtacaggagc ctgaagcact tcaactacga catctgccag 3960  
 agctgctttt tcagcggcag agtggccaag ggccacaaga tgcactacc ccatggtggag 4020  
 tactgcaccc ccaccacctc cggcgaggat gtgagagact tcgccaaagt gctgaagaat 4080  
 aagttccgga ccaagcggta ctttgccaag caccacagga tgggctacct gcccgtcag 4140  
 accgtgctgg agggcgacaa catggagacc gacaccatgt gatgatgagc ggccgcttcc 4200  
 ctttagtgag ggttaatgct tcgagcagac atgataagat acattgatga gtttggacaa 4260  
 accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc tttatttgtg aaatttgtga tgctattgct 4320  
 ttatttgtaa ccattataag ctgcaataaa caagttaaca acaacaattg cattcatttt 4380  
 atgtttcagg ttcaggggga gatgtgggag gttttttaa gcaagtaaaa cctctacaaa 4440  
 tgtggtaaaa tccgataagg actagagcat ggctacgtag ataagtagca tggcgggta 4500  
 atcattaact acaaggaacc cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc 4560  
 tcgctcactg agggcggggc accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc 4620  
 tcagtgagcg agcgagcgcg cag 4643

<210> 3  
 <211> 1197  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> MD1 de humano

10

<400> 3

ES 2 679 621 T3

Met	Leu	Trp	Trp	Glu	Glu	Val	Glu	Asp	Cys	Tyr	Glu	Arg	Glu	Asp	Val
1				5					10					15	
Gln	Lys	Lys	Thr	Phe	Thr	Lys	Trp	Val	Asn	Ala	Gln	Phe	Ser	Lys	Phe
			20					25					30		
Gly	Lys	Gln	His	Ile	Glu	Asn	Leu	Phe	Ser	Asp	Leu	Gln	Asp	Gly	Arg
		35					40					45			
Arg	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Thr	Gly	Gln	Lys	Leu	Pro	Lys
	50					55					60				
Glu	Lys	Gly	Ser	Thr	Arg	Val	His	Ala	Leu	Asn	Asn	Val	Asn	Lys	Ala
65					70					75					80
Leu	Arg	Val	Leu	Gln	Asn	Asn	Asn	Val	Asp	Leu	Val	Asn	Ile	Gly	Ser
				85					90					95	
Thr	Asp	Ile	Val	Asp	Gly	Asn	His	Lys	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Ile	Trp
			100					105						110	
Asn	Ile	Ile	Leu	His	Trp	Gln	Val	Lys	Asn	Val	Met	Lys	Asn	Ile	Met
		115				120						125			
Ala	Gly	Leu	Gln	Gln	Thr	Asn	Ser	Glu	Lys	Ile	Leu	Leu	Ser	Trp	Val
	130					135						140			

ES 2 679 621 T3

Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	Asn	Tyr	Pro	Gln	Val	Asn	Val	Ile	Asn	Phe	Thr
145					150					155					160
Thr	Ser	Trp	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Leu	Asn	Ala	Leu	Ile	His	Ser	His
				165					170					175	
Arg	Pro	Asp	Leu	Phe	Asp	Trp	Asn	Ser	Val	Val	Cys	Gln	Gln	Ser	Ala
			180					185						190	
Thr	Gln	Arg	Leu	Glu	His	Ala	Phe	Asn	Ile	Ala	Arg	Tyr	Gln	Leu	Gly
			195					200				205			
Ile	Glu	Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Glu	Asp	Val	Asp	Thr	Thr	Tyr	Pro	Asp
	210					215					220				
Lys	Lys	Ser	Ile	Leu	Met	Tyr	Ile	Thr	Ser	Leu	Phe	Gln	Val	Leu	Pro
225					230					235					240
Gln	Gln	Val	Ser	Ile	Glu	Ala	Ile	Gln	Glu	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Arg
				245					250					255	
Pro	Pro	Lys	Val	Thr	Lys	Glu	Glu	His	Phe	Gln	Leu	His	His	Gln	Met
			260						265					270	
His	Tyr	Ser	Gln	Gln	Ile	Thr	Val	Ser	Leu	Ala	Gln	Gly	Tyr	Glu	Arg
		275						280					285		
Thr	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Arg	Phe	Lys	Ser	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Gln	Ala
	290					295					300				
Ala	Tyr	Val	Thr	Thr	Ser	Asp	Pro	Thr	Arg	Ser	Pro	Phe	Pro	Ser	Gln
305					310					315					320
His	Leu	Glu	Ala	Pro	Glu	Asp	Lys	Ser	Phe	Gly	Ser	Ser	Leu	Met	Glu
				325					330					335	
Ser	Glu	Val	Asn	Leu	Asp	Arg	Tyr	Gln	Thr	Ala	Leu	Glu	Glu	Val	Leu
			340					345					350		
Ser	Trp	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Asp	Thr	Leu	Gln	Ala	Gln	Gly	Glu	Ile
		355					360					365			
Ser	Asn	Asp	Val	Glu	Val	Val	Lys	Asp	Gln	Phe	His	Thr	His	Glu	Gly
	370					375					380				
Tyr	Met	Met	Asp	Leu	Thr	Ala	His	Gln	Gly	Arg	Val	Gly	Asn	Ile	Leu
385				390						395					400
Gln	Leu	Gly	Ser	Lys	Leu	Ile	Gly	Thr	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Asp	Glu
				405					410					415	
Glu	Thr	Glu	Val	Gln	Glu	Gln	Met	Asn	Leu	Leu	Asn	Ser	Arg	Trp	Glu
			420					425					430		
Cys	Leu	Arg	Val	Ala	Ser	Met	Glu	Lys	Gln	Ser	Asn	Leu	His	Arg	Val
		435					440					445			
Leu	Met	Asp	Leu	Gln	Asn	Gln	Lys	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn	Asp	Trp	Leu
	450					455					460				
Thr	Lys	Thr	Glu	Glu	Arg	Thr	Arg	Lys	Met	Glu	Glu	Glu	Pro	Leu	Gly
465					470					475					480
Pro	Asp	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Arg	Gln	Val	Gln	Gln	His	Lys	Val	Leu
				485					490					495	
Gln	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Glu	Gln	Val	Arg	Val	Asn	Ser	Leu	Thr	His
			500					505					510		
Met	Val	Val	Val	Val	Asp	Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	His	Ala	Thr	Ala	Ala
		515					520					525			
Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Lys	Val	Leu	Gly	Asp	Arg	Trp	Ala	Asn	Ile	Cys
	530					535					540				
Arg	Trp	Thr	Glu	Asp	Arg	Trp	Val	Leu	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Leu	Lys
545					550					555					560
Trp	Gln	Arg	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Cys	Leu	Phe	Ser	Ala	Trp	Leu	Ser
				565					570					575	
Glu	Lys	Glu	Asp	Ala	Val	Asn	Lys	Ile	His	Thr	Thr	Gly	Phe	Lys	Asp
			580					585					590		
Gln	Asn	Glu	Met	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Lys	Leu	Ala	Val	Leu	Lys	Ala
		595					600					605			
Asp	Leu	Glu	Lys	Lys	Lys	Gln	Ser	Met	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ser	Leu	Lys
	610					615					620				
Gln	Asp	Leu	Leu	Ser	Thr	Leu	Lys	Asn	Lys	Ser	Val	Thr	Gln	Lys	Thr
625					630					635					640
Glu	Ala	Trp	Leu	Asp	Asn	Phe	Ala	Arg	Cys	Trp	Asp	Asn	Leu	Val	Gln

ES 2 679 621 T3

				645					650					655			
Lys	Leu	Glu	Lys	Ser	Thr	Ala	Gln	Ile	Ser	Gln	Ala	Val	Thr	Thr	Thr		
			660					665						670			
Gln	Pro	Ser	Leu	Thr	Gln	Thr	Thr	Val	Met	Glu	Thr	Val	Thr	Thr	Val		
		675					680							685			
Thr	Thr	Arg	Glu	Gln	Ile	Leu	Val	Lys	His	Ala	Gln	Glu	Glu	Leu	Pro		
		690				695						700					
Pro	Pro	Pro	Pro	Gln	Lys	Lys	Arg	Gln	Ile	Thr	Val	Asp	Thr	Leu	Glu		
705				710						715				720			
Arg	Leu	Gln	Glu	Leu	Gln	Glu	Ala	Thr	Asp	Glu	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu		
				725					730					735			
Arg	Gln	Ala	Glu	Val	Ile	Lys	Gly	Ser	Trp	Gln	Pro	Val	Gly	Asp	Leu		
			740					745						750			
Leu	Ile	Asp	Ser	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Glu	Lys	Val	Lys	Ala	Leu	Arg		
		755					760							765			
Gly	Glu	Ile	Ala	Pro	Leu	Lys	Glu	Asn	Val	Ser	His	Val	Asn	Asp	Leu		
	770					775						780					
Ala	Arg	Gln	Leu	Thr	Thr	Leu	Gly	Ile	Gln	Leu	Ser	Pro	Tyr	Asn	Leu		
785					790					795					800		
Ser	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Asn	Thr	Arg	Trp	Lys	Leu	Leu	Gln	Val	Ala		
				805					810						815		
Val	Glu	Asp	Arg	Val	Arg	Gln	Leu	His	Glu	Ala	His	Arg	Asp	Phe	Gly		
			820					825						830			
Pro	Ala	Ser	Gln	His	Phe	Leu	Ser	Thr	Ser	Val	Gln	Gly	Pro	Trp	Glu		
		835					840					845					
Arg	Ala	Ile	Ser	Pro	Asn	Lys	Val	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Asn	His	Glu	Thr		
					855							860					
Gln	Thr	Thr	Cys	Trp	Asp	His	Pro	Lys	Met	Thr	Glu	Leu	Tyr	Gln	Ser		
865					870					875				880			
Leu	Ala	Asp	Leu	Asn	Asn	Val	Arg	Phe	Ser	Ala	Tyr	Arg	Thr	Ala	Met		
				885					890						895		
Lys	Leu	Arg	Arg	Leu	Gln	Lys	Ala	Leu	Cys	Leu	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu		
			900					905						910			
Ser	Ala	Ala	Cys	Asp	Ala	Leu	Asp	Gln	His	Asn	Leu	Lys	Gln	Asn	Asp		
		915					920						925				
Gln	Pro	Met	Asp	Ile	Leu	Gln	Ile	Ile	Asn	Cys	Leu	Thr	Thr	Ile	Tyr		
		930				935						940					
Asp	Arg	Leu	Glu	Gln	Glu	His	Asn	Asn	Leu	Val	Asn	Val	Pro	Leu	Cys		
945					950					955				960			
Val	Asp	Met	Cys	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Asn	Val	Tyr	Asp	Thr	Gly	Arg		
				965					970					975			
Thr	Gly	Arg	Ile	Arg	Val	Leu	Ser	Phe	Lys	Thr	Gly	Ile	Ile	Ser	Leu		
			980					985						990			
Cys	Lys	Ala	His	Leu	Glu	Asp	Lys	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Phe	Lys	Gln	Val		
			995				1000							1005			
Ala	Ser	Ser	Thr	Gly	Phe	Cys	Asp	Gln	Arg	Arg	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu		
			1010			1015							1020				
His	Asp	Ser	Ile	Gln	Ile	Pro	Arg	Gln	Leu	Gly	Glu	Val	Ala	Ser	Phe		
1025					1030						1035				1040		
Gly	Gly	Ser	Asn	Ile	Glu	Pro	Ser	Val	Arg	Ser	Cys	Phe	Gln	Phe	Ala		
				1045					1050					1055			
Asn	Asn	Lys	Pro	Glu	Ile	Glu	Ala	Ala	Leu	Phe	Leu	Asp	Trp	Met	Arg		
			1060					1065						1070			
Leu	Glu	Pro	Gln	Ser	Met	Val	Trp	Leu	Pro	Val	Leu	His	Arg	Val	Ala		
		1075					1080							1085			
Ala	Ala	Glu	Thr	Ala	Lys	His	Gln	Ala	Lys	Cys	Asn	Ile	Cys	Lys	Glu		
					1095							1100					
Cys	Pro	Ile	Ile	Gly	Phe	Arg	Tyr	Arg	Ser	Leu	Lys	His	Phe	Asn	Tyr		
1105					1110						1115				1120		
Asp	Ile	Cys	Gln	Ser	Cys	Phe	Phe	Ser	Gly	Arg	Val	Ala	Lys	Gly	His		
				1125					1130					1135			
Lys	Met	His	Tyr	Pro	Met	Val	Glu	Tyr	Cys	Thr	Pro	Thr	Thr	Ser	Gly		
			1140					1145						1150			

ES 2 679 621 T3

Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe Arg Thr  
1155 1160 1165  
Lys Arg Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly Tyr Leu Pro Val Gln  
1170 1175 1180  
Thr Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr Asp Thr Met  
1185 1190 1195

5 <210> 4  
<211> 1198  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> MD1 de cánido

<400> 4

ES 2 679 621 T3

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp Val  
1 5 10 15  
Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Ile Asn Ala Gln Phe Ser Lys Phe  
20 25 30  
Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln Asp Gly Arg  
35 40 45  
Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln Lys Leu Pro Lys  
50 55 60  
Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn Asn Val Asn Lys Ala  
65 70 75 80  
Leu Arg Val Leu Gln Lys Asn Asn Val Asp Leu Val Asp Ile Gly Ser  
85 90 95  
Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp  
100 105 110  
Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met  
115 120 125  
Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val  
130 135 140  
Arg Gln Ser Thr Arg Asn Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr  
145 150 155 160  
Thr Ser Trp Ser Asp Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His  
165 170 175  
Arg Pro Asp Leu Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala  
180 185 190  
Thr Gln Arg Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Lys Tyr Gln Leu Gly  
195 200 205  
Ile Glu Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Ala Thr Thr Tyr Pro Asp  
210 215 220  
Lys Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro  
225 230 235 240  
Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro Arg  
245 250 255  
Pro Ser Lys Val Thr Arg Glu Glu His Phe Gln Leu His His Gln Met  
260 265 270  
His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly Tyr Glu Arg  
275 280 285  
Ala Pro Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala Tyr Thr Gln  
290 295 300  
Ala Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser Pro Leu Pro Ser  
305 310 315 320  
Gln His Leu Glu Thr Pro Glu Asp Lys Ser Phe Gly Arg Ser Leu Thr  
325 330 335  
Glu Thr Glu Ala Asn Leu Asp Ser Tyr Gln Thr Ala Leu Glu Glu Val  
340 345 350  
Leu Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp Ala Leu Gln Ala Gln Gly Glu  
355 360 365  
Ile Ser Asn Asp Val Glu Glu Val Lys Glu Gln Phe His Thr His Glu

ES 2 679 621 T3

	370					375					380				
Gly	Tyr	Met	Met	Asp	Leu	Thr	Ser	His	Gln	Gly	Arg	Val	Gly	Asn	Val
385					390					395					400
Leu	Gln	Leu	Gly	Ser	Gln	Leu	Ile	Gly	Thr	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Asp
				405					410					415	
Glu	Glu	Thr	Glu	Val	Gln	Glu	Gln	Met	Asn	Leu	Leu	Asn	Ser	Arg	Trp
			420					425					430		
Glu	Cys	Leu	Arg	Val	Ala	Ser	Met	Glu	Lys	Gln	Ser	Asn	Leu	His	Lys
			435				440					445			
Val	Leu	Met	Asp	Leu	Gln	Asn	Gln	Gln	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn	Asp	Trp
						455					460				
Leu	Thr	Lys	Thr	Glu	Glu	Arg	Thr	Arg	Lys	Met	Glu	Lys	Glu	Pro	Leu
465						470				475					480
Gly	Pro	Asp	Ile	Glu	Asp	Leu	Lys	Arg	Gln	Val	Gln	Gln	His	Lys	Val
				485						490				495	
Leu	Gln	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln	Glu	Gln	Val	Arg	Val	Asn	Ser	Leu	Thr
			500					505					510		
His	Met	Val	Val	Val	Val	Asp	Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	His	Ala	Thr	Ala
						520						525			
Ala	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Lys	Val	Leu	Gly	Gly	Arg	Trp	Ala	Asn	Ile
						535						540			
Cys	Arg	Trp	Thr	Glu	Asp	Arg	Trp	Val	Leu	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Leu
545						550						555			560
Lys	Trp	Gln	Arg	Phe	Thr	Glu	Glu	Gln	Cys	Leu	Phe	Ser	Ala	Trp	Leu
				565										575	
Ser	Glu	Lys	Glu	Asp	Ala	Val	Asn	Lys	Ile	His	Thr	Thr	Gly	Phe	Lys
				580									590		
Asp	Gln	Ser	Glu	Val	Leu	Ser	Asn	Leu	Gln	Lys	Leu	Ala	Val	Leu	Lys
							600						605		
Thr	Asp	Leu	Glu	Lys	Lys	Lys	Gln	Thr	Met	Asp	Lys	Leu	Cys	Ser	Leu
						615							620		
Asn	Gln	Asp	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Lys	Asn	Thr	Val	Val	Ala	His	Lys
625						630					635				640
Met	Glu	Ala	Trp	Leu	Asp	Asn	Ser	Ala	Gln	Arg	Trp	Asp	Asn	Leu	Val
				645										655	
Gln	Lys	Leu	Glu	Lys	Ser	Ser	Ala	Gln	Ile	Ser	Gln	Ala	Val	Thr	Thr
				660										670	
Thr	Gln	Pro	Ser	Leu	Thr	Gln	Thr	Thr	Val	Met	Glu	Thr	Val	Thr	Met
							680							685	
Val	Thr	Thr	Arg	Glu	His	Ile	Leu	Val	Lys	His	Ala	Gln	Glu	Glu	Leu
						695						700			
Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Gln	Lys	Lys	Arg	Gln	Ile	Ile	Val	Asp	Ala	Leu
705						710									720
Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Leu	Gln	Glu	Ala	Thr	Asp	Glu	Leu	Asp	Leu	Lys
				725										735	
Leu	Arg	Gln	Ala	Glu	Val	Ile	Lys	Gly	Ser	Trp	Gln	Pro	Val	Gly	Asp
			740					745						750	
Leu	Leu	Ile	Asp	Ser	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Glu	Lys	Val	Lys	Ala	Leu
			755				760						765		
Arg	Gly	Glu	Thr	Thr	Pro	Leu	Lys	Glu	Asn	Val	Ser	Tyr	Val	Asn	Asp
							775						780		
Leu	Ala	Arg	Gln	Leu	Thr	Thr	Leu	Gly	Ile	Gln	Leu	Ser	Pro	Tyr	Asn
785							790								800
Leu	Asn	Thr	Leu	Glu	Asp	Leu	Asn	Thr	Arg	Trp	Lys	Leu	Leu	Gln	Val
				805										815	
Ala	Ile	Glu	Asp	Arg	Ile	Arg	Gln	Leu	His	Glu	Ala	His	Arg	Asp	Phe
				820										830	
Gly	Pro	Ala	Ser	Gln	His	Phe	Leu	Ser	Thr	Ser	Val	Gln	Gly	Pro	Trp
				835			840							845	
Glu	Arg	Ala	Ile	Ser	Pro	Asn	Lys	Val	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Asn	His	Glu
						855								860	
Thr	Gln	Thr	Thr	Cys	Trp	Asp	His	Pro	Lys	Met	Thr	Glu	Leu	Tyr	Gln
865						870									880

ES 2 679 621 T3

Ser Leu Ala Asp Leu Asn Asn Val Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr Ala  
 885 890 895  
 Met Lys Leu Arg Arg Leu Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser  
 900 905 910  
 Leu Ser Ala Ala Cys Asp Ala Leu Asp Gln His Asn Leu Lys Gln Asn  
 915 920 925  
 Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu Gln Val Ile Asn Cys Leu Thr Thr Ile  
 930 935 940  
 Tyr Asp Arg Leu Glu Gln Glu His Asn Asn Leu Val Asn Val Pro Leu  
 945 950 955 960  
 Cys Val Asp Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val Tyr Asp Thr Gly  
 965 970 975  
 Arg Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser  
 980 985 990  
 Leu Cys Lys Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys Gln  
 995 1000 1005  
 Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu  
 1010 1015 1020  
 Leu His Asp Ser Ile Gln Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser  
 1025 1030 1035 1040  
 Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln Phe  
 1045 1050 1055  
 Ala Asn Asn Lys Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp Trp Met  
 1060 1065 1070  
 Arg Leu Glu Pro Gln Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu His Arg Val  
 1075 1080 1085  
 Ala Ala Ala Glu Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys  
 1090 1095 1100  
 Glu Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn  
 1105 1110 1115 1120  
 Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys Gly  
 1125 1130 1135  
 His Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr Thr Ser  
 1140 1145 1150  
 Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe Arg  
 1155 1160 1165  
 Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly Tyr Leu Pro Val  
 1170 1175 1180  
 Gln Thr Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr Asp Thr Met  
 1185 1190 1195

<210> 5  
 <211> 3600  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> MD1 de humano opt

10

<400> 5

ES 2 679 621 T3

atgctgtggt	gggaggaagt	ggaggactgc	tacgagagag	aggacgtgca	gaagaaaacc	60
ttcaccaagt	gggtgaacgc	ccagttcagc	aagttcggca	agcagcacat	cgagaacctg	120
ttcagcgacc	tgcaggatgg	caggagactg	ctggatctgc	tggagggact	gaccggccag	180
aagctgcca	aggagaagg	cagcaccaga	gtgcacgccc	tgaacaacgt	gaacaaggcc	240
ctgagagtgc	tgcagaacaa	caacgtggac	ctggtgaata	tcggcagcac	cgacatcgtg	300
gacggcaacc	acaagctgac	cctgggcctg	atctggaaca	tcatcctgca	ctggcaggtg	360
aagaacgtga	tgaagaacat	catggccggc	ctgcagcaga	ccaacagcga	gaagatcctg	420

ES 2 679 621 T3

ctgagctggg	tgaggcagag	caccagaaac	tacccccag	tgaacgtgat	caacttcacc	480
acctcctgga	gcgacggcct	ggccctgaac	gccctgatcc	acagccacag	acccgacctg	540
ttcgactgga	acagcgtggt	gtgtcagcag	agcgccaccc	agagactgga	gcacgccttc	600
aacatcgcca	gataccagct	gggcatcgag	aagctgctgg	accccgagga	cgtggacacc	660
acctaccccg	acaagaaaag	catcctgatg	tatattacct	ctctgtttca	ggtgctgccc	720
cagcaggtgt	ccatcgaggc	catccaggaa	gtggaaatgc	tgcccaggcc	ccccaaagtg	780
accaaggagg	agcacttcca	gctgcaccac	cagatgcact	atagccagca	gatcaccgtg	840
tccttgccc	agggctatga	gagaaccagc	agccccaaagc	ccagattcaa	gagctacgcc	900
tacaccagg	ccgcctacgt	gaccacctcc	gacccacca	gaagcccctt	ccccagccag	960
cacctggagg	ccccgagga	caagagcttc	ggcagcagcc	tgatggagag	cgaagtgaac	1020
ctggacagat	accagaccgc	cctggaggaa	gtgctgtctt	ggctgctgtc	cgccgaggac	1080
accctgcagg	cccagggcga	gatcagcaac	gacgtggaag	tggtgaagga	ccagttccac	1140
accacgagg	gctacatgat	ggatctgacc	gccaccagc	gcagagtggg	caatatcctg	1200
cagctgggca	gcaagctgat	cggcaccggc	aagctgagcg	aggacgagga	gaccgaagtg	1260
caggagcaga	tgaacctgct	gaacagcaga	tgggagtgcc	tgagagtggc	cagcatggag	1320
aagcagagca	acctgcaccg	cgtgctgatg	gacctgcaga	accagaagct	gaaggagctg	1380
aacgactggc	tgaccaagac	cgaggagcgg	accagaaaga	tggaggagga	gcccctgggc	1440
cccgacctgg	aggacctgaa	gagacaggtg	cagcagcaca	aagtgctgca	ggaggacctg	1500
gaacaggagc	aggtgcgcgt	gaacagcctg	accacatgg	tggtcgtggt	ggacgagagc	1560
agcggcgacc	acgccacagc	cgccctggaa	gagcagctga	aagtgctggg	cgacagatgg	1620
gccaacatct	gccggtggac	cgaggacaga	tgggtgctgc	tgacagacat	cctgctgaag	1680
tggcagagac	tgacagagga	gcagtgcctg	tttagcgcct	ggctgagcga	gaaggaggac	1740
gccgtgaaca	agatccacac	caccggcttc	aaggaccaga	acgagatgct	gagcagcctg	1800
cagaagctgg	ccgtgctgaa	ggccgatctg	gagaagaaaa	agcagagcat	gggcaagctg	1860
tactccctga	agcaggacct	gctgtccacc	ctgaagaaca	agagcgtgac	ccagaaaacc	1920
gaggcctggc	tggacaattt	cgcccgggtg	tgggacaatc	tggtgcagaa	actggagaag	1980
agcaccgccc	agatcagcca	ggccgtgacc	accaccagc	ccagcctgac	acagaccacc	2040
gtgatggaga	ccgtgaccac	agtgaccacc	agggagcaga	tcctggtgaa	gcacgcccag	2100
gaggagctgc	cccctcccc	ccctcagaag	aagcggcaga	tcacagtgga	caccctggag	2160
agactgcagg	agctgcagga	agccaccgac	gagctggacc	tgaagctgag	acaggccgaa	2220
gtgatcaagg	gcagctggca	gcctgtgggc	gatctgctga	tcgacagcct	gcaggaccac	2280

ES 2 679 621 T3

ctggagaaag tgaaggcctt gcggggagag atcgccccc tgaaggagaa tgtgagccac 2340  
gtgaacgacc tggccagaca gctgaccacc ctgggcatcc agctgagccc ctacaatctg 2400  
agcaccctgg aagatctgaa caccgggtgg aaactgctgc aggtggccgt ggaggataga 2460  
gtgaggcagc tgcacgagge ccacagagac ttcggccctg cctcccagca cttcctgagc 2520  
accagcgtgc agggcccctg ggagagagcc atctccccc acaaagtgcc ctactacatc 2580  
aaccacgaga cccagaccac ctgctgggac caccctaaga tgaccgagct gtaccagagc 2640  
ctggccgacc tgaacaatgt gcggttcagc gcctacagaa ccgcatgaa gctgaggaga 2700  
ctgcagaagg ccctgtgcct ggacctgctg agcctgagcg ccgctgca cgccctggac 2760  
cagcacaacc tgaagcagaa cgaccagccc atggacattc tgcagatcat caactgcctg 2820  
accaccatct acgatcggct ggagcaggag cacaacaacc tggatgaacgt gccctgtgc 2880  
gtggacatgt gcctgaattg gctgctgaac gtgtacgaca ccggcaggac cggcagaatc 2940  
agagtgtgt cttcaagac cggcatcatc agcctgtgca aggccacct ggaggataag 3000  
taccgctacc tgttcaagca ggtggccagc agcaccggct tctgcatca gaggagactg 3060  
ggcctgctgc tgcacgatag catccagatc cctaggcagc tgggcaagt gccagcttt 3120  
ggcggcagca acatcgagcc ctctgtgagg agctgcttc agttcgcaa caacaagccc 3180  
gagatcgagg ccgccctgtt cctggattgg atgaggctgg agccccagag catggtgtgg 3240  
ctgcctgtgc tgcacagagt ggccgccc gagaccgca agcaccaggc caagtgaac 3300  
atctgcaagg agtgcccat catcgcttc cggtagagga gcctgaagca cttcaactac 3360  
gacatctgcc agagctgctt tttcagcggc agagtggcca agggccaaa gatgcactac 3420  
cccatggtgg agtactgcac cccaccacc tccggcgagg atgtgagaga cttcgccaaa 3480  
gtgctgaaga ataagttccg gaccaagcgg tactttgcca agcaccag gatgggctac 3540  
ctgcccgtgc agaccgtgct ggagggcgac aacatggaga ccgacacat gtgatgatga 3600

<210> 6  
<211> 3603  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> MD1 de cánido opt

10

<400> 6

ES 2 679 621 T3

atgctgtggt	gggaggaagt	ggaggactgc	tacgagagag	aggacgtgca	gaagaaaacc	60
ttcaccaagt	ggatcaacgc	ccagttcagc	aagttcggca	agcagcacat	cgagaacctg	120
ttcagcgatc	tgcaggatgg	caggagactg	ctggatctgc	tggagggact	gaccggccag	180
aagctgcca	aggagaaggg	cagcaccaga	gtgcacgccc	tgaacaacgt	gaacaaggcc	240
ctgagagtgc	tgcagaagaa	caacgtggac	ctggtggata	tcggcagcac	cgacatcgtg	300

ES 2 679 621 T3

gacggcaacc acaagctgac cctgggcctg atctggaaca tcatcctgca ctggcaggtg 360  
aagaacctga tgaagaacat catggccggc ctgcagcaga ccaacagcga gaagatcctg 420  
ctgagctggg tgaggcagag caccagaaac tacccccagg tgaacgtgat caacttcacc 480  
acctcctgga gcgacggcct ggccctgaac gccctgatcc acagccacag acccgacctg 540  
ttcgactgga acagcgtggt gtgtcagcag agcgccaccc agagactgga gcacgccttc 600  
aacatcgcca agtaccagct gggcatcgag aagctgctgg accccgagga cgtggccacc 660  
acctaccccg acaagaaaag catcctgatg tatattacca gcctgttcca ggtgctgcc 720  
cagcaggtgt ccatcgaggc catccaggaa gtggaaatgc tgcccaggcc cagcaaagtg 780  
accagggagg agcacttcca gctgcaccac cagatgcact atagccagca gatcacctg 840  
tccttgccc agggtatga gagagcccct agcagcccca agccccggtt caagagctac 900  
gcctacacc aggccgcta cgtgaccacc tccgacccca ccagaagccc cctgcccagc 960  
cagcacctgg agaccctga ggataagagc ttcggcagaa gcctgaccga gaccgaggcc 1020  
aacctggata gctaccagac cgccctggag gaagtgctgt cttggctgct gtccgccgag 1080  
gacgccctgc agcccaggg cgagatcagc aacgacgtgg aagaagtgaa ggagcagttc 1140  
cacaccacg agggctacat gatggacctg accagccacc agggcagagt gggcaacctg 1200  
ctgcagctgg gcagccagct gatcggcacc ggcaagctga gcgaggacga ggagaccgaa 1260  
gtgcaggaac agatgaacct gctgaacagc agatgggagt gcctgagagt ggccagcatg 1320  
gagaagcaga gcaacctgca caaagtgctg atggatctgc agaaccagca gctgaaggag 1380  
ctgaacgact ggctgaccaa gacagaggag cggacccgga agatggagaa ggagcccctg 1440  
ggccctgaca tcgaggacct gaagaggcag gtgcagcagc ataaggtcct gcaggaggat 1500  
ctggagcagg agcaggtgcg cgtgaacagc ctgaccaca tggtggtcgt ggtggacgag 1560  
agcagcggcg accacgccac agccgccctg gaagagcagc tgaaagtgct gggcggcaga 1620  
tgggccaata tctgccgtg gaccgaggac agatgggtgc tgctgcagga catcctgctg 1680  
aagtggcaga gattcaccga ggagcagtc ctgtttagcg cctggctgag cgagaaggag 1740  
gacgccgtga acaagatcca caccaccggc ttcaaggacc agagcgaagt gctgtccaac 1800  
ctgcagaagc tggccgtgct gaaaaccgac ctggagaaga aaaagcagac catggacaag 1860  
ctgtgcagcc tgaaccagga cctgctgagc gccctgaaga acaccgtggt ggcccacaag 1920  
atggaggcct ggctggataa tagcgtcag agatgggata atctggtgca gaaactggag 1980  
aagagcagcg cccagatcag ccaggccgtg accaccaccc agcccagcct gacacagacc 2040  
acctgatgg agaccgtgac catggtgacc accagggagc acatcctggt gaagcacgcc 2100  
caggaggagc tgccccctcc cccccctcag aagaagcggc agatcatcgt ggatgccctg 2160

ES 2 679 621 T3

gagagactgc aggagctgca ggaagccacc gacgagctgg acctgaagct gagacaggcc 2220  
gaagtgatca agggcagctg gcagcctgtg ggcgatctgc tgatcgacag cctgcaggac 2280  
cacctggaga aagtgaaggc cctgcggggc gagaccaccc ccctgaagga gaacgtgtcc 2340  
tacgtgaacg acctggccag acagctgacc accctgggca ttcagctgag ccctacaac 2400  
ctgaacaccc tggaggatct gaacacccgg tggaaactgc tgcaggtggc cattgaggac 2460  
cggatcaggc agctgcacga ggcccacaga gacttcggcc ctgcttctca gcatttcctg 2520  
agcaccagcg tgcagggccc ctgggagaga gccatcagcc ccaacaaagt gccctactac 2580  
atcaaccacg agaccagac cacctgctgg gaccacccca agatgaccga gctgtaccag 2640  
agcctggccg acctgaacaa tgtgcggttc agcgcctaca gaaccgccat gaagctgcgg 2700  
agactgcaga aggcctgtg cctggacctg ctgtccctga gcgccgctg cgacgccctg 2760  
gaccagcaca acctgaagca gaacgaccag cccatggata tcctgcaggt gatcaactgc 2820  
ctgaccacca tctacgatcg gctggagcag gagcacaaca acctggtgaa cgtgcccctg 2880  
tgcgtggaca tgtgcctgaa ttggctgctg aacgtgtacg acaccggcag gaccggcaga 2940  
atcagagtgc tgtccttcaa gaccggcatc atcagcctgt gcaaggccca cctggaggat 3000  
aagtaccgct acctgttcaa gcaggtggcc agcagcaccg gcttctgcga tcagaggaga 3060  
ctgggcctgc tgctgcacga tagcatccag atccctaggc agctgggcga agtggccagc 3120  
tttggcggca gcaacatcga gccctctgtg aggagctgct tccagttcgc caacaacaag 3180  
cccgagatcg aggcgcacct gttcctggat tggatgaggc tggagcccca gagcatggtg 3240  
tggctgcctg tgctgcacag agtggccgcc gccgagaccg ccaagcacca ggccaagtgc 3300  
aacatctgca aggagtgcc catcatcggc ttccggtaca ggagcctgaa gcacttcaac 3360  
tacgacatct gccagagctg ctttttcagc ggcagagtgg ccaagggcca caagatgcac 3420  
taccatggaggaggactg caccaccacc acctccggcg aggatgtgag agacttcgcc 3480  
aaagtgctga agaataagtt ccggaccaag cggctactttg ccaagcacc caggatgggc 3540  
tacctgcccg tgcagaccgt gctggagggc gacaacatgg agaccgacac catgtgatga 3600  
tga 3603

<210> 7  
<211> 1199  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> MD1 de murino

10

<400> 7

ES 2 679 621 T3

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp Val  
1                   5                   10                   15  
Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Ile Asn Ala Gln Phe Ser Lys Phe



ES 2 679 621 T3

Ala Ala Leu Glu Glu Gln Leu Lys Val Leu Gly Asp Arg Trp Ala Asn  
530 535 540  
Ile Cys Arg Trp Thr Glu Asp Arg Trp Ile Val Leu Gln Asp Ile Leu  
545 550 555 560  
Leu Lys Trp Gln His Phe Thr Glu Glu Gln Cys Leu Phe Ser Thr Trp  
565 570 575  
Leu Ser Glu Lys Glu Asp Ala Met Lys Asn Ile Gln Thr Ser Gly Phe  
580 585 590  
Lys Asp Gln Asn Glu Met Met Ser Ser Leu His Lys Ile Ser Thr Leu  
595 600 605  
Lys Ile Asp Leu Glu Lys Lys Lys Pro Thr Met Glu Lys Leu Ser Ser  
610 615 620  
Leu Asn Gln Asp Leu Leu Ser Ala Leu Lys Asn Lys Ser Val Thr Gln  
625 630 635 640  
Lys Met Glu Ile Trp Met Glu Asn Phe Ala Gln Arg Trp Asp Asn Leu  
645 650 655  
Thr Gln Lys Leu Glu Lys Ser Ser Ala Gln Ile Ser Gln Ala Val Thr  
660 665 670  
Thr Thr Gln Pro Ser Leu Thr Gln Thr Thr Val Met Glu Thr Val Thr  
675 680 685  
Met Val Thr Thr Arg Glu Gln Ile Met Val Lys His Ala Gln Glu Glu  
690 695 700  
Leu Pro Pro Pro Pro Gln Lys Lys Arg Gln Ile Thr Val Asp Ala  
705 710 715 720  
Leu Glu Arg Leu Gln Glu Leu Gln Glu Ala Ala Asp Glu Leu Asp Leu  
725 730 735  
Lys Leu Arg Gln Ala Glu Val Ile Lys Gly Ser Trp Gln Pro Val Gly  
740 745 750  
Asp Leu Leu Ile Asp Ser Leu Gln Asp His Leu Glu Lys Val Lys Ala  
755 760 765  
Leu Arg Gly Glu Ile Ala Pro Leu Lys Glu Asn Val Asn Arg Val Asn  
770 775 780  
Asp Leu Ala His Gln Leu Thr Thr Leu Gly Ile Gln Leu Ser Pro Tyr  
785 790 795 800  
Asn Leu Ser Thr Leu Glu Asp Leu Asn Thr Arg Trp Arg Leu Leu Gln  
805 810 815  
Val Ala Val Glu Asp Arg Val Arg Gln Leu His Glu Ala His Arg Asp  
820 825 830  
Phe Gly Pro Ala Ser Gln His Phe Leu Ser Thr Ser Val Gln Gly Pro  
835 840 845  
Trp Glu Arg Ala Ile Ser Pro Asn Lys Val Pro Tyr Tyr Ile Asn His  
850 855 860  
Glu Thr Gln Thr Thr Cys Trp Asp His Pro Lys Met Thr Glu Leu Tyr  
865 870 875 880  
Gln Ser Leu Ala Asp Leu Asn Asn Val Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr  
885 890 895  
Ala Met Lys Leu Arg Arg Leu Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu Leu  
900 905 910  
Ser Leu Ser Ala Ala Cys Asp Ala Leu Asp Gln His Asn Leu Lys Gln  
915 920 925  
Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr Thr  
930 935 940  
Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln Glu His Asn Asn Leu Val Asn Val Pro  
945 950 955 960  
Leu Cys Val Asp Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val Tyr Asp Thr  
965 970 975  
Gly Arg Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ile  
980 985 990  
Ser Leu Cys Lys Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys  
995 1000 1005  
Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly Leu  
1010 1015 1020  
Leu Leu His Asp Ser Ile Gln Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala

ES 2 679 621 T3

```

1025                1030                1035                1040
Ser Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln
                1045                1050                1055
Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp Trp
                1060                1065                1070
Met Arg Leu Glu Pro Gln Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu His Arg
                1075                1080                1085
Val Ala Ala Ala Glu Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys
                1090                1095                1100
Lys Glu Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe
1105                1110                1115                1120
Asn Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys
                1125                1130                1135
Gly His Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr Thr
                1140                1145                1150
Ser Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe
                1155                1160                1165
Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly Tyr Leu Pro
                1170                1175                1180
Val Gln Thr Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr Asp Thr Met
1185                1190                1195

```

<210> 8  
 <211> 3611  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> MD1 de murino opt

10

<400> 8

ES 2 679 621 T3

atgctgtggt	gggaggaagt	ggaggactgc	tacgagagag	aggacgtgca	gaagaaaacc	60
ttcaccaagt	ggatcaacgc	ccagttcagc	aagttcggca	agcagcacat	cgacaacctg	120
ttcagcgacc	tgcaggacgg	caagagactg	ctggatctgc	tggagggact	gaccggccag	180
aagctgccca	aggagaaggg	cagcaccaga	gtgcacgccc	tgaacaacgt	gaacaaggcc	240
ctgagagtgc	tgcagaagaa	caacgtggac	ctggtgaata	tcggcagcac	cgacatcgtg	300
gacggcaacc	acaagctgac	cctgggcctg	atctggaaca	tcatcctgca	ctggcaggtg	360
aagaacgtga	tgaaaaccat	catggccggc	ctgcagcaga	ccaacagcga	gaagatcctg	420
ctgagctggg	tgaggcagag	caccagaaac	tacccccag	tgaacgtgat	caacttcacc	480
agcagctgga	gcgacggcct	ggccctgaac	gccctgatcc	acagccacag	acccgacctg	540
ttcgactgga	acagcgtggt	gtcccagcac	agcgccaccc	agagactgga	gcacgccttc	600
aacatcgcca	agtgccagct	gggcatcgag	aagctgctgg	accccgagga	cgtggccacc	660
acctaccccg	acaagaaaag	catcctcatg	tatatcacct	ctctgtttca	ggtgctgccc	720
cagcaggtgt	ccatcgaggc	catccaggaa	gtggaaatgc	tgccccggac	cagcagcaaa	780
gtgaccggg	aggagcactt	ccagctgcac	caccagatgc	actatagcca	gcagatcacc	840
gtgtccctgg	cccagggcta	cgagcagacc	agcagctccc	ccaagcccag	attcaagagc	900
tacgccttca	cccagggcgc	ctacgtggcc	acaagcgata	gcaccagag	ccctacccc	960

ES 2 679 621 T3

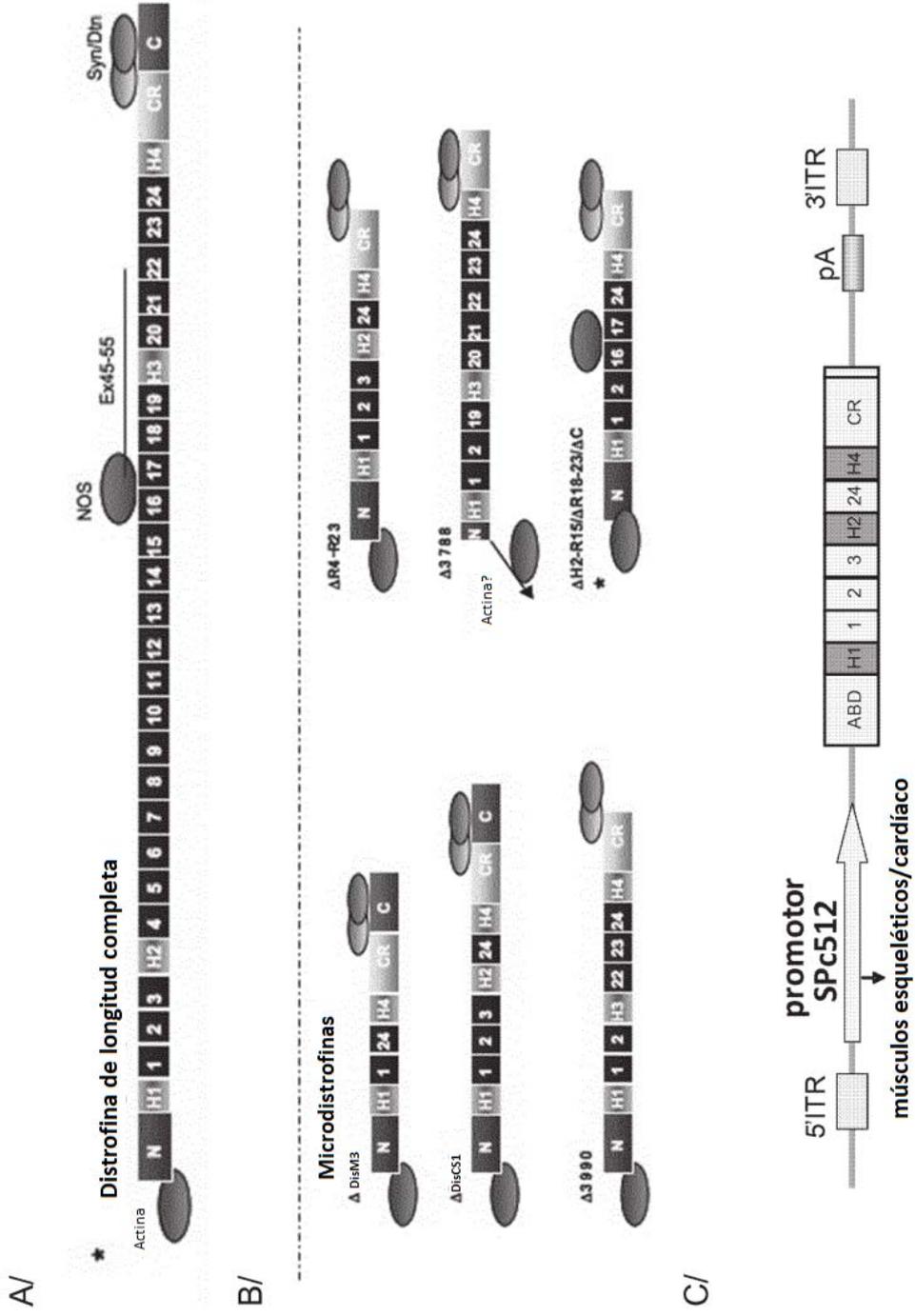
agccagcacc	tggaggcccc	tagagacaag	agcctggaca	gcagcctgat	ggagacagaa	1020
gtgaacctg	acagctacca	gaccgccctg	gaggaagtgc	tgtcttggct	gctgtccgcc	1080
gaggacaccc	tgagagccca	gggcgagatc	agcaacgacg	tggaagaagt	gaaggagcag	1140
ttccacgccc	acgagggctt	catgatggac	ctgacctccc	atcagggcct	ggtgggcaac	1200
gtgctgcagc	tgggcagcca	gctcgtggga	aagggcaagc	tgagcgagga	cgaggaggcc	1260
gaagtgcagg	aacagatgaa	cctgctgaac	agcagatggg	agtgcctgag	agtggcccagc	1320
atggagaagc	agagcaagct	gcacaaagtg	ctgatggatc	tgacagaacca	gaagctgaag	1380
gaactggacg	actggctgac	caagaccgag	gagcggacca	agaagatgga	ggaggagccc	1440
ttcggccccg	acctggagga	cctgaagtgc	caggtgcagc	agcataaggt	cctgcaggag	1500
gacctggaac	aggagcaggt	gcgctgaac	agcctgaccc	acatggtggt	cgtggtggac	1560
gagagcagcg	gcgaccacgc	cacagccgcc	ctggaagagc	agctgaaagt	gctgggcgac	1620
agatgggcca	atatctgccg	gtggaccgag	gatagatgga	tcgtgctgca	ggacatcctg	1680
ctgaagtggc	agcacttcac	cgaggagcag	tgctgttta	gcacctggct	gagcgagaaa	1740
gaggacgcca	tgaagaacat	ccagaccagc	ggcttcaagg	accagaacga	gatgatgagc	1800
agcctgcaca	agatcagcac	cctgaagatc	gacctggaga	agaaaaagcc	cacaatggag	1860
aagctgtcca	gcctgaacca	ggacctgctg	agcgccctga	agaacaagag	cgtgaccag	1920
aaaatggaga	tctggatgga	gaatttcgca	cagaggtggg	acaacctgac	ccagaagctg	1980
gagaagagca	gcgcccagat	cagccaggcc	gtgaccacca	cccagcccag	cctgacacag	2040
accaccgtga	tggagaccgt	gaccatggtg	accaccggg	agcagatcat	ggtgaagcac	2100
gccagaggag	agctgcccc	tccccccct	cagaagaagc	ggcagatcac	agtggatgcc	2160
ctggagagac	tgacaggagct	gcaggaagcc	gccgacgagc	tggatctgaa	gctgagacag	2220
gccgaagtga	tcaagggcag	ctggcagcct	gtgggcgac	tgctgatcga	cagcctgcag	2280
gaccacctgg	agaaagtgaa	ggccctgctg	ggcgagatcg	ccccctgaa	ggagaacctg	2340
aaccgctga	acgacctggc	ccatcagctg	accaccctgg	gcattcagct	gagcccctac	2400
aacctgagca	ccctggagga	tctgaacacc	cggtggagac	tgctgcaggt	ggcctggag	2460
gatagagtga	ggcagctgca	cgaggcccac	agagacttcg	gcctgcctc	ccagcacttc	2520
ctgagcacca	gcgtgcaggg	cccctgggag	agagccatca	gccccaaaa	agtgcctac	2580
tacatcaacc	acgagacca	gaccacctgc	tgggaccacc	ctaagatgac	cgagctgtac	2640
cagagcctgg	ccgacctgaa	caatgtgctg	ttcagcgcct	acagaaccgc	catgaagctg	2700
cggagactgc	agaaggccct	gtgcctggac	ctgctgtccc	tgagcgccgc	ctgcgacgcc	2760
ctggaccagc	acaacctgaa	gcagaacgac	cagcccatgg	atatcctgca	gatcatcaac	2820
tgctgacca	ccatctacga	tcggctggag	caggagcaca	acaacctggt	gaacgtgccc	2880

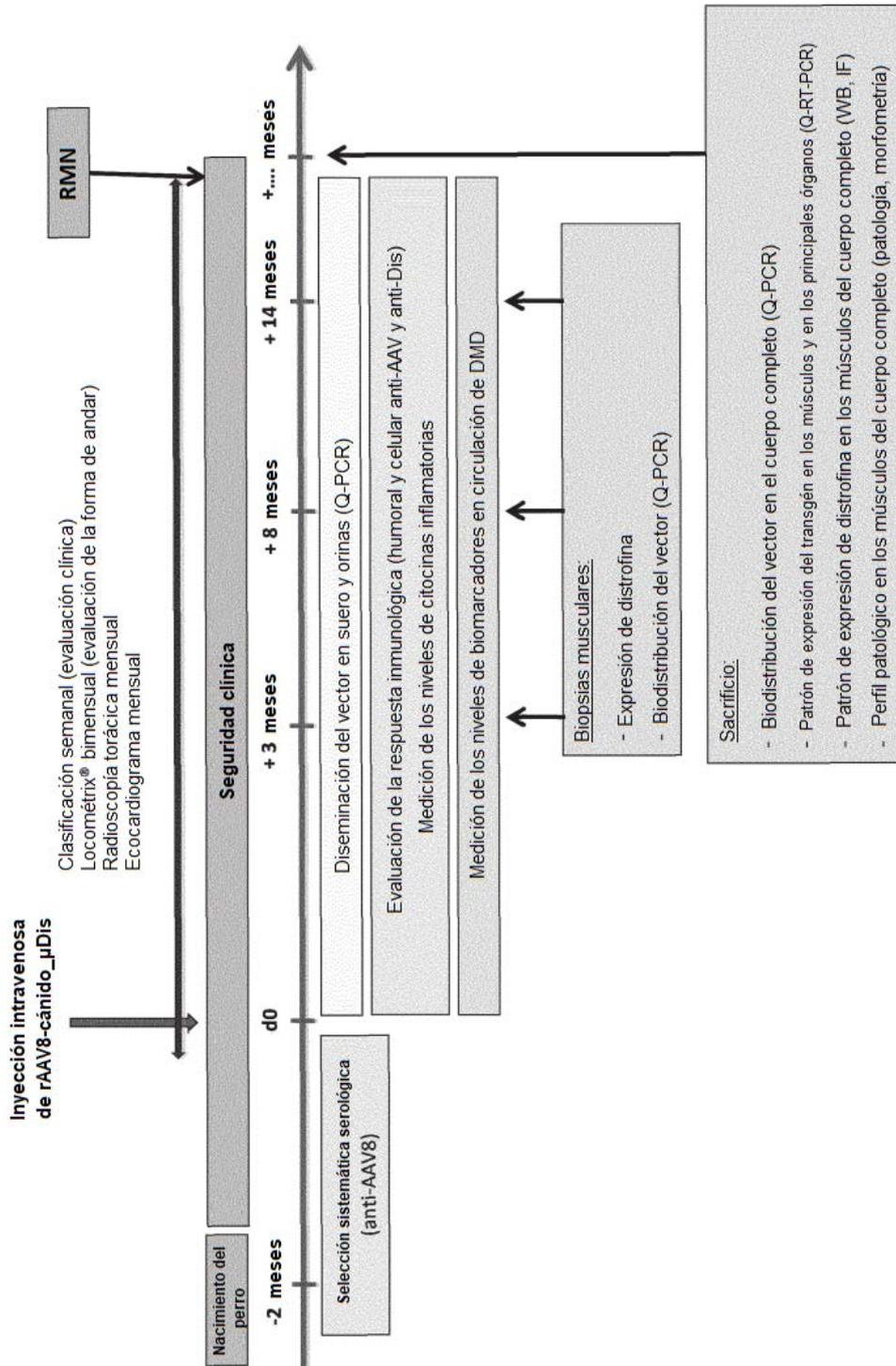
ES 2 679 621 T3

ctgtgcgtgg	acatgtgcct	gaattggctg	ctgaacgtgt	acgacaccgg	caggaccggc	2940
agaatcagag	tgctgtcctt	caagaccggc	atcatcagcc	tgtgcaaggc	ccacctggag	3000
gataagtacc	gctacctggt	caagcagggtg	gccagcagca	ccggcttctg	cgatcagagg	3060
agactgggcc	tgctgctgca	cgatagcatc	cagatcccta	ggcagctggg	cgaagtggcc	3120
agctttggcg	gcagcaacat	cgagccctct	gtgaggagct	gcttccagtt	cgccaacaac	3180
aagcccgaga	tcgaggccgc	cctgttcctg	gattggatga	ggctggagcc	ccagagcatg	3240
gtgtggctgc	ctgtgctgca	cagagtggcc	gccgccgaga	ccgccaagca	ccaggccaag	3300
tgcaacatct	gcaaggagtg	ccccatcatc	ggcttccggt	acaggagcct	gaagcacttc	3360
aactacgaca	tctgccagag	ctgctttttc	agcggcagag	tggccaaggg	ccacaagatg	3420
cactaccca	tggtggagta	ctgcaccccc	accacctccg	gcgaggatgt	gagagacttc	3480
gccaaagtgc	tgaagaataa	gttccggacc	aagcgg tact	ttgccaagca	ccccaggatg	3540
ggctacctgc	ccgtgcagac	cgtgctggag	ggcgacaaca	tggagaccga	caccatgtga	3600
tgtgatgatg	a					3611

**REIVINDICACIONES**

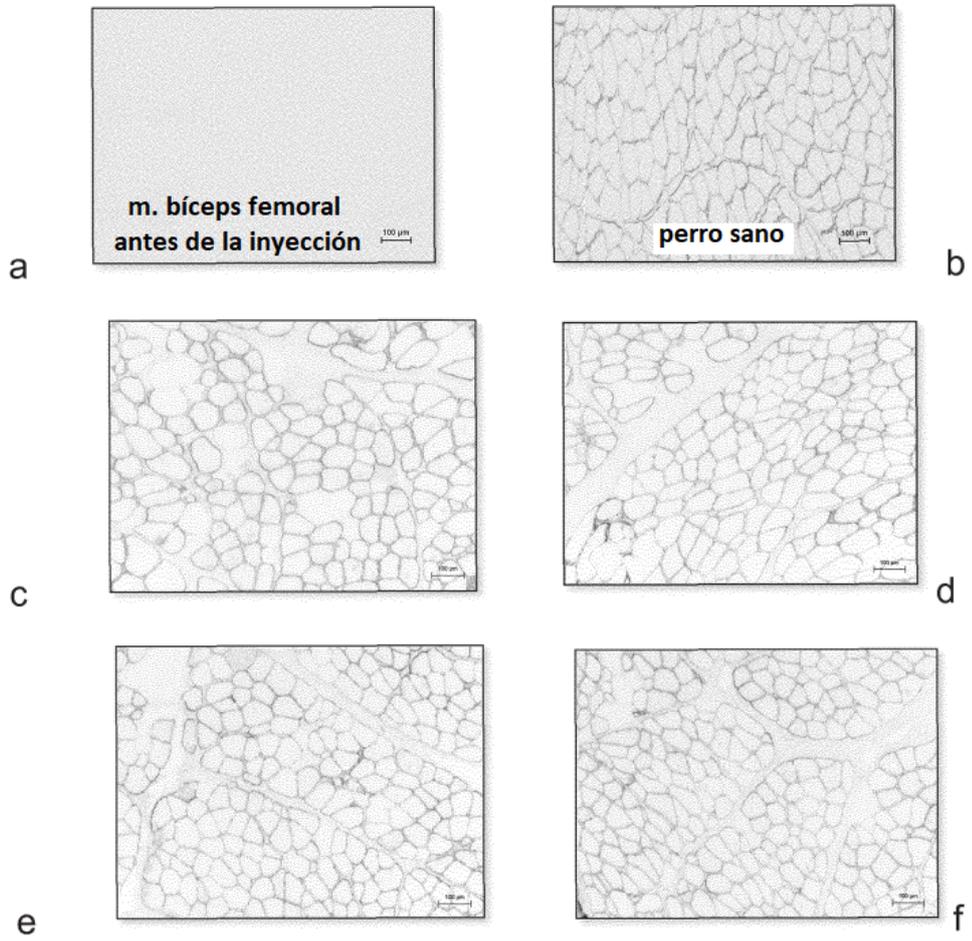
- 5 1. Una composición que comprende un producto de terapia génica para su uso en el tratamiento de una enfermedad distrofica en seres humanos, en donde:
- el producto de terapia génica comprende un vector de virus adenoasociado (AAV) que es un vector AAV2/8 y que tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 1;
  - la composición es para su administración por vía sistémica mediante inyección intravascular;
  - la enfermedad distrofica es la distrofia muscular de Duchenne (DMD).
- 10 2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición se administra mediante inyección intravenosa.
- 15 3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la administración de la composición no induce una respuesta inmunológica adversa.
- 20 4. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición administra con una dosis menor o igual que  $10^{15}$  gv/kg, ventajosamente entre  $10^{12}$  gv/kg y  $10^{14}$  gv/kg.
- 25 5. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una única administración de la composición.
6. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición es para su uso en la mejora de la función muscular.
- 30 7. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición es para su uso en la mejora de la función cardíaca.
8. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición es para su uso en la mejora de la función respiratoria.
- 35 9. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composición es para su uso en la mejora de la función digestiva.
- 40 10. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la composición es para su uso en la mejora de la forma de andar.
11. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la composición es para su uso en la mejora de la calidad y/o esperanza de vida.



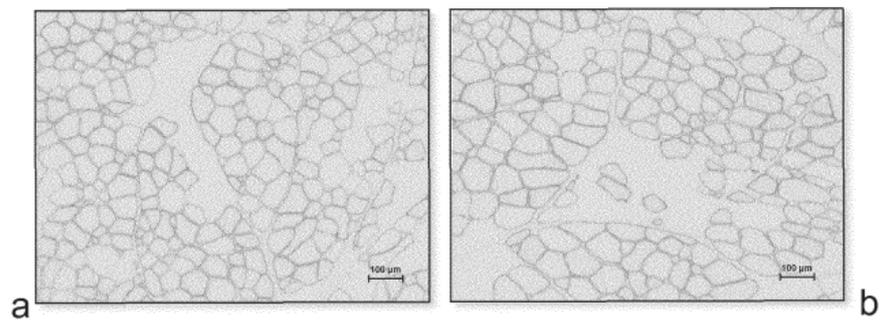


**Figura 2**

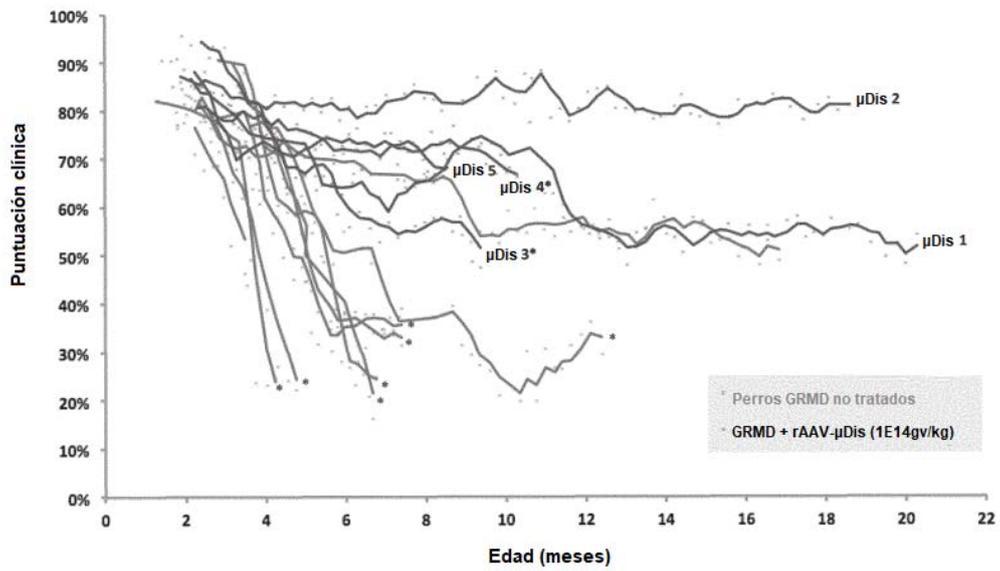
A/



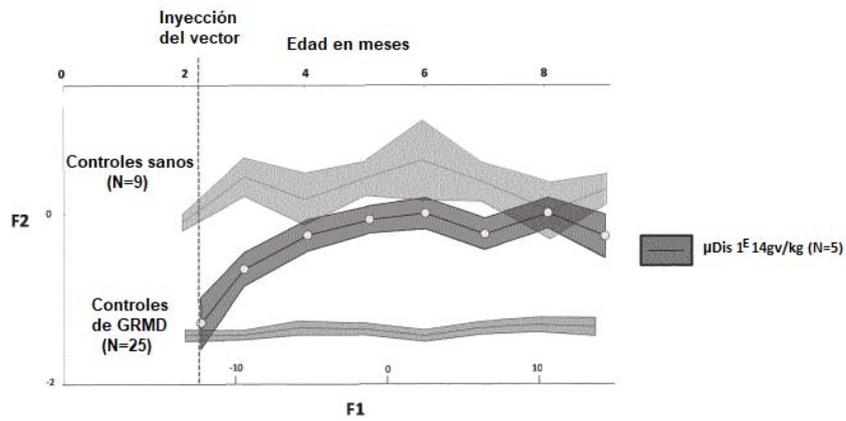
B/



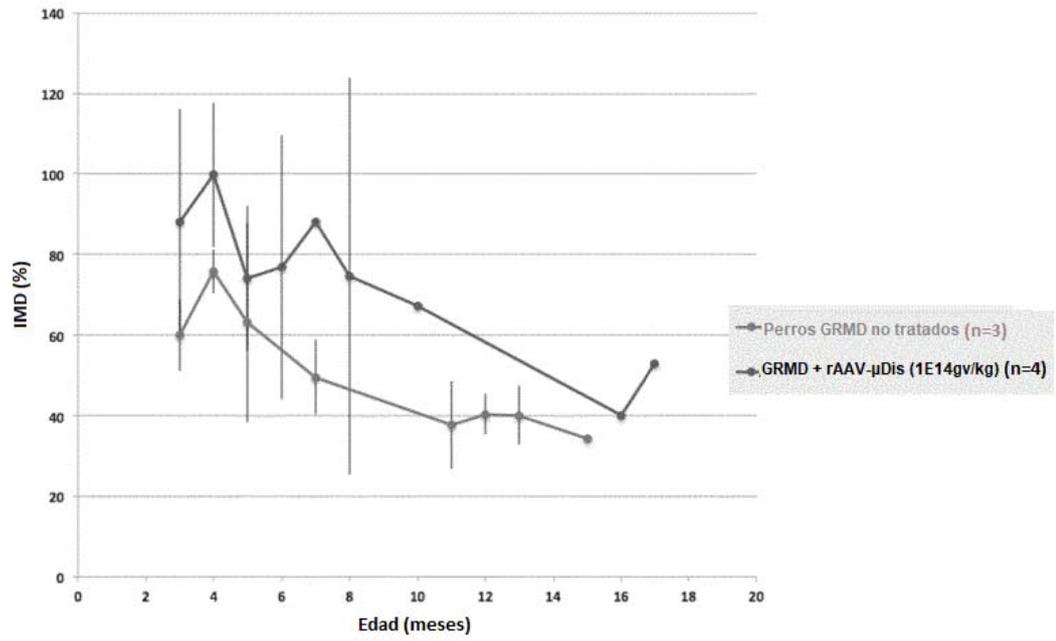
**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**

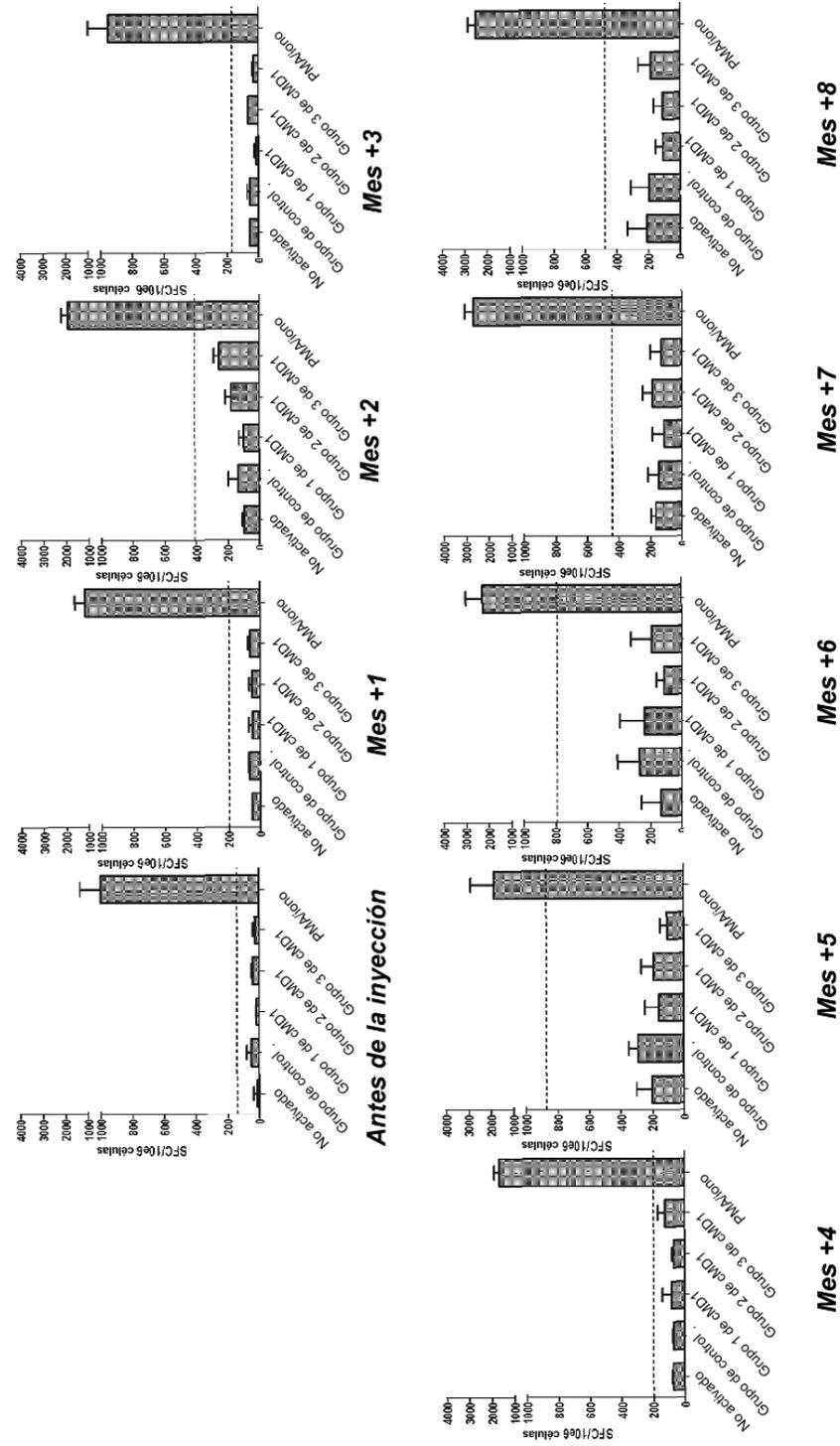
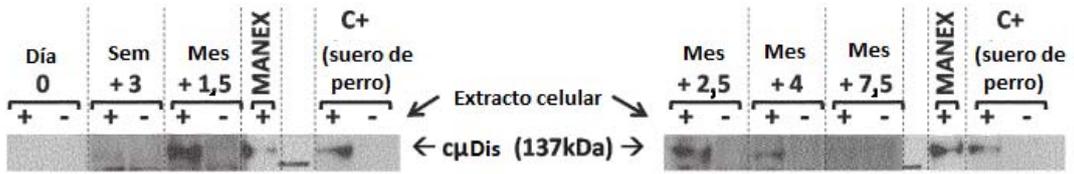


Figura 7



**Figura 8**