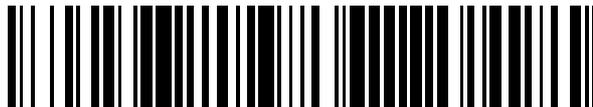


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 727**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2013 PCT/US2013/058636**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14039916**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2013 E 13835266 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2892617**

54 Título: **Polinucleótidos antisentido para inducir la omisión de exón y procedimientos de tratamiento de distrofias**

30 Prioridad:

06.09.2012 US 201261697766 P

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

19.10.2018

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF CHICAGO (100.0%)
5801 South Ellis Avenue
Chicago, IL 60637, US**

72 Inventor/es:

MCNALLY, ELIZABETH

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 686 727 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

Polinucleótidos antisentido para inducir la omisión de exón y procedimientos de tratamiento de distrofias

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere a polinucleótidos antisentido y su uso en composiciones farmacéuticas para inducir la omisión de exón en exones diana del gen gama sarcoglicano (SGCG), útil en el tratamiento de diversas formas de distrofia muscular.

Antecedentes de la invención

10 La distrofia muscular (DM) es un grupo de más de 30 trastornos genéticos caracterizados por debilidad y degeneración del músculo esquelético. La distrofia muscular de cinturas (LGMD) es una clase autosómica de DM. Los músculos más gravemente afectados en la LGMD son los de las extremidades, entre las que se incluyen brazos y piernas, así como los músculos del tronco que afectan a la postura y a la respiración. Los pacientes con DM nacen con una función muscular normal pero desarrollan insuficiencia cardíaca y problemas respiratorios debido a la pérdida de masa y resistencia del músculo cardíaco y respiratorio. La distrofia muscular de cinturas tipo 2C (LGMD2C) está causada por mutaciones en el gen γ -sarcoglicano (Sgcg) [Noguchi y col., Science 270: 819-822 (1995); McNally y col., Am J Hum Genet 59: 1040-1047 (1996); Lasa y col., Eur J Hum Genet 6: 396-399 (1998)]. El γ -sarcoglicano es una proteína asociada con la distrofia [Allikian y col., Traffic 8: 177-183 (2007)]. La distrofia es una proteína citoplásmica con forma de vara que se encuentra a lo largo de la superficie interna de la membrana plasmática de las células musculares. La distrofia está codificada por el gen DMD, que es el gen más grande conocido hasta el momento, abarcando 2,4 MB sobre el cromosoma X [Hoffman, y col., Biotechnology 24: 457-466 (1992)]. Las mutaciones en el gen DMD son la causa más común de la distrofia muscular, afectando a 1 de cada 3500 niños recién nacidos en todo el mundo [Moser, Hum Genet 66: 17-40 (1984)].

25 El complejo distrófino se sitúa en la membrana muscular, conocida como el sarcolema y conecta ovillos de actina intracelular a la matriz extracelular. El complejo distrófino juega un papel fundamental en la estabilización del sarcolema durante la contracción muscular. La mutación o pérdida de distrofina o los sarcoglicanos asociados lleva a la desestabilización del sarcolema y episodios posteriores, tales como lesión de células musculares, necrosis de células musculares y deposición de tejido fibrótico o graso.

30 Los ratones y humanos tienen un complejo distrófino altamente conservado. El modelo de ratón nulo de *Sgcg* (*Sgcg*^{-/-}) fue el primer modelo establecido para LGMD mediante la supresión del exón 2 de *Sgcg*, resultando en un alelo nulo [Hack y col., J Cell Biol 142: 1279-1287 (1998)]. Los ratones mutantes con γ -sarcoglicano desarrollan una patología de enfermedad progresiva que se parece a la de los pacientes de LGMD2C. Los ratones con *Sgcg*^{-/-} nacen según las relaciones mendelianas esperadas. A las 20 semanas de edad, sin embargo, la mitad de los ratones con *Sgcg*^{-/-} mueren y los ratones supervivientes pesan significativamente menos que sus compañeros de camada de tipo salvaje. Los cambios distróficos del músculo esquelético, tales como amplia variación en tamaño de las fibras, infiltración de células inmunes y deposición de tejido fibrótico y graso, resultan evidentes a las 3 semanas de edad pero se vuelven predominantes aproximadamente a las 8 semanas de edad. Acorde con el patrón de progresión de la enfermedad en pacientes, la cardiomiopatía en *Sgcg*^{-/-} también se desarrolla en una etapa más avanzada. A las 20 semanas de edad, los corazones con *Sgcg*^{-/-} muestran una fibrosis notable y una función cardíaca reducida.

40 La alteración del complejo distrófino hace que la membrana muscular sea más frágil y susceptible a desgarros de la membrana cuando se somete a esfuerzo de cizalla durante la contracción. Como resultado de estos desgarros, los músculos esqueléticos nulos de distrofina o sarcoglicano muestran una permeabilidad aumentada que permite solubilizar enzimas tales como quinasa creatina para salir de las proteínas celulares y sanguíneas tales como albúmina o iones tales como calcio para entrar en la célula. Inicialmente, la maquinaria reparadora de la membrana, que incluye proteínas de la familia disferlina, está activada para resellar la membrana dañada [Bansal Nature 423: 168-172 (2003); Doherty y col., Development 132: 5565-5575 (2005)]. Sin embargo, este desvaído del límite del entorno celular y contenido de calcio citoplásmico aumentado están asociados con una serie de episodios celulares dañinos, tales como especies de oxígeno reactivo aumentado, activación de cascada de proteasas y finalmente llevan a muerte celular necrótica [Goldstein y col., J Gen Physiol 136: 29-34 (2010)].

50 La pérdida de fibras musculares también activa las células madre musculares, denominadas células satélite. Las células satélite se dividen e intentan reparar fibras musculares lesionadas. Puesto que los mioblastos solo tienen un potencial de división limitado, la tendencia de degeneración supera gradualmente los esfuerzos de regeneración, dando como resultado una pérdida muscular irreversible. La pérdida de volumen muscular está acompañada por el reemplazo del tejido conectivo y graso. Al igual que los humanos, los ratones mutantes también desarrollan cardiomiopatía como resultado de la pérdida de cardiomiocitos y deposición de tejido fibrótico. Los corazones con una cardiomiopatía no bombean adecuadamente, lo que resulta en la incapacidad de suministrar oxígeno y nutrientes al tejido.

55 La *drosophila* tiene un complejo distrófino que muestra conversación con mamíferos. La *drosophila* γ/δ -sarcoglicano (*Sgcd*) es igualmente similar al γ -sarcoglicano y δ -sarcoglicano mamífero. Estudios previos resultaron en la generación de un modelo de mosca de distrofia muscular induciendo una gran supresión en el locus *Sgcd* a través

de escisión del elemento P imprecisa [Allikian y col., Hum Mol Genet 16: 2933-2943 (2007)]. Se seleccionó la línea *Sgcd*⁸⁴⁰ y se caracterizó adicionalmente puesto que tenía una supresión definida que provoca la ablación de la expresión del único gen γ/δ -sarcoglicano. Similar a la naturaleza progresiva de la DM en mamíferos, las moscas mutantes con *Sgcd* son normales cuando emergen como adultas, pero desarrollan anomalías cardíacas y del músculo esquelético durante el tiempo. A diferencia del corazón con cuatro cámaras en los mamíferos, las moscas tienen un conducto cardíaco simple que promueve la circulación sanguínea. En comparación con las moscas tipo salvaje, los conductos cardíacos en moscas mutantes con *Sgcd* se agrandan y son deficientes en su contracción. La debilidad en el músculo esquelético manifiesta la capacidad de escalada deteriorada en las moscas mutantes. El estudio histológico del músculo de vuelo en las moscas mutantes también reveló un desprendimiento de la fibra muscular del exoesqueleto, que solo se observa raramente en moscas de tipo salvaje.

Las causas más comunes de distrofia muscular son mutaciones en el gen distrofina. Las distintas mutaciones en la distrofina llevan a distintas gravedades. Por ejemplo, una mutación que cambia el marco de lectura, tal como la supresión del exón 43 al exón 48 [Doriguzzi y col., Eur Neurol 33: 454-460 (1993)], lleva a una enfermedad mucho más grave que una con una supresión más grande que abarca del exón 13 al 48 [Passos-Bueno y col., Hum Mol Genet 3: 919-922 (1994)]. El cambio de marco en el caso anterior resulta en la pérdida del extremo C de distrofina, que es el responsable de la situación normal de los sarcoglicanos y otras proteínas asociadas con la distrofina. Además, el nivel de proteína de distrofina también se ve reducido en gran medida, posiblemente debido a degradación del ARN mensajero mediada por mutación terminadora o plegamiento de proteínas adecuado y degradación posterior. En el último caso, la gran supresión reduce el número de repeticiones de espectrina en la región media de la proteína, mientras que mantiene el extremo C y extremo N cruciales intactos. Esto sugiere que la proteína internamente trucada puede ser parcialmente funcional. Estas ligeras mutaciones son conocidas como formas de Distrofia Muscular de Becker (DMB).

La mayoría de genes eucariotas están producidos de exones codificadores de proteínas e intrones no codificadores. Se requiere el corte y empalme para conectar exones para formar un ARNm maduro. Para conseguir un patrón de corte y empalme adecuado, se requiere el reconocimiento del donador de corte y empalme, el aceptador de corte y empalme y los sitios potenciadores de corte y empalme exónico (ESE). El bloqueo de sitios de corte y empalme esenciales mediante polinucleótidos antisentido (AON) induce la exclusión de determinados exones del ARNm maduro [Aartsma-Rus y col., RNA 13: 1609-1624 (2007)]. Este episodio se denomina omisión de exón.

Se han llevado a cabo ensayos clínicos de fase I y fase II de omisión de exón terapéutica, demostrando la seguridad de la administración de AON y eficacia de la restauración de la distrofina [Bertoni, Front Biosci 13: 517-527 (2008); Cirak y col., Lancet 378: 595-605 (2011)]. En el ensayo de fase II, 19 pacientes con edades de 5-15 años participaron en el estudio. Se dividieron en múltiples grupos que recibieron dosis escaladas de AVI-4568 (el fármaco de AON) mediante infusión intravenosa semanalmente durante 12 semanas. No se observó ningún efecto adverso grave relacionado con el fármaco. Se observó la omisión de exón diana en todos los pacientes y se detectó nueva producción de distrofina de un modo dependiente de dosis. Los 3 pacientes con mayor respuesta al fármaco tenían un 15 %, 21 % y 55 % de fibras positivas de distrofina. De acuerdo con la reproducción de la distrofina funcional, también se encontraron proteínas asociadas con la distrofina restauradas en la membrana plasmática de las células musculares.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. La divulgación va dirigida a composiciones para la omisión de exón que comprende dos o más polinucleótidos antisentido y su uso en composiciones farmacéuticas en una estrategia para inducir la omisión de exón en el gen gama sarcoglicano en pacientes que padecen distrofia muscular de cinturas 2C (es decir, LGMD2C) o en pacientes con riesgo de tal enfermedad. La divulgación también proporciona composiciones para su uso en la prevención o tratamiento de distrofia muscular, por ejemplo, LGMD2C, mediante omisión de exón en el gen gama sarcoglicano usando polinucleótidos antisentido.

Un aspecto de la divulgación proporciona una composición para la omisión de exón que comprende dos o más polinucleótidos antisentido en el que cada polinucleótido se hibrida específicamente a una región diana de exón de un ARN gama sarcoglicano, en el que el exón se selecciona entre el grupo que consiste en exón 4 (SEQ ID NO: 1), exón 5 (SEQ ID NO: 2), exón 6 (SEQ ID NO: 3), exón 7 (SEQ ID NO: 4) y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el polinucleótido antisentido no puede formar un sustrato de RNasa H y en realizaciones adicionales el polinucleótido antisentido comprende una estructura principal de polinucleótidos modificados. En algunas realizaciones, la estructura principal modificada es un 2'-O-metil-oligoribonucleótido.

Tabla 1. Secuencias de exón de gama sarcoglicano.

Exón (SEQ ID NO)	Secuencia (5'-3')
4 (SEQ ID NO: 1)	<p>ATTTTGCAAATTTTATAAATCTCTTCTAGGACTCATCTCTGC TTCTACAATCAACCCAGAATGTGACTGTAAATGCGCGCAACT CAGAAGGGGAGGTCACAGGCAGGTTAAAAGTCGGTGAGTCC AGCTTCATCATGGTGCTTTGCA</p>

(continuación)

Exón (SEQ ID NO)	Secuencia (5'-3')
5 (SEQ ID NO: 2)	<p><u>AGTTTATAATAAACTGTTTTAATTCTTCAGGTCCCAAATGG</u> <u>TAGAAGTCCAGAATCAACAGTTTCAGATCAACTCCAACGAC</u> <u>GGCAAGCCACTATTTACTGTAGATGAGAAGGAAGTTGTGGTT</u> <u>GGTACAGATAAACTTCGAGTAACTGGTATGTACTAACTCGAG</u> AAAACACAACAT</p>
6 (SEQ ID NO: 3)	<p><u>GCTCCTGATACATCTTTGTTTTTTGTTTAGGGCCTGAAGGGGC</u> <u>TTTTTTGAACATTCAGTGGAGACACCCCTTGTCAGAGCCGA</u> <u>CCCGTTTCAAGACCTTAGGTAAGAATTTTTGTTCAAATATTA</u> ACAACC</p>
7 (SEQ ID NO: 4)	<p><u>ATTTTAAATACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTGCTTCTTTTCCTCAT</u> <u>CTCAGATTAGAATCCCCCACTCGGAGTCTAAGCATGGATGCC</u> <u>CCAAGGGGTGTGCATATTCAGCTCACGCTGGGAAAATTGA</u> <u>GGCGCTTCTCAAATGGATATTCTTTTTCATAGTAGTGATGG</u> AATGGTGAGTTCATTACAGATCAGCCTCCTACT</p>
<p>El subrayado indica la región codificadora del exón. Se contempla que los polinucleótidos antisentido son secuencias que se dirigen a un exón o a un límite intrón-exón.</p>	

- 5 En realizaciones adicionales, la divulgación contempla que la estructura principal de polinucleótidos modificados comprende un radical modificado sustituido por al menos un azúcar de al menos uno de los polinucleótidos. En una realización específica, el radical modificado es un Morfolino.
- 10 Se contempla adicionalmente por la divulgación que, en algunas realizaciones, la estructura principal de polinucleótidos modificados en el polinucleótido comprende al menos un enlace internucleótido modificado y en algunas realizaciones el enlace internucleótido modificado comprende un fosfato modificado. El fosfato modificado, en diversas realizaciones, se selecciona entre el grupo que consiste en un fosfonato de metilo, un fosforotioato de metilo, un fosforomorfolidato, un fosforopiperazidato y un fosforoamidato.
- La divulgación también proporciona realizaciones en las que el polinucleótido comprende un ácido peptidonucleico.
- 15 En otras realizaciones adicionales, se contempla que el polinucleótido está químicamente enlazado a uno o más conjugados que mejoran la actividad, distribución celular o absorción celular del polinucleótido antisentido. En realizaciones relacionadas, el conjugado es un péptido que mejora la absorción celular y en realizaciones adicionales el péptido se selecciona entre el grupo que consiste en una señal de localización nuclear (NLS), proteína TAT HIV-1, un péptido que comprende un dominio de unión de integrina, una oligolisina, una proteína de fibra adenovirus y un péptido que comprende un dominio de endocitosis mediada por receptor (EMR).
- En algunas realizaciones, el polinucleótido está químicamente enlazado a una molécula de polietilenglicol.
- 20 En otro aspecto de la divulgación, se proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más polinucleótidos antisentido tal como se describe en el presente documento y un tampón fosfato fisiológicamente compatible. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un polinucleótido antisentido adicional, en la que el polinucleótido adicional se hibrida específicamente a un exón de un ácido nucleico gama sarcoglicano.
- 25 Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un uso para inducir la omisión de exón de un ARN gama sarcoglicano, que comprende el suministro a una célula una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz de la composición de la divulgación, induciendo, de este modo, la omisión de exón del ARN gama sarcoglicano.
- 30 En algunas realizaciones, la célula es una célula de músculo humano y en realizaciones adicionales la célula de músculo humano se encuentra en un paciente. El paciente, en diversas realizaciones, es un paciente que tiene distrofia muscular. En realizaciones adicionales, la distrofia muscular es distrofia muscular de cinturas tipo 2C (LGMD2C).

En aún otro aspecto de la divulgación, se proporciona un uso para mejorar la distrofia muscular es distrofia muscular de cinturas tipo 2C (LGMD2C) en un paciente que lo necesita, que comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición del a divulgación, mejorando, de este modo, la LGMD2C.

5 La divulgación también proporciona un uso para inhibir la progresión de patología distrófica asociada con la LGMD2C en un paciente que lo necesita que comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación, inhibiendo, de este modo, la progresión de patología distrófica.

10 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un uso para mejorar la función muscular en un paciente que padece distrofia muscular de cinturas tipo 2C (LGMD2C) que comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición del a divulgación, mejorando, de este modo, la función muscular. En algunas realizaciones, la mejora es una mejora del músculo cardíaco y en realizaciones adicionales la mejora en la función muscular es una mejora en la resistencia muscular. En realizaciones adicionales, la mejora en la resistencia muscular es una mejora en la resistencia del músculo respiratorio y en realizaciones adicionales la mejora en la función muscular es una mejora en la estabilidad motora. En cualquiera de las realizaciones de la divulgación, la mejora en la resistencia del músculo respiratorio se mide como episodios de desaturación nocturna reducidos o evaluación de la función pulmonar mejorada. En cualquiera de las realizaciones de la divulgación, la mejora en la estabilidad motora resulta en un tiempo mejorado para mantenerse en pie o subir escaleras respecto a un tiempo previamente medido para mantenerse en pie o subir escaleras.

20 La mejora en la estabilidad motora, en algunas realizaciones, resulta en un ensayo de caminar seis minutos mejorado por el paciente respecto a una medición previa de un ensayo de caminar seis minutos por ese paciente. Mejoras adicionales contempladas por la divulgación se evalúan mediante histopatología mejorada o pruebas de formación de imágenes no invasivas mejoradas tales como infiltración de fibrograsa reducida y pruebas reducidas de cicatrización. También se contempla la mejora de músculo cardíaco según se documenta por la función ventricular izquierda y derecha, diámetros ventriculares derecho e izquierdo reducidos y prueba reducida de daño cardíaco.

25 Otro aspecto de la divulgación se dirige a un kit que comprende la composición que se describe en el presente documento, opcionalmente en un recipiente y un inserto de envase, etiqueta de envase, instrucciones y otro etiquetado. En algunas realizaciones, el kit comprende adicionalmente un polinucleótido adicional, en la que el polinucleótido adicional se hibrida específicamente a un exón en un ARN gama sarcoglicano.

Breve descripción de los dibujos

30 La **Figura 1** muestra el marco de lectura del gen *Sgcg* de mamífero antes (**A**) y después (**C**) de la omisión de exón 4-7. La supresión de una timina en el exón 6 altera el marco de lectura y es la mutación de LGMD2C más común. (**B**). La omisión de exón 4-7 restaura el marco de lectura. Los exones que siguen el exón "E8" y los que están marcados "E1" representan regiones no traducidas.

35 La **Figura 2** representa la estructura de longitud completa de γ -sarcoglicano (**izquierda**) y el γ -sarcoglicano internamente truncado después de la omisión del exón 4-7 (**derecha**). Se muestran aminoácidos conservados.

40 La **Figura 3** representa mapas de vectores de construcciones mini-*Sgcg* en moscas transgénicas (**A**) y ratones transgénicos (**B**). UAS es la secuencia de control reconocida específicamente por Gal4. El promotor de desmina (Des) es específico del músculo. Los datos preliminares han mostrado que los mini-*Sgcg* se producen en moscas transgénicas UAS-mini-*Sgcc* y en células musculares transfectadas Des-mini-*Sgcg* en cultivo. Cabe destacar que el mini-*Sgcg* producido a partir de ambos transgenes está marcado con el marcador de epítipo Xpress.

45 La **Figura 4** muestra que el conducto cardíaco de *Drosophila* es una estructura de pared fina que va a lo largo del dorso de la mosca adulta (**A**). **B** muestra una imagen ME del conducto cardíaco (h y flechas). **A** y **B** son de Curtis, Morphology 240: 225 (1999). **C** muestra la tinción localizada de membrana a partir del transgén mini-*Sgcg* que expresa mini-*Sgcg* en moscas *Sgcg*⁸⁴⁰ en el conducto cardíaco usando un *GAL4* de *Tinman*.

La **Figura 5** representa que el *Sgcg* de longitud completa y mini-*Sgcg* se expresan y sitúan correctamente en la membrana plasmática de las células del músculo esquelético de moscas transgénicas. Las células del músculo están alineadas paralelas entre sí.

50 La **Figura 6** representa la función cardíaca mejorada en mini-*Sgcg* rescatados de moscas con *Sgcd*⁸⁴⁰. A la izquierda se muestra la dimensión sistólica final (DSF). Las moscas con *Sgcd*⁸⁴⁰ tienen una DSF aumentada, indicando una dilatación del conducto cardíaco. Este alargamiento se rescata cuando la proteína de mini-*Sgcg* se introduce en moscas con *Sgcd*⁸⁴⁰ mediante transgénesis.

La **Figura 7** muestra la construcción para producir mini-*Sgcg* en ratones. Se indica un ratón fundador transgénico positivo (n.º 23, denominado "MJ").

55 La **Figura 8** muestra que la proteína de mini-*Sgcg* se produce en miotubos cuando se transfecta con el vector Des-mini-*Sgcg* y se sitúa en la membrana muscular.

La **Figura 9** representa el rescate de capacidad de caminar en moscas nulas de *Sgcd* usando mini-*Sgcg*. En el panel izquierdo, el eje Y es el número de roturas de haz por hora y el eje X es la hora en la que la medianoche se designa como 0. En el panel derecho, el eje Y es el número total de roturas de haz desde la medianoche hasta las 8 am.

5 La **Figura 10** muestra que la expresión de mini-*Sgcg* en moscas de *Sgcd*^{B40} mejoró significativamente la actividad nocturna.

La **Figura 11** muestra que la proteína de mini-*Sgcg* puede producirse de forma estable en músculo esquelético (esqueleto) y corazón (corazón) de un mamífero.

10 La **Figura 12** representa la expresión de mini-*Sgcg* en dos líneas transgénicas distintas. El panel superior muestra la expresión en tres concentraciones distintas de la línea transgénica 50 o la línea transgénica 84.

La **Figura 13** representa que la proteína de mini-*Sgcg* se sitúa en la membrana plasmática de músculo esquelético cuando se expresa en ratones normales de tipo salvaje (Tg⁺). La misma señal no se detectó en músculo negativo transgénico (Tg⁻) lo que demostró que esta señal deriva del transgén.

15 La **Figura 14** muestra que la expresión de proteína de γ -sarcoglicano endógeno de longitud completa (*Sgcg*) se ve disminuye en la membrana plasmática cuando el mini-*Sgcg* está presente (Tg⁺ (panel izquierdo) frente a cuando el mini-*Sgcg* está ausente (Tg⁻ (panel izquierdo)).

La **Figura 15** representa un modelo de un conjunto de sarcoglicano.

La **Figura 16** muestra que el mini-*Sgcg* está enriquecido en la fracción microsomal pesada del músculo.

20 La **Figura 17** muestra dos líneas celulares humanas con mutaciones de SGCG que han sido infectadas con retrovirus que expresan telomerasa y MyoD. La fila superior es de un paciente con LGMD 2C cuya enfermedad aparece a partir de una mutación que suprime el exón 7 en SGCG. La fila inferior es de un paciente con LGMD 2C que ha sido suprimido del exón 6 de SGCG.

25 La **Figura 18** representa líneas celulares de LGMD 2C que se diferenciaron en el linaje muscular (6 días de diferenciación). La fila superior es de un paciente con LGMD 2C cuya enfermedad aparece a partir de una mutación que suprime el exón 6 en SGCG y la fila inferior es de un paciente con LGMD 2C que ha sido suprimido del exón 7 de SGCG. El MyoD, un marcador muscular, se expresa a partir del retrovirus (panel medio) y la desmina, un marcador muscular, se induce a partir de MyoD (panel derecho) que indica que estas células son modelos viables de enfermedad muscular. El panel a mano izquierda (Hoechst) muestra los núcleos.

Descripción detallada de la invención

30 Las mutaciones en el gen que codifica γ -sarcoglicano, *Sgcg*, lleva a distrofia muscular, una enfermedad con degeneración muscular, incapacidad de regeneración y debilidad muscular. Una estrategia que se examina en el presente documento para el tratamiento de formas genéticas de distrofia muscular es la omisión de exón. La exclusión de determinado(s) exón(es) de transcripciones finales o la omisión de exón, puede conseguirse bloqueando sitios de corte y empalme esenciales usando uno o más polinucleótidos antisentido (AON). Mediante la inducción de corte y empalme alrededor de exones con mutación, se produce una proteína internamente suprimida pero potencialmente funcional, el γ -sarcoglicano es una proteína asociada a la membrana que es parte del complejo de proteína de distrofina, un complejo que estabiliza la membrana muscular durante la contracción muscular. El gen *Sgcg* está compuesto de 8 exones. La mutación más común en *Sgcg* es la supresión de timidina 525 en el exón 6 (525 Δ T), causando la producción de 19 aminoácidos sin sentido y un codón de terminación prematuro. La omisión de exones 4-7 restaura el marco de lectura de proteína adecuado, resultando en una proteína de γ -sarcoglicano internamente truncada. La forma truncada del γ -sarcoglicano reduce la proteína de longitud completa desde los aminoácidos 291 a los aminoácidos 157 y retiene la región intracelular, el dominio de la transmembrana y el motivo rico en cisteína crucial en el extremo carboxi.

45 El gen de γ -sarcoglicano se conserva entre humano, ratón y *Drosophila*, y se han generado previamente ambos modelos de mosca y ratón de las mutaciones del gen γ -sarcoglicano. La secuencia de aminoácidos de gama sarcoglicano humano se expone en la SEQ ID NO: 5, mientras que la secuencia de aminoácidos de gama sarcoglicano de ratón se expone en la SEQ ID NO: 6. El murino truncado o γ -sarcoglicano humano que resulta de la omisión de exón 4-7 se ha denominado "mini-*Sgcg*." La secuencia de aminoácidos de mini-*Sgcg* humano que resulta de la omisión de exón 4-7 se expone en la SEQ ID NO: 7, mientras que la secuencia de aminoácidos de mini-*Sgcg* de ratón que resulta de la omisión de exón 4-7 se expone en la SEQ ID NO: 8.

Los datos proporcionados en el presente documento demuestran que la proteína mini-*Sgcg* se produce en *Drosophila* transgénica, donde se localiza normalmente a la membrana plasmática. Las estructuras del γ -sarcoglicano de longitud completa y la proteína truncada después de la omisión de exón se muestra en la Figuras 1 y 2, respectivamente.

De este modo, la divulgación proporciona una composición para la omisión de exón que comprende dos o más polinucleótido(s) antisentido aislado(s) en el que cada polinucleótido se hibrida específicamente a una región diana de exón de un ARN gama sarcoglicano, en el que el exón se selecciona entre el grupo que consiste en exón 4 (SEQ ID NO: 1), exón 5 (SEQ ID NO: 2), exón 6 (SEQ ID NO: 3), exón 7 (SEQ ID NO: 4) y una combinación de los mismos.

Como se usa en el presente documento, "hibridación" significa una interacción entre dos o tres cadenas de ácidos nucleicos mediante enlaces de hidrógenos de acuerdo con las normas de complementariedad de ADN de Watson-Crick, enlaces de Hoogsteen u otro enlace específico de secuencia conocido en la técnica. La hibridación puede realizarse en distintas condiciones de exigencia conocidas en la técnica. "Hibridarse específicamente" tal como se usa en el presente documento, es la hibridación que permite un dúplex estabilizado entre cadenas de polinucleótidos que son complementarias o sustancialmente complementarias. Por ejemplo, una cadena de polinucleótidos que tiene 21 unidades de polinucleótidos puede formar pares de bases con otro polinucleótido de 21 unidades de nucleótidos, sin embargo, solo 19 bases sobre cada cadena son complementarias o sustancialmente complementarias, de modo que el "dúplex" tiene 19 pares de base. Las bases restantes pueden, por ejemplo, existir como salientes 5' y/o 3'. Además, dentro del dúplex, no se requiere el 100 % de complementariedad; es posible la complementariedad sustancial dentro de un dúplex. La complementariedad sustancial se refiere al 75 % o superior de complementariedad. Por ejemplo, una falta de coincidencia en un dúplex que consiste en 19 pares de base resulta en un 94,7 % de complementariedad, volviendo el dúplex sustancialmente complementario.

Cabe destacar en el presente documento que, como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/una", y "el" y "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

También cabe destacar que el término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento se entiende que significa aproximadamente.

Diseño de polinucleótido/polinucleótidos antisentido

Para inducir la omisión de exón en exones de transcripción de gen de gama sarcoglicano, el polinucleótido antisentido se selecciona basándose en las secuencias de exones que se muestran en las Tablas 1 y 2. La divulgación también proporciona una combinación o "cóctel" de dos o más polinucleótidos antisentido capaces de unirse a una diana o dianas seleccionada para inducir la omisión de exón. La omisión de exón que se contempla en el presente documento induce la exclusión de exones 4, 5, 6 y/o 7 para generar una proteína de gama sarcoglicano internamente truncada, enmarcada. La exclusión de exones 4, 5, 6 y 7 resulta en la generación de una proteína internamente truncada que carece de 135 aminoácidos, mientras que la supresión del exón 5 resulta en una proteína enmarcada suprimida que carece de 40 aminoácidos. Las proteínas internamente truncadas, denominadas mini-Sgcg, retienen la capacidad de interactuar con la distrofina y sus proteínas asociadas y estabilizar las células del músculo cardíaco y esquelético.

Dentro del contexto de la divulgación, sitio(s) preferente(s) diana son los implicados en el corte y empalme de ARNm (es decir, sitios donadores de corte y empalme, sitios aceptadores de corte y empalme y elementos potenciadores de corte y empalme exónico). Los puntos de ramificación de corte y empalme y las secuencias de reconocimiento de exones o potenciadores de corte y empalme también son sitios diana potenciales para la modulación de corte y empalme de ARNm.

Por lo tanto, en diversas realizaciones, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince o más polinucleótidos antisentido se usan para inducir la omisión de exón de un ácido nucleico gama sarcoglicano. La elección del núcleo de polinucleótidos antisentido puede determinarse de forma empírica por un experto en la técnica. El experto en la técnica puede evaluar individualmente la capacidad relativa de las composiciones que comprenden dos, tres, cuatro o más polinucleótidos antisentido para producir un producto proteínico de interés *in vitro*. En resumen, y en un ejemplo de referencia, una composición que comprende un único polinucleótido antisentido que está diseñado para hibridarse específicamente (es decir, bloquear) un sitio aceptador de corte y empalme en el exón 4 de un ácido nucleico gama sarcoglicano se añade a un cultivo de fibroblastos obtenidos a partir de un paciente portador de una mutación en el gama sarcoglicano. A continuación, se inducen los fibroblastos para adoptar un linaje miogénico mediante expresión de MyoD forzada (véase Ejemplo 2 para detalles) y los miotubos resultantes se evalúan para su expresión de superficie de una proteína mini-Sgcg mediante, por ejemplo y sin limitación, un experimento de inmunofluorescencia. Pueden llevarse a cabo análisis de inmunofluorescencia adicionales de miotubos para identificar si los sarcoglicanos adicionales (es decir, α -, β - y δ -sarcoglicano) están co-localizados con mini-Sgcg en los miotubos. Tal co-localización de los miembros del complejo de sarcoglicano asociado con las membranas musculares indica que el mini-Sgcg que se produce tras la administración de la composición que comprende un único polinucleótido antisentido es capaz de inducir eficazmente la omisión de exón del ácido nucleico gama sarcoglicano para resultar en una proteína truncada que retiene su capacidad de asociarse con los otros miembros del complejo de sarcoglicano, así como incorporarse en una membrana muscular. Pueden llevarse a cabo experimentos similares con composiciones que comprenden individualmente dos, tres, cuatro, cinco o más polinucleótidos antisentido, cada uno diseñado para hibridarse específicamente a un exón de un ácido nucleico gama sarcoglicano.

Para identificar y seleccionar polinucleótidos antisentido adecuados para su uso en la modulación de omisión de exón, debe identificarse, en primer lugar, una secuencia de ácido nucleico cuya función debe modularse. Esto puede ser, por ejemplo, un gen (o una forma transcrita de ARNm del gen) cuya expresión se asocia con un trastorno particular o estado de enfermedad o una molécula de ácido nucleico a partir de un agente infeccioso. Dentro del contexto de la divulgación, sitio(s) adecuado(s) diana son los implicados en el corte y empalme de ARNm (por ejemplo, sitios donadores de corte y empalme, sitios aceptadores de corte y empalme y elementos potenciadores de corte y empalme exónico). Los puntos de ramificación de corte y empalme y las secuencias de reconocimiento de exones o potenciadores de corte y empalme también son sitios diana potenciales para la modulación de corte y empalme de ARNm contemplados por la divulgación.

Tabla 2. Tabla de coordinados de exones basados en la Construcción Genoma Humano UCSC 19.

	Inicio de exón	Finalización de exón	Inicio de exón +30	Finalización de exón +30
exón 4	23824768	23824856	23824738	23824886
exón 5	23853497	23853617	23853467	23853647
exón 6	23869553	23869626	23869523	23869656
exón 7	23894775	23894899	23894725*	23894929

Exones *sgcg* por UCSC hg19, transcrito NM_000231
 *-50 a partir del inicio de exón debido a la región rica en T

Los expertos en la técnica pueden diseñar fácilmente polinucleótidos antisentido de acuerdo con la presente divulgación. Por ejemplo, enseñanzas generales en la técnica incluyen, aunque no de forma limitativa, Aartsma-Rus y col., *Methods Mol Biol.* 867: 117-29 (2012); Aartsma-Rus y col., *Methods Mol Biol.* 867: 97-116 (2012); van Roon-Mom y col., *Methods Mol Biol.* 867: 79-96 (2012). Las directrices generales también incluyen intentar evitar 3 nucleótidos G o C consecutivos, escogiendo longitudes y secuencias que favorecen el autocultivo (se evitará el horquillado) y evitar esas secuencias que probablemente formen dímeros de cebadores. En algunas realizaciones, un polinucleótido antisentido de la divulgación es uno que está diseñado para hibridarse específicamente a un exón o a un límite intrón-exón, de modo que el polinucleótido antisentido se hibrida específicamente a una secuencia que se encuentra completamente dentro de un exón de un ácido nucleico gama sarcoglicano o aproximadamente un nucleótido del polinucleótido antisentido cruza dicho límite intrón-exón cuando el polinucleótido antisentido está hibridado específicamente al ácido nucleico gama sarcoglicano. En algunas realizaciones en el que el polinucleótido antisentido se hibrida específicamente a una secuencia que se encuentra completamente dentro de un exón, se contempla que un extremo del polinucleótido antisentido es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos a partir de un extremo del exón. El límite intrón-exón para cada uno de los exones 4, 5, 6 y 7 se muestra en la Tabla 1. En realizaciones adicionales, un polinucleótido antisentido de la divulgación es uno que está diseñado para hibridarse específicamente a un límite intrón-exón de un ácido nucleico gama sarcoglicano, tal como aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos del polinucleótido antisentido atraviesan dicho límite intrón-exón. Se entiende que un nucleótido puede "atravesar el límite intrón-exón" en el lado del exón o en el lado del intrón. Por lo tanto, un polinucleótido antisentido que se hibrida específicamente y predominantemente a una secuencia intrónica y solo se hibrida a un nucleótido de un exón colindante "atravesaría el límite intrón-exón" mediante un nucleótido. De forma similar, un polinucleótido antisentido que se hibrida específicamente a una secuencia exónica y solo se hibrida a un nucleótido de un intrón colindante "atravesaría el límite intrón-exón" mediante un nucleótido. En cualquiera de las realizaciones anteriormente mencionadas, el polinucleótido antisentido tiene al menos aproximadamente 10 nucleótidos y hasta 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos de longitud. Las longitudes de los polinucleótidos antisentido contemplados por la divulgación se describen con más detalle a continuación.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden dos o más polinucleótidos antisentido para inducir la omisión de exón de un ácido nucleico gama sarcoglicano, de modo que se produce una proteína "mini-Sgcg" que tiene la capacidad de (a) asociarse eficazmente con otros miembros del complejo de sarcoglicano (es decir, α -, β - y δ -sarcoglicano) y (b) incorporarse correctamente en una membrana muscular. En algunas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento resultan en la restauración de un sarcoglicano en una superficie de la membrana muscular, de modo que aproximadamente el 1 % de la proteína de gama sarcoglicano se restaura respecto a la cantidad de proteína de gama sarcoglicano en una membrana muscular con ausencia de administración de la composición farmacéutica. En realizaciones adicionales, los usos descritos en el presente documento resultan en la restauración de una proteína de sarcoglicano en la superficie de la membrana muscular, tal como aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 21 %, aproximadamente el 22 %, aproximadamente el 23 %, aproximadamente el 24 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 26 %, aproximadamente el 27 %, aproximadamente el 28 %, aproximadamente el 29 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 31 %, aproximadamente el 32 %, aproximadamente el 33 %, aproximadamente el 34 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 36 %, aproximadamente el 37 %, aproximadamente el 38 %, aproximadamente el 39 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 41 %, aproximadamente el 42 %, aproximadamente el 43 %, aproximadamente el 44 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 46 %, aproximadamente el 47 %, aproximadamente el 48 %, aproximadamente el 49 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 51 %, aproximadamente el 52 %, aproximadamente el 53 %, aproximadamente el 54 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 56 %, aproximadamente el 57 %, aproximadamente el 58 %, aproximadamente el 59 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, aproximadamente el 100 %.

aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 26 %, aproximadamente el 27 %, aproximadamente el 28 %, aproximadamente el 29 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 31 %, aproximadamente el 32 %, aproximadamente el 33 %, aproximadamente el 34 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 36 %, aproximadamente el 37 %, aproximadamente el 38 %, aproximadamente el 39 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 41 %, aproximadamente el 42 %, aproximadamente el 43 %, aproximadamente el 44 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 46 %, aproximadamente el 47 %, aproximadamente el 48 %, aproximadamente el 49 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 51 %, aproximadamente el 52 %, aproximadamente el 53 %, aproximadamente el 54 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 56 %, aproximadamente el 57 %, aproximadamente el 58 %, aproximadamente el 59 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 9 veces, aproximadamente 10 veces o más de la proteína de gama sarcoglicano se restaura respecto a la cantidad de proteína de gama sarcoglicano en la membrana muscular con la ausencia de administración de la composición farmacéutica. Tal restauración de la proteína de gama sarcoglicano en la membrana muscular se puede determinar por un experto en la técnica mediante, por ejemplo y sin limitación, obteniendo una biopsia muscular del paciente y realizando inmunofluorescencia con un anticuerpo que tiene una afinidad de enlace específico para la proteína mini-Sgcg.

Polinucleótidos

Los productos, usos y procedimientos de la divulgación comprenden dos o más polinucleótidos. Como se usa en el presente documento, un "polinucleótido" es un oligómero que comprende nucleótidos. Un polinucleótido puede comprender formas modificadas de ADN, ARN del mismo o una combinación de los mismos.

El término "nucleótido" o su plural tal como se usa en el presente documento es intercambiable con formas modificadas tal como se describe en el presente documento y, de otro modo, conocido en la técnica. En ciertos ejemplos, la técnica usa el término "nucleobase" que abarca nucleótidos naturales así como modificaciones de nucleótidos que pueden polimerizarse. Por lo tanto, nucleótido o nucleobase se refiere a las nucleobases naturales de adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U) así como nucleobases que no son naturales como xantina, diaminopurina, 8-oxo-N6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N',N'-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina (mC), 5-(C₃-C₆)-alquinilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y las nucleobases "no naturales" descritas en Benner y col., patente de EE.UU. n.º 5.432.272 y Susan M. Freier and Karl-Heinz Altmann, 1997, *Nucleic Acids Research*, vol. 25: págs. 4429-4443. El término "nucleobase" no solo incluye los heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos. Nucleobases naturales y no naturales adicionales incluyen las que se desvelan en la patente de Estados Unidos n.º 3.687.808 (Merigan, y col.), en el capítulo 15 po Sanghvi, en *Antisense Research and Application*, Ed. S. T. Crooke and B. Lebleu, CRC Press, 1993, en *Englisch y col.*, 1991, *Angewandte Chemie, International Edition*, 30: 613-722 (véase, especialmente páginas 622 y 623, y en *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, J. I. Kroschwitz Ed., John Wiley & Sons, 1990, páginas 858-859, Cook, *Anti-Cancer Drug Design* 1991, 6, 585-607). En diversos aspectos, los polinucleótidos también incluyen una o más "bases nucleosídicas" o "unidades de base" que incluyen compuesto tales como compuestos heterocíclicos que pueden servir como nucleobases, que incluyen determinadas "bases universales" que no son bases nucleosídicas en el sentido más clásico pero sirven como bases nucleosídicas. Bases universales incluyen 3-nitropirrol, indoles opcionalmente sustituidos (por ejemplo, 5-nitroindol) e hipoxantina opcionalmente sustituida. Otras bases universales deseables incluyen pirrol, y derivados de diazol o triazol, que incluyen las bases universales conocidas en la técnica.

Los polinucleótidos también pueden incluir nucleobases modificadas. Una "base modificada" se entiende en la técnica que es una que puede formar pares con una base natural (por ejemplo, adenina, guanina, citosina, uracilo y/o timina) y/o pueden formar pares con una base no natural. Se describen bases modificadas ilustrativas en el documento EP 1 072 679 y el documento WO 97/12896. Las nucleobases modificadas incluyen, sin limitación, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina y otros derivados de alquililo de bases de pirimidina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8 sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Más bases modificadas incluyen

5 pirimidinas tricíclicas tales como citidina de fenoxacina(1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxacina-2(3H)-ona), citidina de fenotiaccina (1H-pirimido[5, 4-b][1,4]benzotiaccina-2(3H)-ona), abrazaderas G tales como una citidina de fenoxacina sustituida (por ejemplo, la 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxacina-2(3H)-ona), citidina de carbazol (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-one), citidina de piridindol (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las bases
 10 modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base purínica o pirimidínica se ha reemplazado por otros heterociclos, por ejemplo, 7-desazaadenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Nucleobases adicionales incluyen las desveladas en la patente de los EE.UU. n.º 3.687.808, las desveladas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley y Sons, 1990, las desveladas por Englisch y col., 1991, *Angewandte Chemie, International Edition*, 30: 613, y las desveladas por
 15 Sanghvi, J. E., Capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas bases son útiles para aumentar la afinidad de unión del polinucleótido e incluye pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y N-2, N-6 y O-6 purinas sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Las sustituciones de 5-metilcitosina han mostrado aumentar la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C y, en determinados aspectos, con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo. Véase, la patente de los EE.UU. n.º 3.687.808, las patentes de los EE.UU. n.º 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121, 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; 5.750.692 y 5.681.941.

20 Se contemplan polinucleótidos modificados para su uso en los que ambos uno o más linaje de azúcar y/o linaje de internucleótido de las unidades de nucleótidos en el polinucleótido se reemplaza con azúcares "no naturales" (es decir, azúcares distintos de ribosa o deoxiribosa) o enlaces de internucleótidos, respectivamente. En un aspecto, esta realización contempla un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, la estructura principal de azúcar de un polinucleótido se reemplaza por una estructura principal que contiene amidas (por ejemplo, enlaces peptídicos entre unidades de N-(2-aminoetil)-glicina). Véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262, y Nielsen y col., *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

25 Los polinucleótidos también pueden contener uno o más grupos de azúcar sustituidos. En un aspecto, una modificación del azúcar incluye Ácidos Nucleicos Bloqueados (LNA) en los que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar, formando, de este modo, un grupo de azúcar bicíclico. El enlace es en determinados aspecto un grupo metileno (-CH₂-)_n que entrecruza el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' en el que n es 1 o 2. Se describen LNA y la preparación de los mismos en el documento WO 98/39352 y WO 99/14226.

30 Para evitar la degradación del pre-ARNm durante la formación del dúplex con los polinucleótidos antisentido, los polinucleótidos antisentido usando en el procedimiento pueden adaptarse para minimizar o evitar la escisión por RNasa H endógena. Esta propiedad resulta ventajosa puesto que el tratamiento del ARN con los polinucleótidos no metilados bien intracelularmente o en extractos puros que contienen RNasa H lleva a la degradación de los dúplex pre-ARNm:polinucleótido antisentido. Cualquier forma de polinucleótido antisentido modificado que sea resistente a
 35 tal degradación o que no induzca tal degradación, queda contemplada por la divulgación. Ejemplos no limitantes de moléculas antisentido que, cuando se duplican con ARN, no se escinden por RNasa H celular son polinucleótidos que comprenden derivados de nucleótidos de 2'-O-metilo. los 2'-O-metil-oligoribonucleótidos son muy estables en un entorno celular y en tejidos animales y sus dúplex con ARN tiene valores T_m superiores que sus homólogos ribo o deoxiribo.

40 Los polinucleótidos antisentido que no activan la RNasa H pueden producirse de acuerdo con técnicas conocidas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.149.797). Tales polinucleótidos antisentido, que pueden ser secuencias deoxiribonucleótidas o ribonucleótidas, contienen simplemente cualquier modificación estructural que impide estéricamente o evita el enlace de la RNasa H a una molécula dúplex que contiene el polinucleótido como un miembro de la misma, cuya modificación estructural no impide sustancialmente o altera la formación de dúplex.
 45 Puesto que las partes del polinucleótido implicado en la formación del dúplex son sustancialmente distintas de las partes implicadas en el enlace de RNasa H al mismo, hay disponibles numerosas moléculas antisentido que no activan la RNasa H. (Se usa la activación en este sentido para referirse a la degradación de RNasa H, bien como un resultado de un sustrato que no es susceptible a tal degradación o que tal sustrato que es incapaz de inducir degradación) Por ejemplo, tales moléculas antisentido pueden ser polinucleótidos en los que al menos uno o todos, los internucleótidos que entrecruzan restos de fosfato son fosfatos modificados, tales como fosfonatos de metilo, fosforotioatos de metilo, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidatos y/o fosforamidatos. Por ejemplo, cada uno de los restos fosfato de unión entre nucleótidos puede estar modificado como se ha descrito. En otro ejemplo no limitante, tales polinucleótidos antisentido son polinucleótidos en los que al menos uno o todos, los nucleótidos contienen un carbono 2' unido a un radical alquilo inferior (por ejemplo, C₁-C₄, alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, tal
 50 como metilo, etilo, etenilo, propilo, 1-propenilo, 2-propenilo e isopropilo). Por ejemplo, cada uno de los nucleótidos puede estar modificado como se ha descrito.

Los procedimientos de fabricación de polinucleótidos de una secuencia predeterminada son bien conocidos. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989) y F. Eckstein (ed.) *Oligonucleotides and Analogues*, 1ª Ed. (Oxford University Press, Nueva York, 1991). Son preferentes los procedimientos de síntesis de fase sólida para tanto poliribonucleótidos como polideoxiribonucleótidos (los procedimientos bien conocidos de sintetización de ADN también son útiles para sintetizar ARN). También se pueden preparar enzimáticamente poliribonucleótidos. Las nucleobases no naturales pueden incorporarse al polinucleótido,
 60

también. Véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos n.º 7.223.833; Katz, J. Am. Chem. Soc., 74:2238 (1951); Yamane, y col., J. Am. Chem. Soc., 83:2599 (1961); Kosturko, y col., Biochemistry, 13:3949 (1974); Thomas, J. Am. Chem. Soc., 76:6032 (1954); Zhang, y col., J. Am. Chem. Soc., 127:74-75 (2005); y Zimmermann, y col., J. Am. Chem. Soc., 124:13684-13685 (2002).

- 5 Los polinucleótidos que se contemplan en el presente documento varían de aproximadamente 5 polinucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el polinucleótido se encuentra entre al menos 5 nucleótidos y al menos 20 nucleótidos, entre al menos 5 nucleótidos y al menos 30 nucleótidos o entre al menos 5 nucleótidos y al menos 50 nucleótidos.

10 En realizaciones adicionales, un polinucleótido contemplado por la divulgación tiene aproximadamente de 5 a aproximadamente 60, 70, 80, 90, 100 o más nucleótidos de longitud, aproximadamente de 5 a 90 nucleótidos de longitud, aproximadamente de 5 a 80 nucleótidos de longitud, aproximadamente de 5 a 70 nucleótidos de longitud, aproximadamente de 5 a 60 nucleótidos de longitud, aproximadamente de 5 a 50 nucleótidos de longitud, aproximadamente de 5 a 45 nucleótidos de longitud, aproximadamente de 5 a 40 nucleótidos de longitud, aproximadamente de 5 a 35 nucleótidos de longitud, aproximadamente de 5 a 30 nucleótidos de longitud, aproximadamente de 5 a 25 nucleótidos de longitud, aproximadamente de 5 a 20 nucleótidos de longitud, aproximadamente de 5 a 15 nucleótidos de longitud, aproximadamente de 5 a 10 nucleótidos de longitud, y todos los polinucleótidos intermedios en longitud de los tamaños específicamente desvelados hasta el punto que el polinucleótido sea capaz de conseguir el resultado deseado. Por consiguiente, se contemplan polinucleótidos de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 de longitud.

Los polinucleótidos de la divulgación tienen aproximadamente el 40 % de CG a aproximadamente el 60 % de CG, con una Tm de aproximadamente 48 °C o superior.

- 25 Otra modificación de los polinucleótidos de la invención implica enlazar químicamente el polinucleótido a uno o más restos o conjugados que mejoran la actividad, distribución celular o absorción celular del polinucleótido. Tales restos incluyen, aunque no de forma limitativa, restos lípidos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-trititol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, dodecandiol o restos undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, el di-hexadecil-rac-glicerol o el trietil-amonio 1,2- di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido acético de adamantano, un radical de palmitilo, o un radical de octadecilamina o un radical de hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

Agentes terapéuticos

Los compuestos de la divulgación también se pueden usar como profilácticos o terapéuticos, que pueden utilizarse para el fin del tratamiento de una enfermedad genética.

- 35 En una realización, la divulgación proporciona composiciones que comprenden dos o más polinucleótidos antisentido que se enlazan a una diana seleccionada en el pre-ARNm de gama sarcoglicano para inducir la omisión de exón eficaz y consistente descrita en el presente documento en una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz mezclada con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Un vehículo farmacéuticamente aceptable se refiere, generalmente, a materiales que son adecuados para su administración a un sujeto en el que el vehículo no resulta biológicamente dañino o, de otro modo, causa efectos indeseados. Tales vehículos son típicamente ingredientes inertes de un medicamento. Típicamente, se administra un vehículo a un sujeto junto con un principio activo sin causar ninguno efecto biológicamente indeseado o interactuando de un modo perjudicial con cualquier otro de los componentes de una composición farmacéutica en la que está contenido. Se describen vehículos farmacéuticamente aceptables en Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., (1990).

45 En una forma más específica de la divulgación se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de dos o más polinucleótidos antisentido junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen diluyentes de diverso contenido tamponador (por ejemplo, fosfato, Tris-HCl, acetato), pH y resistencia iónica y aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Tween 80, Polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, TImersol, alcohol de bencilo) y sustancias formadoras de volumen (por ejemplo, lactosa, manitol). El material puede incorporarse en preparaciones de partículas de compuestos poliméricos tales como, por ejemplo y sin limitación, ácido poliláctico o ácido poliglicólico o en liposomas. También puede usarse ácido hialurónico. Tales composiciones pueden influenciar el estado físico, estabilidad, tasa de liberación *in vivo* y tasa de escisión *in vivo* de las composiciones desveladas. Las composiciones se pueden preparar en forma líquida o pueden ser en polvo seco, tal como forma liofilizada.

Se apreciará que las composiciones farmacéuticas proporcionadas de acuerdo con la divulgación pueden administrarse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas

para su administración se administran mediante inyección, vía oral o por ruta pulmonar o nasal. Los polinucleótidos antisentido, en diversas realizaciones, se suministran mediante rutas de administración, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea.

5 Las moléculas antisentido de la invención abarcan cualquier sal, éster o sales de tales ésteres farmacéuticamente aceptable, o cualquier otro compuesto que, cuando se administra a un animal entre el que se incluye un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o resto del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la divulgación también se dirige a profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos y otros bioequivalentes.

10 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del precursor y no imparte efectos toxicológicos indeseados al mismo.

15 Para los polinucleótidos, ejemplos preferentes de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no de forma limitativa, (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico; (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido alginico, ácido poliglutamico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico; y (d) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloro, bromo y yodo. Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden administrarse en una cantidad de modos dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser tópica (que incluye oftálmica y a membranas de la mucosa que incluye el suministro rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación de polvos o aerosoles, (que incluyen mediante nebulizador, intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye la inyección o infusión intravenosa, intra-arterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, administración intratraqueal o intraventricular. Los polinucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo se cree que son particularmente útiles para la administración oral.

20 Las formulaciones farmacéuticas de la divulgación, que se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de asociar los principios activos con el/los vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme los principios activos con vehículos líquido o vehículos sólidos finamente divididos o ambos y, a continuación, si es necesario, moldear el producto.

25 La terapia de combinación con un agente terapéutico adicional también se contempla en la divulgación. Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden suministrarse simultáneamente con una composición de la divulgación incluyen, sin limitación, un esteroide glucocorticoide (por ejemplo y sin limitación, prednisone y deflazacort), un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un beta bloqueador del receptor adrenérgico, un agente anti-fibrótico y una combinación de los mismos.

Kits

30 La divulgación también proporciona kits para el tratamiento de un paciente con una enfermedad genética tal como LGMD2C. En un aspecto, el kit comprende una composición tal como se desvela en el presente documento, opcionalmente en un recipiente y un inserto de envase, etiqueta de envase, instrucciones y otro etiquetado.

En una realización adicional, se proporciona un kit que comprende un polinucleótido adicional, en la que el polinucleótido adicional se hibrida específicamente a un exón en un ARN gama sarcoglicano.

45 Los expertos en la técnica apreciarán que las aplicaciones del procedimiento anterior tienen una amplia aplicación para identificar moléculas antisentido adecuadas para su uso en el tratamiento de muchas otras enfermedades.

Ejemplos

Ejemplo 1

50 **Eficacia de rescate de γ -sarcoglicano de longitud completa de mamífero y mini-Sgcg en moscas nulas de sarcoglicano.**

Los sarcoglicanos se conservan entre *Drosophila* y mamíferos, las moscas nulas de γ -sarcoglicano desarrollan síntomas similares a los de los mamíferos. Se generaron moscas transgénicas que expresan γ -sarcoglicano murino de longitud completa y mini-Sgcg, y se encontró que la proteína de mini-Sgcg se sitúa correctamente en la membrana plasmática de las células musculares de la mosca.

Las moscas nulas de γ/δ -sarcoglicano (*Sgcd*^{B40}) se generaron previamente y se caracterizaron [Allikian y col., Hum Mol Genet 16: 2933-2943 (2007)]. Usando PCR y transferencia de Southern, se ha mostrado que los exones 1 a 3 y el exón parcial 4 de los 6 exones en el gen *Sgcd* de *Drosophila* se suprime en moscas *Sgcd*^{B40}.

5 Para determinar si el mini-*Sgcg* retiene la función de la proteína de longitud completa, se utilizó el sistema UAS-GAL4 [Brand y col., Development. 118: 401-15 (1993)] para expresar dos construcciones de sarcoglicano distintas. El GAL4 es un factor de transcripción que reconoce una secuencia de control específica denominada UAS.

La primera construcción expresa la secuencia codificadora completa del gen *Sgcg* murino del exón 2 al exón 8, denominada como *UAS-Sgcg*. La segunda construcción comprende la secuencia de un marcador de epítipo Xpress y el exón 2, exón 3 y exón 8 del gen *Sgcg* murino solo, denominado como *UAS-mini-Sgcg* (Figura 1). La construcción más corta retiene la secuencia codificadora de un dominio intracelular intacto, el dominio de la transmembrana y parte del dominio extracelular que incluye el extremo carboxilo esencial (Figura 2). En la Figura 3 se representa una comparación de las construcciones usadas en *Drosophila* y ratón. Una línea transgénica de *UAS-Sgcg* y una de *UAS-mini-Sgcg* se generaron en antecedentes genéticos emparejados. También se obtuvo una reserva de Mef2-GAL4. Mef2 es un conductor específico muscular que promueve la expresión de GAL4 en tanto tejido muscular cardíaco como esquelético. Las moscas que portan tanto Mef2-GAL4 como *UAS-Sgcg* o *UAS-mini-Sgcg* producen proteína de *Sgcg* o *mini-Sgcg* específicamente en el conducto cardíaco y en el tejido muscular. Para expresar la longitud completa y mini-*Sgcg* en moscas mutantes, *Sgcd*^{B40}, hembras vírgenes de Mef2-GAL4 se cruzaron con moscas macho *UAS-Sgcg/+* o *UAS-mini-Sgcg/+*. Puesto que el gen *Sgcd* está situado en el cromosoma X, toda la progenie macho de cada cruce fue nula para *Sgcd*, con la mitad portando transgenes GAL4 y UAS. La otra mitad sirvió como un control negativo interno. Esta comparación minimiza los efectos de antecedentes genéticos y medioambientales en ensayos de comportamiento. Las moscas de tipo salvaje con edades y antecedentes genéticos coincidentes sirvieron como el control positivo.

Los datos mostraron que el *mini-Sgcg* tiene una localización de membrana plasmática distinta en conductos cardíacos de moscas con *Sgcd*^{B40} (Figura 4) y en el músculo corporal (Figura 5). Este patrón es similar al *Sgcg* de longitud completa (Figura 5). Los estudios en el músculo humano, de ratones y sistemas de expresión celular sugieren que el conjunto de complejo de sarcoglicano se requiere para el lanzamiento del γ -sarcoglicano a la membrana plasmática [Allikian y col., Traffic 8: 177-83 (2007); Chen y col., Exp Cell Res. 312: 1610-25 (2006); Crosbie y col., Hum Mol Genet. 9:2019-27 (2000)]. Por lo tanto, la localización subcelular correcta de ambas proteínas implica la interacción con las subunidades de sarcoglicano de la mosca, resaltando la conservación entre el γ -sarcoglicano murino y de mosca. Lo más importante, los resultados indicaron que la proteína de mini-*Sgcg* retiene la función de interacción con los otros componentes del complejo de distrofina.

Estructura del músculo esquelético y función en moscas rescatadas transgénicamente.

Los pacientes con LGMD2C muestran una histología muscular distinta de los individuos sanos, entre la que se incluye pérdida de fibras musculares maduras, deposición anormal de tejido fibrótico o graso e infiltración de células inmunes [Dubowitz, Muscle disorders in childhood. Saunders, Filadelfia, xiii, 282 (1978)]. Las moscas con *Sgcd*^{B40} muestran un desprendimiento de músculo de vuelo del exoesqueleto y este hallazgo resulta más prominente en moscas que se les deja hacer ejercicio [Goldstein y col., Hum Mol Genet. 20: 894-904 (2011)]. Para fomentar el uso muscular, las moscas se mantienen en una caja de 20x20x20 cm en lugar de viales estándar para que puedan volar a su aire. Las moscas tienen 28 días de edad antes de realizar la recolección para su examen histológico. Específicamente, se recolectan los tórax, seccionados y teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) usando el protocolo de fijación de Carnoy. Se compara a continuación frecuencia de la fractura muscular de vuelo entre las moscas mutantes, moscas rescatadas y moscas de tipo salvaje.

De forma similar a los pacientes humanos, las moscas con *Sgcd*^{B40} desarrollan una capacidad locomotriz alterada con el tiempo [Allikian y col., Hum Mol Genet 16: 2933-43 (2007)]. Los defectos de motilidad se miden usando un ensayo de geotaxis negativo. A diferencia de la mayoría de aparatos para la medición en volumen, se diseñó un aparato más "individualizado" que puede proporcionar la medición de capacidad de caminar de una mosca individual tan preciso como 0,5 cm [Goldstein y col., Hum Mol Genet. 20: 894-904 (2011)]. El aparato está compuesto de 16 tubos de plástico verticales que tiene 13 cm de longitud con reglas a cada lado. En resumen, se coloca una mosca individual en cada tubo después de anestésarla, se dejó recuperar durante 30 minutos y a continuación se evaluó. Para evaluar el caminar, a continuación se golpea las moscas a la parte de abajo y se las deja escalar durante 5 segundos. Se puntúa la distancia que viaja cada mosca al final de los 5 segundos. Se realizaron seis pruebas en un intervalo de 1 minuto. Se emplea el análisis de varianza (ANOVA) con un ensayo post Tukey para el análisis de datos en software de PRISM.

Evaluación de rescate de función cardíaca usando tomografía de coherencia óptica (TCO)

55 Los pacientes con distrofia muscular desarrollan cardiomiopatía dilatada debido a la contractilidad alterada de las células del músculo cardíaco. Las moscas con *Sgcd*^{B40} también mostraron un mal funcionamiento cardíaco según envejecían, indicada por un conducto cardíaco agrandado y un acortamiento de fracción reducido [Allikian y col., Hum Mol Genet 16: 2933-43 (2007); Goldstein y col., Hum Mol Genet. 20: 894-904 (2011)]. La función cardíaca de las moscas se examina mediante TCO [Wolf y col., Proc Natl Acad Sci USA. 103: 1394-9 (2006)]. La TCO sirve

según el homólogo de la mosca con respecto a la ecocardiografía (ECHO) usada con mamíferos. La principal diferencia entre la TCO y la ECHO es que la TCO mide la luz retrodispersada en lugar del sonido. La TCO determina el diámetro sistólico final (diámetro sistólico final), el diámetro diastólico final (DDF), acortamiento fraccional (AF) y frecuencia cardíaca. De veinte a cuarenta moscas de cada genotipo fueron sometidas a ensayo a los 7-10 días de edad. Los datos mostraron que la expresión mini-*Sgcg* redujo la dilatación del conducto cardíaco en moscas con *Sgcg*^{B40} (Figura 6), lo que indica que el *mini-Sgcg* era funcional. Las moscas se evaluarán en edades más adultas, cuando la cardiomiopatía sea más prevalente. Cabe destacar que, los resultados se compararán con moscas transgénicas que expresan murino de longitud completa y γ -sarcoglicano para determinar si el grado de corrección es similar entre el mini-*Sgcg* y el *Sgcg* de longitud completa.

Se espera que la expresión de tanto mini-*Sgcg* como *Sgcg* de longitud completa llevará al rescate de la progresión de la enfermedad en moscas mutantes. Específicamente, se espera que se observará una menor alteración muscular, una capacidad de caminar mejorada y una función cardíaca restaurada en moscas mutantes con el mini-*Sgcg* o *Sgcg*. Es posible que los procedimientos de preparación del tejido muscular puedan interferir con la identificación de desgarres musculares. El daño muscular induce señales de TGF β que rodean los sitios lesionados, que pueden visualizarse mediante la actividad del indicador de dad-lacZ [Goldsteiny col., Hum Mol Genet. 20: 894-904 (2011)]. La construcción de indicador de dad-lacZ se espera que proporcione una mejor visualización del desgarramiento muscular [Goldstein y col., Hum Mol Genet. 20: 894-904 (2011)]. Si el ensayo de caminar no es lo suficientemente sensible para detectar la mejora conllevada por la expresión de mini-*Sgcg*, se realizará un ensayo de motilidad alternativo que permita el examen de una mayor cantidad de moscas en un momento [Shcherbata y col., EMBO J 26: 481-93 (2007)]. Mutant flies have reduced life span [Allikian y col., Hum Mol Genet 16: 2933-43 (2007)]. Por lo tanto, el tiempo de vida de las moscas rescatadas con mini-*Sgcg* se determina, proporcionando pruebas adicionales de los beneficios de la expresión mini-*Sgcg* y se cuantificará el tiempo de vida aumentado. Los datos han mostrado que la expresión de mini-*Sgcg* mejoró significativamente la función cardíaca en moscas con *Sgcg*^{B40}, llevando a la esperanza de que el mini-*Sgcg* o *Sgcg* de longitud completa proporcionará efectos beneficiosos en la prevención o tratamiento de enfermedad distrofica tal como LGMD (por ejemplo, LGMD2C). Como comparación, las moscas que expresan *Sgcd* de *Drosophila* también se han generado para fines comparativos.

Ejemplo 2

El Mini-*Sgcg* puede reemplazar *Sgcg* de longitud completa en el modelo de ratón mutante de γ -sarcoglicano

Mediante la caracterización de la corrección del fenotipo mutante en un modelo de ratón establecido, puede determinarse una predicción más precisa del efecto de reemplazar el γ -sarcoglicano de longitud completa con el γ -sarcoglicano truncado en pacientes humanos.

Ratón transgénico que expresa mini-*Sgcg* en músculo usando el promotor de desmina humano con la secuencia codificadora de mini-*Sgcg*

Para evaluar la función del mini-*Sgcg* en ratones, se generaron ratones transgénicos que expresaban mini-*Sgcg* murino usando el promotor de desmina que se expresa tanto en células cardíacas como musculares [Pacak y col., Genet Vaccines Ther 6: 13 (2008)]. Se requiere γ -sarcoglicano para una función adecuada de tanto el músculo cardíaco como esquelético [Zhu y col., FASEB J 16: 1096-1098 (2002)]. Para evaluar la eficacia de rescate de los sub-dominios de γ -sarcoglicano en ambos tejidos musculares, se usa el promotor de desmina humano. La desmina es un filamento intermedio que se expresa en todo el tejido muscular, entre el que se incluye el músculo cardíaco y esquelético [Su y col., Proc Natl Acad Sci USA 101: 6062-6067 (2004)]. Además de ser específico al tejido, el gen de desmina también se activa durante la diferenciación muscular a alrededor el mismo tiempo que los sarcoglicanos [Li y col., J Cell Biol 124: 827-841 (1994); Noguchi y col., Eur J Biochem 267: 640-648 (2000)]. El nivel de expresión de desmina permanece bajo en la división de mioblastos y alcanza un nivel persistentemente alto en miofibras terminalmente diferenciadas. Las secuencias mínimas de la región reguladora del gen de desmina humano se han clonado y han mostrado la mejora de la expresión del gen diana de alto nivel específicamente en tanto músculo cardíaco como esquelético [Pacak y col., Genet Vaccines Ther 6: 13 (2008)].

Usando una construcción de CMV-mini-*Sgcg* en un vector 3.0 de pcDNATM (Invitrogen), el promotor de CMV se reemplazó con el promotor de desmina. Se insertó un marcador de epítipo de Xpress en el extremo N del mini-*Sgcg*. Se inyectó la construcción de desmina-mini-*Sgcg* purificada (véase Figura 3B) y se generó un fundador macho de transgén positivo (Figura 7). El fundador macho se alimenta a ratones con *Sgcg*^{-/-}. Las inyecciones de transgén continuaron y se generaron cinco líneas de fundador adicionales. Para evaluar la función del promotor de desmina, se transfectaron células C2C12 (una línea de célula muscular cultivada) con la construcción de desmina-mini-*Sgcg* y se encontró que el mini-*Sgcg* se produjo en miotubos diferenciados (Figura 8).

Nivel de expresión y localización subcelular de mini-*Sgcg* usando el marcador de epítipo

Se ha mostrado que la sobreexpresión de γ -sarcoglicano causa distrofia muscular grave en ratones de tipo salvaje cuando los niveles de expresión son aproximadamente 20 veces por encima de los niveles normales [Zhu y col., FASEB J 16: 1096-8 (2002)]. Este resultado fue probablemente debido a la formación de agregados de proteína citoplásmica anormales que interfieren con el conjunto de complejo de sarcoglicano y la dirección de la membrana.

El número de copia de la línea transgénica única actualmente generada aparece bajo, así que no se anticipan problemas resultantes de la sobreexpresión. El músculo de ratones transgénicos de desmina-mini-*Sgcg* se examina para localización de la membrana normal usando el marcador Xpress. Se ha llevado a cabo experimentos con esta misma construcción en células C2C12, una línea de célula muscular. En estas células, el mini-*Sgcg* mostró una localización similar a la proteína de γ -sarcoglicano endógena.

Para determinar adicionalmente el nivel de producción de mini-*Sgcg*, se recogió tanto tejido muscular cardíaco y esquelético de diversas líneas transgénicas y se procesó para experimentos de inmunotransferencia. El marcador de epítipo de Xpress permite que la proteína de mini-*Sgcg* sea fácilmente detectable en la inmunotransferencia mediante el uso de un anticuerpo frente a Xpress. Se detecta γ -sarcoglicano de longitud completa usando el anticuerpo NCL-g-sarc (Novocastra). Puesto que este anticuerpo monoclonal se provoca contra un péptido de 12 aminoácidos dentro del exón 6, solo se detectará la proteína de longitud completa pero no la de mini-*Sgcg*. También se han generado anticuerpos policlonales que reconocerán tanto el mini-*Sgcg* como el de longitud completa. Tras la generación de líneas transgénicas adicionales, se escoge una línea que muestre un nivel de expresión cercano al del tipo salvaje.

15 **Rescate de mutantes de γ -sarcoglicano cruzando el transgén en ratones con *Sgcg*^{-/-}**

Para determinar si el mini-*Sgcg* puede reemplazar el *Sgcg* de longitud completa en mamíferos, se alimentan ratones Tg⁺ (transgén positivo) de mini-*Sgcg* a ratones con *Sgcg*^{-/-} para determinar si se puede recuperar la disfunción cardíaca y muscular en *Sgcg*^{-/-}. La evitar la desviación fenotípica, los ratones con *Sgcg*^{-/-} se mantienen como heterocigotos para reducir la selección de modificadores espontáneamente desarrollados. Para introducir el transgén de mini-*Sgcg* en ratones con *Sgcg*^{-/-}, se alimenta *Sgcg*^{+/-} a ratones Tg⁺ de mini-*Sgcg*. Los machos F1 de Tg⁺ *Sgcg*^{+/-} se alimentan a hembras. En F2, se producen ratones Tg⁺ *Sgcg*^{-/-}. Entre los compañeros de camada, se usan ratones de tipo salvaje Tg⁺ como controles positivos mientras que se usan ratones Tg⁻ *Sgcg*^{-/-} como controles negativos. Para medir si el mini-*Sgcg* puede mejorar la función muscular alterada en ratones con *Sgcg*^{-/-}, se comparan los siguientes aspectos entre cohortes: localización subcelular de proteínas de sarcoglicano, interacción directa entre mini-*Sgcg* y otros sarcoglicanos, permeabilidad de membrana plasmática de células musculares, deposición de tejido fibrótico (fibrosis) y función de musculo esquelético y función cardíaca. Se examina la histopatología de ratones recuperados de transgén para compararse con ratones de tipo salvaje y con *Sgcg*^{-/-}. Los músculos se examinan para su variación en tamaño de fibra, nucleación central y reemplazo por fibrosis y grasa. Los ratones con *Sgcg*^{-/-} y transgénicos son todos en el fondo de C57B16/J.

30 **Localización subcelular**

En las células cardíacas y musculares que carecen de γ -sarcoglicano, α -, β - y δ -sarcoglicanos también se ven reducidos en gran medida de la membrana muscular mientras que sus niveles de ARNm permaneces normales, lo que indica que se requiere la presencia de γ -sarcoglicano para la localización de membrana estable de otros sarcoglicanos en el complejo [Hack y col., J Cell Sci. 113(14): 2535-44 (2000)]. Para evaluar si la proteína de mini-*Sgcg* puede restaurar la localización adecuada de otros sarcoglicanos en ausencia del γ -sarcoglicano de longitud completa, se examinaron secciones de tejido muscular congelado de animales Tg⁺ *Sgcg*^{-/-} y se realizó microscopía de inmunofluorescencia usando anticuerpos contra α -, β - y δ -sarcoglicano, respectivamente. Todos los anticuerpos están disponibles en el mercado o aquellos que se han generado previamente.

Interacción

En células musculares de tipo salvaje, α -, β -, γ - y δ -sarcoglicanos forman un complejo hermético que se localiza en la membrana plasmática, el γ -sarcoglicano puede co-inmunoprecipitarse (co-IP) con β -sarcoglicano de tejido muscular [Hack y col., J Cell Sci. 113(14): 2535-44 (2000)]. Para examinar si el mini-*Sgcg* también puede interactuar con el β -sarcoglicano, se realiza la co-IP sobre preparaciones de proteínas recogidas a partir de ratones Tg⁺ *Sgcg*^{-/-}. El músculo se fracciona para aislar las membranas a partir de los componentes miofibrilares. Estas preparaciones microsomales se llevan a cabo sobre el músculo completo y solo se usa la fracción microsomal en la co-IP.

Permeabilidad de la membrana

En animales con *Sgcg*^{-/-}, la membrana plasmática muscular se debilita y se vuelve más permeable a moléculas de proteínas grandes. El tinte azul de Evans (TAE) es un tinte de molécula pequeño que se une firmemente a la albumina y mide la permeabilidad de sarcolema [Matsuda y col., J Biochem 118: 959-64 (1995)]. Se inyecta a ratones TAE y se sacrifican 40 horas después de la inyección. El TAE se mide incubando los tejidos en 1 mililitro de formamida a 55 °C durante 2,5 horas y determinando la absorbancia de la elución resultante a 620 nm. También se mide el nivel de suero de creatina quinasa (CK) usando el Kit de Ensayo de Creatina Quinasa EnzyChrom™ (Sistemas BioAssay).

Fibrosis

El colágeno es el componente principal del tejido fibroso excesivo. Para cuantificar la deposición de colágeno, se llevan a cabo ensayos de hidroxiprolina (HOP) para cuantificar el contenido de colágeno. La hidroxiprolina es un aminoácido modificado que comprende una parte principal de colágeno. Los tejidos cardíacos y musculares se

recogen y se llevan a cabo los ensayos de HOP según los procedimientos descritos [Heydemann y col., *Neuromuscul Disord* 15: 601-9 (2005)].

Función cardíaca

5 La disfunción cardíaca es una causa directa principal de discapacidad y muerte en pacientes con distrofia muscular. Los ratones que carecen de γ -sarcoglicanos también pueden desarrollar una cardiomiopatía dilatada. Para investigar la función cardíaca, se lleva a cabo una ecocardiografía (ECHO) para medir la dimensión diastólica final (DDF), la dimensión sistólica final (DSF) y el acortamiento fraccional (AF).

Análisis de ratones

10 Se analizan ratones a las 12 y 24 semanas de edad puesto que estos mismos puntos muestran tanto enfermedad muscular como cardíaca. Los números usados reflejarán los estudios fisiológicos que se están llevando a cabo y requieren típicamente cohortes de entre 5 y 10 para mostrar significancia (test t). También se usan animales adicionales para proporcionar un suministro de tejido para la microscopía y transferencia de Western.

Cepa	Edades	Número	Fin
C57B16/J	12 y 24 semanas	10-20	Tejido, eco, histo, IF
Des-mini- <i>Sgcg</i> Tg	12 y 24 semanas	10-20	Tejido, eco, histo, IF
<i>Sgcg</i> ^{-/-}	12 y 24 semanas	10-20	Tejido, eco, histo, IF
Des-mini- <i>Sgcg</i> Tg/ <i>Sgcg</i>	12 y 24 semanas	10-20	Tejido, eco, histo, IF

15 Se están usando ratones porque proporcionan un buen modelo de enfermedad muscular y cardíaca que refleja lo que se observa en humanos con mutaciones genéticas similares. Se han examinado sobre 500 ratones de este genotipo (*Sgcg*) y se han establecido procedimientos cuantitativos de fenotipado [Heydemann y col., *Neuromuscul Disord* 15(9-10): 601-9 (2005); Heydemann y col., *J. Clin. Invest* 119(12): 3703-12 (2009); Swaggart y col., *Physiol Genomics* 43(1): 24-31 (2011)]. Dada la diferencia en el fenotipo esperado de los estudios de *Drosophila*, se anticipa se serán suficientes cohortes de 5-10 ratones.

Resultados esperados

20 Se esperan varias líneas de ratones que albergan transgenes des-mini-*Sgcg* que expresan proteína de mini-*Sgcg* a distintos niveles en tejido muscular, con algunas líneas a niveles de γ -sarcoglicano casi endógeno. Se espera que el mini-*Sgcg* no sea detectable en otros tejidos. También se espera que la proteína de mini-*Sgcg* se enriquece en la membrana plasmática en ratones de tipo salvaje. Es posible que se observa algo de tinción citoplásmica o perinuclear de mini-*Sgcg* debido a que la presencia de *Sgcg* de longitud completa pueda competir con el mini-*Sgcg* para su inclusión en el complejo de sarcoglicano. Se espera una tinción de membrana plasmática distinta de mini-*Sgcg* en ratones con *Sgcg*^{-/-}. Se ha observado un patrón de expresión similar en estudios en *Drosophila*. En músculo Tg⁺ *Sgcg*^{-/-}, se espera que la expresión mini-*Sgcg* restaure la localización de la membrana de otros sarcoglicanos. También se espera que el mini-*Sgcg* esté presente entre las proteínas asociadas con, y empujadas abajo por, el β -sarcoglicano. Se espera una histopatología mejorada, una absorción de TAE reducida, un nivel de CK disminuido, menos HOP y función cardíaca mejorada en Tg⁺ *Sgcg*^{-/-} en comparación con camadas de Tg⁻ *Sgcg*^{-/-} sin el transgén. Estos representarían todos una mejora en la enfermedad muscular y cardíaca, estableciendo que el mini-*Sgcg* rescata la mutación de *Sgcg*, como era de esperar.

35 Basándose en estudios sobre *Drosophila* descritos en el presente documento, se espera que el mini-*Sgcg* tenga muchas de las funciones del *Sgcg*. Los ratones transgénicos también permitirán la investigación de la interacción con otros componentes importantes del complejo de distrofina, tal como distrofina, sarcospano e interacciones con otros componentes de la transmembrana.

40 Para la omisión de exón, se han obtenido fibroblastos a partir de pacientes humanos con LGMD2C. Un enfoque de expresión de MyoD forzado, que se describe a continuación, se usa para inducir estas células en un linaje miogénico [Kimura y col., *Hum Mol Genet* 17: 2507-17 (2008)]. Estas células proporcionarán un entorno a base de células en el cual evaluar la omisión de exón de *Sgcg* humano.

Ejemplo 3

Omisión de exón en cultivo muscular derivado de pacientes humanos

45 El fundamento de los experimentos descritos a continuación es que la omisión de exón requiere la optimización de polinucleótidos antisentido y prueba de función *in vitro*.

Uso de transformación de MyoD para inducir fibroblastos humanos primarios cultivados para convertirse en

mioblastos

Se han obtenido fibroblastos aislados de dos pacientes con LGMD2C que portan una supresión del exón 6 en el gen *Sgcg*. El MyoD es un regulador maestro del programa de diferenciación muscular. La expresión forzada de MyoD en fibroblastos pueden convertir los fibroblastos en un linaje muscular [Lattanzi y col., J Clin Invest 101: 2119-2128 (1998)].

El MyoD es un iniciador clave del programa de diferenciación de músculo esquelético [Weintraub y col., Science 251: 761-766 (1991)]. El MyoD es el responsable de activar otros reguladores musculares esenciales, tales como el factor potenciador de los miocitos 2 (MEF2) y miogenina. Se ha mostrado que la expresión forzada de MyoD en fibroblastos es capaz de convertir fibroblastos en mioblastos tanto *in vitro* como *in vivo* [Kimura y col., Hum Mol Genet 17: 2507-2517 (2008)]. Por lo tanto, la introducción de MyoD en fibroblastos es suficiente para convertir un fibroblasto abajo en un linaje de mioblastos. Una vez establecido, los mioblastos en condiciones adecuadas pueden inducirse para diferenciarse adicionalmente en miotubos. Este procedimiento se aplica a fibroblastos humanos y los "fibroblastos forzados por MyoD" son útiles para el diagnóstico de enfermedad muscular humana. Los mioblastos derivados de pacientes humanos que portan la mutación de γ -sarcoglicano descritos en el presente documento se requieren para evaluar la eficacia de la omisión de exón inducida por AON potenciales distintos. Mediante el uso de fibroblastos dérmicos de pacientes con LGMD2C evita la necesidad de biopsias musculares dolorosas requeridas para obtener mioblastos.

Kimura y col. realizaron una construcción de MyoD inducible por tamoxifeno y se insertó el gen de MyoD en genomas de fibroblastos a través del vector lentivíricos. Encontraron que los fibroblastos transfectados eran capaces de formar miotubos tanto *in vivo* como *in vitro* cuando se administra tamoxifeno. El vector de MyoD se usa para transfectar los fibroblastos obtenidos a partir de pacientes con LGMD2C. Los fibroblastos transfectados se expanden sin inducción de tamoxifeno y se congelan en pequeños alícuotas para su futuro uso.

Los fibroblastos forzados por MyoD tratados con polinucleótidos antisentido inducen la omisión de exón de los exones 4-7 de *Sgcg*

Para dirigirse a exones específicos, se diseñan polinucleótidos antisentido (AON) para bloquear el donador de corte y empalme, el aceptor de corte y empalme o sitios potenciadores de corte y empalme (ESE). Los sitios del donador de corte y empalme y el aceptor de corte y empalme se localizan en límites de exón-intrón y tienen secuencias altamente conservadas. Basándose en la secuencia de nucleótidos y la estructura secundaria de las transcripciones de ARN, se predicen los sitios ESE con elevada precisión mediante software tal como ESEfinder, que predice los sitios de unión para las cuatro proteínas serina/arginina más abundantes implicadas en la regulación de corte y empalme (proteínas de SR). Se diseña una serie de AON basándose en la predicción de programas de software disponibles. A continuación, se examina la eficacia y especificidad de AON distintos en miotubos convertidos a partir de fibroblastos, después de un protocolo que se ha usado para evaluar la eficacia de la omisión de exón en miotubos humanos primarios [Aartsma-Rus y col., Hum Mol Genet 12: 907-914 (2003)]. Específicamente, se tratan los fibroblastos con tamoxifeno durante 24 horas para inducir la expresión de MyoD antes de cambiar los fibroblastos a un medio de diferenciación para la inducción de la formación de miotubos. Después de 7-14 días de privación de suero, los miotubos se transfecta con AON usando polietilenimina (PEI) durante 3 horas en un medio bajo en suero. A las 24 horas después de la transfección, se extrajo el ARN total de los cultivos de miotubo. La relación de la transcripción de ARNm más corta compuesto de solo el exón 1,2,3 y 8 con respecto a las transcripciones de longitud completa se cuantifica realizando reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). El producto de PCR se fracciona sobre un gel de agarosa y se calcula la relación de productos cortos/largos usando el software de Photoshop. Se seleccionan los AON con una eficacia de omisión de exón más alta.

Uso de microscopía de inmunofluorescencia (IF) para evaluar si el extremo carboxi de γ -sarcoglicano está presentes después del tratamiento antisentido y si se estabilizan otros sarcoglicanos usando este enfoque

Las mutaciones de cambio de marco en el gen de *Sgcg* en pacientes da como resultado una proteína terminada prematuramente sin un extremo C. Un estudio previo ha mostrado que el producto de proteína del gen de *Sgcg* con una mutación de 525 Δ T no se detectó por un anticuerpo policlonal de conejo provocado contra la proteína de *Sgcg* completa [McNally y col., Am J Hum Genet 59: 1040-1047 (1996)]. Este resultado sugirió que el gen de *Sgcg* mutante no fue capaz de producir un producto de proteína estable. Esto también es probable en el caso en los pacientes con LGMD2C a partir de los cuales se obtuvieron los fibroblastos.

La restauración del marco de lectura resulta en la traducción de una proteína internamente truncada con un extremo C normal. Para visualizar la producción de proteína inducida por AON, se lleva a cabo la microscopía de IF usando el anticuerpo policlonal contra la proteína de γ -sarcoglicano de longitud completa sobre miotubos con y sin tratamiento de AON. Mediante el uso de la IF, también puede determinarse si la proteína de γ -sarcoglicano más pequeña se localiza en la membrana. La IF también se lleva a cabo para detectar otros sarcoglicanos (por ejemplo, α -, β - y δ -sarcoglicano) y evaluar si se han restaurado a la membrana en ratones Tg⁺ *Sgcg*^{-/-}.

Resultados esperados

Se espera que los fibroblastos se conviertan en células similares a mioblastos que sean capaces de formar miotubos

cuando se administra tamoxifeno. Como alternativa, los mioblastos se obtienen de pacientes humanos. Se espera que varios tratamientos de AON convertirán una fracción sustancial de la transcripción de *Sgcg* de longitud completa en una proteína internamente truncada más pequeña. Las proteínas internamente truncadas. Se espera que no se detecte tinción de *Sgcg* por el anticuerpo policlonal en miotubos de pacientes sin tratamiento de AON, mientras que la proteína de γ -sarcoglicano internamente truncada se espera que se localice en la membrana de un porcentaje sustancial de miotubos tratados. Además, se espera que se restauren otros componentes del complejo de distrofina en la membrana plasmática de los miotubos que muestran tinción de membrana de γ -sarcoglicano positivo. En el caso de que el anticuerpo policlonal sea capaz de detectar producto residual del gen de *Sgcg* 525 Δ T, un anticuerpo contra el extremo C de la proteína de γ -sarcoglicano se provoca para detectar específicamente la proteína de γ -sarcoglicano truncada.

Ejemplo 4

Comportamiento de caminar en moscas nulas de *Sgcd*

Este experimento se diseñó para evaluar si la pérdida de *Sgcd* en *Drosophila* afecta negativamente su actividad de caminar.

Se usó un monitor diseñado para evaluar la actividad de caminar (Trikinetics, Waltham, MA) para registrar el movimiento, medido como roturas de haz infrarrojos, durante un período de 24 horas sobre *Drosophila* individual. Normalmente, la *Drosophila* muestra un repunte marcado en la actividad al amanecer y al anochecer, independientemente del genotipo. Los datos se muestran en la Figura 9. Para evaluar la actividad basal, se analizaron los datos desde le medianoche hasta las 8 am, encuadrados como región de interés en el panel izquierdo de la Figura 9. Las moscas de tipo salvaje tienen significativamente más actividad, medido como roturas de haz infrarrojos, que las moscas con *Sgcd*^{B40} que carecen de γ -sarcoglicano y sirven como modelo de Distrofia muscular de las cinturas tipo 2C. Este declive en la actividad refleja lo que se ha observado en pacientes con distrofia muscular que muestran una deambulación reducida debido a la debilidad muscular.

Expresión de mini-*Sgcg* en moscas de *Sgcd*^{B40} mejoró significativamente la actividad nocturna

La Figura 10 muestra que la expresión de mini-*Sgcg* en moscas de *Sgcd*^{B40} mejoró significativamente la actividad nocturna de *Drosophila* mutante, medido como roturas de haz infrarrojos (comparar *Sgcd*^{B40} frente a *Sgcd*^{B40}, mini-*Sgcg* en panel izquierdo). Estos datos indican que el mini-*Sgcg* puede funcionar en lugar del γ/δ -sarcoglicano de longitud completa que se suprime en moscas con *Sgcd*^{B40}. El panel derecho muestra que la actividad nocturna se rescató por igual mediante *Sgcg*, que es la proteína de γ -sarcoglicano de ratón de longitud completa y mini-*Sgcg* (*Sgcg*^{B40}, *Sgcg* en comparación a *Sgcd*^{B40}, mini-*Sgcg*). Estos datos indican que el mini-*Sgcg* es tan funcional como el *Sgcg* de longitud completa para restaurar la actividad de caminar.

Ejemplo 5

Se produce de forma estable proteína de Mini-*Sgcg* en músculo esquelético y corazón de mamíferos

Se introdujo in transgén que usa el promotor de desmina para conducir la expresión de Mini-*Sgcg* en ratones de tipo salvaje normales (Tg⁺). Los datos se presentan en la Figura 11. El aislamiento de músculo (cuádriceps) esquelético y la inmunotransferencia se realizó tal como se describe en Hack y col. [J Cell Sci. 113: 2535-44 (2000)]. La proteína de Mini-*Sgcg* se detecta firmemente en músculo esquelético y corazón al peso molecular tal como se espera de 18 KDa (Figura 11, flecha). No se detecta en otros tipos de células tales como hígado, bazo y riñón. Este patrón de expresión refleja el promotor de desmina que conduce la expresión solo en corazón y músculo. El Mini-*Sgcg* no se detecta en los ratones de tipo salvaje, no transgénicos (Tg-) (véase Figura 11). El epítipo Xpress (Invitrogen) se colocó sobre Mini-*Sgcg*, y un anticuerpo de conejo policlonal purificado de afinidad provocado al epítipo Xpress se usó a una dilución de 1:1000 para detectar la expresión a partir del transgén. Estos datos demuestran que la proteína de mini-*Sgcg* es estable en músculo y corazón de mamífero y además que la proteína es capaz de translocarse correctamente a la membrana muscular.

Caracterización de ratones transgénicos

Se establecieron dos líneas transgénicas distintas que expresaban mini-*Sgcg*. Los animales transgénicos se crearon usando protocolos estándar. Tal como se representa en la Figura 12, la línea 50 expresa niveles superiores que la línea 84. El panel superior de la Figura 12 muestra la expresión en tres concentraciones distintas desde la línea 50 o la línea 84. Estos datos demuestran que el mini-*Sgcg* es una proteína estable en músculo esquelético y músculo cardíaco. Se usó un anticuerpo con respecto a proteína de γ -sarcoglicano endógena para demostrar la expresión de la proteína de *Sgcg* (longitud completa) en estas mismas muestras. Se generó un anti-Xpress de conejo purificado de afinidad policlonal en Pocono Rabbit Farms. Se usó una dilución de 1:1000 para la inmunotransferencia para detectar mini-*Sgcg* (Figura 12, paneles superiores). El anticuerpo con respecto a γ -sarcoglicano se había descrito previamente [McNally y col., Hum Mol Genet. 5: 1841-7 (1996)] y se usó para detectar γ -sarcoglicano endógeno a 1:1000.

Proteína de Mini-*Sgcg* se localiza en la membrana plasmática de músculo esquelético

La Figura 13 muestra que la proteína de mini-Sgcg se sitúa en la membrana plasmática de músculo esquelético cuando se expresa en ratones normales de tipo salvaje (Tg⁺). Se usó un anticuerpo anti-Xpress para detectar la expresión en la periferia de cada miofibrila consistente con la localización en la membrana plasmática o sarcolema, de músculo esquelético. Este patrón intracelular es idéntica a la proteína de γ -sarcoglicano (*Sgcg*) e indica que el mini-Sgcg se transloca adecuadamente. Esta misma señal no se detectó en músculo negativo transgénico (Tg⁻) (Figura 13, panel derecho) lo que demostró que esta señal deriva del transgén. La inmunotinción se realizó tal como se describe en Hack y col. [J Cell Sci. 113: 2535-44 (2000)]. El anticuerpo policlonal purificado de afinidad con respecto al epítipo Xpress se usó a 1:200.

Expresión de proteína de γ -sarcoglicano endógeno de longitud completa se disminuye en la membrana plasmática cuando hay presente mini-Sgcg

La Figura 14 muestra los resultados de un experimento diseñado para evaluar si la proteína de mini-Sgcg puede competir con la proteína de γ -sarcoglicano endógeno *in vivo*. Cabe destacar que la intensidad de señal del *Sgcg* endógeno de longitud completa está reducida en el panel izquierdo de la Figura 14 en comparación con el panel derecho. Estos datos demuestran que el mini-Sgcg compite con el *Sgcg* endógeno normal y, por lo tanto, el mini-Sgcg puede reemplazar el *Sgcg* de longitud completa. La inmunotinción se realizó tal como se describe en Hack y col. [J Cell Sci. 113: 2535-44 (2000)]. El anticuerpo de anti- γ -sarcoglicano policlonal se usó a 1:200.

La Figura 15 representa un modelo de un conjunto de sarcoglicano. Las referencias publicadas describen el conjunto del complejo de sarcoglicano [Chan y col., J Cell Biol. 143: 2033-44 (1998); Chen y col., Exp Cell Res. 312: 1610-25 (2006); Hack y col., J Cell Sci. 113: 2535-44 (2000)]. En músculo de mamífero, en el que hay cuatro subunidades de sarcoglicano, α -, β -, γ - y δ -sarcoglicano, las subunidades de β -sarcoglicano y δ -sarcoglicano se juntan en primer lugar como una unidad en el retículo endoplasmático (RE)/aparato de Golgi. Esta etapa se sigue por la adición de α -sarcoglicano y γ -sarcoglicano. El conjunto del complejo de sarcoglicano es necesario pero no suficiente para la translocación a la membrana plasmática [Chen y col., Exp Cell Res. 312: 1610-25 (2006)]. Las mutaciones en las subunidades de sarcoglicano alteran de translación normal del complejo de sarcoglicano desde el RE/Golgi a la membrana plasmática. La translocación a la membrana plasmática requiere una interacción con la distrofina y se asocia con la estabilización de la membrana plasmática. Los complejos de sarcoglicano que contienen γ -sarcoglicano (γ) o Mini-Sgcg (*my*) se translocan exitosamente a la membrana plasmática. En el músculo de *Drosophila*, en el que hay solo una única subunidad de γ/δ -sarcoglicano, el mini-Sgcg de mamífero puede rescatar la pérdida del único radical de γ/δ -sarcoglicano y rescatar la función cardíaca y muscular defectuosa (tal como se muestra en el presente documento).

El Mini-Sgcg se enriquece en la fracción microsomal pesada del músculo

El músculo puede fraccionarse en una fracción citoplásmica (C) y de membrana. La fracción de membrana puede subdividirse adicionalmente en microsomas de luz (L) y (H). El complejo de sarcoglicano se encuentra normalmente en el complejo microsomal pesado que contiene la membrana plasmática. El músculo de ratones que expresan mini-Sgcg (T⁺) se fraccionó para separar el citoplasma de la luz y fracciones microsomales pesadas. La fracción microsomal pesada contiene el RE, Golgi y fracciones de membrana plasmática. En dos líneas transgénicas distintas (84 y 50), el mini-Sgcg enriquece en gran medida la fracción microsomal pesada (Figura 16). Esto demuestra que el mini-Sgcg se encuentra en la fracción intracelular adecuada. El procedimiento para aislar microsomal fue tal como se ha descrito previamente [Ohlendieck y col., J Cell Biol. 112: 135-48 (1991)] con la modificación descrita en [Duclos y col., J Cell Biol. 142: 1461-71 (1998); Hack y col., J Cell Sci. 113: 2535-44 (2000)]. El anticuerpo usado en los paneles superiores de la Figura 16 es el epítipo anti-Xpress purificado de afinidad. El anticuerpo usado en el panel inferior de la Figura 16 fue un anticuerpo anti- γ -sarcoglicano policlonal de conejo [McNally y col., Hum Mol Genet. 5: 1841-7 (1996)]. Los anticuerpos se usaron a 1:500. Todos los anticuerpos secundarios fueron de Jackson Immunochemicals (cabra-anti-conejo-HRP) usados a 1:1000.

Establecimiento de líneas celulares humanas con mutaciones de SGCG

Se han establecido dos células humanas con mutaciones de SGCG para los fines de evaluar la omisión de exón para la producción de mini-Sgcg. Estas líneas derivan de fibroblastos dérmicos aislados de pacientes humanos con mutaciones del gen SGCG primario. La fila superior de la Figura 17 muestra células de un paciente con LGMD 2C cuya enfermedad aparece a partir de una mutación que suprime el exón 7 en SGCG. La fila inferior de la Figura 17 muestra células de un paciente con LGMD 2C que ha sido suprimido del exón 6 de SGCG. Estas líneas celulares se infectaron con retrovirus que expresaban telomerasa y MyoD. La infección con el virus de telomerasa proporciona una línea celular inmortalizada y la infección con el virus de MyoD proporciona medios regulados de inducción de diferenciación muscular puesto que la posición nuclear del MyoD se encuentra bajo el control del tamoxifeno [Kimura y col., Hum Mol Genet. 17: 2507-17 (2008); Kendall y col., Sci Transl Med. 4: 164ra160 (2012)]. Esta combinación crea líneas celulares que están inmortalizadas con telomerasa, que proporciona un suministro preparado de células. El control regulable de la expresión nuclear de MyoD proporciona un mecanismo mediante el cual la conversión muscular puede inducirse según se desee. Estas líneas celulares sirven como modelos celulares de LGMD 2C y proporcionan el formato en el cual la expresión inducida de mini-Sgcg puede evaluarse en un contexto celular humano. Con la adición del tamoxifeno, el MyoD se localiza en el núcleo y las células se someten a diferenciación en miotubos alargados (Figura 17, panel medio y derecho).

Las líneas celulares de LGMD 2C se diferenciaron en el linaje muscular

La Figura 18 muestra que las líneas celulares de LGMD 2C se diferenciaron en el linaje muscular después de 6 días de diferenciación. Con la adición del tamoxifeno, las líneas de línea celular de LGMD 2C se someten a cambios morfológicos volviéndose alargadas y expresando marcadores miogénicos y demostrando diferenciación en el linaje muscular. El MyoD, un marcador muscular, se expresa a partir del retrovirus (Figura 18, panel medio) y la desmina, un marcador muscular, se induce a partir de MyoD (Figura 18, panel derecho) que indica que estas células son modelos viables de enfermedad muscular. El panel a mano izquierda de la Figura 18 (Hoechst) muestra los núcleos. Los procedimientos para el cultivo celular se describen en Kendall y col. [Sci Transl Med. 4: 164ra160 (2012)]. Los anticuerpos anti-desmina y anti-MyoD fueron de ThermoFisher (PA5-17182 y MA1-41017, respectivamente). Los anticuerpos secundarios fueron de Sondas Moleculares/Invitrogen (cabra-anti ratón Cy3, cabra anti ratón Alexa488, respectivamente).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> McNally, y col.

<120> TRATAMIENTO DE Distrofia muscular de cinturas

15 <130> 27373/47153A

<150> US 61/697.766

<151> 06/09/2012

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1

<211> 148

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25 <220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(118)

<223> Región codificadora de exón

<400> 1

at tt t g c a a a t t t t a t a a a t c t c t t t c t a g g a c t c a t c t c t g c t t t c t a c a a t c a a c c c a g 60

a a t g t g a c t g t a a a t g c g c g c a a c t c a g a a g g g g a g g t c a c a g g c a g g t t a a a a g t c g g t 120

g a g t c c a g c t t c a t c a t g g t g c t t t g c a 148

30 <210> 2

<211> 180

<212> ADN

<213> Homo sapiens

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(150)

<223> Región codificadora de exón

<400> 2

a g t t t a t a a t a a a c t g t t t t a a t t c t t c a g g t c c a a a a t g g t a g a a g t c c a g a a t c a a c 60

a g t t t c a g a t c a a c t c c a a c g a c g g c a a g c c a c t a t t t a c t g t a g a t g a g a a g g a a g t t g 120

t g g t t g g t a c a g a t a a a c t t c g a g t a a c t g g t a t g t a c t a a c t c g a g a a a a c a c a a c a t 180

40 <210> 3

<211> 133

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 686 727 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(103)
 <223> Región codificadora de exón
 5 <400> 3
 gctcctgata catotttggt ttttgtttag ggctgaagg ggctctttt gaacattcag 60
 tggagacacc cttgtcaga gccgaccggt ttcaagacct taggtaagaa ttttgttca 120
 aatattaaca acc 133
 <210> 4
 <211> 204
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(174)
 <223> Región codificadora de exón
 15 <400> 4
 attttaata cttttttttt ttttttttgt gcttcttttc ctcatctcag attagaatcc 60
 cccactcgga gtctaagcat ggatgccccca aggggtgtgc atattcaagc tcacgctggg 120
 aaaattgagg cgctttctca aatggatatt ctttttcata gtagtgatgg aatggtgagt 180
 tcattcacag atcagcctcc tact 204
 <210> 5
 <211> 291
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (100)..(130)
 <223> Exón 4
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (131)..(169)
 <223> Exón 5
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (170)..(193)
 <223> Exón 6
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (194)..(234)
 <223> Exón 7
 <400> 5
 Met Val Arg Glu Gln Tyr Thr Thr Ala Thr Glu Gly Ile Cys Ile Glu
 1 5 10 15
 Arg Pro Glu Asn Gln Tyr Val Tyr Lys Ile Gly Ile Tyr Gly Trp Arg

ES 2 686 727 T3

			20					25				30			
Lys	Arg	Cys	Leu	Tyr	Leu	Phe	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Ile	Leu	Val
		35					40					45			
Val	Asn	Leu	Ala	Leu	Thr	Ile	Trp	Ile	Leu	Lys	Val	Met	Trp	Phe	Ser
	50					55					60				
Pro	Ala	Gly	Met	Gly	His	Leu	Cys	Val	Thr	Lys	Asp	Gly	Leu	Arg	Leu
65					70					75					80
Glu	Gly	Glu	Ser	Glu	Phe	Leu	Phe	Pro	Leu	Tyr	Ala	Lys	Glu	Ile	His
				85					90					95	
Ser	Arg	Val	Asp	Ser	Ser	Leu	Leu	Leu	Gln	Ser	Thr	Gln	Asn	Val	Thr
			100					105					110		
Val	Asn	Ala	Arg	Asn	Ser	Glu	Gly	Glu	Val	Thr	Gly	Arg	Leu	Lys	Val
		115					120					125			
Gly	Pro	Lys	Met	Val	Glu	Val	Gln	Asn	Gln	Gln	Phe	Gln	Ile	Asn	Ser
	130					135					140				
Asn	Asp	Gly	Lys	Pro	Leu	Phe	Thr	Val	Asp	Glu	Lys	Glu	Val	Val	Val
145					150					155					160
Gly	Thr	Asp	Lys	Leu	Arg	Val	Thr	Gly	Pro	Glu	Gly	Ala	Leu	Phe	Glu
				165					170					175	
His	Ser	Val	Glu	Thr	Pro	Leu	Val	Arg	Ala	Asp	Pro	Phe	Gln	Asp	Leu
			180					185					190		
Arg	Leu	Glu	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser	Leu	Ser	Met	Asp	Ala	Pro	Arg	Gly
		195					200					205			
Val	His	Ile	Gln	Ala	His	Ala	Gly	Lys	Ile	Glu	Ala	Leu	Ser	Gln	Met
	210					215					220				
Asp	Ile	Leu	Phe	His	Ser	Ser	Asp	Gly	Met	Leu	Val	Leu	Asp	Ala	Glu
225					230					235					240
Thr	Val	Cys	Leu	Pro	Lys	Leu	Val	Gln	Gly	Thr	Trp	Gly	Pro	Ser	Gly
				245					250					255	
Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Tyr	Glu	Ile	Cys	Val	Cys	Pro	Asp	Gly	Lys	Leu
			260					265					270		

ES 2 686 727 T3

Tyr Leu Ser Val Ala Gly Val Ser Thr Thr Cys Gln Glu His Ser His
 275 280 285

Ile Cys Leu
 290

<210> 6
 <211> 291
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (100)..(130)
 <223> Exón 4

 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (131)..(169)
 <223> Exón 5

 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (170)..(193)
 <223> Exón 6

 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (194)..(234)
 <223> Exón 7

 <400> 6

Met Val Arg Glu Gln Tyr Thr Thr Val Thr Glu Gly Thr His Ile Glu
 1 5 10 15

Arg Pro Glu Asn Gln His Ile Tyr Lys Ile Gly Ile Tyr Gly Trp Arg
 20 25 30

Lys Arg Cys Leu Tyr Leu Phe Val Leu Leu Leu Leu Ala Ile Leu Val
 35 40 45

Val Asn Leu Ala Leu Thr Ile Trp Ile Leu Lys Val Met Trp Phe Ser
 50 55 60

Pro Ile Gly Met Gly His Leu His Val Thr Ala Asp Gly Leu Arg Leu
 65 70 75 80

Glu Gly Glu Ser Glu Phe Leu Phe Pro Leu Tyr Ala Lys Glu Ile Arg
 85 90 95

Ser Arg Val Asp Ser Ser Leu Leu Leu Gln Ser Thr Gln Asn Val Thr
 100 105 110

ES 2 686 727 T3

Val Ser Ala Arg Asn Ser Glu Gly Glu Val Thr Gly Arg Val Lys Val
 115 120 125

Gly Ala Gln Met Val Glu Val Gln Ser Gln His Phe Gln Ile Asn Ser
 130 135 140

Glu Asp Gly Lys Pro Leu Phe Ser Ala Glu Glu Gln Asp Val Val Val
 145 150 155 160

Gly Thr Gly Arg Leu Arg Val Thr Gly Pro Glu Gly Ala Leu Phe Glu
 165 170 175

His Ser Val Glu Thr Pro Leu Val Arg Ala Asp Pro Phe Gln Asp Leu
 180 185 190

Arg Leu Glu Ser Pro Thr Arg Ser Leu Ser Met Asp Ala Pro Arg Gly
 195 200 205

Val His Val Lys Ala Asn Ala Gly Lys Leu Glu Ala Leu Ser Gln Met
 210 215 220

Asp Ile Ile Leu Gln Ser Ser Glu Gly Val Leu Val Leu Asp Ala Glu
 225 230 235 240

Thr Val Gly Leu Thr Lys Leu Lys Gln Gly Thr Gln Gly Pro Ala Gly
 245 250 255

Ser Ser Asn Gly Phe Tyr Glu Ile Cys Ala Cys Pro Asp Gly Lys Leu
 260 265 270

Tyr Leu Ser Met Ala Gly Glu Val Thr Thr Cys Glu Glu His Ser His
 275 280 285

Val Cys Leu
 290

<210> 7
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

5

Met Val Arg Glu Gln Tyr Thr Thr Ala Thr Glu Gly Ile Cys Ile Glu
 1 5 10 15

Arg Pro Glu Asn Gln Tyr Val Tyr Lys Ile Gly Ile Tyr Gly Trp Arg
 20 25 30

ES 2 686 727 T3

Lys Arg Cys Leu Tyr Leu Phe Val Leu Leu Leu Leu Ile Ile Leu Val
 35 40 45

Val Asn Leu Ala Leu Thr Ile Trp Ile Leu Lys Val Met Trp Phe Ser
 50 55 60

Pro Ala Gly Met Gly His Leu Cys Val Thr Lys Asp Gly Leu Arg Leu
 65 70 75 80

Glu Gly Glu Ser Glu Phe Leu Phe Pro Leu Tyr Ala Lys Glu Ile His
 85 90 95

Ser Arg Val Leu Val Leu Asp Ala Glu Thr Val Cys Leu Pro Lys Leu
 100 105 110

Val Gln Gly Thr Trp Gly Pro Ser Gly Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Glu
 115 120 125

Ile Cys Val Cys Pro Asp Gly Lys Leu Tyr Leu Ser Val Ala Gly Val
 130 135 140

Ser Thr Thr Cys Gln Glu His Ser His Ile Cys Leu
 145 150 155

<210> 8
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 8

Met Val Arg Glu Gln Tyr Thr Thr Ala Thr Glu Gly Ile Cys Ile Glu
 1 5 10 15

Arg Pro Glu Asn Gln Tyr Val Tyr Lys Ile Gly Ile Tyr Gly Trp Arg
 20 25 30

Lys Arg Cys Leu Tyr Leu Phe Val Leu Leu Leu Leu Ile Ile Leu Val
 35 40 45

Val Asn Leu Ala Leu Thr Ile Trp Ile Leu Lys Val Met Trp Phe Ser
 50 55 60

Pro Ala Gly Met Gly His Leu Cys Val Thr Lys Asp Gly Leu Arg Leu
 65 70 75 80

Glu Gly Glu Ser Glu Phe Leu Phe Pro Leu Tyr Ala Lys Glu Ile His
 85 90 95

ES 2 686 727 T3

Ser Arg Val Leu Val Leu Asp Ala Glu Thr Val Cys Leu Pro Lys Leu
100 105 110

Val Gln Gly Thr Trp Gly Pro Ser Gly Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Glu
115 120 125

Ile Cys Val Cys Pro Asp Gly Lys Leu Tyr Leu Ser Val Ala Gly Val
130 135 140

Ser Thr Thr Cys Gln Glu His Ser His Ile Cys Leu
145 150 155

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para la omisión de exón que comprende dos o más polinucleótidos antisentido, en la que cada polinucleótido se hibrida específicamente a una región diana de exón en un ARN gama sarcoglicano, en el que el exón se selecciona entre el grupo que consiste en exón 4 (SEQ ID NO: 1), exón 5 (SEQ ID NO: 2), exón 6 (SEQ ID NO: 3), exón 7 (SEQ ID NO: 4) y una combinación de los mismos.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que los polinucleótidos antisentido no pueden formar un sustrato de RNasa H.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que al menos uno de los polinucleótidos antisentido comprende una estructura principal de polinucleótidos modificados que comprende un radical modificado sustituido por el azúcar de al menos uno de los polinucleótidos.
4. La composición de la reivindicación 3, en la que el radical modificado es un Morfolino.
5. La composición de la reivindicación 3 o reivindicación 4, en la que la estructura principal de polinucleótidos modificados es al menos uno de los polinucleótidos que comprende al menos un linaje de internucleótidos modificado.
- 15 6. La composición de la reivindicación 5, en la que el linaje de internucleótidos comprende un fosfato modificado seleccionado entre el grupo que consiste en un fosfonato de metilo, un fosforotioato de metilo, un fosforomorfolidato, un fosforopiperazidato y un fosforoamidato.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en la que al menos un polinucleótido antisentido es un 2'-O-metil-oligoribo-nucleótido.
- 20 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que al menos un polinucleótido antisentido está químicamente enlazado a uno o más conjugados que mejoran la actividad, distribución celular o absorción celular del polinucleótido antisentido.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que al menos un polinucleótido antisentido está químicamente enlazado a una molécula de polietilenglicol.
- 25 10. La composición de la reivindicación 8 o reivindicación 9 en la que el conjugado es un péptido que mejora la absorción celular y en la que el péptido se selecciona entre el grupo que consiste en una señal de localización nuclear (NLS), proteína TAT HIV-1, un péptido que comprende un dominio de unión de integrina, oligolisina, proteína de fibra adenovirus y un péptido que comprende un dominio de endocitosis mediada por receptor (EMR).
- 30 11. Una composición farmacéutica, que comprenden los dos o más polinucleótidos antisentido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un tampón fosfato fisiológicamente compatible.
12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o la composición farmacéutica de la reivindicación 11 para su uso en la inducción de la omisión de exón de un ARN gama sarcoglicano en una célula (preferentemente una célula de músculo humano y particularmente en la que la células de músculo humano se encuentra en un paciente que tiene distrofia muscular).
- 35 13. La composición o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la célula se encuentra en un paciente que tiene distrofia muscular de las cinturas tipo 2C (LGMD2C).
- 40 14. La composición o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en el alivio, inhibición o mejora de distrofia muscular de cinturas tipo 2C (LGMD2C) en un paciente que lo necesita, en la que se debe administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición, aliviando, de este modo, la LGMD2C, inhibiendo la progresión de la patología distrófica o mejorando la función muscular.
15. La composición o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la mejora comprende mejorar la función del músculo cardíaco, mejorar la resistencia del músculo respiratorio o mejorar la estabilidad motora.

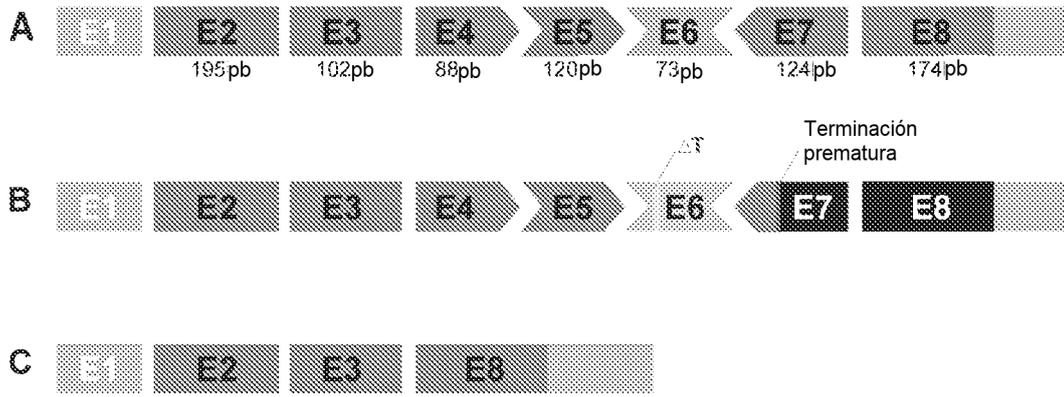


Figura 1

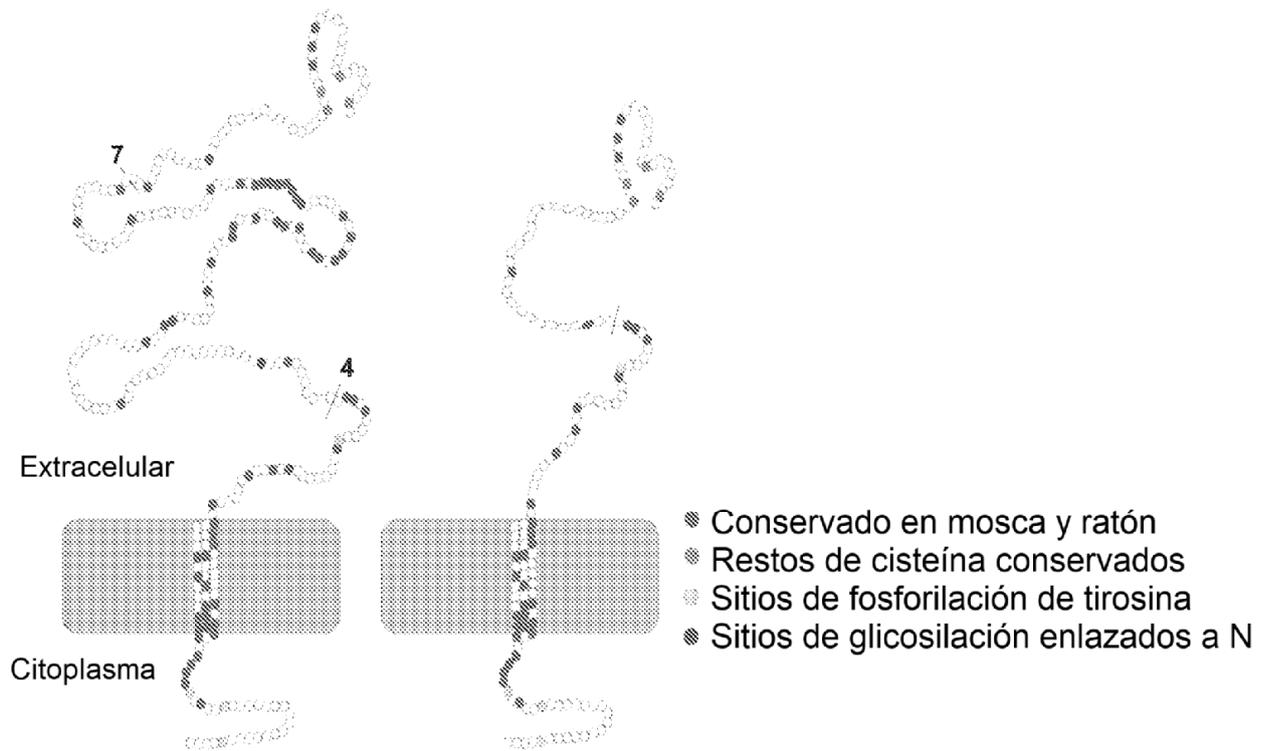


Figura 2

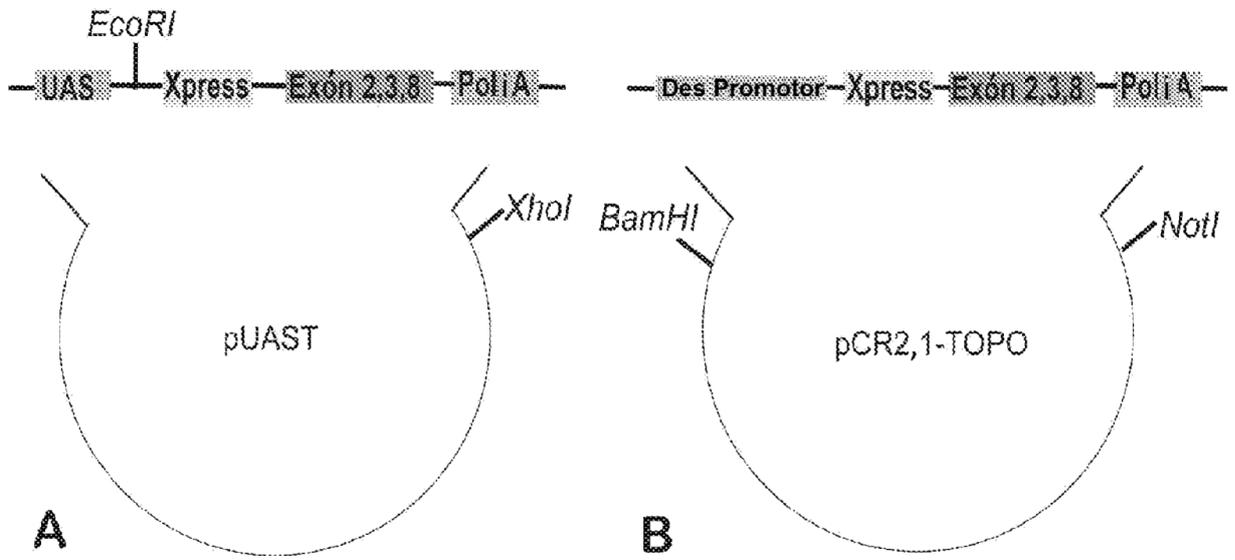


Figura 3

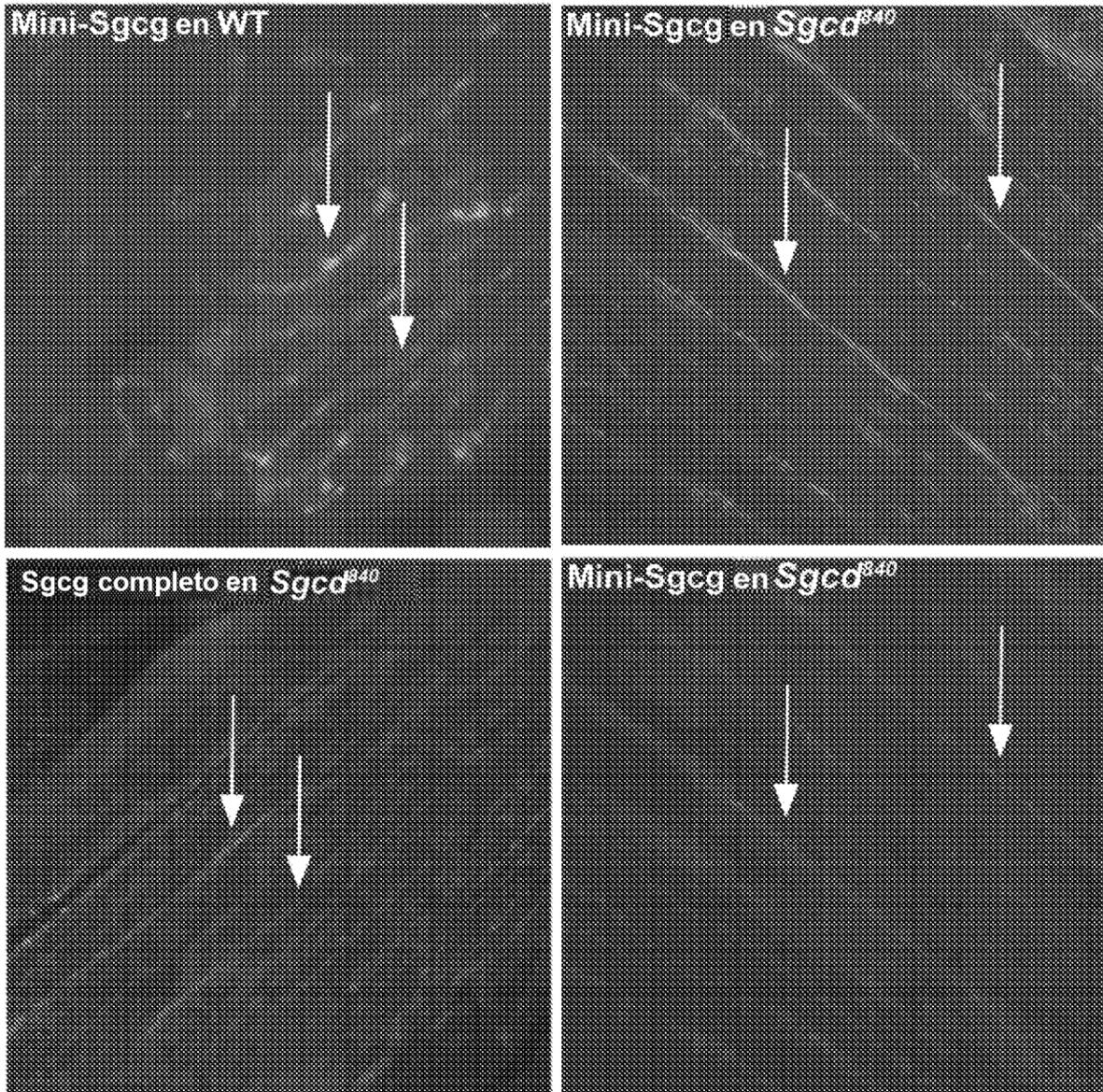


Figura 5

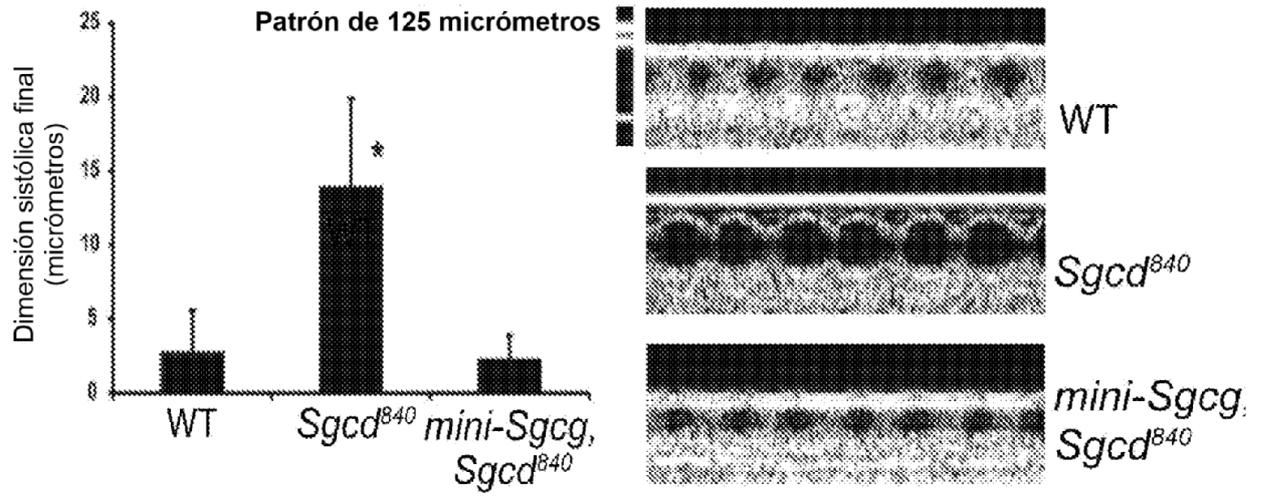


Figura 6

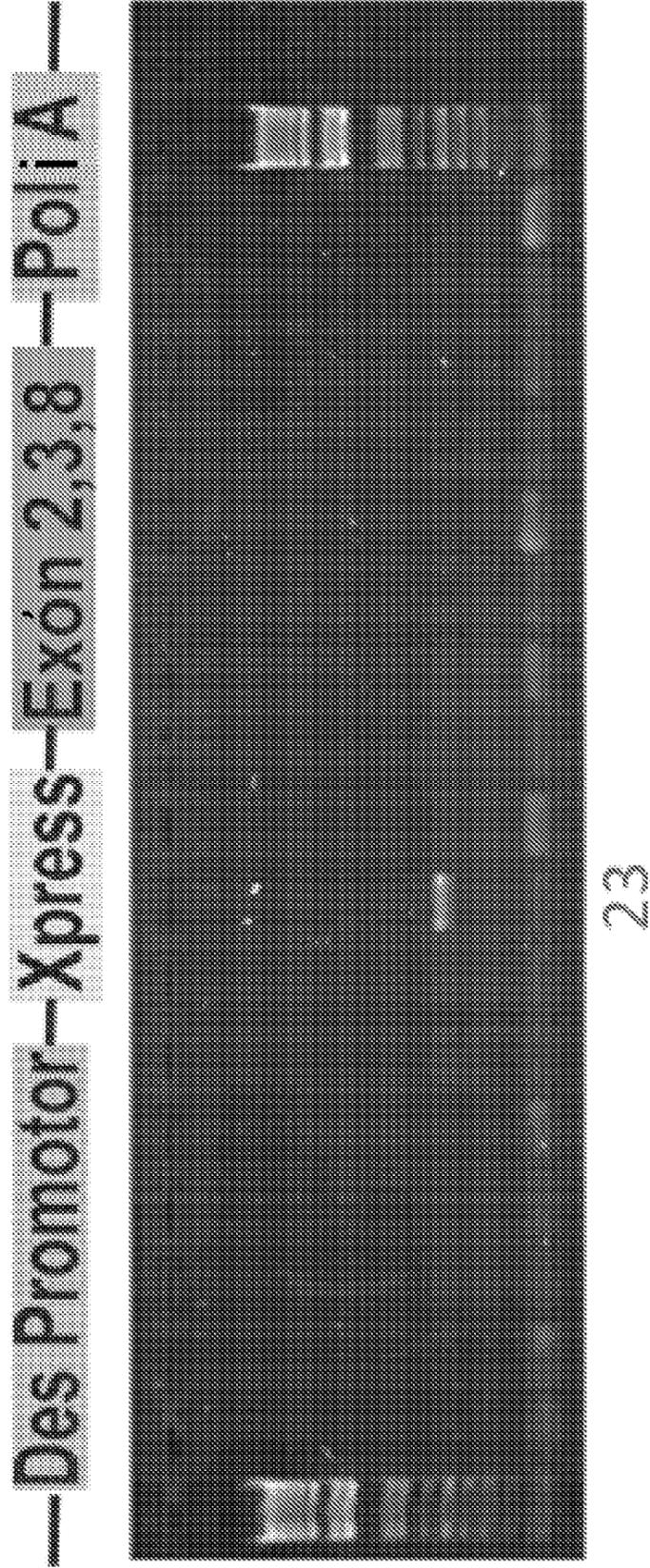


Figura 7



Figura 8

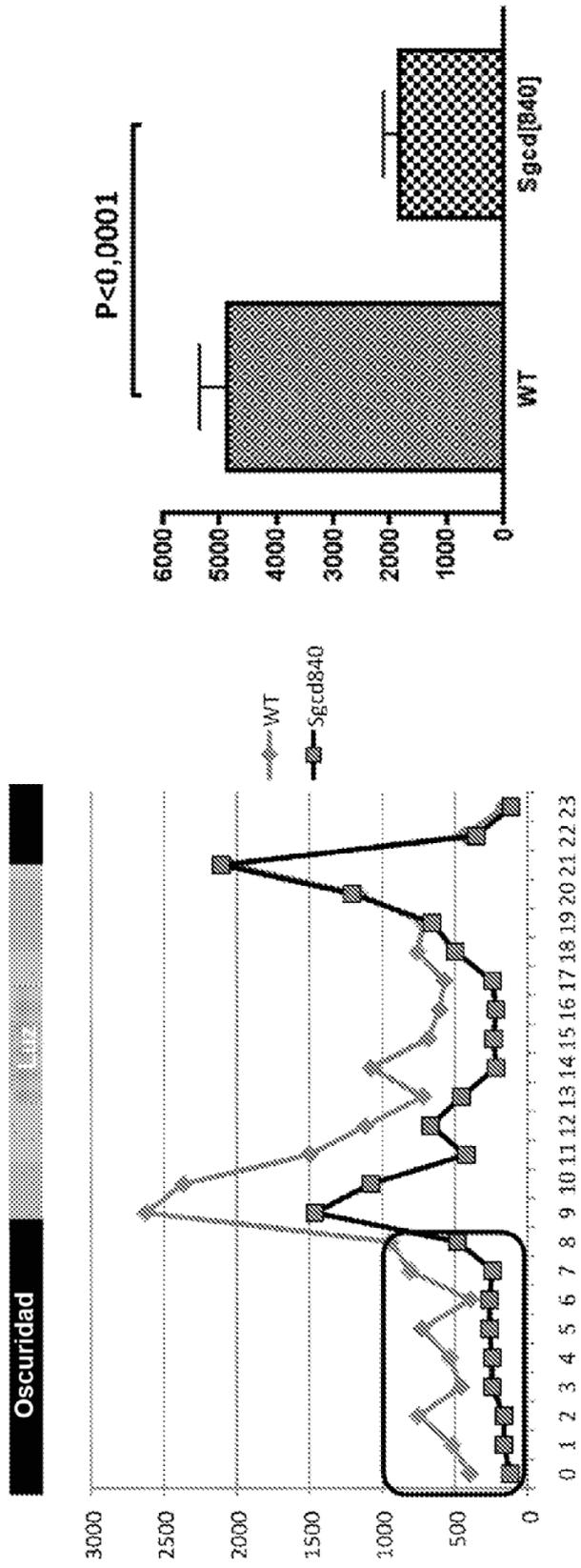
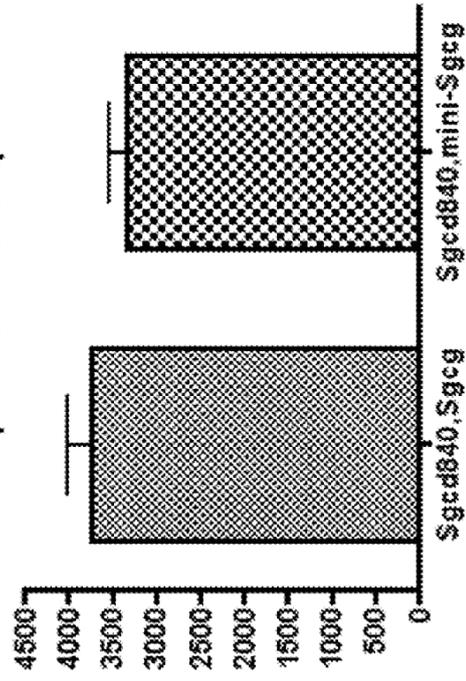


Figura 9

Mini-sgcg mejora la actividad nocturna así como la longitud completa de Sgcg



Mini-sgcg mejora la actividad nocturna

$P < 0,0001$

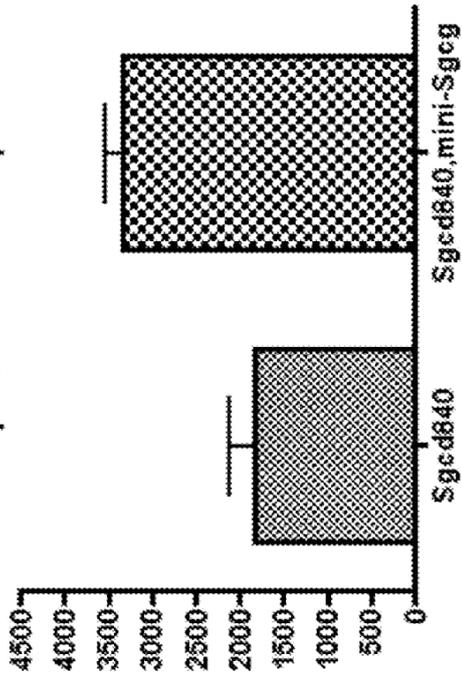


Figura 10

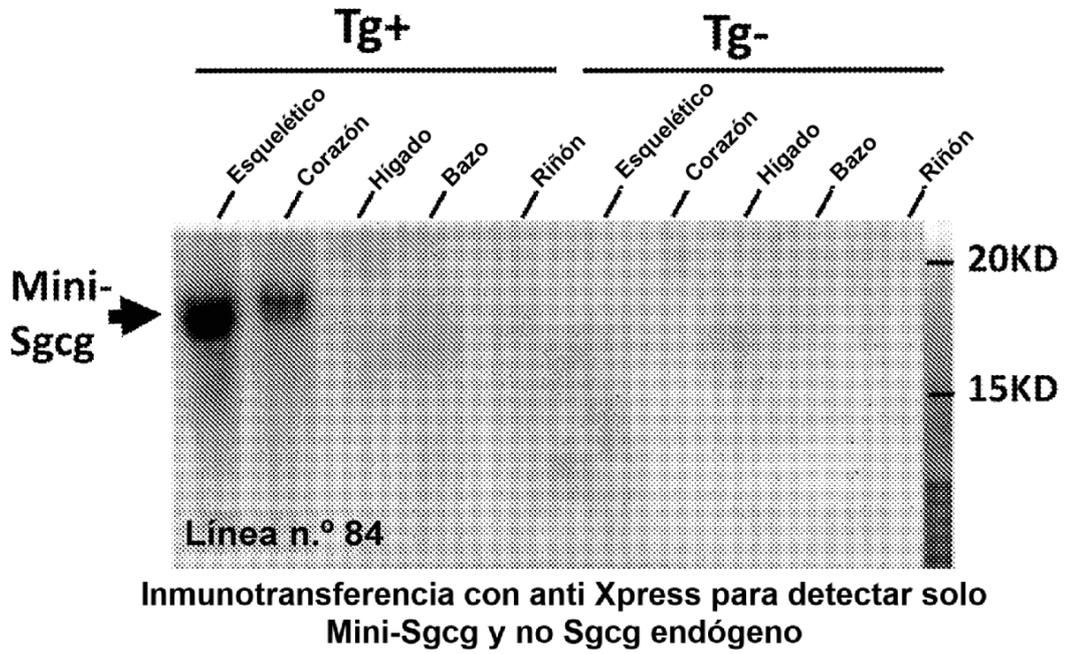


Figura 11

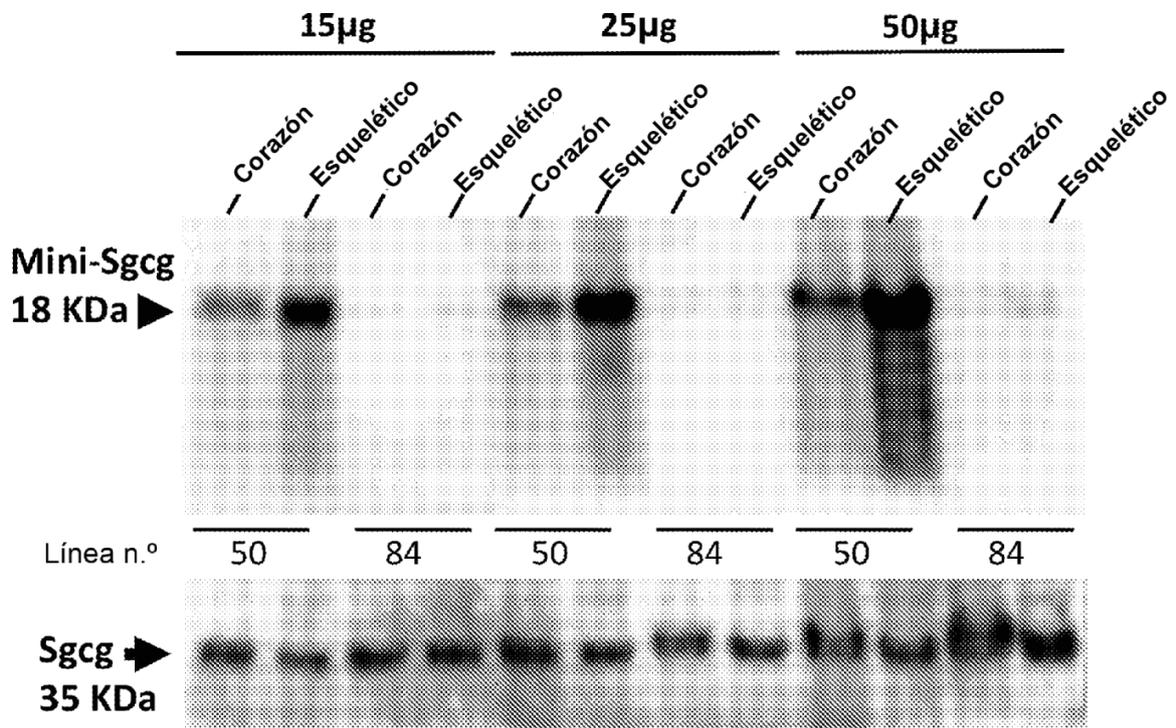
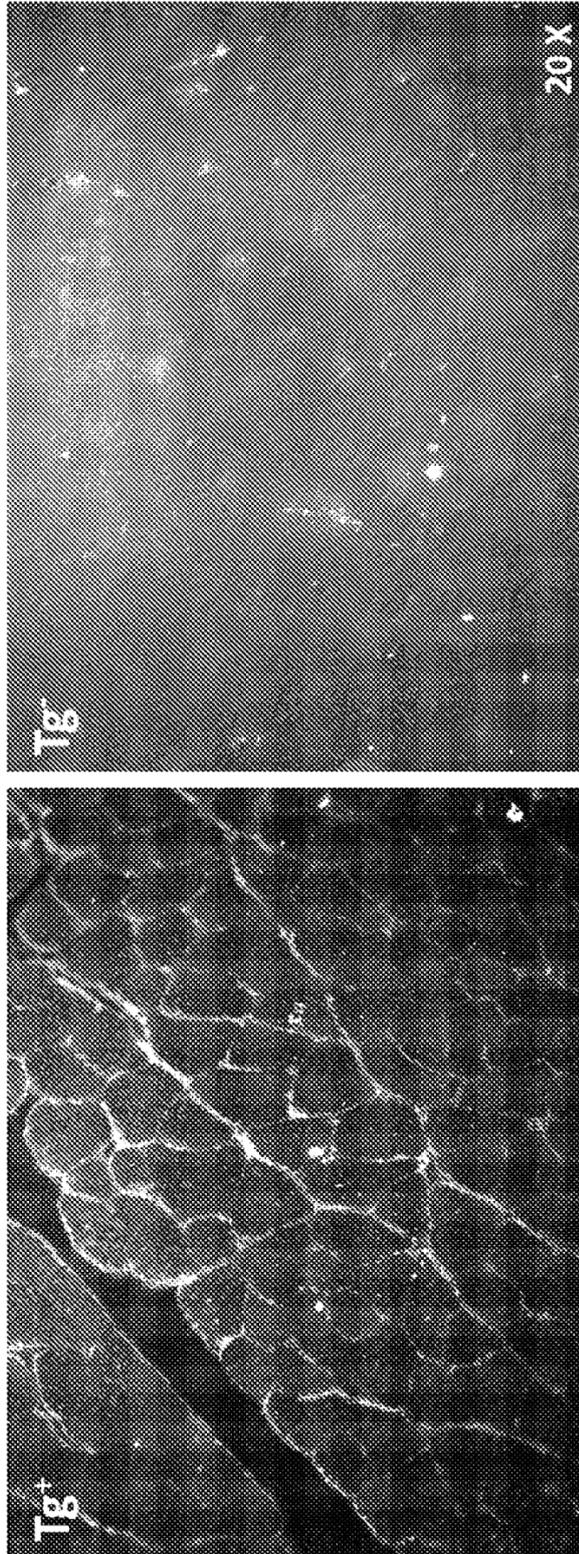


Figura 12



Línea n.º 50, anticuerpo anti-Xpress, detectando solo Mini-Sgcg en músculo esquelético

Figura 13

**Sgcg de longitude complete endógeno (proteína endógena) se ve
reducida por la presencia de Mini-Sgcg**

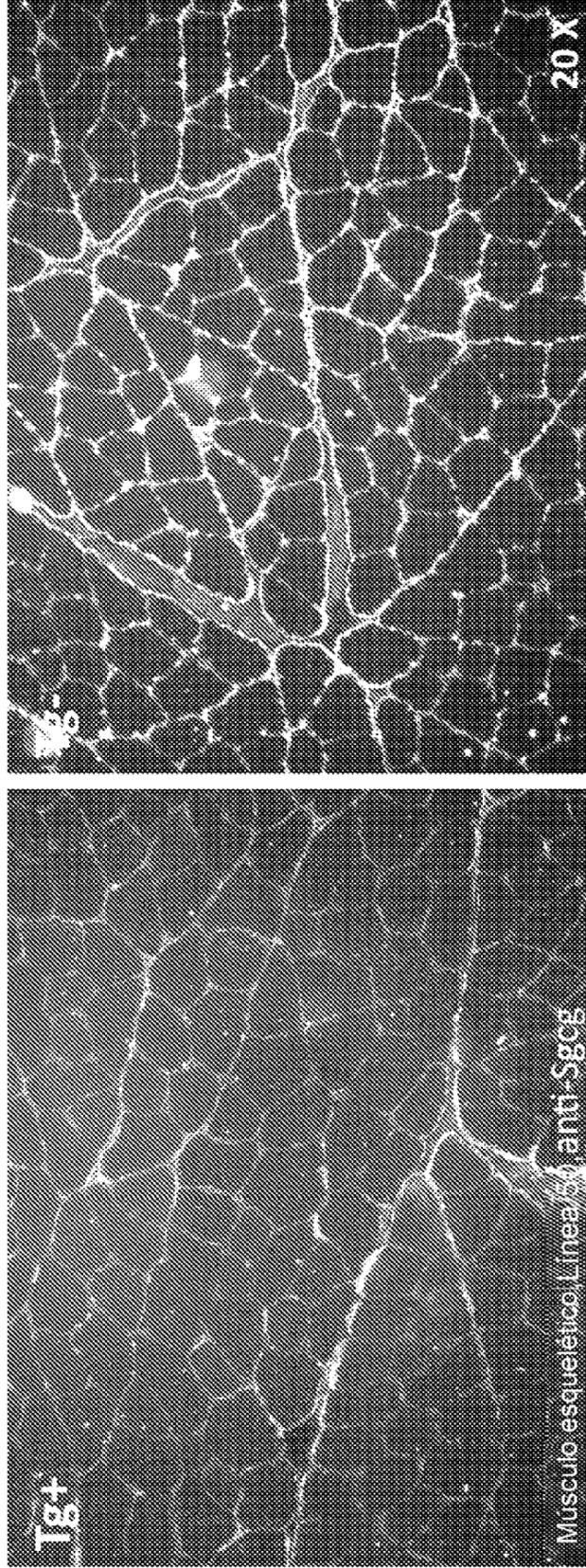


Figura 14

Conjunto de sarcoglicano

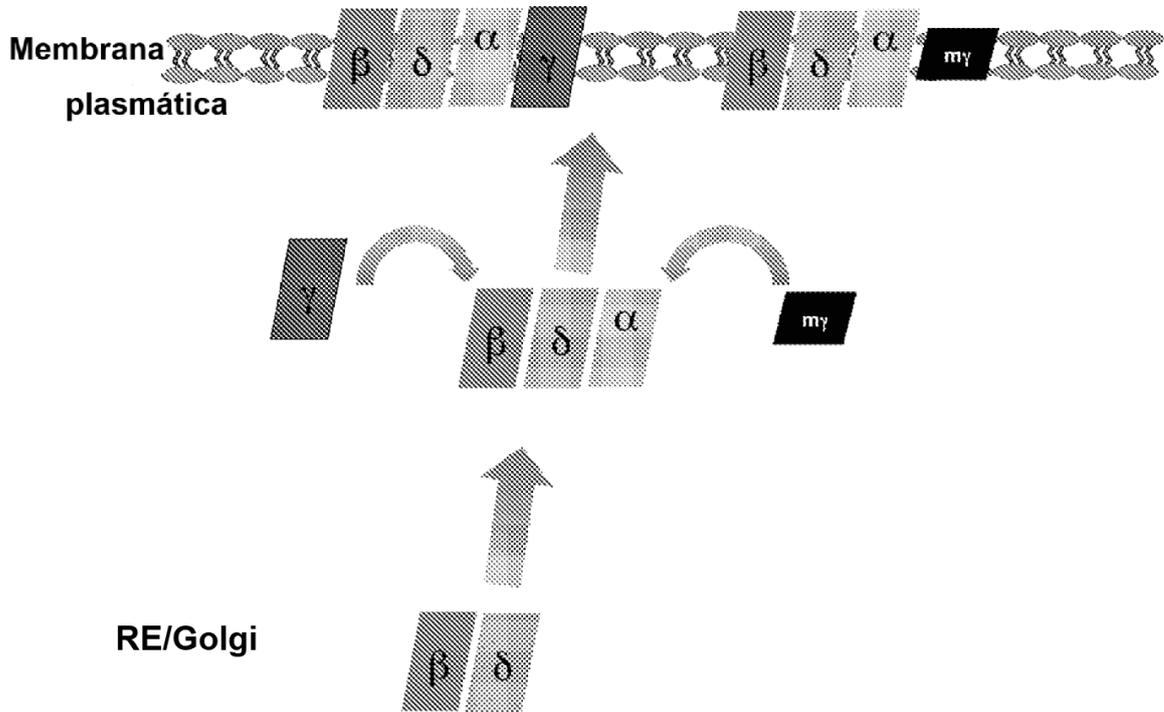
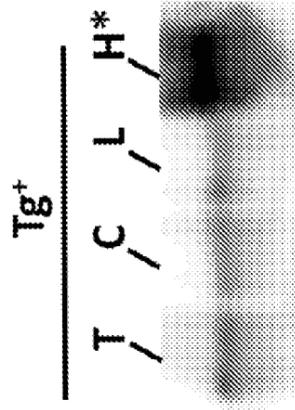
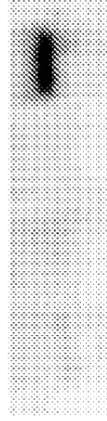


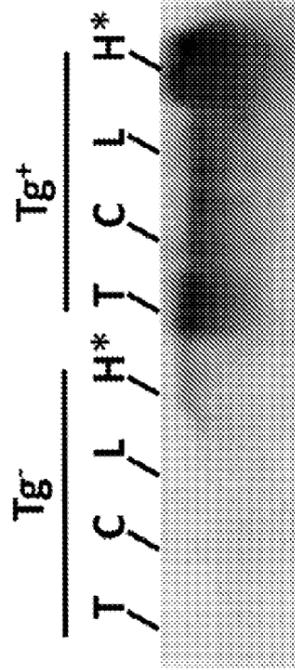
Figura 15



Mini-SgCG



SgCG



Línea n.º 84

*Enriquecimiento de Mini-SgCG en microsomos pesados en líneas de Tg⁺

T = lisato de músculo total
C = Fracción citoplásmica
L = fracción microosomal ligera
H = fracción microosomal pesada

Figura 16

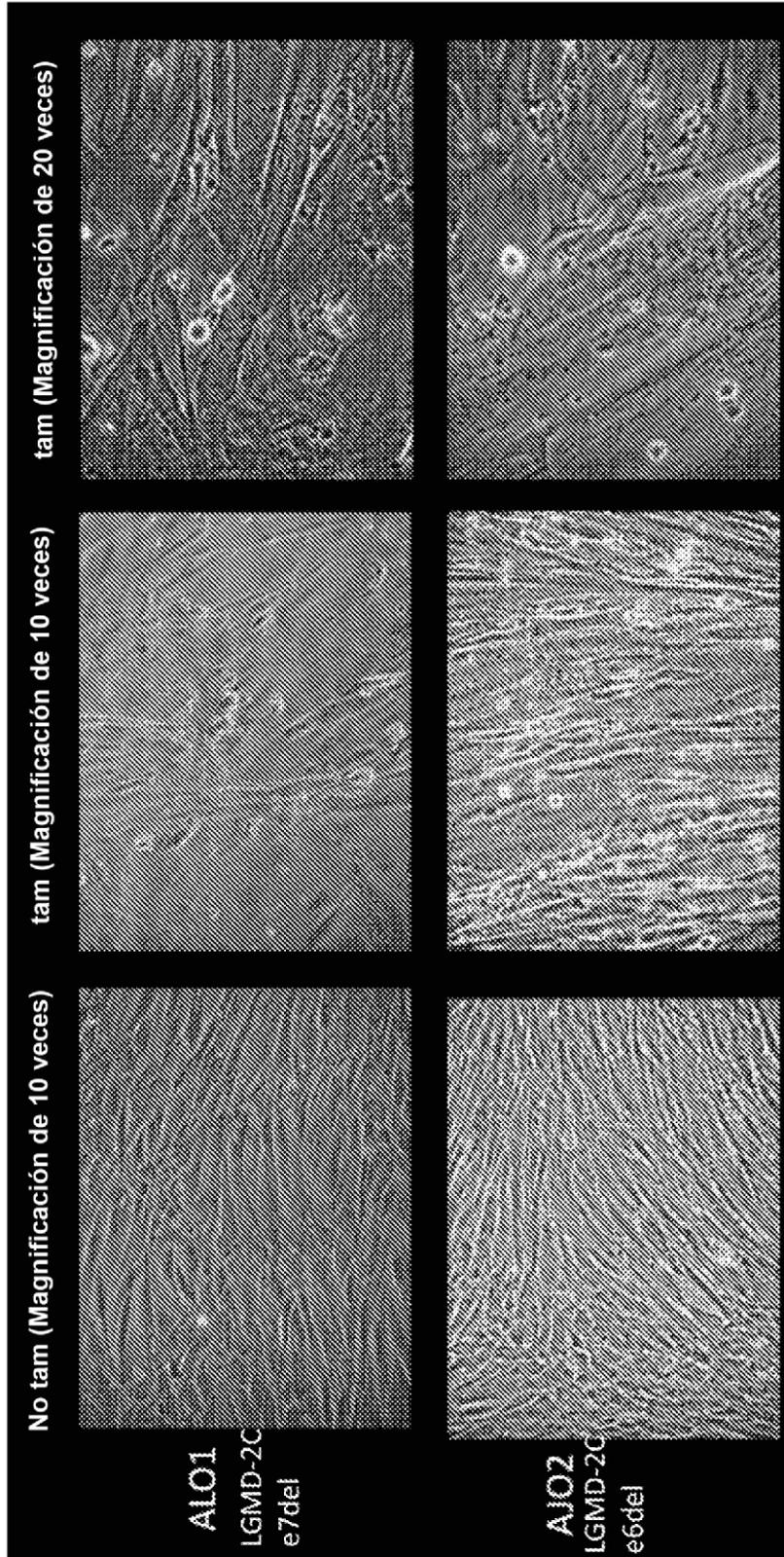


Figura 17

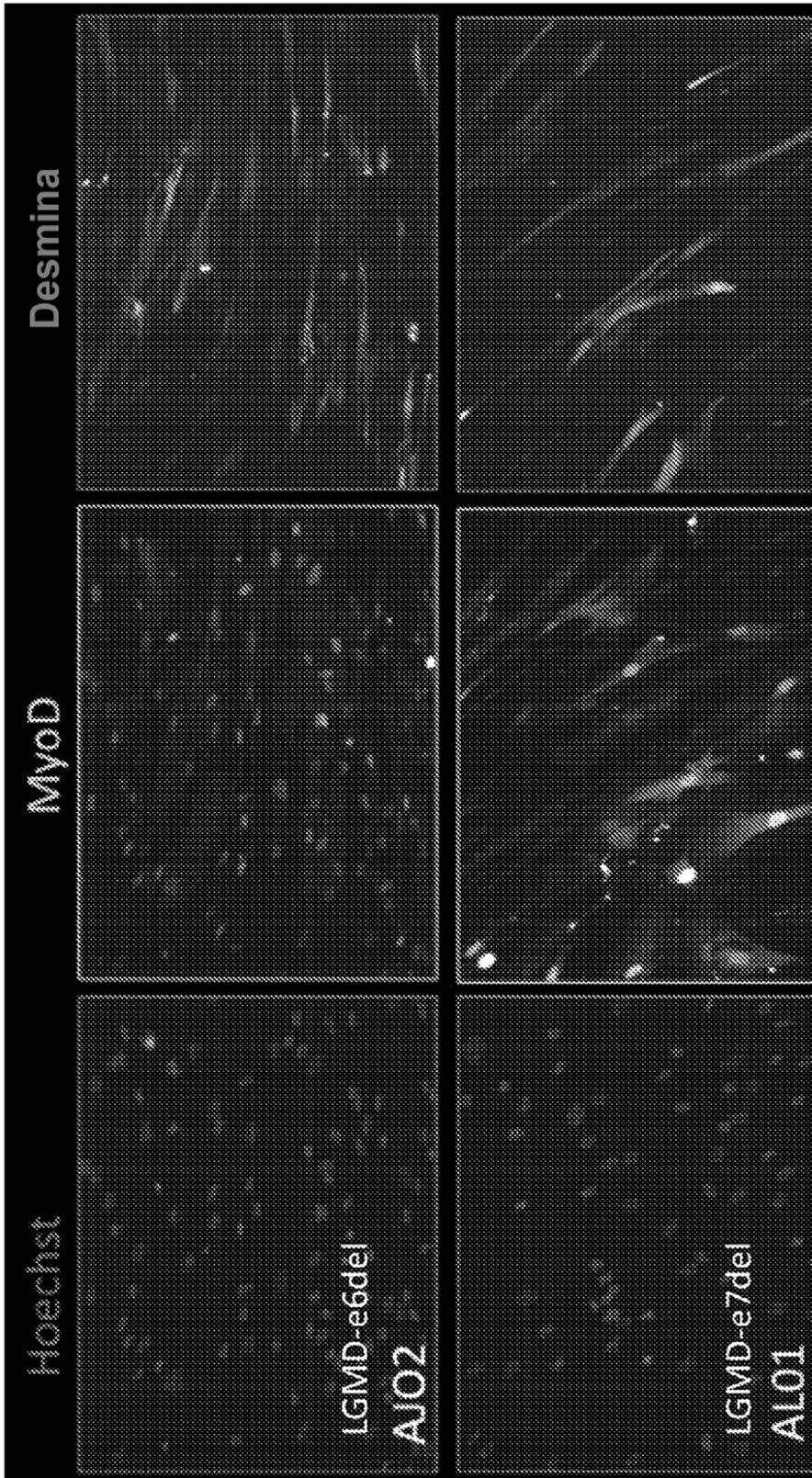


Figura 18