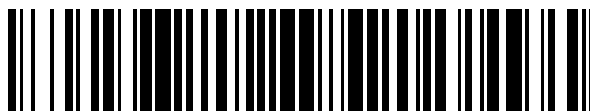


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 862**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2014** **PCT/EP2014/072466**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015** **WO15055859**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2014** **E 14786893 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 3058071**

54 Título: **Inhibidor de la dinamina 2 para el tratamiento de miopatías centronucleares**

30 Prioridad:

18.10.2013 EP 13306440

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

16.11.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (33.3%)
4, rue Blaise Pascal
67000 Strasbourg, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)

72 Inventor/es:

LAPORTE, JOCELYN;
COWLING, BELINDA y
TASFAOUT, HICHEM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 689 862 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

Inhibidor de la dinamina 2 para el tratamiento de miopatías centronucleares

Campo de la invención

La presente descripción se refiere a un inhibidor de la dinamina 2 para ser usado en el tratamiento de las miopatías centronucleares. La presente descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen el inhibidor de la dinamina 2 y a su uso para el tratamiento de las miopatías centronucleares.

Antecedentes de la invención

Las miopatías centronucleares (MCN) son un grupo de miopatías congénitas caracterizadas por debilidad muscular y confirmadas histológicamente por atrofia de las fibras, predominancia de fibras de tipo I e incremento de la centralización de los núcleos (corpúsculos), no secundaria a la regeneración muscular. Se han caracterizado tres formas principales de MCN: MCN ligada al cromosoma X (MCN-LX, también denominada miopatía miotubular, OMIM 310400) debida a mutaciones en la miotubularina con actividad fosfatasa de fosfoinosítidos (MTM1) (Laporte, J. et al., *Nature Genetics*, 1996, 13 (2): págs. 175-82), MCN autosómica recesiva (MCN-AR, OMIM 255200) causada por mutaciones en la anfifisina 2 (BIN1), una proteína de remodelación de la membrana (Nicot, A. S. et al., *Nature Genetics*, 2007, 39 (9): págs. 1134-9), y MCN autosómica dominante (MCN-AD, OMIM 160150) debida a mutaciones en la dinamina 2 (DNM2) (Bitoun, M. et al., *Nature Genetics*, 2005, 37 (11): págs. 1207-9) o debida a mutaciones en otros genes, tales como BIN1 (Bohm et al., *Brain*, 25 de setiembre de 2014. pii:awu272 [Epub antes de imprenta]). Otros genes han sido relacionados con una miopatía de tipo MCN: RYR1 que codifica el receptor de la rianodina, TTN que codifica la titina, CCDC78 (OMIM 614807) y la fosfatasa de los fosfoinosítidos MTMR14 (denominada hJUMPY; OMIM 160150). No se conoce la relación genética entre los genes implicados y faltan estrategias terapéuticas potentes.

La miopatía centronuclear ligada al cromosoma X, también denominada miopatía miotubular, es la forma más habitual y grave de la MCN, que aparece tras el nacimiento y suele acabar en muerte durante en los primeros años de vida (Jungbluth, H. et al., *Orphanet J. Rare Dis.*, 2008, 3: pág. 26). En la actualidad, no hay cura ni tratamientos eficaces para este trastorno. Se han descrito hasta la fecha más de 200 mutaciones diferentes en *MTM1* en aproximadamente 450 familias, la mayoría de las cuales conducen a una fuerte reducción de la proteína. Ya se habían caracterizado con anterioridad ratones genosuprimidos o genosustituidos en *Mtm1*, que recapitulan el fenotipo de MCN con los rasgos histológicos clásicos que incluyen un posicionamiento anormal de los orgánulos, localización incorrecta de los núcleos y atrofia muscular, asociado a la correspondiente reducción en la fuerza muscular. Se ha detectado un defecto en la estructura de las tríadas relacionado con el acoplamiento anormal de la excitación y la contracción en varios modelos de animales y pacientes con diferentes formas de MCN, con la identificación de un defecto común en todas las formas de MCN («Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies», Toussaint A. et al., *Acta Neuropathol.* Febrero de 2011; 121 (2): 253-66). Esto concuerda con una función propuesta para MTM1 en la regulación de la cantidad de fosfoinosítidos en el retículo sarcoplasmático de las tríadas.

Las dinaminas son proteínas grandes con actividad GTPasa que desempeñan funciones importantes en el tráfico y endocitosis de la membrana, y en el ensamblaje del citoesqueleto de actina. Las proteínas dinamina contienen un dominio GTPasa del extremo amino, dominio central, dominio PH (al que se fija el fosfoinosítido), GED (dominio efector de la GTPasa) y un PRD (dominio rico en prolina) para las interacciones entre proteínas. Se han identificado tres dinaminas en los humanos: la dinamina 1, que se expresa exclusivamente en las neuronas, la dinamina 3 que predomina en el cerebro y en los testículos, y la dinamina 2 (DNM2) de expresión ubicua. Se han identificado diferentes mutaciones de DNM2 en heterocigosis en las enfermedades específicas de tejido: la miopatía centronuclear autosómica dominante que afecta al músculo esquelético, y la neuropatía periférica de Charcot-Marie-Tooth autosómica dominante (CMTDIB, OMIM 606482).

Los estudios bioquímicos recientes nos hacen pensar que algunas mutaciones de DNM2 causantes de MCN incrementan la estabilidad de los oligómeros de dinamina y la actividad GTPasa. Esto se complementó *in vivo* bien mediante genosustitución o mediante la sobreexpresión en los ratones de la mutación más frecuente de DNM2 (p.R465W) que presentan los pacientes con MCN, lo que indujo rasgos de tipo MCN en los ratones adultos, lo que indica que la enfermedad no se debe a haploinsuficiencia. La sobreexpresión de la DNM2 de tipo silvestre (WT, del inglés *wild type*) también ocasionó la alteración en el músculo, aunque en menor grado.

La solicitud de patente internacional WO 2013/0065558 describe que el miR-133a desempeña una función que modula la expresión de DNM2. Como DNM2 está mutado en la MCN, se plantea que un agonista de un miembro de la familia de miR-133 podría ser beneficioso para el tratamiento de la miopatía centronuclear. Sin embargo, el miR-133 tiene numerosas dianas (véanse las bases de datos en línea para la predicción de la diana de los miRNA y las anotaciones funcionales, tales como <http://mirdb.org/mirdb/>, en donde se ofrecen las 226 dianas predichas para hsa-miR-133a en la miRDB y ninguna de ellas es DNM2, y los mismos tipos de resultados se obtienen con otras bases de datos en línea). Ya que el miR-133 tiene numerosas dianas y no es, por lo tanto, selectivo, podría tener efectos perjudiciales. Además, hasta ahora no se ha descrito ninguna mejora de la MCN con la administración de

miR133.

Por consiguiente, existe la necesidad apremiante de un tratamiento adecuado para la miopatía centronuclear, en concreto de agentes terapéuticos nuevos y más eficaces.

Compendio de la invención

5 La búsqueda de tratamientos prometedores para las miopatías centronucleares condujeron a los inventores al descubrimiento de que la disminución de DNM2 puede impedir, parar y potencialmente anular la progresión del fenotipo MCN-LX. Además, se identificó que la MTM1 actúa como un regulador negativo de *DNM2* en la organización del músculo y la fuerza. Mientras que DNM2 es una mecanoenzima clave para procesos celulares importantes, su reducción es extremadamente beneficiosa para la MCN-LX y otras miopatías centronucleares y, así
10 pues, representa una nueva estrategia terapéutica en potencia. El trabajo presentado aquí demuestra que la disminución de DNM2 tiene un potente impacto terapéutico sobre las miopatías centronucleares. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un inhibidor de la dinamina 2 para ser usado en el tratamiento de las miopatías centronucleares. En una realización concreta, la miopatía centronuclear se selecciona
15 del grupo que consiste en MCN ligada al cromosoma X (MCN-LX), MCN autosómica recesiva (MCN-AR) y MCN autosómica dominante (MCN-AD). En una realización preferida, la miopatía centronuclear es la MCN-LX o la MCN-AR.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la dinamina 2 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para ser usados en el tratamiento de una
20 miopatía centronuclear.

Se describe un método para el tratamiento de una miopatía centronuclear, en donde el método comprende la etapa de administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la dinamina 2.

Finalmente, la presente invención se refiere al uso de un inhibidor de la dinamina 2 para la preparación de una
25 composición farmacéutica para el tratamiento de una miopatía centronuclear.

El inhibidor de la dinamina 2 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra la dinamina 2, una molécula de ácido nucleico que interacciona directamente con un ácido nucleico que codifica la dinamina 2 y una molécula pequeña que inhibe la actividad, expresión o función de la dinamina 2. En una realización preferida, el inhibidor de la dinamina 2 se selecciona del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que interacciona
30 directamente con un ácido nucleico que codifica la dinamina 2. En una realización concreta, el inhibidor de la dinamina 2 es un RNAi, un ácido nucleico antisentido o una ribozima que interfiere específicamente con la expresión de la dinamina 2.

En una realización más específica, el inhibidor de la dinamina 2 es un siRNA, shRNA o un snRNA antisentido.

Un objeto adicional de la invención se refiere a un método para cribar o para identificar compuestos útiles para el
35 tratamiento de las miopatías centronucleares que comprende:

a) Dar a conocer u obtener un compuesto candidato; y

b) Determinar si dicho compuesto candidato inhibe la actividad o la expresión de la dinamina 2,

c) Seleccionar dicho compuesto candidato si inhibe la actividad o la expresión de la dinamina 2.

El método para cribar o identificar una molécula idónea para el tratamiento de las miopatías centronucleares puede
40 optativamente comprender además la etapa de administrar *in vivo* o *in vitro* la molécula seleccionada en un modelo de animal no humano con miopatía centronuclear, o en una parte del mismo (tejido o células), y analizar el efecto sobre la aparición o la progresión de la miopatía.

Estos y otros objetos y realizaciones de la invención se harán más evidentes después de la descripción detallada de la invención.

45 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Cantidad de DNM2 en la MCN-LX. (A) Inmunotransferencia de tipo Western representativa de lisados musculares de pacientes con MCN-LX para DNM2, MTM1 y control de carga de GAPDH, m = meses de edad. (B) Nivel relativo de expresión de la proteína DNM2 determinada mediante densitometría, normalizada por el control de carga de GAPDH, en total n = 3-5 pacientes. Los lisados de músculo esquelético tibial anterior (TA) (C) y diafragma (E) de ratones de tipo silvestre (WT) y Mtm1-/y de 5 semanas de edad se inmunoensayaron para DNM2 y GAPDH (control de carga). La cantidad relativa de la proteína DNM2 se determinó mediante densitometría de los polipéptidos inmunorreactivos de DNM2, normalizados por la carga de GAPDH, para el TA (D) y el diafragma (F). La expresión

de DNM2 se representa como la diferencia de veces desde el lisado del control WT, con $n = 4$ ratones. (G) Los cortes del músculo diafragma se tiñeron con HE. Barra de escala: 100 mm. Todos los gráficos describen la media \pm EEM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Figura 2. La reducción de la expresión de DNM2 rescata enormemente la esperanza de vida de los ratones Mtm1-/y. (A) Esperanza de vida de todos los ratones, representada como el porcentaje (%) de supervivencia de los ratones. Todos los ratones en los grupos WT, Dnm2+/-, y Mtm1-/y Dnm2+/- sobrevivieron hasta los 12 meses de edad. Los ratones más viejos alcanzaron los 2 años de edad. (B) Se representa la masa del cuerpo entero de todos los ratones. Sólo los ratones Mtm1-/y muestran una reducción significativa en la masa corporal. (C) La cantidad relativa de la proteína DNM2 se determinó por densitometría de los polipéptidos inmunorreactivos de DNM2, normalizados por la carga de GAPDH. La cantidad de DNM2 se representa como la diferencia de veces desde el lisado del control del WT. La expresión se determinó en ratones con 8 semanas, 16 semanas y 6 meses de edad a partir de los músculos diafragma (DIA) (C), gastrocnemio (GAS) (D), tibial anterior (TA) (E), y sóleo (SOL) (F), con $n = 2-8$ ratones. Los niveles de ARNm se cuantificaron por análisis de qRT-PCR, y la cantidad de DNM2 se expresó con respecto al control de carga de GAPDH (G). El gráfico representa 3 experimentos independientes. Masas musculares de GAS (H), TA (I) y SOL (J) ($n = 5-13$ ratones). Todos los gráficos describen la media \pm EEM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (s = semanas de edad, m = meses de edad).

Figura 3. Prácticamente todos los rasgos histológicos de las MCN se rescatan en los ratones Mtm1-/y con una reducción de la expresión de DNM2. Los cortes transversales del TA de ratones de 8 (A) o 16 (C) semanas de edad se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) (panel superior) o succinato deshidrogenasa (SDH) (panel inferior) y se visualizaron mediante microscopia óptica. Barra de escala: 300 mm; barra de escala para grandes aumentos: 25 mm. (B) Los cortes musculares transversales se visualizaron mediante microscopia electrónica de transmisión. La flecha indica la acumulación de membranas en torno al núcleo. Barra de escala: 0,5 mm. A los cortes musculares transversales de músculos TA de 8 (D) y 16 (E) semanas de edad se les analizó la superficie de las fibras. El tamaño de las fibras está agrupado en intervalos de 500 μm^2 y se representa como el porcentaje de fibras totales en cada grupo ($n = 5-7$ ratones). (F) Se puntuó la frecuencia de las fibras con los núcleos internos o centrales ($n = 5$ ratones). Los núcleos internos se definen como no subsarcoplémicos ni centrales. Las imágenes y la estadística no se midieron en los ratones Mtm1-/y a las 16 semanas de edad ya que solían morir antes de llegar a esta edad (NA: no aplicable). Todos los gráficos describen la media \pm EEM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Figura 4. Mejora de la fuerza y resistencia musculares de los ratones Mtm1-/y con una reducción de la expresión de DNM2. (A) Se realizó la prueba de la cuerda cada semana con ratones de 3 a 8 semanas de edad. Una caída se consideraba igual a 20 segundos. (B) La fuerza máxima absoluta del músculo TA se midió en los ratones de 8 y 16 semanas de edad. (C) La fuerza máxima específica del músculo TA representa la fuerza máxima absoluta referida a la masa muscular. (D) La predisposición al agotamiento del músculo TA se midió como el tiempo transcurrido para alcanzar el 50% de la fuerza muscular máxima producida en (B). No fue posible medir el agotamiento muscular en los ratones Mtm1-/y a las 8 semanas de edad debido a la debilidad muscular extrema. Los ratones Mtm1-/y suelen morir antes de las 16 semanas de edad y, por lo tanto, no se midieron a esta edad (NA). Todos los gráficos describen la media \pm EEM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ($n =$ mínimo 5 ratones por grupo).

Figura 5. Mejora de la ultraestructura muscular de los ratones Mtm1-/y con la reducción de la expresión de DNM2. Se tomaron imágenes de los músculos TA de ratones de 8 (A) y 16 (B) semanas de edad mediante microscopia electrónica de transmisión. Barra de escala: 0,5 mm (A) o 1 mm (B).

Figura 6. Localización de las tríadas en el músculo TA de ratones de 8 semanas de edad. (A) Los cortes transversales y longitudinales de músculo se tiñeron con RyR1, o se cotiñeron con los anticuerpos contra RyR1 (verde) y α -actinina (rojo), y se tomaron imágenes por microscopia confocal. Barra de escala: 20 mm (cortes transversales) o 5 mm (imágenes longitudinales). (B) Se tomaron imágenes de los músculos TA de ratones de 8 semanas de edad con microscopia electrónica de transmisión (MET). Las flechas apuntan a las tríadas localizadas con normalidad, que se muestran en el inserto de gran aumento. Barra de escala: 200 nm, barra de escala para grandes aumentos: 100 nm. (C) Porcentaje de tríadas visualizadas por sarcómero en los músculos TA de 8 semanas de edad de (B). El gráfico describe la media \pm EEM (* $p < 0,05$). (D) Los cortes transversales de músculo se tiñeron con caveolina 3 y se tomaron imágenes con microscopia confocal. Barra de escala: 50 mm.

Figura 7. Fenotipo a largo plazo de ratones Mtm1-/y con reducción de la expresión de DNM2. (A) Ratones WT de 12 semanas de edad (izquierda) y Mtm1-/y Dnm2+/- (derecha). (B) Prueba de la huella plantar que indica el ángulo de separación entre las patas traseras. Imágenes de los datos en bruto en la figura S7. (C) Prueba de la prensión de las 4 patas. (D) Prueba de cilindro giratorio realizada en modo aceleración (de 4 a 40 rpm en 5 minutos). Se registró el momento en el que se caían los ratones. Se registraron tres pruebas al día para cada ratón. (E) La prueba de suspensión requiere que los ratones estén colgados de una tapa de jaula hasta 60 segundos. Se realizaron tres pruebas por ratón. (F) Una prueba de pletismógrafo para las mediciones de la respiración en reposo se realizó con los ratones de 6 semanas de edad. Se muestran el tiempo de inspiración, el tiempo de espiración, el tiempo de relajación y la frecuencia de la respiración; las demás mediciones están en la figura S8. (G) Se midió la fuerza muscular máxima del diafragma en tiras del diafragma de ratones de 6 semanas de edad. Se describen la relación de la fuerza y la frecuencia, y de la fuerza máxima específica en contracción espasmódica y tetánica (100 Hz). (H) Los cortes longitudinales del músculo diafragma se tiñeron con HE y se tomaron imágenes al microscopio óptico.

Barra de escala: 100 mm. Todos los gráficos describen la media \pm EEM (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). n = mínimo 5 ratones.

Figura 8. La reducción de DNM2 únicamente en el músculo esquelético mejora la esperanza de vida y la enfermedad de los ratones *Mtm1*^{-/-}. (A) Esperanza de vida de todos los ratones representada como un porcentaje de supervivencia. Los ratones *Mtm1*^{-/-} con reducción de DNM2 en el músculo se representan como *Mtm1*^{-/-} *Dnm2*^{2skm/+}. (B) Masa corporal de los ratones. (C) Inmediatamente después de la disección, se pesaron los músculos gastrocnemio (GAS), tibial anterior (TA) y sóleo (SOL). Los gráficos representan la masa muscular como un porcentaje de la masa del cuerpo entero (n = 5-12 ratones). (D) Los cortes transversales del TA de ratones de 16 semanas de edad se tiñeron con HE (panel superior) o SDH (panel inferior). Barra de escala: 100 mm. (E) Cortes transversales de músculos TA de 16 semanas de edad en los que se analizó el área de las fibras. El tamaño de las fibras está agrupado en intervalos de 500 μm^2 y se representa como un porcentaje de las fibras totales en cada grupo (n = 4-7 ratones). (F) La frecuencia de las fibras con núcleos internos o centrales se contó en el músculo TA (n = 4-7 ratones). (G) Cantidad relativa de la proteína DNM2 determinada mediante densitometría de los polipéptidos inmunorreactivos de DNM2, normalizada por la carga de GAPDH. El nivel de DNM2 se representa como una diferencia de veces desde el lisado de control del WT (n = 4-7 ratones). Todos los gráficos describen la media \pm EEM (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

Figura 9. La reducción de DNM2 en el músculo esquelético después de que aparezcan los síntomas mejora la esperanza de vida y la enfermedad de los ratones *Mtm1*^{-/-}. (A) Esperanza de vida de todos los ratones representada como un porcentaje de la supervivencia. Los ratones *Mtm1*^{-/-} con reducción de DNM2 en el músculo se representan como *Mtm1*^{-/-} *Dnm2*^{(i)skm/+}. (B) Masa corporal de los ratones. (C) Inmediatamente después de la disección, se pesaron los músculos gastrocnemio (GAS), tibial anterior (TA) y sóleo (SOL). Los gráficos representan la masa muscular como un porcentaje de la masa corporal total (n = 5-12 ratones). (D) Los cortes transversales del TA de ratones de 16 semanas de edad se tiñeron con HE (panel superior) o SDH (panel inferior). Barra de escala: 100 mm. (E) En los cortes transversales de músculos TA de 16 semanas de edad se analizó el área de las fibras. El tamaño de las fibras está agrupado en intervalos de 500 μm^2 y se representa como un porcentaje de fibras totales en cada grupo (n = 4-7 ratones). (F) Se contó la frecuencia de las fibras con núcleos internos o centrales (n = 4-7 ratones). (G) Cantidad relativa de la proteína DNM2 determinada por densitometría de los polipéptidos inmunorreactivos de DNM2, normalizada por la carga de GAPDH. La cantidad de DNM2 se representa como una diferencia de veces desde el lisado del control del WT (n = 5-7 ratones). Todos los gráficos describen la media \pm EEM (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

Figura 10. Destrucción selectiva del *Dnm2* de ratón para crear un ratón heterocigoto para *Dnm2*. La región genómica que rodea el exón 8 seleccionado de *Dnm2* en los ratones. Se ha predicho que la delección del exón 8 conduce a un transcrito con el marco de lectura alterado.

Figura 11. Caracterización bioquímica y fenotípica de los ratones heterocigotos para *Dnm2*. (A) Análisis de sangre para la concentración urea, calcio y colesterol total en los ratones heterocigotos para *Dnm2* (*Dnm2*^{+/-}) y de tipo silvestre (WT). (B) Mediciones electrocardiográficas (ECG) en los ratones WT y *Dnm2*^{+/-}. Los valores del eje X representan las mediciones que se muestran debajo de cada prueba del siguiente modo; RR (intervalo entre dos ondas R, medidas en ms); HR = frecuencia cardíaca (ms); PR (intervalo de la onda P-R, ms); QT (intervalo de las ondas Q-T, bpm); QTcBZ (QT corregido, msCorr). (C) Masa del cuerpo entero. (D) Escáner densitométrico de todo el cuerpo. La cantidad de tejido magro y grasa se muestra como un porcentaje de la composición corporal total. (E) La velocidad de la conducción de un único nervio (VCUN) sensitivo se obtiene de la electromiografía muscular realizada en los ratones WT y *Dnm2*^{+/-}. (F) Masa total del músculo TA. Fuerza máxima absoluta (G) y específica (H) del músculo TA. (I) Medición del agotamiento del músculo TA, en donde el agotamiento se representa con el tiempo que transcurre en segundos (s) hasta que se produce el 50% de la fuerza máxima. Todos los ratones analizados eran ratones macho de 10 a 15 semanas de edad (n = 8-12 por grupo). Todos los gráficos representan la media \pm EEM y ninguno de los parámetros evaluados era significativamente diferente entre los ratones WT y *Dnm2*^{+/-}.

Figura 12. Localización de dinamina 2, miotubularina y α -actinina en los músculos TA. Los cortes longitudinales del músculo de ratones de 8 semanas de edad se cotiñeron con los anticuerpos contra (A) DNM2-R2680 (verde) y α -actinina (rojo), o se tiñeron con el anticuerpo contra (B) MTM1-R2827, y se tomaron imágenes mediante microscopia confocal. Barra de escala: 5 μm .

Figura 13. La atrofia se rescata en los músculos esqueléticos de los ratones *Mtm1*^{-/-} con la reducción de la expresión de la dinamina 2. La masa de ELD (A), plantar (B), GAS (C), TA (D), SOL (E), corazón (F) e hígado (G) están descritas como un porcentaje de la masa corporal total (n = 5-15 ratones). Todos los gráficos describen la media \pm EEM (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (s = semanas de edad, m = meses de edad). (H) Cortes transversales de GAS (H) o SOL (I) de ratones de 8 semanas de edad teñidos con HE (panel superior) o SDH (panel inferior). Barra de escala: 100 μm .

Figura 14. Niveles de expresión de proteínas en diferentes músculos a edades diferentes. Los lisados del músculo gastrocnemio (GAS) (A-C), tibial anterior (TA) (D-F), sóleo (G-I) y diafragma (J, K) de 8 semanas (A, D, G, J), 16 semanas (B, E, H) y 6 meses (C, F, I, K) de edad se inmunoensayaron para DNM2 y GAPDH (control de carga). Cuando se lisaron, los lisados también se inmunoensayaron para MTM1. Cuando aparece un doblete, la MTM1 está

representada por la banda inferior. Los carriles interpuestos que son irrelevantes para este estudio se tacharon con una cruz (G, I, J).

Figura 15. La localización de la desmina y la organización de la estructura de las tríadas se rescatan en el músculo TA de ratones *Mtm1*^{-/-} de 8 semanas de edad con la reducción de la expresión de la dinamina 2. Los cortes transversales de músculos de ratones de 8 semanas de edad se tiñeron con un anticuerpo contra la desmina (A) o el DHPRα (B) y se tomaron imágenes con microscopia confocal. Barra de escala: 50 μm (panel superior) y 20 μm (panel inferior) para ambos. Obsérvese la acumulación citosólica de la desmina en *Mtm1*^{-/-}, que se rescata en la mayoría de las fibras de *Mtm1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-}.

Figura 16. Patrones de la huella plantar de ratones de 6 y 12 meses de edad. Se ha trazado una línea del mejor ajuste para describir el ángulo medido entre las patas traseras. Resulta llamativo que, al caminar, los ratones *Mtm1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} tengan sus patas hacia afuera en comparación con los ratones WT y *Dnm2*^{+/-}. Los datos analizados se muestran en la figura 7B. (B) La prueba de la prensión de las patas delanteras se realizó cada mes (n = mínimo 5 ratones por grupo). El gráfico describe la media ± EEM. No se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos.

Figura 17. Resultados del pletismógrafo para ratones *Mtm1*^{-/-} de 6 meses de edad con reducción de la expresión de la dinamina 2. La prueba del pletismógrafo se realizó con los ratones en reposo para valorar los patrones de respiración en reposo. Todos los gráficos describen la media ± EEM. No se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos.

Figura 18. La delección heterocigota de la dinamina 2 únicamente en el músculo esquelético mejora la enfermedad de los ratones *Mtm1*^{-/-}. (A) Los cortes transversales del TA de ratones de 16 semanas de edad se tiñeron con HE o SDH. Barra de escala: 300 μm. En los cortes transversales de los músculos GAS (B) y SOL (C) de 16 semanas de edad se analizó el área de las fibras. El tamaño de las fibras está agrupado en intervalos de 500 μm² y se representa como un porcentaje de las fibras totales en cada grupo (n = 3-6 ratones). (D) Se contó la frecuencia de las fibras con núcleos internos o centrales (n = 3-6 ratones). Los lisados del músculo gastrocnemio (GAS) (E), tibial anterior (TA) (F), sóleo (SOL) (G), (las imágenes son de la misma inmunotransferencia) y diafragma (H) de ratones de 16 semanas de edad se inmunoanalizaron para DNM2, MTM1 y GAPDH (control de carga). Todos los gráficos describen la media + EEM (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

Figura 19. Nivel de expresión de las proteínas en los ratones *Mtm1*^{-/-} *Dnm2*^{skm+/-}. Los lisados de los músculos esqueléticos gastrocnemio (GAS) (A), tibial anterior (TA) (B) y diafragma (C) de ratones de 16 semanas de edad se inmunoanalizaron para DNM2, MTM1 y GAPDH (control de carga).

Figura 20. Los ratones *Bin1*^{-/-} mueren perinatalmente mientras que los ratones *Bin1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} sobrevivieron e incrementaron su masa corporal. A: La masa corporal en gramos muestra que los ratones *Bin1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} alcanzan los 34 gramos. B: No se pueden diferenciar los ratones de tipo silvestre y *Bin1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} de 10 semanas de edad.

Figura 21. Los ratones *Bin1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} no muestran deficiencias de funcionamiento en los análisis clínicos en comparación con los de tipo silvestre (ratones WT). (A-F) Se analizaron los ratones *Bin1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} jóvenes (2-6 meses de edad) y viejos (12-17 meses de edad). (G-H) La fuerza máxima específica (fuerza máxima absoluta con respecto a la masa muscular) y el tiempo de semirrelajación son parecidos a ambas edades en los ratones *Bin1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} y de tipo silvestre (WT), lo que apoya la normalidad de la fuerza muscular y de la predisposición al agotamiento.

Figura 22. Los ratones *Bin1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} muestran una histología cercana a los controles. Los ratones *Bin1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} presentan fibras musculares con forma y tamaño normales (HE: tinción con hematoxilina y eosina) y tinción oxidativa normal (SDH). Tienen tendencia a mostrar núcleos más centralizados sin signos de exceso de regeneración.

Figura 23. Tamaño de las fibras (A) y posición de los núcleos (B). Los ratones *Bin1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} muestran un tamaño parecido de las fibras con una ligera tendencia hacia fibras más pequeñas, aunque no es significativo cuando se compara la media del diámetro de todas las fibras (izquierda). Los ratones *Bin1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} tienen núcleos más centralizados (derecha).

Figura 24. Exones del ARNm de la dinamina 2 y dominios de la proteína dinamina 2: a) Regiones del ARNm de la dinamina 2 que se seleccionaron para ser diana selectiva del shRNA (arriba), mutaciones dominantes en DNM2 que conducen a la miopatía centronuclear (abajo). b) Dominio GTPasa, dominio (CENTRAL), dominio de homología con la pleckstrina (PH), dominio efector de la GTPasa (GED) y dominio rico en prolinas (PRD).

Figura 25. Expresión de la proteína dinamina 2 en las células HEK transfectadas con shDnm2. a) Inmunotransferencia de tipo Western de las células HEK (células de riñón embrionario de humano) cotransfectadas con hDNM2 (plásmido que codifica la DNM2 de humano) y el shRNA que actúa selectivamente sobre el ARNm de DNM2. b) El análisis de densitometría muestra que los shRNA n.ºs B, C, F, I y J actúan selectivamente sobre la hDNM2 y reducen su expresión de manera eficaz.

Figura 26. Expresión del ARNm de la dinamina 2 en las células C2C12 transfectadas con el shDnm2. El nivel del ARNm de Dnm2 se valoró en las C2C12 (mioblastos de ratón) transfectadas con el shRNA. El shRNA seleccionado redujo de manera eficaz el ARNm de Dnm2 aproximadamente al 50%.

Figura 27. Expresión de la proteína dinamina 2 en el músculo tibial anterior (TA) de tipo silvestre (WT) inyectado con dependovirus (AAV, por su nombre en inglés). a) Inmunotransferencia de tipo Western del TA WT inyectado con el AAV que expresa el shDnm2 n.º C o bien la secuencia desordenada. b) El análisis de densitometría muestra que el shRNA n.º C actúa selectivamente sobre Dnm2 *in vivo* y reduce su expresión aproximadamente al 60% en comparación con el WT inyectado con el AAV que lleva la secuencia desordenada.

Figura 28. Masa de los TA de Mtm1-/y KO y expresión de la proteína Dnm2 al cabo de 5 semanas de la inyección intramuscular del AAV. a) La inyección intramuscular del AAV que codifica el shDnm2 n.º C muestra una ganancia de masa muscular en comparación con el TA inyectado con el AAV que lleva la secuencia desordenada. b) Inmunotransferencia de tipo Western del gastrocnemio de Mtm1-/y KO inyectado con AAV que expresa el shDnm2 n.º C o bien la secuencia desordenada.

Figura 29. Cortes transversales del músculo gastrocnemio de Mtm1-/y KO teñido con HE (hematoxilina y eosina) al cabo de 5 semanas de la inyección intramuscular del AAV. La inyección intramuscular con el AAV que codifica el shDnm2 n.º C (derecha) muestra una mejora de la histología muscular y un incremento del tamaño de las fibras en el gastrocnemio de Mtm1-/y KO en comparación con el gastrocnemio de Mtm1-/y KO inyectado con el AAV que lleva la secuencia desordenada (izquierda).

Figura 30. Distribución del tamaño de las fibras, tamaño medio de las fibras y cuantificación de la posición de los núcleos en cortes transversales del músculo gastrocnemio de Mtm1-/y KO inyectados con los AAV. a) La distribución del tamaño de las fibras muestra que el gastrocnemio de Mtm1-/y KO inyectado con el AAV-shDnm2 n.º C presentaba fibras más grandes que el gastrocnemio de Mtm1-/y KO inyectado con el AAV que lleva la secuencia desordenada. b) La medición del tamaño medio de las fibras demuestra que el gastrocnemio de Mtm1-/y KO inyectado con AAV-shDnm2 presenta fibras más grandes (que casi doblan el tamaño) que el gastrocnemio de Mtm1-/y KO inyectado con el AAV que lleva la secuencia desordenada. c) El gastrocnemio de Mtm1-/y KO inyectado con el AAV-shDnm2 n.º C presenta menos posiciones anormales de los núcleos dentro de las fibras musculares que el gastrocnemio de Mtm1-/y KO inyectado con el AAV que lleva la secuencia desordenada. Se midieron más de 800 fibras para (a) y (b). Se contaron 1000 fibras para cada muestra en (c).

Descripción detallada

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que conoce corrientemente el experto en la técnica a la cual pertenece esta invención.

La dinamina 2 está codificada por el gen *DNM2* (ID de gen: 1785). De manera más precisa, el gen *DNM2* está localizado desde el par de bases 10.919.884 al par de bases 10.942.586 del cromosoma 19 (versión GRCh37/hg19) o desde el par de bases 10.718.053 al 10.831.910 en la localización NC_000019.10 (GRCh38/hg19). El gen de la dinamina 2 o los productos génicos también se conocen con otros nombres, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, CMTDI1, CMTDIB, DI-CMTB, DYN2, DYN2_HUMAN, dinamina II, DYNII.

Inhibidores de la dinamina 2

Tal y como se usa en la presente memoria, el término «inhibidor de la dinamina 2» hace referencia a cualquier molécula capaz de hacer disminuir específicamente la expresión de la dinamina 2 o de inhibir la actividad o función de la dinamina 2. Tal inhibidor de la dinamina 2 es un inhibidor directo, lo que significa que interacciona directamente con la proteína dinamina 2 o bien con un ácido nucleico que codifica dicha dinamina 2 o una parte de la misma. Los inhibidores de la dinamina 2 de acuerdo con la invención son capaces de inhibir o hacer disminuir la actividad funcional de la dinamina 2 *in vivo* y/o *in vitro*. El inhibidor puede inhibir la actividad funcional de la dinamina 2 hasta al menos aproximadamente el 30%, preferiblemente hasta al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente hasta al menos aproximadamente el 70, 75 u 80%, aún preferiblemente hasta el 85, 90 o 95%. En concreto, el inhibidor puede inhibir la expresión de la dinamina 2 al menos aproximadamente el 10%, preferiblemente al menos aproximadamente el 30%, preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente al menos aproximadamente el 70, 75 u 80%, aún preferiblemente el 85, 90 o 95%.

Un inhibidor de la dinamina 2 de la invención puede actuar bloqueando y/o inhibiendo la actividad o la función de la dinamina 2. Esto podría conseguirse, por ejemplo, inhibiendo la actividad enzimática de la dinamina 2. La actividad funcional o enzimática de la dinamina 2 la puede valorar con facilidad el experto en la técnica de acuerdo con los métodos conocidos, mediante el análisis, por ejemplo, de la actividad GTPasa o de la función de la dinamina 2 en la endocitosis mediada por clatrina (Macia E. et al. «Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin»: *Developmental cell* 10, 839-850, junio de 2006). Para los inhibidores de la actividad GTPasa o de la fijación a lípidos, la localización subcelular, la endocitosis mediada por clatrina, la endocitosis de vesículas sinápticas, se puede utilizar el método descrito en McCluskey et al, *Traffic*, 2013; McGeachie et al, *ACS Chem Biol*, 2013. Para la actividad GTPasa de la dinamina 2, oligomerización, fijación de lípidos, se pueden utilizar los métodos descritos en Wang et al., *J. Biol. Chem.* 2010; o en Kenniston y Lemmon, *EMBO J*, 2010.

El inhibidor de la dinamina 2 de la invención también puede actuar bloqueando y/o inhibiendo la expresión de la dinamina 2 (que incluye la transcripción, el ajuste, la maduración del transcrito o la traducción). La disminución o inhibición de la expresión de la dinamina 2 se puede evaluar por cualquier medio conocido por el experto en la técnica, que incluye, pero sin limitarse a ellos, la valoración de la cantidad de proteína dinamina 2 mediante el uso de, por ejemplo, el análisis de inmunotransferencia de tipo Western (tal como se muestra en la figura 1) o ELISA, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo antidinamina 2, y/o la valoración del nivel del ARNm de la dinamina 2 (tal y como se muestra en la figura 2) mediante el uso de cualquier técnica disponible, tal como la PCR cuantitativa, por ejemplo.

El inhibidor de la dinamina 2 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra la dinamina 2, una molécula de ácido nucleico que interacciona directamente con un ácido nucleico que codifica la expresión de la dinamina 2 y una molécula pequeña que inhibe la actividad enzimática (a saber, inhibición de la actividad GTPasa), la expresión (tal como por inhibición del promotor, ajuste o traducción) o la función (tal como la inhibición de la oligomerización, activación, fijación de lípidos o fijación a su pareja) de la dinamina 2.

De acuerdo con una realización concreta, el inhibidor de la dinamina 2 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra la dinamina 2 o una molécula de ácido nucleico (o nucleótido) que interacciona directamente con un ácido nucleico que codifica la dinamina 2.

En una realización preferida, el inhibidor de la dinamina 2 se selecciona del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente con la expresión de la dinamina 2. De acuerdo con la invención, la molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente con la expresión de la dinamina 2 suele ser un ácido nucleico que no se produce de forma natural. En una realización concreta, el inhibidor de la dinamina 2 es un RNAi, un ácido nucleico antisentido o una ribozima que interfiere específicamente con la expresión de la dinamina 2.

En una realización concreta, el inhibidor de la dinamina 2 es un siRNA o un shRNA.

En la presente invención, el ácido nucleico es capaz de hibridarse específicamente a un gen o a transcritos que codifican la dinamina 2. Con «que se hibrida específicamente» se pretende decir que se hibrida en condiciones rigurosas. En particular, las condiciones rigurosas se pueden definir mediante la concentración de sales, la concentración de solvente orgánico, por ejemplo, formamida, temperatura, y otras condiciones bien conocidas en la técnica. Las condiciones típicas de hibridación rigurosa incluyen temperaturas por encima de 30 °C, preferiblemente por encima de 35 °C, más preferiblemente de más de 42 °C, y/o salinidad de menos de aproximadamente 500 mM, preferiblemente de menos de 200 mM. No obstante, se debe saber que, para hibridarse específicamente, el ácido nucleico de acuerdo con la invención no necesita tener una complementariedad del 100% con la secuencia diana. En concreto, un ácido nucleico con un grado de complementariedad al menos igual que aproximadamente el 90% es capaz de hibridarse específicamente. Preferiblemente, el grado de complementariedad entre el ácido nucleico de acuerdo con la invención y la secuencia diana es igual a al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%.

El término «complementario» o «complementariedad» se refiere a la capacidad que tienen los polinucleótidos para formar pares de bases con otra molécula polinucleotídica. Los pares de bases están formados típicamente por puentes de hidrógeno entre las unidades nucleotídicas en hebras polinucleotídicas antiparalelas. Las hebras polinucleotídicas complementarias pueden apairar sus bases a la manera de Watson y Crick (p. ej., A con T, A con U, C con G) o de cualquier otra manera que permita la formación de dobles cadenas. Tal y como los expertos en la técnica saben, cuando se utiliza el ARN en lugar del ADN, el uracilo y no la timina es la base que se considera complementaria a la adenosina. Sin embargo, cuando se representa U en el contexto de la presente invención, está implícita la capacidad para sustituir una T, a menos que se diga otra cosa. La complementariedad perfecta o la complementariedad al 100% se refiere a la situación en la que cada unidad nucleotídica de una hebra polinucleotídica puede fijarse a una unidad nucleotídica de una segunda hebra polinucleotídica. La complementariedad menos que perfecta se refiere a la situación en la que algunas, pero no todas, las unidades nucleotídicas de dos hebras pueden fijarse entre sí. Por ejemplo, para dos icosámeros, si solo pueden fijarse entre sí dos pares de bases en cada hebra, las hebras polinucleotídicas muestran una complementariedad del 10%. Del mismo modo, si 18 pares de bases en cada hebra pueden fijarse con las de otra, las hebras polinucleotídicas muestran una complementariedad del 90%.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término «iRNA», «RNAi» o «ARN interferente» hace referencia a cualquier ARN que es capaz de hacer disminuir la expresión de la proteína deseada. Abarca moléculas de ARN interferente pequeño (siRNA), ARN bicatenario (dsRNA), ARN monocatenario (ssRNA) y de ARN ahorquillado pequeño (shRNA). La interferencia por ARN designa un fenómeno mediante el cual el dsRNA suprime específicamente la expresión de un gen deseado a nivel postranscripcional. En condiciones normales, la interferencia por ARN se inicia mediante moléculas de ARN bicatenario (dsRNA) de varios miles de pares de bases de longitud. *In vivo*, el dsRNA introducido en una célula se escinde en una mezcla de moléculas de dsRNA pequeñas denominadas siRNA. La enzima que cataliza la escisión, Dicer, es una endo-ARNasa que contiene dominios de ARNasa III (Bernstein, Caudy et al., 2001. *Nature*. 18 de enero de 2001; 409 (6818): 363-6). En las células de mamíferos, los siRNA producidos por Dicer tienen de 21 a 23 pb de longitud, con una secuencia bicatenaria de 19 o 20 nucleótidos, protuberancias de dos nucleótidos en los extremos 3' y 5'-trifosfato (Zamore, Tuschl et al., *Cell*. 31 de marzo de 2000; 101 (1): 25-33; Elbashir, Lendeckel et al. *Genes Dev*. 15 de enero de 2001;

15 (2): 188-200; Elbashir, Martinez et al. *EMBO J.* 3 de diciembre de 2001; 20 (23): 6877-88). De acuerdo con la invención, los iRNA no abarcan los microRNA.

Una serie de patentes y solicitudes de patente han descrito, en términos generales, el uso de las moléculas de siRNA que inhiben la expresión génica, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 99/32619. El tratamiento basado en interferencia por ARN mediante siRNA y shRNA también se detalla en la revisión de Z. Wang et al., *Pharm. Res.* (2011) 28: 2983-2995.

El siRNA o el shRNA normalmente se diseñan contra una región de 19 a 50 nucleótidos detrás del codón iniciador de la traducción, mientras que normalmente se evitan la UTR (región sin traducir) en 5' y la UTR en 3'. La secuencia diana del siRNA o shRNA elegida debe someterse a una búsqueda con BLAST en una base de datos de EST para asegurarse de que sólo actuará selectivamente sobre el gen deseado. Diferentes productos están disponibles en el mercado para ayudar en la preparación y el uso del siRNA o del shRNA.

En una realización preferida, la molécula de RNAi es un siRNA de al menos aproximadamente 10 a 40 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos.

El siRNA o el shRNA puede comprender ARN que se produce en la naturaleza, ARN sintético o ARN producido por medios recombinantes, así como ARN alterado que difiere del ARN que se produce en la naturaleza por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como en el extremo de la molécula o a uno o varios nucleótidos internos del siRNA, lo que incluye modificaciones que hacen el siRNA resistente a la digestión de las nucleasas.

Algunos ácidos nucleicos inhibidores de la dinamina 2 están disponibles en el mercado. Se pueden citar, por ejemplo, pero sin limitarse a ellos: Abnova-Novus Biologicals, RNAi de la dinamina 2 con las referencias: H00001785-R05-H00001785-R08; Santa Cruz Biotechnology, siRNA de la dinamina II (h) con la referencia: sc-35236, Dinamina II (h)-PR con la referencia: sc-35236-PR, plásmido con el shRNA de la dinamina II (h) con la referencia: sc-35236-SH, partículas lentivíricas con el shRNA de la dinamina II (h) con la referencia: sc-35236-V).

En una realización concreta, la molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente con la dinamina 2 es un ácido nucleico que interfiere específicamente con al menos una parte de la secuencia completa del ADNc de la dinamina 2 del músculo de humano (tal y como se muestra en la SEQ ID n.º 1, variante 1 de transcrito (NM_001005360.2) (exón 10a, 13ter) con 12b añadido). De acuerdo con esta realización y más específicamente, la molécula de RNAi es un siRNA o un shRNA de al menos aproximadamente 10 a 40 nucleótidos de longitud, preferiblemente iRNA con aproximadamente 15 a 30 nucleótidos. En una realización particular, el siRNA o el shRNA actúa selectivamente sobre al menos un exón del ARNm de la dinamina 2 y más específicamente al menos uno de los exones 1, 4, 5, 12b, 13, 15, 17 y 21 del ARNm de la dinamina 2.

En una realización particular, la molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente con la dinamina 2 comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- secuencia de iRNA de SEQ ID n.º 2: 5'- AAGGACATGATCCTGCAGTTCAT - 3' (o shRNA seq n.º C de más abajo),

-secuencia de iRNA de SEQ ID n.º 3: 5'- AAGAGGCTACATTGGCGTGGTGA- 3',

- secuencia de iRNA de SEQ ID n.º 4: 5'- AGGTGGACACTCTGGAGCTCTCC - 3',

- secuencia de iRNA de SEQ ID n.º 5: 5'- AAGAAGTACATGCTGCCTCTGGA - 3',

- secuencia de iRNA de SEQ ID n.º 6: 5'- AACGTCTACAAGGACCTGCGGCA - 3',

- secuencia de iRNA de SEQ ID n.º 7: 5'- AGGAGAACACCTTCTCCATGGAC - 3',

- secuencia de iRNA de SEQ ID n.º 8: 5'- AACTGTTACTATACTGAGCAG - 3',

- secuencia de iRNA de SEQ ID n.º 9: 5'- TGCCAACTGTTACTATACT - 3',

- secuencia de iRNA de SEQ ID n.º 10: 5' - GAAGAGCTGATCCCGCTGG - 3',

- secuencia de iRNA de SEQ ID n.º 11: 5' - GCACGCAGCTGAACAAGAA - 3',

- secuencia de iRNA de SEQ ID n.º 12: 5'-GGACTTACGACGGGAGATC-3',

- secuencia de iRNA de SEQ ID n.º 13: 5' -GGATATTGAGGGCAAGAAG-3',

- secuencia de iRNA de SEQ ID n.º 14: 5'-GGACCAGGCAGAAAACGAG-3',

- secuencia de iRNA del shRNA 15: 5'- GCGAATCGTCACCACTTAC-3'.

| shRNA contra DNM2 | Secuencia diana | Exón destinatario de Dnm2 | SEQ ID n.º: |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------|
| A | AACCGCGGGATGGAAG AGCT | 1 | 16 |
| B | AACTTGACCCTCATCG ACCTC | 4 | 17 |
| C | AAGGACATGATCCTGC AGTTCAT | 4 | 2 |
| D | TCGGTGTTCATCACCAA GCT | 5 | 18 |
| E | TGCCAACTGTTTCTATA CT | 12b | 19 |
| F | AACTGTTTCTATACTGA GGAG | 12b | 20 |
| G | TTTCTATACTGAGGAG CTGGT | 12b | 21 |
| H | GCACGCAGCTGAACAA GAA | 13 | 22 |
| I | AAGAAGTACATGCTGC CTCTGGA | 15 | 23 |
| J | AACACCTTCTCCATGG ACCC | 17 | 24 |
| K | CCATTATCCGCCCAGC CGAGC | 21 | 25 |

5 También se puede utilizar el ácido nucleico antisentido para hacer disminuir la expresión de la dinamina 2. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a todo o a parte de un ácido nucleico sentido que codifica la dinamina 2, por ejemplo, complementario a la hebra codificante de una molécula de ADNc bicatenario o complementaria a una secuencia de ARNm, y se cree que interfiere con la traducción del ARNm deseado. Los ácidos nucleicos antisentido utilizados en la invención interfieren específicamente con la expresión de la dinamina 2.

10 De acuerdo con una realización, el ácido nucleico antisentido es una molécula de ARN complementaria a un ARNm deseado que codifica la dinamina 2.

De acuerdo con otra realización, el nucleótido antisentido representa una secuencia de ácido nucleico monocatenario, bien ADN o ARN, que es complementaria a una parte de un pre-ARNm que codifica la dinamina 2. En concreto, el nucleótido antisentido de la presente invención está diseñado para bloquear un sitio aceptor de ajuste (AA) y/o un potenciador del ajuste exónico (PAE) y/o un punto de ramificación en el pre-ARNm de la dinamina 2 y/o cualquier secuencia que podría modular el ajuste del pre-ARNm, a saber, se diseña para ser complementario a una parte del pre-ARNm de la dinamina 2 que comprende un AA, un PAE, una secuencia del punto de ramificación o cualquier secuencia que podría modular el ajuste del pre-ARNm. Más específicamente, el nucleótido antisentido se utiliza para inducir el escape del exón dentro de un pre-ARNm de la dinamina 2, gracias a lo cual se genera un cambio de marco que produce un ADNc truncado que contiene un codón de parada prematuro en el ARNm resultante. Así pues, esta estrategia permite reducir la cantidad de la proteína DNM2. En una realización concreta, el nucleótido antisentido se utiliza para inducir el escape del exón dentro de un pre-ARNm de la dinamina 2. Por ejemplo, el nucleótido antisentido implementado está diseñado para que induzca específicamente el escape del exón 2 o del exón 8. En una realización concreta, el nucleótido antisentido de la presente invención es capaz de inducir la inclusión de un codón de parada prematuro en el ARNm de la DNM2 de humano. El escape del exón 2 o del exón 8 se demostró que conducía a una ausencia de la proteína dinamina 2 (tal y como se menciona en «Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy». Cowling B. S., Chevremont T., Prokic I., Kretz C., Ferry A., Coirault C., Koutsopoulos O., Laugel V., Romero N. B., Laporte J., *J Clin Invest.* 3 de marzo de 2014; 124 (3): 1350-63. doi: 10.1172/JCI71206. Epub de 24 de febrero de 2014; y Tinelli E., Pereira J. A., Suter U. *Hum Mol. Genet.* 1 de noviembre de 2013; 22 (21): 4417-29. doi: 10.1093/hmg/ddt292. Epub de 27 de junio de 2013).

En una realización concreta, el nucleótido antisentido está diseñado para inducir específicamente el escape del exón 2 o del exón 8 de DNM2 y comprende o consiste en una de las siguientes secuencias:

U7-Ex2 (escape de la diana en el exón 2 de DNM2 con un snRNA U7 antisentido) que comprende la secuencia siguiente:

5 SEQ ID n.º 26: GTCACCCGGAGGCCTCTCATTCTGCAGCTC

U7-Ex8 (escape de la diana en el exón 8 de DNM2 con un snRNA U7 antisentido), que comprende la secuencia siguiente:

SEQ ID n.º 27: ACACACTAGAGTTGTCTGGTGGAGCCCCGCATCA

10 Un ácido nucleico antisentido puede tener, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. En concreto, las moléculas de ARN antisentido suelen tener de 15 a 50 nucleótidos de longitud. Un ácido nucleico antisentido para ser usado en la invención se puede construir mediante síntesis química y reacciones de ligación enzimática con el uso de los procedimientos conocidos en la técnica. En concreto, el ARN antisentido se puede sintetizar químicamente, producirse mediante la transcripción *in vitro* a partir de moldes lineales (p. ej., productos de PCR) o circulares (p. ej., vectores víricos o no víricos), o producirse mediante la transcripción *in vivo* desde vectores víricos o no víricos. El ácido nucleico antisentido se puede modificar para mejorarle la estabilidad, la resistencia a las nucleasas, la especificidad por la diana, y para mejorarle las propiedades farmacológicas. Por ejemplo, el ácido nucleico antisentido podría incluir nucleótidos modificados y/o esqueleto diseñado para incrementar la estabilidad física de la doble cadena formada entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido.

20 En el contexto de la invención, las «ribozimas» son moléculas de ARN catalítico con actividad ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un ARNm, con el cual tiene una región complementaria. Así pues, las ribozimas se pueden utilizar para escindir catalíticamente los ARNm transcritos de manera que se inhibe la traducción de la proteína codificada por el ARNm. Las moléculas de ribozima específicas de la dinamina 2 funcional se pueden diseñar, producir y administrar mediante los métodos que se suelen conocer en la técnica (véase, p. ej., Fanning y Simmons (2006) «RNA Towards Medicine» (*Handbook of Experimental Pharmacology*), ed. Springer, págs. 289-303).

La edición del genoma también se puede utilizar como una herramienta acorde con la invención. La edición del genoma es un tipo de ingeniería genética en la que el ADN se inserta, se reemplaza o se retira de un genoma mediante el uso de nucleasas manipuladas de manera artificial, o «tijeras moleculares». Las nucleasas crean una rotura bicatenaria (DSB, por su nombre en inglés) específica en las posiciones deseadas del genoma y dañan los mecanismos endógenos de la célula para reparar la rotura inducida mediante procesos naturales de recombinación homóloga (RH) y de unión de extremos no homólogos (NHEJ, por su nombre en inglés). En la actualidad hay cuatro familias de nucleasas manipuladas genéticamente que se pueden utilizar: nucleasas con dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), el sistema CRISPR/Cas (más específicamente el sistema Cas9, como describen P. Mali et al., en *Nature Methods*, vol. 10., n.º 10, octubre de 2013) o endonucleasas de asentamiento remanipuladas a partir de meganucleasas manipuladas genéticamente. Dichas nucleasas se pueden administrar a las células como ADN o bien como ARNm, tales ADN o ARNm están manipulados genéticamente para que actúen selectivamente sobre el gen de DNM2, de acuerdo con la invención. De acuerdo con una realización, el inhibidor de la dinamina 2 es un ADN o un ARNm manipulado genéticamente para que actúe selectivamente sobre el gen de DNM2 y para que introduzca las nucleasas mediante el uso del tratamiento de edición del genoma, o es una nucleasa manipulada genéticamente para que actúe selectivamente sobre *DNM2* mediante el uso del tratamiento de edición del genoma.

Los nucleótidos que están definidos más arriba que se usan de acuerdo con la invención se pueden administrar en forma de precursores de ADN o de moléculas que los codifican.

45 Para el uso *in vivo*, los nucleótidos de la invención se pueden estabilizar mediante modificaciones químicas, tales como modificaciones del esqueleto de fosfatos (p. ej., enlaces fosforotioato). Los nucleótidos de la invención se pueden administrar en forma libre (desnudos) o mediante el uso de sistemas de administración que mejoran la estabilidad y/o la acción selectiva, p. ej., liposomas, o se pueden incorporar en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, microesferas bioadherentes o vectores proteínicos, o en combinación con un péptido catiónico. Pueden también acoplarse a un péptido biomimético que penetra en las células. También se pueden administrar en forma de sus precursores o los ADN que los codifican. Las versiones estabilizadas químicamente de los nucleótidos también incluyen «morfolinos» (morfolino oligómeros de fosfordiamidato, PMO), oligómeros 2'-O-metilados, PMO etiquetado con el péptido AcHN-(RXRRBR)2XB (R, arginina, X, ácido 6-aminohexanoico y B, ®-alanina) (PPMO), triciclo-ADN, o ARN nucleares pequeños (sn, por su nombre en inglés). Las últimas formas de nucleótidos que se pueden utilizar para este efecto son moléculas de ARN nucleares pequeños que incluyen U1, U2, U4, U4atac, U5, U7, U11 y U12 (u otras snRNP de tipo U), preferiblemente el snRNA U7 (tal y como se identificó más arriba para las SEQ ID n.ºs 26 y 27), en concreto, en combinación con un método de transferencia vírica basado en, pero sin limitarse a ellos, lentivirus, retrovirus o

dependovirus. Todas estas técnicas se conocen bien en la técnica.

La molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente con la expresión de la dinamina 2 de la invención se puede administrar *in vivo* sola o asociada a un vector. En el sentido más amplio, un «vector» es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del nucleótido a las células y, preferiblemente, en donde las células expresan DNM2. Preferiblemente, el vector transporta el nucleótido a las células con reducción de la degradación respecto al grado de degradación que se obtendría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, plásmidos, fagémidos, virus y otros vehículos procedentes de fuentes víricas o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o la incorporación de los nucleótidos de la invención. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, pero sin limitarse a ellas, secuencias de ácido nucleico de los virus siguientes: lentivirus tal como el VIH-1, retrovirus, tal como el virus de la leucemia murina de Moloney, adenovirus, dependovirus; virus de tipo SV40; virus del herpes tal como el HSV-1 y el virus de la variolovacuna. Se pueden utilizar con facilidad otros vectores que no se nombran en la presente memoria, pero que son conocidos en la técnica. Entre los vectores que se han validado para aplicaciones clínicas y que se pueden utilizar para administrar los nucleótidos, los lentivirus, retrovirus y dependovirus (AAV, por su nombre en inglés *adeno-associated virus*) muestran un mayor potencial para la estrategia de escape de exones.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «anticuerpo» se usa para referirse en sentido amplio a cualquier agente de fijación inmunológico, tal como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y anticuerpo humanizado o quimérico. En determinadas realizaciones, se prefieren IgG y/o IgM porque son los anticuerpos más frecuentes en la situación fisiológica y son los más fáciles de fabricar. El término «anticuerpo» se utiliza para hacer referencia a cualquier molécula de tipo anticuerpo que tiene una región de fijación a antígeno e incluye fragmentos de anticuerpos, tales como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos con un único dominio (AcUD), Fv, scFv (Fv de cadena única) y similares. Se conoce bien en la técnica la tecnología para preparar y utilizar diferentes construcciones basadas en anticuerpos y fragmentos. Los medios para preparar y caracterizar los anticuerpos se conocen bien en la técnica (véase, p. ej., Harlow, E. y Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, ed., Cold Spring Harbor Laboratory).

Un anticuerpo «humanizado» es un anticuerpo en el que la región flanqueante constante y variable de una o varias inmunoglobulinas humanas está fusionada con la región de fijación, p. ej., la CDR, de una inmunoglobulina de animal. Los anticuerpos «humanizados» que se contemplan en la presente invención son anticuerpos quiméricos de ratón, rata u otras especies, que llevan dominios de regiones constantes y/o variables de humano, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos recombinantes o genéticamente manipulados y fragmentos de los mismos. Tales anticuerpos humanizados están diseñados para mantener la especificidad de la fijación del anticuerpo no humano del cual proceden las regiones de fijación, a la vez que evitan una reacción inmunitaria contra el anticuerpo no humano.

Un anticuerpo «quimérico» es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante o una porción de la misma está alterada, remplazada o intercambiada de tal manera que el sitio de fijación del antígeno (región variable) está conectado a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferentes o alteradas, o a una molécula completamente diferente que le confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, p. ej., una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable o una porción de la misma, está alterada, remplazada o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

Los anticuerpos dirigidos contra la dinamina 2 están disponibles en el mercado, tales como los anticuerpos vendidos o hechos por Novus Biologicals: números de catálogo: anticuerpo contra la dinamina 2 NB300-617, anticuerpo contra la dinamina 2 NBP2-16244, anticuerpo contra la dinamina 2 (6C9) H00001785-M01, por Santa Cruz Biotechnology: número de catálogo: sc-81150, sc-6400, sc-166525, sc-166669, sc-166526, por BD-Biosciences: anti-DNM2 (ac de ratón, 610264) o por IGBMC-IIIkirch: anti-DNM2: R2679, R2680, R2865, R2866, R2640 o R2641.

En otra realización concreta, el inhibidor de la dinamina 2 es una molécula pequeña que inhibe la actividad enzimática o función de la dinamina 2.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «actividad, expresión o función de la molécula pequeña que inhibe la dinamina 2» hace referencia a una molécula pequeña que puede ser un compuesto orgánico o inorgánico, que suele tener menos de 1000 Da, con la capacidad para inhibir o reducir la actividad, expresión o función de la dinamina 2. Esta molécula pequeña puede proceder de cualquier organismo conocido (entre ellos pero sin limitarse a ellos, animales, plantas, bacterias, hongos y virus) o de una colección de moléculas sintéticas. Las moléculas pequeñas que inhiben la actividad, expresión o función de la dinamina 2 se pueden identificar con el método descrito en este documento.

Los inhibidores de la dinamina se describen en Harper C. B. et al., *Trends Cell Biol.* Febrero de 2013; 23 (2): 90-101. Revisión. En una realización concreta, tal molécula se selecciona del grupo que consiste en:

- Dynasore (un compuesto semicarbazónico y permeable a las células que es inhibidor no competitivo de la dinamina 1 y de la dinamina 2: n.º de CAS 304448-55-3), su nombre químico es (3,4-dihidroxibencilideno)hidrazida de ácido 3-hidroxinaftaleno-2-carboxílico,

-Hydroxy-Dynasore (un inhibidor muy potente de la dinamina 2 (CI_{50} = 2,6 μ M)) (el Hydroxy-Dynasore es un análogo hidroxilado y permeable a las células del inhibidor de la dinamina, Dynasore: n.º CAS 1256493-34-1), su nombre químico es 3-hidroxi-*N'*-[(2,4,5-trihidroxifenil)metilideno]naftaleno-2-carbohidrazida,

5 - Bromuro de tetradeciltrimetilamonio (n.º CAS 1119-97-7), vendido con el nombre MitMAB™ (ab120466) por Abcam (un inhibidor de la dinamina 1 y la dinamina 2 permeable a las células (CI_{50} = 8,4 μ M para la inhibición de la dinamina II)). Actúa selectivamente sobre el dominio con homología de la pleckstrina (PH) (de fijación de los lípidos). Inhibe la endocitosis de las vesículas sinápticas y mediadas por el receptor (CI_{50} = 2,2 μ M),

10 - Phthaladyn-23 (un compuesto del ftalimida permeable a las células que está descrito que inhibe la actividad GTPasa de la dinamina 2 (CI_{50} = 63 μ M)), el nombre químico de la Phthaladyn-23 es ácido 4-cloro-2-((2-(3-nitrofenil)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1*H*-isoindol-5-carbonil)-amino)-benzoico,

-Dynole 34-2, es un inhibidor V de la dinamina (scbt.com) y actúa sobre la actividad GTPasa, es no competitivo para el GTP, el nombre químico del Dynole 34-2 es 2-ciano-*N*-octil-3-[1-(3-dimetilaminopropil)-1*H*-indol-3-il]acrilamida,

- M-divi 1 (inhibidor de la división mitocondrial, CI_{50} = 10 μ M) (scbt.com), el nombre químico de M-divi 1 es 3-(2,4-dicloro-5-metoxifenil)-2-sulfanilquinazolin-4(3*H*)-ona,

15 - Iminodyn-22/17 (scbt.com) (Iminodyn 22: CI_{50} = 390 nM cuando actúa sobre un sitio alostérico de la GTPasa y muestra antagonismo no competitivo con respecto al GTP), el nombre químico de Iminodyn-22 es *N,N'*-(propano-1,3-diil)bis(7,8-dihidroxi-2-imino-2*H*-cromeno-3-carboxamida), el nombre químico de Iminodyn-17 es *N,N'*-(etano-1,2-diil)bis(7,8-dihidroxi-2-imino-2*H*-cromeno-3-carboxamida).

-OcTMAB, a saber, bromuro de octadeciltrimetilamonio, (abcam.com), actúa selectivamente sobre el dominio PH,

20 - Péptido inhibidor de la dinamina (Tocris Biosciences 1774): con la secuencia de aminoácidos: QVPSRPNRAP

- Dyngo-4a (CI_{50} = 2,5 μ M), actúa sobre un sitio alostérico de la GTPasa, el nombre químico de Dyngo-4a es 3-hidroxi-*N'*-[(2,4,5-trihidroxifenil)metilideno]naftaleno-2-carbohidrazida,

25 - RTIL-13 (CI_{50} = 2,3 μ M), es un soporte de norcantaridina que actúa selectivamente sobre el dominio PH, el nombre del compuesto químico RTIL-13 es bromuro de 4-(*N,N*-dimetil-*N*-octadecil-*N*-etil)-4-aza-10-oxatriciclo-[5.2.1]decano-3,5-diona.

Usos de los inhibidores de la dinamina 2

La invención se refiere a un método para tratar una miopatía centronuclear mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la dinamina 2, tal y como está definido más arriba, a los pacientes que lo necesitan, y a los usos de tal inhibidor de la dinamina 2 en el tratamiento de una miopatía centronuclear. También se refiere al uso de un inhibidor de la dinamina 2 para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una miopatía centronuclear. Se refiere a un inhibidor de la dinamina 2 para ser usado en el tratamiento de una miopatía centronuclear.

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la dinamina 2 y, optativamente, un vehículo farmacéuticamente aceptable, en concreto para ser usado en el tratamiento de una miopatía centronuclear.

En una realización concreta de la invención, la enfermedad que se ha de tratar se selecciona del grupo que consiste en MCN ligada al cromosoma X (MCN-LX), la MCN autosómica recesiva (MCN-AR) y la MCN autosómica dominante (MCN-AD). En una realización preferida más específica, la miopatía centronuclear es la MCN-LX (también denominada miopatía miotubular) o la MCN-AR. En otra realización específica, la miopatía centronuclear es una miopatía centronuclear debido a mutaciones en BIN1, y dicha enfermedad puede ser una miopatía centronuclear recesiva o bien dominante.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «cantidad terapéuticamente eficaz» se pretende que sea una cantidad de un agente terapéutico que, administrado a un paciente, es suficiente para constituir un tratamiento de una miopatía centronuclear. En una realización concreta, la cantidad terapéuticamente eficaz a administrar es una cantidad suficiente para reducir la expresión, actividad o función de la dinamina 2 hasta un nivel igual o preferiblemente inferior al nivel normal. El nivel normal es la expresión, actividad o función de la dinamina 2 de sujetos que no presentan miopatías centronucleares (tal y como se muestra en la figura 1, por ejemplo). La cantidad de inhibidor de la dinamina 2 a administrar se puede determinar mediante el procedimiento estándar bien conocido por los expertos en la técnica. Los datos fisiológicos del paciente (p. ej., edad, altura y peso), las vías de administración y la enfermedad a tratar se deben tener en cuenta para determinar la dosis adecuada, optativamente comparada con sujetos que no presentan miopatías centronucleares. El experto en la técnica reconocerá que la cantidad de inhibidor de la dinamina 2 o de un vector que contiene o expresa el ácido nucleico que interfiere específicamente con la expresión de la dinamina 2 a administrar será una cantidad que es suficiente para inducir la mejoría de los síntomas indeseados de la miopatía centronuclear. Tal cantidad puede variar, entre otras cosas,

según factores tales como el inhibidor de la dinamina 2 seleccionado, el sexo, la edad, el peso, el estado físico del paciente, etc., y se puede determinar caso por caso. La cantidad puede variar también según otros componentes de un protocolo de tratamiento (p. ej., administración de otros medicamentos, etc.). Por lo general, cuando el inhibidor de la dinamina 2 es un ácido nucleico, una dosis idónea está en el margen de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, y con más frecuencia de aproximadamente 2 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg. Si se elige una administración del ácido nucleico basada en virus, las dosis idóneas dependerán de diferentes factores, tales como el virus que se emplea, la vía de administración (intramuscular, intravenosa, intraarterial u otra), pero típicamente puede oscilar de 10^{-9} a 10^{-15} partículas víricas por kilogramo. Si el inhibidor es una molécula pequeña que inhibe la actividad, expresión o función de la dinamina 2, cada dosis unitaria puede contener, por ejemplo, de 2 a 300 mg/kg de masa corporal, en particular de 5 a 100 mg/kg de masa corporal. Si el inhibidor es un anticuerpo, cada dosis unitaria puede contener, por ejemplo, de 0,1 a 20 mg/kg de masa corporal, en particular de 4 a 10 mg/kg de masa corporal. Los expertos en la técnica reconocerán que tales parámetros suelen utilizarse con normalidad durante los ensayos clínicos. Además, los expertos en la técnica reconocerán que, aunque los síntomas de la enfermedad se pueden aliviar completamente mediante los tratamientos descritos en la técnica, este puede no ser el caso. Incluso un alivio parcial o intermitente de los síntomas puede ser un beneficio grande para el destinatario. Además, el tratamiento del paciente puede ser un solo acontecimiento, o el paciente recibe varias veces la administración del inhibidor de la dinamina 2, que pueden estar, según los resultados obtenidos, separadas por varios días, separadas por varias semanas o separadas por varios meses o incluso separadas por varios años.

La composición farmacéutica de la invención está formulada de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar (véase, p. ej., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (20.^a ed.) ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York) conocidas por los expertos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas posibles incluyen las idóneas para la administración oral, rectal, intravaginal, mucosa, tópica (entre ellas, transdérmica, yugal y sublingual) o parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial e intradérmica). Para estas formulaciones, el excipiente convencional se puede usar según las técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

Más en concreto, para dar a conocer un efecto terapéutico localizado, se prefieren las vías de administración musculares específicas. En particular, se prefiere la administración intramuscular.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden formular para que liberen prácticamente todo el fármaco activo de manera inmediata tras la administración o en cualquier momento o periodo de tiempo predeterminado después de la administración.

Dentro del contexto de la invención, el término «tratamiento» denota un tratamiento curativo, sintomático y preventivo. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «tratamiento» de una enfermedad se refiere a cualquier acto que pretende extender la esperanza de vida de los sujetos (o pacientes), tal como el tratamiento y retraso de la progresión de la enfermedad. El tratamiento se puede diseñar para erradicar la enfermedad, parar la progresión de la enfermedad y/o favorecer la regresión de la enfermedad. El término «tratamiento» de una enfermedad también se refiere a cualquier acto que pretenda disminuir los síntomas relacionados con la enfermedad, tales como la hipotonía y la debilidad muscular. Más específicamente, el tratamiento de acuerdo con la invención pretende retrasar la aparición de los fenotipos o síntomas de la miopatía centronuclear, mejorar el comportamiento motor y/o muscular y/o la esperanza de vida, en particular mediante el rescate de la organización intracelular de las miofibrillas, lo que incluye la organización de las miofibrillas, la estructura de tríadas y/o el posicionamiento de los núcleos.

El sujeto (o paciente) a tratar es cualquier mamífero, preferiblemente un ser humano. Preferiblemente, el sujeto es un paciente humano, cualquiera que sea su edad o sexo. Los recién nacidos, los lactantes y los niños están también incluidos.

Detección selectiva de los inhibidores de la dinamina 2

La presente invención también se refiere a un método para identificar o cribar moléculas útiles para el tratamiento de una miopatía centronuclear, preferiblemente la MCN-LX, basándose en la capacidad que tienen tales moléculas para inhibir la expresión, actividad y/o función de la dinamina 2.

En concreto, la invención se refiere a un método de detección selectiva que comprende las etapas de:

a) dar a conocer u obtener un compuesto candidato; y

b) determinar si dicho compuesto candidato inhibe la actividad, función y/o expresión de la dinamina 2,

c) en donde la capacidad de dicho compuesto candidato para inhibir la expresión, función o actividad de dicha dinamina 2 indica que dicho compuesto candidato es indicativo de su utilidad para el tratamiento de la miopatía centronuclear.

El compuesto candidato a analizar en el marco de este método puede ser de cualquier naturaleza molecular, por ejemplo, puede corresponder a una molécula química (preferiblemente una molécula pequeña), un anticuerpo, un péptido, un polipéptido, un aptámero, un siRNA, un shRNA, un snRNA, un oligonucleótido sentido o antisentido, o una ribozima.

- 5 La capacidad que dicho compuesto candidato tiene para inhibir la expresión, actividad o función de la dinamina 2 podría analizarse mediante el uso de cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los identificados más arriba o los descritos en los ejemplos.

El método para el cribado o la identificación de una molécula idónea para el tratamiento de las miopatías centronucleares puede optativamente comprender la etapa de administrar *in vivo* o *in vitro* la molécula seleccionada en un modelo de animal no humano con miopatía centronuclear o en una parte del mismo (tejido o células, tales como tejido o células musculares) y analizar el efecto sobre la aparición o progresión de la miopatía.

Como modelos de animales no humanos con miopatía centronuclear se pueden citar los ratones KO sin el exón 4 de *Mtm1*, ratones con genosustitución R69C en *Mtm1*, atrapamiento génico de *Mtm1* Taconic (*Mtm1^{gt/y}*), ratones con genosustitución R465W en *Dnm2*, labrador retriever mutado en *Mtm1*, gran danés mutado en *bin1*, o ratones como los utilizados en los ejemplos que vienen a continuación.

Los ejemplos que vienen a continuación se ofrecen con el propósito de ilustrar, y no para limitar.

Ejemplos

Ejemplo 1

20 Materiales. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpos monoclonales de ratón contra la subunidad DHPR α_1 (Cav1.1) (MA3-920; Affinity Bioreagents), α -actinina (EA-53, Sigma-Aldrich), caveolina 3 (clon 26, BD Biosciences), desmina (Y-20; Santa Cruz Biotechnology) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, MAB374; Chemicon); y anti-RYR1 de conejo (una amable donación de Isabelle Marty, Instituto Grenoble de Neurociencias, Francia). Los anticuerpos anti-DNM2 de conejo (R2680 y R2865, caracterizados en Cowling, B. S. et al., 2011, Increased expression of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness *Am. J. Pathol* 178: 2224-2235. Increased expression of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness *Am. J. Pathol* 178: 2224-2235) y anti-MTM1 (R2827) (Hnia, K. et al., 2011. «Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle». *J. Clin Invest.* 121: 70-85) se fabricaron en IGBMC (Francia). Los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa se compraron a Invitrogen. Los anticuerpos secundarios contra la IgG de ratón y de conejo, conjugados a la peroxidasa de rábano picante (HRP), se compraron a Jackson ImmunoResearch Laboratories. Se compraron los siguientes productos: tinción nuclear de Hoechst (B2883, Sigma-Aldrich), kit de reacción quimioluminiscente ECL (Pierce), LipofectamineTM (Life Technologies), reactivo Tri (Molecular Research Center, Ohio, EE.UU.), kit SYBR Green 1 Master (Roche Diagnostics), kit de transcripción inversa miScript (Qiagen), ensayos con cebador específicos para miScript (Qiagen) y un kit de PCR con Sybr Green para miScript (Qiagen). Las biopsias de los pacientes de control AHJ38 (1,5 meses) y 39 (3,4 meses), la biopsias de MCN-LX con las mutaciones MTM1 utilizadas eran AHJ35 (15 días) (MTM1 – intrón 11-10A > GS420_R421innaFIG) y AHJ36 (1m) (MTM1-c.445-49_445-4del), 1 (MTM1-p.Leu213Pro) y 15 (MTM1-p.Ileu466dup) y el paciente 12129/89 (MTM1-p.Val49PhefsX6, sin publicar).

40 Generación de ratones heterocigotos para *Dnm2*. El vector para la acción selectiva se creó con el exón 8 de *Dnm2* flanqueado por los sitios LoxP (figura 10), a continuación se linealizó y se electroporó en las células madre embrionarias (ES). Las células ES recombinantes se inyectaron en blastocistos C57BL/6 que se implantaron en hembras pseudoembarazadas y se determinó la transmisión de las líneas germinales. Los ratones criados y analizados eran de la cepa 129pas (promotor del CMV).

45 Generación de ratones heterocigotos para *Mtm1*-*ly* y *Dnm2*. La creación y caracterización de los ratones *Mtm1*-*ly* se describió anteriormente (Buj-Bello, A. et al. 2002. «The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but no for myogenesis in mice». *Proc. Natl Acad Sci USA* 99: 15060-15065; Al-Qusairi, L. et al., 2009, «T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase». *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 18763-18768). Las ratonas hembra de la cepa 129pas heterocigotas para *Mtm1* se cruzaron con ratones macho heterocigotos para *Dnm2* para producir los cuatro genotipos posibles en la descendencia de machos: *Mtm1*+/*ly* *Dnm2*+/+ (WT); *Mtm1*+/*ly* *Dnm2*+/- (*Dnm2*+/-); *Mtm1*-*ly* *Dnm2*+/+ (citado como *Mtm1*-*ly*) y *Mtm1*-*ly* *Dnm2*+/- . Todos los ratones analizados eran machos.

55 Generación de ratones *Mtm1*-*ly* *Dnm2*^{skm+/-} y *Mtm1*-*ly* *Dnm2*^{(i)skm+/-}. Los ratones C57BL/6 con α -actina de músculo esquelético humano (HSA-Cre) y los ratones HSA Cre-ER^{T2} procedían del IGBMC (Francia) (Shuler, M. et al. 2005. «Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse». *Genesis* 41: 165-170; Miniou P et al., 1999. «Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage». *Nucleic Acids Res* 27: e27). Los ratones *Dnm2*+/- con sitios LoxP se cruzaron con ratones HSA-Cre y HSA Cre-ER^{T2} para producir ratones *Dnm2*^{skm+/-} y *Dnm2*^{skm(i)+/-} positivos para Cre, respectivamente. Los ratones macho *Dnm2*^{skm+/-} o *Dnm2*^{(i)skm+/-} se

cruzaron con ratonas hembra *Mtm1*^{+/-}. Se analizó la descendencia macho con los genotipos siguientes; carril 1: *Mtm1*^{+/y} *Dnm2*^{+/+} (WT), *Mtm1*^{-/y} *Dnm2*^{+/+} (*Mtm1*^{-/y}), *Mtm1*^{-/y} *Dnm2*^{skm+/-}; y carril 2: ratones inducibles con tamoxifeno *Mtm1*^{+/y} *Dnm2*^{+/+} (WT), *Mtm1*^{-/y} *Dnm2*^{+/+} (*Mtm1*^{-/y}), *Mtm1*^{-/y} *Dnm2*^{+/-} HSA-Cre-ER^{T2} (*Mtm1*^{-/y} *Dnm2*^{(i)skm+/-}). Para inducir la escisión de *Dnm2* después del nacimiento, los ratones de 3 semanas de edad recibieron una inyección con 1 mg de tamoxifeno (concentración de 1 mg/100 µl), cada día durante 3 días. Todos los ratones se sacrificaron a las 16 semanas de edad. Todos los ratones analizados eran machos, 50% de ratones de la cepa 129pas (*Mtm1*^{-/y}) y 50% de la cepa C57BL/6 (promotor HSA).

Experimentos con animales. Los animales se alojaron en una habitación con la temperatura controlada (19 a 22 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h. Los ratones se pesaron cada semana hasta el año de edad. Los ratones se sacrificaron por compasión cuando era necesario por inhalación de CO₂ seguido de luxación cervical, de acuerdo con las legislaciones nacionales y europeas sobre experimentación animal. Los músculos y otros tejidos se diseccionaron (músculo TA con anestesia cuando se necesitó para la MET) y se congelaron en isopentano enfriado con nitrógeno y nitrógeno líquido para los ensayos histológicos y de inmunotransferencia, respectivamente.

Fenotipado de los ratones *Dnm2*^{+/-}. Ratones macho y hembra heterocigotos para *Dnm2* con 10 a 15 semanas de edad se fenotiparon con el programa de fenotipado EUMODIC (<http://www.eumodic.eu>) y los resultados se hicieron públicos (<http://www.europenome.org>). El análisis bioquímico de la sangre, las mediciones del ECG, el escáner densitométrico y las pruebas de electromiografía presentados aquí para los ratones macho (n = 10 por grupo) se realizaron como parte de las líneas de proceso 1 y 2 del programa de fenotipado EUMODIC, en el Instituto Clínico del Ratón (ICS, Illkirch, Francia, <http://www.ics-mci.fr/>).

Pruebas de la cuerda, de prensión (2 y 4 patas), de suspensión, del cilindro giratorio y de huella plantar. Prueba de la cuerda: los ratones se cuelgan de un alambre por las patas delanteras y se deja que durante 20 segundos suban las patas traseras al alambre. Se realizaron tres intentos por ratón, con 5 min de reposo entre los intentos. Una caída se consideró que equivalía a 20 segundos (n = mínimo 5 ratones por grupo). Pruebas de fuerza prensil: se realizaron colocando las 2 patas delanteras o las 4 patas sobre la malla de un dinamómetro (Bioseb, Chaville, Francia) y a los ratones se les tiró de la cola en la dirección contraria. Se registró la fuerza máxima ejercida por el ratón antes de perder la prensión. Se realizaron tres intentos por ratón, con un reposo de 30 segundos entre los intentos (prueba con 2 patas, n = mínimo 5 ratones por grupo; prueba con 4 patas, n = 5 a 7 ratones por grupo). Prueba de suspensión: se suspendió a los ratones de un barrote de la jaula durante un máximo de 60 segundos. Se anotó el tiempo que tardó el ratón en caerse de la jaula en cada intento. Se realizaron tres intentos por ratón. Prueba del cilindro giratorio: se analizaron la coordinación y la fuerza muscular de todo el cuerpo y la predisposición al agotamiento con una prueba del cilindro giratorio acelerado (Panlab, Barcelona, España). Los ratones se colocaron en el cilindro que se aceleró de 4 a 40 rpm durante 5 minutos. Se realizaron tres intentos al día, con un descanso de 5 minutos entre los intentos del día 1 (día de entrenamiento), y luego los 4 días que se registraron. Se puntuó a los animales por su latencia a la caída (en segundos). La media de los tres intentos se calculó para cada experimento recogido más arriba (n = 5 a 7 ratones por grupo). Prueba de la huella plantar: las patas traseras de los ratones se recubrieron con tinta que no era tóxica y se dejó que los ratones caminaran por un túnel (50 cm de largo, 9 cm de ancho, 6 cm de alto) cuyo suelo estaba revestido con un papel. A continuación, se midió el ángulo entre las patas traseras a partir del patrón de huellas plantares que se generó, mediante el uso del programa del análisis ImageJ. Se analizaron un mínimo de 6 huellas plantares por ratón (n = 5 a 8 ratones por grupo).

Mediciones del pletismógrafo. Se utilizó la prueba para medir el patrón de respiración espontánea en los ratones sin estimular y sin restricciones, y se realizó con un pletismógrafo barométrico de todo el cuerpo (EMKA Technologies) en el ICS, Illkirch, Francia (n = 3 a 5 ratones por grupo).

Propiedades contráctiles del músculo TA. Se evaluaron las mediciones de la fuerza muscular mediante la medición *in situ* de la contracción isométrica del músculo en respuesta a la estimulación del nervio y del músculo, tal y como está descrito anteriormente (Cowling, B. S. et al., 2011 *Am J Pathol* 178: 2224-2235, Vignaud, A. et al. 2005, *Exp. Physiol* 90: 487-495; Vignaud, A. et al. *J. Biomed Biotechnol.* 2010: 724914). Se muestran los resultados de la estimulación del nervio (n = 5 a 11 ratones por grupo). Se midió el agotamiento como el tiempo que tarda en alcanzar un 50% de la fuerza máxima producida. Después de las mediciones de la contracción, se sacrificaron los animales mediante luxación cervical. Se diseccionaron entonces los músculos TA y se pesaron para determinar la fuerza máxima específica.

Propiedades contráctiles del músculo diafragma. Se valoró la contracción isométrica del diafragma sobre tiras musculares de la parte ventral del diafragma costal, tal y como está descrito previamente (50). Brevemente, se diseccionaron *in situ* dos tiras musculares por ratón. Cada músculo se montó en una cámara de tejidos que contenía una solución de Krebs-Henseleit. La solución se burbujeó con una mezcla gaseosa de O₂ al 95% y CO₂ al 5%, y se mantuvo a 27 °C y pH 7,4. Los extremos musculares se sujetaron con pinzas de muelle y se conectaron a un transductor de fuerza electromagnética. Las tiras de diafragma se estimularon eléctricamente por medio de dos electrodos de platino colocados en paralelo al músculo y que administran estimulación eléctrica de una duración de 1 ms. Se determinó la curva de fuerza por frecuencia. Se consiguió una fuerza máxima absoluta con una frecuencia de estimulación de 100 Hz en una cadena que duraba 400 ms. Al final del experimento, se calculó cada área transversal muscular (en mm²) a partir de la relación de la masa muscular por la longitud muscular óptima (Lo), suponiendo una densidad muscular de 1,06. La fuerza máxima isométrica total se normalizó por área transversal

para obtener la tensión total en $\text{mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ ($n = 3$ a 5 ratones por grupo).

Inmunotransferencia. Los músculos de ratón se trocearon y se homogeneizaron en hielo durante 3×30 s (homogeneizador Ultra Turrax) en 10 veces el peso/volumen del tampón Tris-Cl con NP-40 al 1%, pH 8, y luego se extrajeron durante 30 min a 4°C . Se determinó la concentración de proteínas con un kit de ensayo de proteínas DC (Bio-Rad Laboratories) y los lisados se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western en una membrana de nitrocelulosa. Los anticuerpos primarios utilizados fueron DNM2-R2680 (1:500), DNM2-R2865 (1:500), MTM1-R2827 (1:500) y GAPDH (1:10.000); los anticuerpos secundarios fueron anticonejo conjugado a HRP o antirrón conjugado a HRP (1:10.000). Se escanearon las películas de la inmunotransferencia de tipo Western y se determinó la intensidad de la banda con el programa informático ImageJ (Rasband, W. S., ImageJ, Instituto Nacional de Salud de los EE. UU., Bethesda, Maryland, EE. UU., <http://rsb.info.nih.gov/ij>, 1997-2009). Los valores de la densitometría se normalizaron por los correspondientes valores de GAPDH total y se expresaron como una diferencia de veces con respecto al control listado ($n = 5$ a 7 ratones por grupo).

Análisis por qRT-PCR. Se extrajo el ARN total de lisados del músculo esquelético tibial anterior de 8 semanas de edad con el reactivo Tri (Molecular Research Center, Ohio, EE. UU.) y la transcripción inversa y la amplificación se realizaron con los cebadores OligodT. A continuación, se realizó la RT-PCR cuantitativa en tiempo real con un termociclador Lightcycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, Francia) con cebadores para DNM2 (cebador directo CCAACAAAGGCATCTCCCT (SEQ ID. 28); cebador inverso TGGTGAGTAGACCCGAAGGT (SEQ ID n.º 29) y el ARNm de GAPDH como estándar, con el kit SYBR Green 1 Master (Roche Diagnostics). Los resultados se normalizaron por los correspondientes valores de GAPDH total y se expresaron como una diferencia de veces con respecto a los controles de las crías WT de la misma camada ($n = 2$ a 3 ratones por grupo, realizado por triplicado).

Análisis del músculo esquelético por histología y por inmunofluorescencia. Se prepararon criocortes longitudinales y transversales ($8\ \mu\text{m}$) de los músculos esqueléticos de ratón, se fijaron y se tiñeron con los anticuerpos contra DHP α 1 (1:100), RYR1 (1:200), α -actinina (1:1.000), caveolina 3 (1:1.000), DNM2-R2680 (1:200), MTM1-R2827 (1:200) y desmina (1:100). Los núcleos se detectaron por cotinción con Hoechst (Sigma-Aldrich) durante 10 min. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal de barrido con láser (TCS SP5; Leica Microsystems, Mannheim, Alemania). Se fijaron los cortes transversales secados al aire y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) o succinato deshidrogenasa (SDH), y se realizó la adquisición de imágenes con un escáner deslizante NanoZoomer 2 HT equipado con el módulo de fluorescencia L11600-21 (Hamamatsu Photonics, Japón) o con un microscopio DMRXA2 (Leica Microsystems GmbH). El área del corte transversal (ACT) se analizó en los cortes de HE del músculo esquelético TA de ratón con el uso del programa informático de análisis de imágenes FIJI. Se calculó la ACT (μm^2) (>500 fibras por ratón) a partir de 4 a 7 ratones por grupo. El porcentaje de fibras del músculo TA con núcleos centralizados o internalizados se contó en >500 fibras de 4 a 6 ratones con la ayuda del módulo contador de células en el programa informático de análisis de imágenes ImageJ.

Microscopia electrónica de transmisión. Los ratones se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de 10 μl por gramo corporal de ketamina (20 mg/ml, Virbac, Carros, Francia) y xilazina (0,4%, Rompun, Bayer, Wuppertal, Alemania). Las biopsias de músculo TA se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón de cacodilato a 0,1 M (pH 7,2) y se procesaron tal y como está descrito previamente (Buj-Bello, A. et al., 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99: 15060-15065; Cowling, B. S. et al. 2011, *Am J. Pathol*, 178: 2224-2235). Se identificaron las estructuras de tríadas en los cortes longitudinales del músculo y se cuantificó el número de tríadas por sarcómero. La relación de tríadas por sarcómero se calculó dividiendo el número de tríadas claramente identificado por el número total de sarcómeros presentes en la imagen, tal y como está descrito previamente (Amoasii, L. et al. 2012 *PLoS Genet* 8: e1002965). Se contaron de 40 a 80 tríadas por ratón.

Microscopia y análisis estadístico. Toda la microscopia se realizó en el centro de imágenes del IGBMC. Todas las muestras para la microscopia se montaron en el reactivo Fluorsave (Merck) y se visualizaron a temperatura ambiente. La microscopia óptica se realizó con un microscopio de fluorescencia (DM4000; Leica Microsystems) equipado con una cámara CCD de color (Coolsnap cf colour, Photometrics). La microscopia confocal se realizó con un microscopio confocal de barrido con láser (TCS SP2 o SP5; Leica Microsystems, Mannheim, Alemania). Los programas informáticos de análisis ImageJ y FIJI se utilizaron para el análisis de las imágenes. El análisis estadístico se realizó con la prueba de la t de Student sin emparejar a menos que se mencione de otra manera. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Autorización del estudio. La experimentación animal fue autorizada por el comité ético institucional Com'Eth IGBMC-ICS (2012-128). Todas las biopsias humanas se utilizaron después de obtener el consentimiento informado.

RESULTADOS

Creación y caracterización de los ratones heterocigotos para *Dnm2* (*Dnm2*^{+/-}). La genosupresión constitutiva de *Dnm2* se demostró anteriormente que era letal al principio de la embriogénesis (Ferguson, S. M. et al., 2009. «Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits». *Dev. Cell* 17: 811-822). Se crearon ratones genosuprimidos para *Dnm2* (*Dnm2*^{-/-}) actuando selectivamente sobre el exón 8 de *Dnm2* (figura 10) (véase el apartado métodos para más detalles). De 100 crías, no identificamos ningún ratón *Dnm2*^{-/-}.

/-, lo que confirma que *Dnm2*^{-/-} es mortal para el embrión. Las crías heterocigotas (*Dnm2*^{+/-}) se identificaron como se esperaba a partir de las relaciones de herencia mendeliana y estas crías se analizaron adicionalmente con el programa de fenotipado EUMODIC (para conocer más detalles, véase el apartado de métodos y <http://www.eumodic-eu/>). El análisis químico básico de la sangre no indicó ninguna diferencia entre los ratones de tipo silvestre (WT) y los heterocigotos (*Dnm2*^{+/-}) para las concentraciones de urea (lo que indica una función renal normal), calcio (homeostasia osmótica) y colesterol total (lo que indica ausencia de enfermedad cardiovascular) (figura 11A). Las mediciones de ECG normales sugerían que la actividad eléctrica no estaba alterada en el corazón (figura 11B). En conjunto, no había ninguna diferencia evidente en la masa corporal (figura 11C) ni ninguna diferencia en el tejido magro ni en el contenido de grasa entre los ratones WT y *Dnm2*^{+/-} (figura 11D). A continuación, se realizaron las pruebas básicas de la función muscular. Una prueba por electromiografía no reveló ninguna diferencia en la velocidad de conducción de un único nervio (VCUN) (figura 11E). La masa del músculo tibial anterior (TA) era parecida entre los ratones WT y *Dnm2*^{+/-} (figura 11F), y no se detectó ninguna diferencia en la fuerza máxima específica o absoluta ni en la predisposición al agotamiento del músculo TA (figura 11G-I), lo que indica en conjunto que los ratones *Dnm2*^{+/-} son clínica y fisiológicamente iguales a los ratones WT, sin ninguna diferencia detectable en la función muscular.

Cantidad de DNM2 en la miopatía centronuclear ligada al cromosoma X. Antes de investigar el potencial terapéutico de la disminución de DNM2 en la MCN-LX, se comprobó la cantidad de proteína DNM2 mediante inmunotransferencia de tipo Western de lisados musculares en los pacientes con MCN-LX (figura 1A). Se identificó un incremento de 1,5 veces de la expresión de la proteína DNM2 a partir de las cinco biopsias analizadas del músculo neonatal en la MCN-LX cuando se compararon con las biopsias de control emparejadas por la edad (figura 1B). A continuación, se determinó si el incremento de la expresión de DNM2 también se observaba en un modelo animal con MCN-LX. En este estudio, se utilizaron los ratones *Mtm1*^{-/-} que se caracterizaron anteriormente y que reprodujeron fielmente la MCN-LX (Buj-Bello, A. et al., 2002 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15060-15065; Al-Qusairi, L. et al., 2009, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 18763-18768; Amoasii, L. et al., 2012, *PLoS Genet* 8: e1002965). Los lisados del músculo TA de ratones *Mtm1*^{-/-} de 5 semanas de edad mostraban un incremento significativo de la cantidad de DNM2 en comparación con las crías de la misma camada de los controles WT (figura 1C-D), lo que sugiere que el incremento de DNM2 está conectado con el fenotipo de MCN-LX. En el músculo diafragma también se observó un incremento de la expresión de DNM2 (figura 1E-F) y este músculo aparecía afectado desde el punto de vista histológico, con más fibras atroficas que contienen núcleos mal localizados (figura 1G). Este hallazgo sugiere que la insuficiencia respiratoria es una causa de muerte para los ratones *Mtm1*^{-/-}.

La reducción de la expresión de DNM2 prolonga enormemente la esperanza de vida de los ratones *Mtm1*^{-/-}. La reducción de DNM2 a nivel genético al 50% en los ratones *Dnm2*^{+/-} no tenía ningún impacto clínico ni fisiológico. Para analizar si la reducción de la expresión de la dinamina 2 puede rescatar la MCN ligada al cromosoma X debido a las mutaciones de *MTM1*, los ratones *Mtm1*^{+/-} se cruzaron con los ratones *Dnm2*^{+/-} para producir descendencia de machos que son *Mtm1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-}. La mayoría de los ratones *Mtm1*^{-/-} se murieron entre los 1 y 3 meses de edad, tal y como ya se había descrito (Buj-Bello, A. et al. 2002 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15060-15065), mientras que el 100% de los ratones *Mtm1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} sobrevivieron durante al menos un año (figura 2A), sin ninguna diferencia significativa en la masa corporal en comparación con los ratones WT (figura 2B), lo que indica que la reducción de la expresión de DNM2 puede rescatar la letalidad precoz observada en los ratones *Mtm1*^{-/-}. Los ratones *Mtm1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} que no se sacrificaron tienen ahora más de 2 años de edad. A las 8 semanas de edad, cuando cerca del 60% de los ratones *Mtm1*^{-/-} aún seguían vivos, los ratones *Mtm1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} resultaban indistinguibles de los ratones WT tras la inspección general, mientras que los ratones *Mtm1*^{-/-} mostraban una disminución significativa del movimiento y de la actividad.

Se realizaron los análisis de inmunotransferencia de tipo Western en los lisados de varios músculos a diferentes edades para determinar la cantidad de proteína DNM2 que se expresaba. En el músculo diafragma, la cantidad de la proteína DNM2 se redujo aproximadamente al 50% en los ratones *Dnm2*^{+/-} y los *Mtm1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} en comparación con los ratones WT, tal y como se esperaba, a las 8 semanas (8 s) y a los 6 meses (6 m) de edad (figura 2C). Los ratones *Mtm1*^{-/-} mostraban un incremento de DNM2 en el diafragma en comparación con los ratones WT a las 8 semanas, en concordancia con los resultados de los ratones de 5 semanas de edad (figura 1F). En los músculos gastrocnemio (figura 2D), tibial anterior (figura 2E) y sóleo (figura 2F) se observó la misma tendencia a las 8 semanas, 16 semanas y 6 meses (figura 14). Así pues, la cantidad de DNM2 aumenta de manera coherente en los ratones *Mtm1*^{-/-} y se reduce de manera coherente en los diferentes músculos a diferentes edades de los ratones *Dnm2*^{+/-} y *Mtm1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} en comparación con los ratones WT.

Para determinar si la variación de la expresión de la proteína DNM2 se debe a la alteración de la síntesis de proteínas, se realizó el análisis de qRT-PCR en lisados de los músculos TA de 8 semanas. La cantidad de ARNm de *Dnm2* en ambos ratones *Dnm2*^{+/-} y *Mtm1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} se redujo significativamente en comparación con los ratones WT y *Mtm1*^{-/-} (figura 2G), lo que se correlaciona con la expresión de la proteína DNM2 (figura 2E). Resulta interesante que no se observara ningún incremento significativo de la expresión del ARNm de *Dnm2* en los lisados del músculo *Mtm1*^{-/-} en comparación con los ratones WT, lo que indica que el incremento de la expresión de la proteína DNM2 en el músculo *Mtm1*^{-/-} se puede deber a un incremento de la estabilización de DNM2 o a la reducción de la degradación, en vez de a un incremento de la transcripción.

Ya que el músculo TA era uno de los músculos más afectados en los ratones *Mtm1-ly*, la localización de MTM1 y DNM2 se investigó mediante inmunofluorescencia en el músculo TA de los ratones de 8 semanas de edad. El disco Z, identificado mediante la tinción de la α -actinina, apareció relativamente intacto (figura 12A). La DNM2 se colocalizó con la α -actinina en el disco Z y apareció relativamente inalterada en los ratones *Mtm1-ly* y *Mtm1-ly Dnm2+/-* (figura 12A). Tal y como se esperaba, la miotubularina apenas era detectable en los ratones *Mtm1-ly* y en los *Mtm1-ly Dnm2+/-* (figura 12B). En conjunto, la reducción de la expresión de DNM2 rescata la esperanza de vida y la masa corporal de los ratones *Mtm1-ly* hasta el nivel del tipo silvestre.

La atrofia muscular de los ratones *Mtm1-ly* se rescata al reducir la expresión de DNM2. Para analizar adicionalmente el efecto de la reducción de la expresión de DNM2 en los ratones *Mtm1-ly*, se midió la masa de diferentes músculos. La contracción rápida del músculo gastrocnemio estaba atrofiada en los ratones *Mtm1-ly*, pero no se observó ninguna atrofia en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* hasta 1 año de edad (figura 2H). Al igual que otros músculos de contracción rápida, el músculo ELD y el músculo plantar no presentaron ninguna atrofia en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* hasta el año de edad en comparación con los ratones WT (figura 13A-B). El músculo TA, que había sido el más caracterizado en los ratones *Mtm1-ly*, mostraba una fuerte atrofia en los ratones *Mtm1-ly* en comparación con los *Mtm1-ly Dnm2+/-*, WT y *Dnm2+/-* de 8 semanas de edad (figura 2I). La masa del TA de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* era indistinguible de la de los ratones WT a esta edad. A las 16 semanas de edad, a diferencia de los ratones *Mtm1-ly*, los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* todavía seguían vivos (figura 2A) y presentaban cierta atrofia del TA en comparación con los ratones WT y *Dnm2+/-*, lo que indica que se retrasa la atrofia del TA en los *Mtm1-ly Dnm2+/-*. Resulta interesante que la contracción lenta del músculo sóleo mostraba atrofia en los ratones *Mtm1-ly* de 8 semanas de edad mientras que no había atrofia en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* de hasta 1 año de edad en comparación con los ratones WT (figura 2J). Se observaron resultados parecidos cuando se midió la masa muscular total con respecto a la masa corporal (figura 13C-E). No se observó ninguna diferencia en la masa del hígado ni del corazón entre los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* y WT (figura 13F-G). Por lo tanto, la atrofia muscular se rescató totalmente en los músculos gastrocnemio y sóleo, y se retrasó fuertemente en el músculo TA después de la reducción de la expresión de DNM2 en los ratones *Mtm1-ly*.

Los rasgos histológicos de las MCN se rescatan enormemente en los ratones *Mtm1-ly* al reducir la expresión de DNM2. La MCN se presenta histológicamente con núcleos internos mal localizados e hipotrofia de las fibras musculares. Se analizaron dos puntos temporales principales: temprano (8 semanas de edad), cuando la mayoría de los ratones *Mtm1-ly* todavía están vivos, y tardío (16 semanas de edad [16 s]), cuando el 95% de los ratones *Mtm1-ly* han muerto. A las 8 semanas de edad en los *Mtm1-ly*, el músculo TA mostraba la mala localización de los núcleos característica (figura 3A-F), reducción del tamaño de las fibras (figura 3A-D) y tinción anormal con SDH con acumulaciones subsarcolémicas y centrales (figura 3A). El músculo TA de los *Mtm1-ly Dnm2+/-* era similar al de los ratones WT y *Dnm2+/-* desde el punto de vista histológico, tal y como se observó para los músculos gastrocnemio y sóleo (figura 13H-I) con solo unas pocas fibras anormales en la tinción con SDH (figura 3A). Se rescató la hipotrofia de las fibras y los núcleos internos y centrales se redujeron significativamente en comparación con los ratones *Mtm1-ly* (figura 3A, D, F). Además, se redujeron las acumulaciones de membrana en torno al núcleo (figura 3B). Hacia las 16 semanas de edad, el fenotipo del músculo TA de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* era mixto, ya que algunas áreas parecían sanas y otras zonas se parecían a los ratones *Mtm1-ly* a las 8 semanas de edad, con hipotrofia de las fibras musculares, mala localización de los núcleos y tinción anormal con SDH (figura 3C, E, F). Luego se analizó la localización de la desmina, un compañero de fijación de MTM1 que se demostró que estaba perturbada en los ratones *Mtm1-ly* (Hnia, K. et al. 2011. *J Clin Invest.* 121: 70-85). Los ratones *Mtm1-ly* mostraban una fuerte alteración de la localización de la desmina, que apenas se observó en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* (figura 15A), lo que indica que se recuperó la localización normal de la desmina en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* de 8 semanas de edad. En conjunto, estos resultados indican que la presentación del fenotipo de MCN en los diferentes músculos en los ratones *Mtm1-ly* se rescata o se retrasa enormemente mediante la reducción de la expresión de la proteína dinamina 2.

La reducción de la expresión de DNM2 mejora la fuerza muscular y el funcionamiento de los ratones *Mtm1-ly*. Se realizaron diferentes pruebas para determinar si la reducción de la expresión de DNM2 rescata el fenotipo funcional de los ratones *Mtm1-ly* además del fenotipo histológico. La prueba de la cuerda requiere que los ratones que están colgados por las patas delanteras suban y mantengan las patas traseras en la barra. Mientras que los ratones *Mtm1-ly* se cayeron de la cuerda en varios intentos y eran incapaces de realizar la prueba a las 8 semanas de edad, los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* realizaron la prueba del mismo modo que los ratones WT y *Dnm2+/-* (figura 4A), lo que indica un rescate de la fuerza de todo el cuerpo a esta edad. Se midió la fuerza máxima absoluta y la específica (con respecto a la masa muscular) a las 8 y 16 semanas de edad en el músculo TA. Con 8 semanas de edad, los ratones *Mtm1-ly* mostraban una fuerza muscular máxima absoluta y específica extremadamente débil, mientras los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* realizaron la prueba de igual manera que los ratones WT y *Dnm2+/-* (figura 4B-C). A las 16 semanas de edad, se redujo la fuerza máxima del músculo TA de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-*, en concordancia con los datos histológicos. Además, no se observó ningún cambio en la predisposición al agotamiento a las 8 semanas de edad; sin embargo, a las 16 semanas, el músculo TA se agotaba más rápido que en los controles (figura 4D). En particular, desde los puntos de vista histológico y fisiológico, los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* de 16 semanas funcionaban mejor que los ratones *Mtm1-ly* a las 8 semanas, lo que indica que la progresión de la enfermedad fue más lenta o bien que se recuperaron algunas, pero no en todas, las fibras musculares, según venía indicado por el fenotipo mixto observado en la histología del músculo TA de 16 semanas de edad. Se reducen la

atrofia global y la disminución de la fuerza muscular máxima del músculo TA en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* y se retrasa enormemente en comparación con los ratones *Mtm1-ly*.

Mejoría de la ultraestructura muscular en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-*. Lo siguiente fue determinar si se había rescatado la ultraestructura del músculo de los *Mtm1-ly Dnm2+/-*. Se realizó la microscopia electrónica de transmisión (MET) en el músculo TA de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* de 8 y 16 semanas de edad. El aspecto del TA de los *Mtm1-ly Dnm2+/-* de 8 semanas de edad se parecía al de los ratones WT y *Dnm2+/-*, con alineamiento de los discos Z y sarcómeros, y sin ninguna anomalía estructural mitocondrial obvia, mientras que el músculo de los *Mtm1-ly* mostraba una forma anormal de las mitocondrias, acumulaciones anormales de membranas y alineamiento incorrecto de los discos Z, y una alteración de la anchura de la miofibrilla (figura 5A). Cabe destacar que el músculo de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* de 16 semanas de edad era heterogéneo, algunas regiones aparecían sanas (figura 5B, abajo a la izquierda), mientras que otras áreas aparecían alteradas (abajo a la derecha). Además, las anomalías mitocondriales eran detectables en algunas regiones de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* de 16 semanas de edad, que no eran evidentes a las 8 semanas de edad. Esto apoya los resultados histológicos y fisiológicos anteriores, lo que indica que el fenotipo de la MCN en el músculo TA de los *Mtm1-ly Dnm2+/-* está rescatado de forma parcial, a pesar de que esté sustancialmente rescatado en diferentes momentos del tiempo.

La estructura de las tríadas está normalizada en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-*. Un rasgo común compartido entre los pacientes con MCN y los modelos de animales de MCN es una alteración de la estructura y de la posición de las tríadas dentro del músculo esquelético (Toussaint, A. et al. 2011. «Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies». *Acta Neuropathol* 121: 253-266; Dowling, J. J. et al., 2009. «Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy». *PLoS Genet* 5: e1000372; al-Qusairi, L. et al. 2009. «T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase». *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 106: 18763-18768; Beggs et al., 2010. «MTM1 mutation associated with X-linked myotubular myopathy in Labrador Retrievers». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 14697-14702). Para determinar si la estructura de las tríadas estaba afectada en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-*, se examinó la localización de los marcadores de las tríadas mediante inmunomarcación. El DHPR α , un canal del calcio dependiente del voltaje hallado en los túbulos T de los músculos maduros, se localizó en estructuras salpicadas dentro de las miofibrillas del TA de los ratones WT y *Dnm2+/-*, en concordancia con la localización de los túbulos T (figura 15B). Sin embargo, se perdió esta tinción específica en el músculo de los *Mtm1-ly*, lo que indica una alteración seria de los túbulos T. En el músculo de los *Mtm1-ly Dnm2+/-*, el DHPR α se localizó igual que en el músculo de WT y de *Dnm2+/-*, lo que sugiere el rescate de las estructuras de los túbulos T en estos ratones. Esto se confirmó mediante cortes del músculo teñidos para detectar el receptor de la rianodina (RyR1), un canal del calcio localizado específicamente en el retículo sarcoplásmico de las tríadas. Las imágenes transversales mostraban un rescate de la localización de RyR1 en la mayoría de las fibras de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-*, en donde solo unas pocas fibras muestran acumulaciones de RyR1 tal y como se observa ampliamente en los ratones *Mtm1-ly* (figura 6A). En las imágenes longitudinales se observó un doblete de tinción de RyR1 en torno al disco Z (marcado con α -actinina) en el músculo de WT y *Dnm2+/-* en concordancia con la localización de las tríadas. Esta tinción en el músculo de los *Mtm1-ly* quedó gravemente alterada y se rescató parcialmente en el músculo de los *Mtm1-ly Dnm2+/-*. Para analizar adicionalmente las tríadas, se tomaron imágenes de MET de muchos aumentos de los ratones de 8 semanas de edad. Se observó una fuerte desorganización de las estructuras de los túbulos T/tríadas en los ratones *Mtm1-ly* en comparación con los ratones WT y *Dnm2+/-*, mientras que las tríadas bien posicionadas eran visibles con claridad en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* (figura 6B). El análisis de las tríadas confirmó que no había ninguna diferencia en el número de tríadas por sarcómero en los ratones WT, *Dnm2+/-* o *Mtm1-ly Dnm2+/-*, mientras que los ratones *Mtm1-ly* mostraban una reducción del número de tríadas por sarcómero (figura 6C). Así pues, se rescató la localización y la estructura de las tríadas en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* de 8 semanas de edad.

La caveolina 3 se halla en los túbulos T durante el desarrollo y la regeneración musculares, mientras que, en el músculo maduro, la caveolina 3 está localizada principalmente en el sarcolema (revisado en Miniou, P. et al., 1999. «Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage». *Nucleic Acids Res* 27: e27). Para determinar si la localización de la caveolina 3 está alterada en los ratones *Mtm1-ly* y los *Mtm1-ly Dnm2+/-*, se tiñeron los cortes transversales del músculo con un anticuerpo contra la caveolina 3. Mientras que el músculo de los ratones WT y *Dnm2+/-* mostraba una localización de la caveolina 3 en el sarcolema tal y como se esperaba, muchas fibras de los ratones *Mtm1-ly* mostraban una patrón de tinción interna muy fuerte de la caveolina 3 (figura 6D). Este fenotipo se rescató en buena parte en el músculo de los *Mtm1-ly Dnm2+/-*, en los que solo unas fibras esporádicas mostraban una localización interna de la caveolina 3.

Fenotipo fisiológico a largo plazo de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-*. La MCN-LX presenta una debilidad muscular muy seria en los pacientes y letalidad en los ratones *Mtm1-ly* en menos de 1 a 3 meses; sin embargo, la reducción de la expresión de la dinamina 2 en estos ratones rescató la esperanza de vida y mejoró enormemente la fuerza muscular al cabo de 8 y 16 semanas. El fenotipo de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* en los últimos puntos temporales se determinó que valoraba el grado de función muscular compatible con una esperanza de vida normal. Los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* con 6 y 12 meses de edad eran capaces de moverse y realizar tareas básicas. Los ratones ancianos *Mtm1-ly Dnm2+/-* tenían un aspecto parecido al de los ratones WT (figura 7A), pero caminaban con las patas traseras apuntando hacia afuera. Esto se cuantificó mediante la colocación de las patas traseras en tinta y la medición del ángulo que forman las patas traseras al caminar (figura 16A; figura 7B). Este rasgo no progresaba desde los 6 a 12 meses de edad, ya que los resultados eran similares cuando se medían a ambas edades. Para

determinar la fuerza máxima global de la pata de estos ratones, se realizó la prueba de la fuerza prensil de la pata con un dinamómetro. Cuando se midieron solo las dos patas delanteras, no se observó ninguna diferencia entre los ratones WT o *Mtm1-ly Dnm2+/-* durante los primeros 12 meses (figura S7B). Cuando se midieron las cuatro patas, se observó una pequeña reducción de la fuerza en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* en comparación con los ratones WT, tanto a los 6 meses como a los 12 meses de edad (figura 7C), lo que indica que las patas traseras de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* mostraba una reducción de la fuerza muscular máxima en comparación con los ratones WT, lo que no era progresivo. Se realizó la prueba del cilindro giratorio para la coordinación motora general, la fuerza y la resistencia, y no se observó ninguna diferencia a los 6 o 12 meses de edad (figura 7D), lo que confirmó que la coordinación general y la fuerza global de los *Mtm1-ly Dnm2+/-* no estaba alterada gravemente. La prueba de suspensión es una prueba extenuante que necesita que el ratón esté colgado de la tapa de la jaula durante 60 segundos. Los ratones *Mtm1-ly* gravemente afectados eran incapaces de realizar esta prueba al cabo de 1 mes (figura 7E). En cambio, los ratones ancianos *Mtm1-ly Dnm2+/-* eran capaces de realizar esta prueba hasta la última edad analizada de 12 meses, aunque era en un menor grado que los ratones WT y *Dnm2+/-* (figura 7E). Ya que los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* eran capaces de llevar a cabo con éxito las pruebas de fuerza motora básicas hasta los 12 meses de edad, concluimos que el fenotipo de la enfermedad no es progresivo con el tiempo y que se consiguen rescatar la esperanza de vida y una función motora básica.

Funcionamiento normal del diafragma a largo plazo en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-*. Se demostró que cada músculo parecía estar afectado de manera diferente en el modelo de MCN-LX de los *Mtm1-ly*, y que se rescatan diferencialmente mediante la reducción de DNM2 (figura 2C-J, figura 13). La principal preocupación para la longevidad de los pacientes con MCN-LX es el funcionamiento continuo del diafragma, ya que tienen una insuficiencia respiratoria potencialmente mortal (Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C. y Laporte, J. 2008. «Centronuclear (myotubular) myopathy». *Orphanet J Rare Dis.* 3: 26). Además, la histología del diafragma en los ratones *Mtm1-ly* de 5 semanas de edad está profundamente alterada (figura 1G). Así pues, se analizó el funcionamiento del músculo diafragma en los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* de 6 meses de edad. Se utilizó la prueba del pletismógrafo para medir el patrón de respiración espontánea en los ratones en las condiciones de reposo. Los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* funcionaron de manera similar a los ratones WT y *Dnm2+/-*, sin que se detectara ninguna diferencia significativa (figuras 17 y 7F). Se midió la fuerza máxima específica en las tiras aisladas del músculo diafragma. No se detectó ninguna diferencia significativa en la relación entre fuerza y frecuencia, aunque se observó una reducción de la fuerza máxima específica (figura 7G). Desde el punto de vista histológico, el músculo diafragma de los *Mtm1-ly Dnm2+/-* se parecía al músculo de los WT y *Dnm2+/-*, sin que se observara ninguna alteración importante en el posicionamiento de los núcleos ni en la fibrosis (figura 7H). El músculo diafragma de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* mantenía la reducción de la cantidad de proteína DNM2 en los ratones de 6 meses de edad (figura 2C), en comparación con los ratones *Mtm1-ly* en los que la cantidad de la proteína DNM2 había aumentado al cabo de 5 semanas (figura 1E-F) y 8 semanas (figura 2C). En conjunto, el músculo diafragma de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* era indistinguible del de los ratones de control, lo que apoya la mejoría fenotípica extensa de los fenotipos MCN-LX tras la reducción de DNM2.

La reducción de DNM2 específica de músculo es suficiente para rescatar el fenotipo y mejorar la esperanza de vida de los ratones *Mtm1-ly*. En este estudio, fuimos capaces de rescatar totalmente la esperanza de vida de los ratones *Mtm1-ly* y la mayoría de los rasgos clínicos e histológicos de la enfermedad con la reducción de la expresión de DNM2 *in utero* en todos los tejidos. Para comprobar si el rescate del fenotipo muscular es autónomo de la célula, se obtuvieron ratones con α -actina de músculo esquelético humano (HSA)-Cre y HSA Cre-ER^{T2} (Schuler, M. et al. 2005. «Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse». *Genesis* 41: 165-170), que se cruzaron con los ratones con *Dnm2* flanqueado por sitios LoxP para producir ratones herocigóticos *Dnm2^{skm+/-}* (Cre+) y *Dnm2^{(i)skm+/-}* (Cre-ER^{T2}). A continuación, estos ratones se cruzaron con ratones *Mtm1-ly* para producir la escisión específica de tejido de DNM2 en este contexto genético. Cuando se redujo la expresión de DNM2 en el músculo (*Mtm1-ly Dnm2^{skm+/-}*), el promotor de HAS activo desde 9 d. p. c. (Minioiu, P. et al. 1999 «Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage». *Nucleic Acids Res.* 27: e27), aumentó la esperanza de vida de los ratones *Mtm1-ly Dnm2^{skm+/-}*, en donde un 75% de los ratones sobrevivieron hasta al menos las 16 semanas de edad, mientras que ningún ratón *Mtm1-ly* sobrevivió hasta esta edad (figura 8A), en concordancia con los resultados de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* (figura 2A). Una cohorte de 4 ratones WT y 4 ratones *Mtm1-ly Dnm2^{skm+/-}* se mantuvo viva para el análisis futuro a largo plazo, y todos los ratones tienen en la actualidad de 9 a 12 meses de edad. También se observó un incremento concordante de la masa corporal en los ratones *Mtm1-ly Dnm2^{skm+/-}* en comparación con los ratones *Mtm1-ly* (figura 8B). No se observó ninguna diferencia en la masa del músculo gastrocnemio ni del sóleo entre los ratones *Mtm1-ly Dnm2^{skm+/-}* y los ratones WT (figura 8C). A las 16 semanas, cuando todas las crías de la misma camada *Mtm1-ly* habían muerto, el músculo TA de los ratones *Mtm1-ly Dnm2^{skm+/-}* mostraba cierta atrofia muscular, con una reducción de la masa muscular y del tamaño de las fibras en comparación con las crías WT de la misma camada, lo que se asoció a un incremento de los núcleos internos y centrales, y cierta tinción anormal con SDH (figura 8D-F), parecida a la del músculo TA de los ratones *Mtm1-ly Dnm2+/-* de 16 semanas de edad (figura 2). Estas alteraciones eran menos pronunciadas que las observadas en los ratones *Mtm1-ly* con 8 semanas de edad. Es importante señalar que el gastrocnemio y el sóleo no mostraban ninguna diferencia significativa en el tamaño de las fibras ni en la posición de los núcleos en comparación con los ratones WT (figura 18A-D), lo que indica que el fenotipo se rescata de manera diferente en los diferentes músculos. La cantidad de proteína DNM2 se midió en diferentes músculos a las 16 semanas y había una reducción significativa de la expresión de DNM2 en el diafragma, pero no en los otros músculos medidos en comparación con los ratones WT (figuras 8G, S9E-H). Los ratones *Mtm1-*

/y no estaban disponibles a esta edad para comparar la cantidad de DNM2 que se incrementa en los puntos de tiempo más tempranos en estos músculos (figura 2). Ya que el diafragma es un músculo vital que se necesita para respirar, la reducción de la expresión de DNM2 aquí puede ser importante para incrementar la supervivencia de los ratones *Mtm1*-/y *Dnm2*^{skm+/-}. La reducción de la expresión de DNM2 en el músculo diafragma en los ratones *Mtm1*-/y es crítica para rescatar la MCN-LX.

La reducción de DNM2 específica de músculo tras el nacimiento es suficiente para rescatar los ratones *Mtm1*-/y. Los ratones *Mtm1*-/y se cruzaron con los ratones *Dnm2*+/- con el sistema HSA-Cre-ER^{T2} para permitir la escisión de *DNM2* después del parto en el músculo, inducido por una inyección de tamoxifeno (Schuler M. et al. 2005. «Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse». *Genesis* 41: 165-170). Es importante señalar que se realizaron las inyecciones con tamoxifeno cuando los ratones tenían 3 semanas de edad, después de que comenzaran los síntomas como la atrofia muscular (figura 2) y los núcleos centralizados (Al-Qusairi, L. et al. 2009. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 18763-18768). El 70% de los ratones *Mtm1*-/y *Dnm2*^{(i)skm+/-} que recibieron la inyección sobrevivieron al menos hasta las 16 semanas de edad (figura 9A). Se observó una masa corporal más elevada en comparación con los ratones *Mtm1*-/y, aunque, a las 16 semanas de edad, el peso corporal seguía estando significativamente reducido en comparación con los ratones WT (figura 9B). No se observó ninguna diferencia en la masa normalizada de los músculos gastrocnemio, sóleo o TA en comparación con los ratones WT a las 16 semanas de edad (figura 9C), a diferencia de los ratones *Mtm1*-/y en momentos de tiempo más tempranos (figura 2). El análisis posterior del músculo TA de los ratones *Mtm1*-/y *Dnm2*^{(i)skm+/-} mostró cierta hipotrofia de las fibras (figura 9D-E) asociada a un incremento de los núcleos centrales e internos y una tinción anormal con SDH (figura 9D,F), similar a la del músculo TA de los ratones *Mtm1*-/y *Dnm2*+/- de 16 semanas (figura 3). Se observó una disminución de la expresión de la proteína DNM2 en el músculo gastrocnemio de los ratones *Mtm1*-/y *Dnm2*^{(i)skm+/-} de 16 semanas de edad en comparación con los ratones WT, aunque se observó un incremento de la expresión de la proteína DNM2 en los músculos TA y diafragma (figura 9G, figura S10). Estas diferencias se pueden deber a la eficacia diferencial de la escisión de *DNM2* tras la activación, mediada por el tamoxifeno, de la recombinasa Cre. El incremento en la expresión de DNM2 en el diafragma con 16 semanas de edad puede estar correlacionada con la reducción de la tasa de supervivencia de los ratones *Mtm1*-/y *Dnm2*^{(i)skm+/-} de 8 a 16 semanas de edad. Por lo tanto, se puede concluir que la reducción de la cantidad de DNM2 en el músculo después de nacer, a una edad en la que los *Mtm1*-/y están afectados, es suficiente para mejorar la esperanza de vida y el fenotipo de la MCN observado en los ratones *Mtm1*-/y.

Ejemplo 2

Los materiales y métodos son los mismos, o equivalentes, que los utilizados en el ejemplo 1.

Los ratones *Bin1*-/- constituyen un modelo de ratón para la MCN-AR y no sobreviven más de 24 horas desde que nacen.

La tabla 1 que viene a continuación muestra los resultados obtenidos con los ratones que tienen diferentes genotipos.

| Genotipo | Razón mendeliana esperada | Número de ratones observados | Razón observada |
|-----------------|---------------------------|------------------------------|-----------------|
| Tipo silvestre | 25% | 46 | 35% |
| <i>Bin1</i> +/- | 50% | 85 | 65% |
| <i>Bin1</i> -/- | 25% | 0 | 0% |

Tabla 1. Los ratones *Bin1*-/- se mueren perinatalmente. Recuento de genotipos unos pocos días después del nacimiento de varias crías de la misma camada obtenidas por el cruce de machos *Bin1*+/- con hembras *Bin1*+/-, y que muestra ausencia del genotipo *Bin1*-/-.

Para ilustrar que la disminución de DNM2 puede mejorar significativamente el fenotipo de un modelo de ratón para la MCN-AR (el ratón *Bin1*-/-), una disminución del 50% de la dinamina 2 en el ratón *Bin1*-/- puede rescatar con eficacia la letalidad precoz, lo que conduce a la supervivencia de los ratones *Bin1*-/- *Dnm2*+/- durante al menos 12 meses (figura 20), que tienen una masa corporal por debajo de la normal (figura 20) y unas normales fuerza muscular específica, resistencia al agotamiento, y comportamientos de fuerza y coordinación (figura 21). Las evaluaciones histológicas y la cuantificación muestran que los músculos de *Bin1*-/- *Dnm2*+/- tienen normales la forma y el tamaño de las fibras hasta al menos los 12 meses de edad, tinción oxidativa normal y un ligero incremento de núcleos centrales sin signos de una regeneración excesiva (figuras 22-23).

Así pues, la disminución de la DNM2 puede mejorar significativamente varias formas de la MCN en los ratones (la MCN-LX en los ratones *Mtm1*-/y y la MCN-AR en los ratones *Bin1*-/-).

Ejemplo 3

Materiales y métodos

Producción y purificación de AAV (dependovirus):

5 Los vectores AAV2/9 se generaron mediante una triple transfección de la línea celular AAV-293 con el inserto de pAAV2 que contiene el inserto bajo el control del promotor del CMV y flanqueado por repeticiones terminales invertidas del serotipo 2, pXR1 que contiene los genes *rep* y *cap* del serotipo 9 de AAV, y pHelper que codifica funciones cooperadoras del adenovirus. Los lisados celulares se sometieron a 3 ciclos de congelación y descongelación, luego se trataron con 50 U/ml de Benzonase® (Sigma) durante 30 minutos a 37 °C y se aclararon por centrifugación. Los vectores víricos se purificaron por ultracentrifugación en gradiente de yodixanol seguido de diálisis y concentración frente a solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco mediante el uso de filtros de centrifugación (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 30K, Millipore, Bedford). Las partículas físicas se cuantificaron por PCR en tiempo real con el uso de un plásmido estándar pAAV-eGFP, y los títulos se expresan como genomas víricos por mililitro (gv/ml). Los títulos de rAAV utilizados en estos experimentos fueron 5 a 7×10^{11} gv/ml.

15 Transducción de AAV a los músculos tibial anterior (TA) y gastrocnemio de ratones de tipo silvestre:

Los ratones 129PAS de tipo silvestre, macho, de 3 semanas de edad, se anestesiaron por inyección i.p. de 5 µl/g de ketamina (20 mg/ml; Virbac, Carros, Francia) y xilazina (0,4%, Rompun; Bayer, Wuppertal, Alemania). A los músculos de la pata izquierda se les inyectaron 25 µl de AAV2/9 shDnm2 n.º C, mientras a los músculos de la pata derecha se les inyectó la misma cantidad de AAV2/9 con la secuencia desordenada. Se alojó a los animales en una habitación con la temperatura controlada (19 °C a 22 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas. Los ratones se sacrificaron por inhalación de CO₂ seguido de la luxación cervical, de acuerdo con las legislaciones nacionales y europeas sobre experimentación con animales. Los músculos TA y gastrocnemio se diseccionaron 5 semanas después de la inyección, se pesaron y se congelaron en isopentano enfriado con nitrógeno y nitrógeno líquido para la histología.

25 Valoración histológica:

Se prepararon cortes transversales de 8 µm, se fijaron y se tiñeron con HE (hematoxilina y eosina). Se analizó el tamaño de las fibras a partir de los cortes con HE mediante el programa informático Fiji. El porcentaje de fibras del músculo TA con los núcleos centralizados e internados se contó con el módulo contador de células en el programa informático de análisis de imágenes Fiji. El área de las fibras se midió con el programa informático Fiji. Para cada muestra se contaron y se midieron más de 800 fibras.

Transfección de las células:

Las células HEK (de riñón embrionario de humano) se cotransfectaron con el plásmido que codifica el shDnm2 y el plásmido que codifica la isoforma específica del músculo hDNM2 (DNM2 de humano) con el uso de Lipofectamine 2000 comprada a Thermo Fisher Scientific. Los mioblastos de ratón C2C12 se electroporaron con el plásmido que codifica el shDnm2 con el uso del kit de Amaxa V Cell Line Nucleofector™ adquirido a Lonza.

Tabla 2: Secuencias y posibles dianas inespecíficas para el shRNA contra el gen *DNM2*.

El exón 12b del ARNm de la dinamina 2 tiene la secuencia siguiente:

SEQ ID n.º 30: 5' ctgttactat actgagcagc tggtagacctg 3',

o corresponde a la secuencia de proteína codificada SEQ ID n.º 31: (Cys Tyr Tyr Thr Glu Gln Leu Val Thr Cys).

40 Las secuencias destinatarias en DNM2 son 100% homólogas a las del *Dnm2* murino y del *DNM2* de humano. No hay genes inespecíficos que tengan una homología mayor del 80%, lo que descarta la disminución eficaz de las dianas inespecíficas.

Tabla 2

| ShRNA contra DNM2 | Secuencia diana | Exón destinatario en Dnm2 | Posible diana inespecífica en humano y % de homología | Posible diana inespecífica en ratón y % de homología |
|-------------------|------------------------|---------------------------|---|--|
| A | AACCGCGGGATGGAAG AGCT | 1 | Ceramida sintasa 2 (CERS2) 70% | Fosfatasa 1F (que contiene el dominio PP2C) (Ppm1f) 70% |
| B | AACTTGACCCTCATCG ACCTC | 4 | Homólogo a DnaJ (Hsp40), subfamilia C, miembro 2 (DNAJC2) 71% | Canal de potasio dependiente de voltaje, subfamilia G, miembro 1 (Kcng1) 76% |

| ShRNA contra DNM2 | Secuencia diana | Exón destinatario en Dnm2 | Posible diana inespecífica en humano y % de homología | Posible diana inespecífica en ratón y % de homología |
|-------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--|---|
| C | AAGGACATGATCCTGC AGTTCAT | 4 | Miosina 1E (MYO1E) 43% | Canal de potasio dependiente de voltaje, subfamilia G, miembro 1 (Kcng1) 52% |
| D | TCGGTGTGCATCACCA GCT | 5 | Dinamina 1, 73% | Miosina 1E (MYO1E) 78% |
| E | TGCCAACTGTTTCTATA CT | 12b | Proteína con varios dominios PDZ (MPDZ) 73% | Proteína 1 que interacciona con la foliculina (Fnip1) 73% |
| F | AACTGTTTCTATACTGA GGAG | 12b | GTP ciclohidrolasa 1 (GCH1) 76% | Protocadherina 17 (Pcdh17) 71% |
| G | TTTCTATACTGAGGAG CTGGT | 12b | Contenedora 1 de dominio THUMP, 71% | Proteína cinasa 2 de la familia WNK sin lisina (Wnk2) 71% |
| H | GCACGCAGCTGAACAA GAA | 13 | Tensina 3 (TNS3) 78% | Sustrato de la tirosina cinasa regulada por HGF (Hgs) 78% |
| I | AAGAAGTACATGCTGC CTCTGGA | 15 | Correpresor transcripcional 1 de la familia SKI (SKOR1) 69% | Dedo de zinc de tipo C3H1 (Zfc3h1) y contenedora 5A de dominio DENN/MADD (Dennd5a) 69% |
| J | AACACCTTCTCCATGG ACCC | 17 | GTP ciclohidrolasa 1 (GCH1) 80% | GTP ciclohidrolasa 1 (Gch1) 75% |
| K | CCATTATCCGCCAGC CGAGC | 21 | | |

Tabla 2

Resultados (figuras 24 a 30)

- 5 - Ejemplos de shRNA cuya diana específica está en la secuencia de DNM2 (figura 24) y que pueden hacer disminuir con eficacia la cantidad de dinamina 2 en las células HEK transfectadas (figura 25), en los mioblastos murinos C2C12 transfectados (figura 26), en el tibial anterior de los ratones de tipo silvestre a los que se ha inyectado un AAV que expresa un shRNA que actúa selectivamente sobre DNM2 (figura 27; AAGGACATGATCCTGCAGTTCAT: SEQ C o SEQ ID n.º 2).
- 10 - Ejemplos de una mejoría fenotípica en el modelo de ratón Mtm1-/y KO para la MCN-LX al cabo de 5 semanas de la inyección de un AAV que expresa un shRNA que actúa selectivamente sobre DNM2 (AAGGACATGATCCTGCAGTTCAT: SEQ C o SEQ ID n.º 2) en los músculos tibial anterior (TA) y gastrocnemio: en comparación con la inyección de un shRNA desordenado de control, el shRNA que actúa selectivamente sobre DNM2 hace mejorar el peso de los músculos inyectados (figura 28), la histología general (figura 29), hace incrementar el tamaño de las fibras en las valoraciones cualitativas y cuantitativas (figuras 29 y 30)
- 15 y el posicionamiento de los núcleos (figura 30).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Université de Strasbourg
Université de Strasbourg; CNRS; INSERM

5 <120> Inhibidor de la dinamina 2 para el tratamiento de miopatías centronucleares

<130> B1692

<160> 31

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 3714

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| gaggtcgctc | gggtcgggtg | tcgcctgaga | accggatgag | gcggcgaccg | tgaggccgag | 60 |
| ccgggagcgg | gcgtcttgcc | gaggcccggg | cgggcgggga | gcaacggcta | cagacgccgc | 120 |
| ggggccaggt | cgttgagggt | cggcggcggg | cgaggagcgc | agggcgctcg | ggccgggggc | 180 |
| cgccggcgcc | atgggcaacc | gcgggatgga | agagctgata | ccgctgggtca | acaaactgca | 240 |
| ggacgccttc | agctccatcg | gccagagctg | ccacctggac | ctgccgcaga | tcgctgtagt | 300 |
| gggcgccag | agcgccggca | agagctcggt | gctggagaac | ttcgtgggcc | gggacttcct | 360 |
| tcccccggt | tcaggaatcg | tcacccggcg | gcctctcatt | ctgcagctca | tcttctcaaa | 420 |
| aacagaacat | gccgagtttt | tgcactgcaa | gtccaaaaag | tttacagact | ttgatgaagt | 480 |
| ccggcaggag | attgaagcag | agaccgacag | ggtcacgggg | accaacaaaag | gcactctccc | 540 |
| agtgcctatc | aaccttcgag | tctactcgcc | acacgtgttg | aacttgacct | tcactgacct | 600 |
| cccgggtatc | accaaggtgc | ctgtgggcga | ccagcctcca | gacatcgagt | accagatcaa | 660 |
| ggacatgata | ctgcagttca | tcagccggga | gagcagcctc | attctggctg | tcacgcccgc | 720 |
| caacatggac | ctggccaact | ccgacgccct | caagctggcc | aaggaagtcg | atccccaagg | 780 |
| cctacggacc | atcgggtgtca | tcaccaagct | tgacctgatg | gacgagggca | ccgacgccag | 840 |
| ggacgtcttg | gagaacaagt | tgctcccgtt | gagaagaggc | tacattggcg | tggtgaaccg | 900 |
| cagccagaag | gatattgagg | gcaagaagga | catccgtgca | gcactggcag | ctgagaggaa | 960 |
| gttcttcctc | tcccaccccg | cctaccggca | catggccgac | cgcattgggca | cgccacatct | 1020 |
| gcagaagacg | ctgaatcagc | aactgaccaa | ccacatccgg | gagtcgctgc | cggccctacg | 1080 |
| tagcaaaacta | cagagccagc | tgctgtccct | ggagaaggag | gtggaggagt | acaagaactt | 1140 |
| tcggcccgac | gacccacccc | gcaaaaccaa | agccctgctg | cagatgggtcc | agcagtttgg | 1200 |
| ggtggatttt | gagaagagga | tcgagggtc | aggagatcag | gtggacactc | tggagctctc | 1260 |
| cgggggcgcc | cgaatcaatc | gcactctcca | cgagcgggtc | ccatttgagc | tggtgaagat | 1320 |

20

ES 2 689 862 T3

| | |
|--|------|
| ggagtttgac gagaaggact tacgacggga gatcagctat gccattaaga acatccatgg | 1380 |
| agtcaggacc gggcttttca ccccggaactt ggcattcgag gccattgtga aaaagcaggt | 1440 |
| cgtcaagctg aaagagccct gtctgaaatg tgtcgacctg gttatccagg agctaataca | 1500 |
| tacagttagg cagtgtacca gtaagctcag ttcctacccc cggttgcgag aggagacaga | 1560 |
| gcgaatcgtc accacttaca tccgggaacg ggaggggaga acgaaggacc agattcttct | 1620 |
| gctgatcgac attgagcagt cctacatcaa cacgaaccat gaggacttca tcgggtttgc | 1680 |
| caactgttac tatactgagc agctggtgac ctgtgccag cagaggagca cgcagctgaa | 1740 |
| caagaagaga gccatcccca atcaggggga gatcctggtg atccgcaggg gctggctgac | 1800 |
| catcaacaac atcagcctga tgaaaggcgg ctccaaggag tactggtttg tgctgactgc | 1860 |
| cgagtcactg tcctggtaca aggatgagga ggagaaagag aagaagtaca tgctgcctct | 1920 |
| ggacaacctc aagatccgtg atgtggagaa gggcttcatg tccaacaagc acgtcttcgc | 1980 |
| catcttcaac acggagcaga gaaacgtcta caaggacctg cggcagatcg agctggcctg | 2040 |
| tgactccag gaagacgtgg acagctggaa ggcctcgttc ctccgagctg gcgtctaccc | 2100 |
| cgagaaggac caggcagaaa acgaggatgg ggcccaggag aacaccttct ccatggaccc | 2160 |
| ccaactggag cggcaggtgg agaccattcg caacctggtg gactcatacg tggccatcat | 2220 |
| caacaagtcc atccgcgacc tcatgccaaa gaccatcatg cacctcatga tcaacaatac | 2280 |
| gaaggccttc atccaccacg agctgctggc ctacctatac tcctcggcag accagagcag | 2340 |
| cctcatggag gagtgcggtg accaggcaca gcggcgggac gacatgctgc gcatgtacca | 2400 |
| tgccctcaag gaggcgctca acatcatcgg tgacatcagc accagcactg tgtccacgcc | 2460 |
| tgtacccccg cctgtcgatg acacctggct ccagagcgcc agcagccaca gccccactcc | 2520 |
| acagcgccga ccggtgtcca gcatacacc ccctggccgg ccccagcag tgagggggccc | 2580 |
| cactccaggg cccccctga ttctgtttcc cgtgggggca gcagcctcct tctcggcgcc | 2640 |
| cccaatccca tcccggcctg gaccccagag cgtgtttgac aacagtgacc tcttcccagc | 2700 |
| ccgcctcag atcccatctc ggccagttcg gatccccca gggattcccc caggagtgcc | 2760 |
| cagcagaaga cccctgctg cggccagccg gccaccatt atccgcccag ccgagccatc | 2820 |
| cctgctcgac taggcctcga gggggcggtg ctctcggggg ggccctcacgc acccgcgcg | 2880 |
| caggagcttc agtggctctg ggccctccgc cgccttatg ctgggaccag gctcccagtg | 2940 |
| ggcagccctg gcctcttct taacgctggc ccgggtccag ggccggcccc tgtgcctggc | 3000 |
| tggacaccgc actgcgcaaa gggggcctgg agctccaggc agggggcgct ggggtgttgc | 3060 |
| actttggggg atggagtctc aggggtggcag aggggggacc agaacccttg acaccatcct | 3120 |
| gaatgagggg tccagcctgg gggggactct accaaggtct tcttgggctg ggaaagccca | 3180 |
| tgtagggcag gccttctata agtgcgggca ccaagggcgc ctacatcccc aggccttgct | 3240 |

ES 2 689 862 T3

```

gggggtgcagg ggtatatcaa cttcccattha gcaggagctc cccagcggca agcctggccc 3300
agtgggctcg gtagtgccca gctggcaggc ctgagggtga catagtcctt cccggccata 3360
ttaaccacac agcctgagcc tggcccagcc tcggctgcca gaggtgcctt tgctaggccc 3420
ggagccggttg gcccgggccg gccttgccct attcctctcc tcctcctcct cctgggtccc 3480
ccaggggtggc tgggcttggg ctatgtgggt ggtgggtggc gggggtcttg ggggcctctc 3540
agctcccgcc catgcctccc tgatgggtgg gcccaggcg gcctctctct gaggagacct 3600
caccactcc tcgctcagtt tgaccactgt aagtgcctgc actctgtatt ctattaataa 3660
actaaaataa aggaagacg ctgctggtgg ctgctgaaaa aaaaaaaaaa aaaa 3714

```

```

5  <210> 2
   <211> 23
   <212> ADN
   <213> secuencia artificial

10 <220>
   <223> iARN

   <400> 2
   aaggacatga tctgcagtt cat      23

15 <210> 3
   <211> 23
   <212> ADN
   <213> secuencia artificial

20 <220>
   <223> iARN

   <400> 3
   aagaggctac attggcgtgg tga      23

25 <210> 4
   <211> 23
   <212> ADN
   <213> secuencia artificial

30 <220>
   <223> iARN

   <400> 4
   agtggacac tctggagctc tcc      23

35 <210> 5
   <211> 23
   <212> ADN
   <213> secuencia artificial

40 <220>
   <223> iARN

   <400> 5
   aagaagtaca tgctgcctct gga      23

45 <210> 6
   <211> 23
   <212> ADN
   <213> secuencia artificial

50 <220>

```

<223> iARN
 <400> 6
 5 aacgtctaca aggacctgcg gca 23
 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> iARN
 <400> 7
 15 aggagaacac cttctcatg gac 23
 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> iARN
 <400> 8
 25 aactgttact atactgagca g 21
 <210> 9
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> iARN
 35 <400> 9
 tgccaactgt tactatact 19
 <210> 10
 40 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 45 <223> iARN
 <400> 10
 gaagagctga tcccgctgg 19
 50 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 55 <220>
 <223> iARN
 <400> 11
 60 gcacgcagct gaacaagaa 19
 <210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 65 <220>

<223> iARN
 <400> 12
 5 ggacttacga cgggagatc 19
 <210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> iARN
 <400> 13
 15 ggatattgag ggcaagaag 19
 <210> 14
 <211> 19
 <212> ADN
 20 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> iARN
 <400> 14
 25 ggaccaggca gaaaacgag 19
 <210> 15
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> iARN
 35 <400> 15
 gcgaatcgtc accacttac 19
 <210> 16
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 45 <223> shARN
 <400> 16
 aaccgcggga tggagagct 20
 <210> 17
 50 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 55 <223> shARN
 <400> 17
 60 aacttgaccc tcatcgacct c 21
 <210> 18
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 65 <220>

<223> shARN
 <400> 18
 5 tcggtgtcat caccaagct 19
 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> shARN
 <400> 19
 15 tgccaactgt ttctatact 19
 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> shARN
 <400> 20
 25 aactgttct atactgagga g 21
 <210> 21
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> shARN
 35 <400> 21
 ttctatact gaggagctgg t 21
 <210> 22
 40 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 45 <223> shARN
 <400> 22
 gcacgcagct gaacaagaa 19
 <210> 23
 50 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 55 <223> shARN
 <400> 23
 60 aagaagtaca tgctgcctct gga 23
 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 65 <220>

<223> shARN
 <400> 24
 aacaccttct ccatggaccc 20
 5
 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> shARN
 <400> 25
 15 ccattatccg cccagccgag c 21
 <210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ARN antisentido
 25 <400> 26
 gtcacccgga ggcctctcat tctgcagctc 30
 <210> 27
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> ARN antisentido
 35 <400> 27
 acacactaga gttgtctggt ggagcccga tca 33
 <210> 28
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 45 <223> cebador para DNM2 directo
 <400> 28
 ccaacaaagg catctcccct 20
 50 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador para DNM2 inverso
 <400> 29
 60 tggtagtag acccgaaggt 20
 <210> 30
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 65 <220>

<223> mRNA

<400> 30

ctgttactat actgagcagc tggtagacctg 30

5

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 31

Cys Tyr Tyr Thr Glu Gln Leu Val Thr Cys

1

5

10

15

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la dinamina 2 para ser usado en el tratamiento de una miopatía centronuclear, en donde el inhibidor de la dinamina 2 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra la dinamina 2, una molécula de ácido nucleico que interacciona directamente con un ácido nucleico que codifica la dinamina 2, y una molécula pequeña que inhibe la actividad, expresión o función de la dinamina 2, en donde dicha molécula pequeña se selecciona del grupo que consiste en (3,4-dihidroxibencilideno)hidrazida del ácido 3-hidroxinaftaleno-2-carboxílico, 3-hidroxi-*N*-[(2,4,5-trihidroxifenil)metilideno]naftaleno-2-carbohidrazida, bromuro de tetradeciltrimetilamonio, ácido 4-cloro-2-((2-(3-nitrofenil)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1*H*-isoindol-5-carbonil)-amino)-benzoico, 2-ciano-*N*-octil-3-[1-(3-dimetilaminopropil)-1*H*-indol-3-il]acrilamida, 3-(2,4-dicloro-5-metoxifenil)-2-sulfanilquinazolin-4(3*H*)-ona, *N,N'*-(propano-1,3-diil)bis(7,8-dihidroxi-2-imino-2*H*-cromeno-3-carboxamida), *N,N'*-(etano-1,2-diil)bis(7,8-dihidroxi-2-imino-2*H*-cromeno-3-carboxamida), bromuro de octadeciltrimetilamonio, péptido inhibidor de la dinamina con la secuencia de aminoácidos: QVPSRPNRAP, 3-hidroxi-*N*-[(2,4,5-trihidroxifenil)metilideno]naftaleno-2-carbohidrazida y bromuro de 4-(*N,N*-dimetil-*N*-octadecil-*N*-etil)-4-aza-10-oxatriciclo-[5.2.1]decano-3,5-diona.
2. El inhibidor de la dinamina 2 para ser usado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la miopatía centronuclear se selecciona del grupo que consiste en la MCN ligada al cromosoma X, MCN autosómica recesiva y MCN autosómica dominante.
3. El inhibidor de la dinamina 2 para ser usado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la miopatía centronuclear es la MCN ligada al cromosoma X o la MCN autosómica recesiva.
4. El inhibidor de la dinamina 2 para ser usado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la miopatía centronuclear es una miopatía centronuclear debido a mutaciones en BIN1.
5. El inhibidor de la dinamina 2 para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, en donde el inhibidor de la dinamina 2 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra la dinamina 2 o una molécula de ácido nucleico que interacciona directamente con un ácido nucleico que codifica la dinamina 2.
6. El inhibidor de la dinamina 2 para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el inhibidor de la dinamina 2 es un RNAi, un ácido nucleico antisentido o una ribozima que interfiere específicamente con la expresión de la dinamina 2, preferiblemente el inhibidor de la dinamina 2 es un siRNA o un shRNA.
7. El inhibidor de la dinamina 2 para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el inhibidor de la dinamina 2 es un nucleótido antisentido que induce el escape del exón dentro del pre-ARNm de la dinamina 2.
8. El inhibidor de la dinamina 2 para ser usado de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el inhibidor de la dinamina 2 es un nucleótido antisentido diseñado para inducir específicamente el escape del exón 2 o del exón 8 de DNM2, y preferiblemente comprende o consiste en una de las secuencias siguientes:
U7-Ex2 (escape de la diana del exón 2 de DNM2), que comprende la secuencia siguiente:
SEQ ID n.º 26: GTCACCCGGAGGCCTCTCATTCTGCAGCTC
U7-Ex8 (escape de la diana del exón 8 de DNM2), que comprende la secuencia siguiente:
SEQ ID n.º 27: ACACACTAGAGTTGTCTGGTGGAGCCCGCATCA.
9. El inhibidor de la dinamina 2 para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el inhibidor de la dinamina 2 es una molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente con la dinamina 2 que comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID n.ºs 2 a 25.
10. El inhibidor de la dinamina 2 para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el inhibidor de la dinamina 2 es un ADN, ARNm o una nucleasa manipulada genéticamente para actuar selectivamente sobre el gen de DNM2 y para introducir nucleasas mediante el uso del tratamiento de edición del genoma.
11. El inhibidor de la dinamina 2 para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el inhibidor se administra en una cantidad suficiente para reducir la expresión de la dinamina 2 o la actividad, expresión o función de la dinamina 2 en una cantidad igual o preferiblemente menor que la cantidad normal.
12. Un método para identificar o cribar moléculas útiles en el tratamiento de una miopatía centronuclear, preferiblemente MCN-LX, que comprende las etapas de:

- a. dar a conocer u obtener un compuesto candidato; y
- b. determinar si dicho compuesto candidato inhibe la actividad, función y/o expresión de la dinamina 2,
- c. seleccionar dicho compuesto candidato si inhibe la actividad o la expresión o la función de la dinamina 2.

5 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde este comprende además la etapa de administrar *in vitro* la molécula seleccionada en un modelo de animal no humano de miopatía centronuclear o una parte del mismo y analizar el efecto sobre el comienzo o la progresión de la miopatía.

14. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la dinamina 2 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para ser usado en el tratamiento de una miopatía centronuclear y, más preferiblemente, el inhibidor de la dinamina 2 es tal y como está definido por una de las reivindicaciones 1 a 10.

10

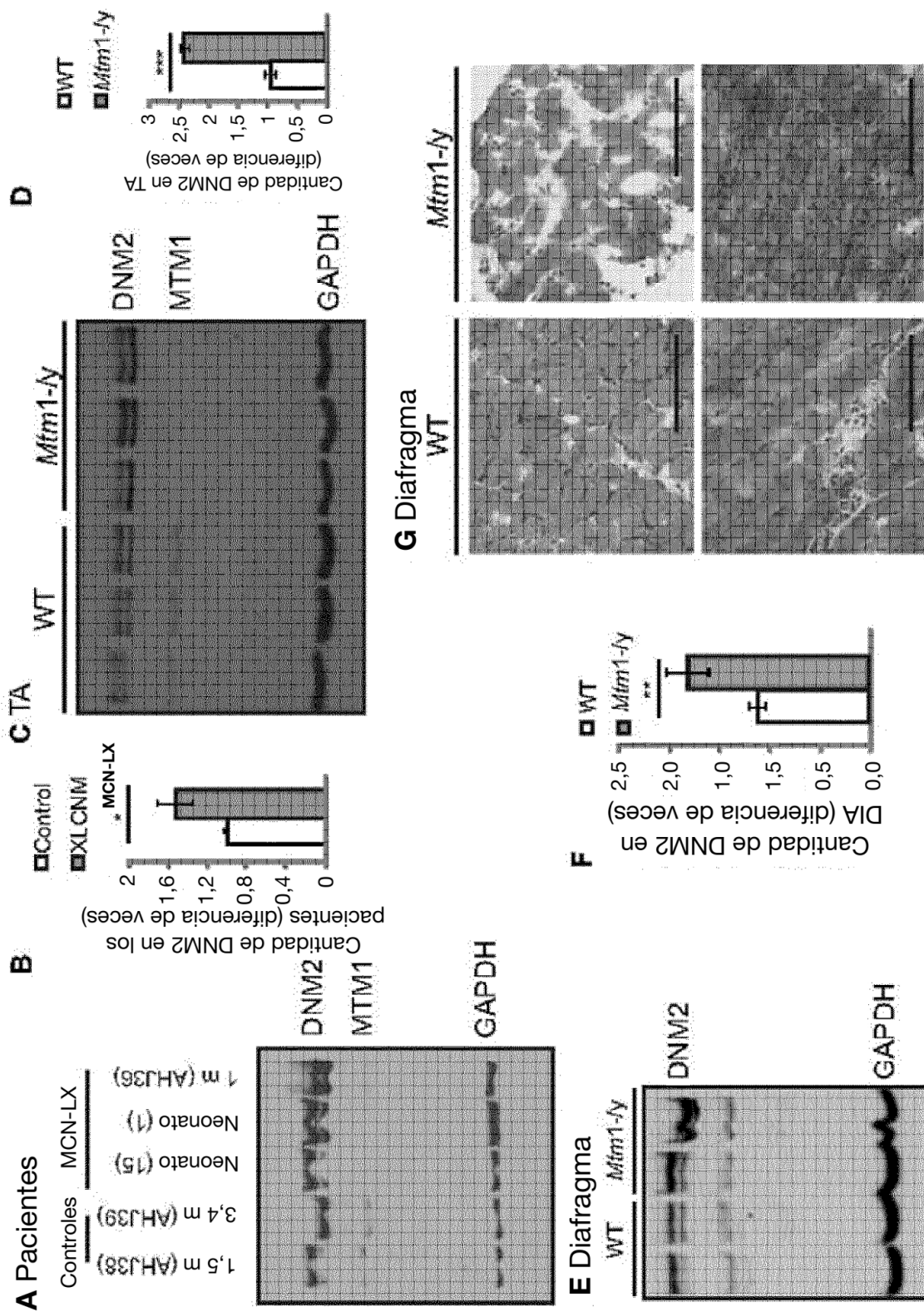


Figura 1

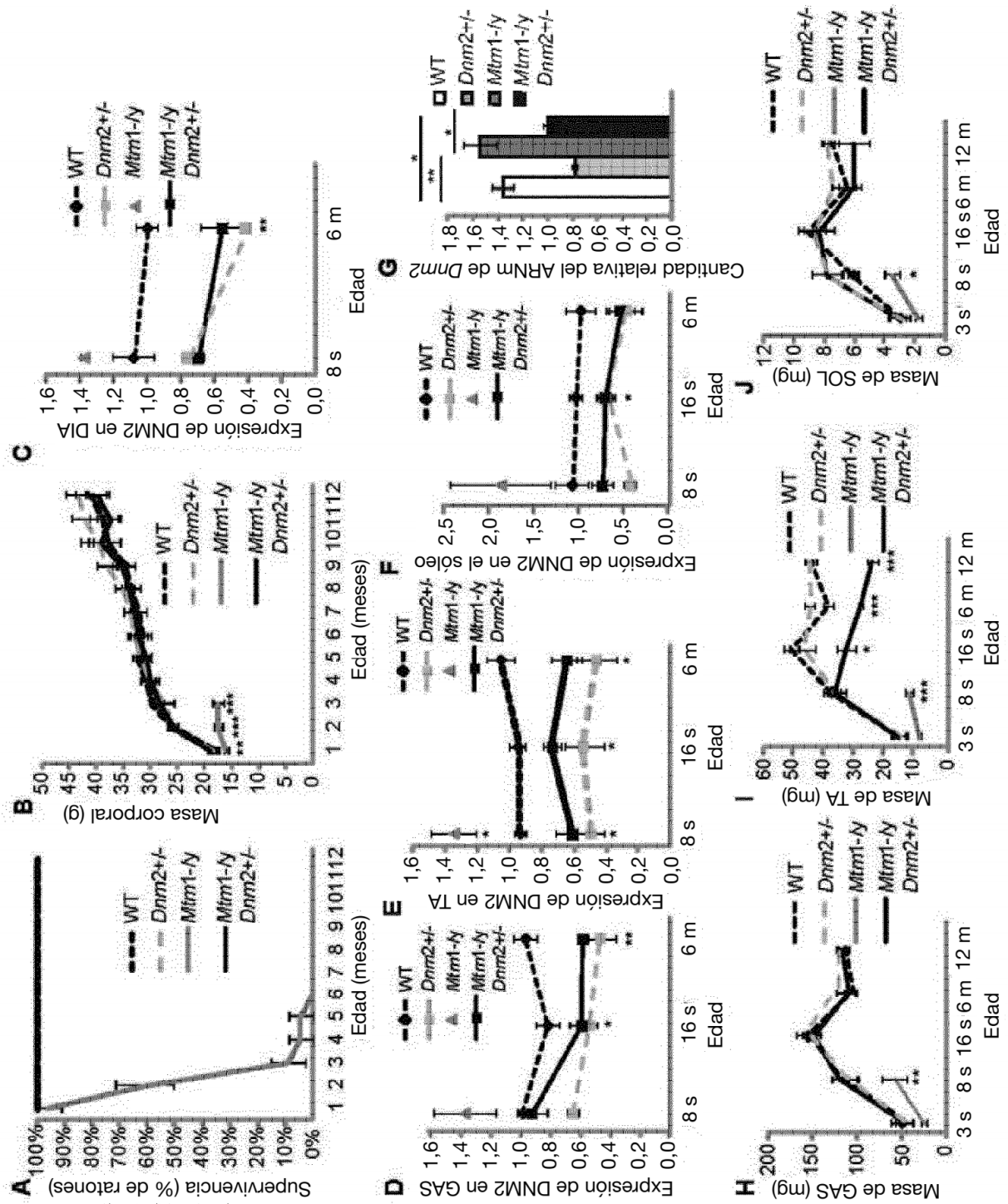


Figura 2

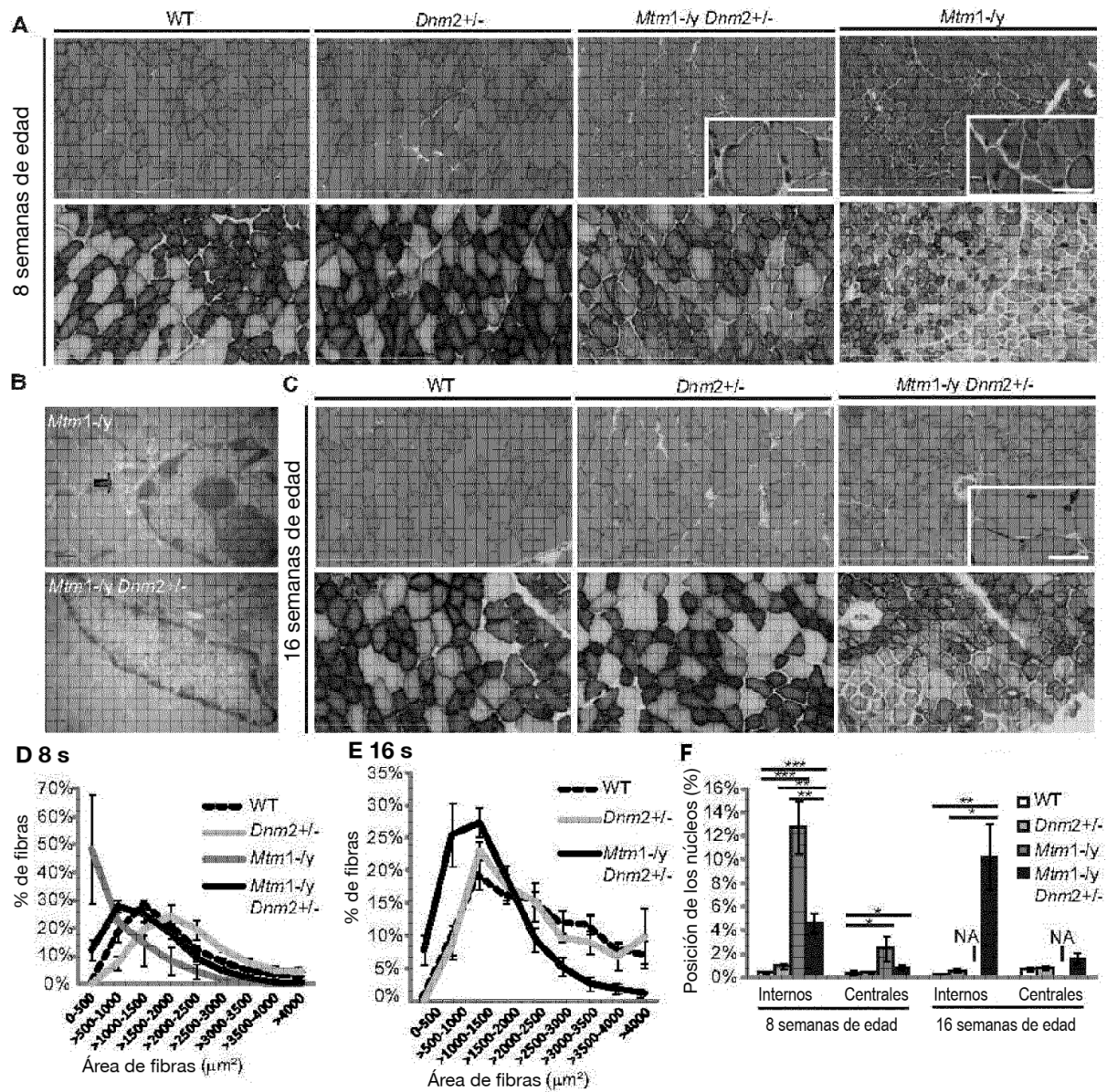


Figura 3

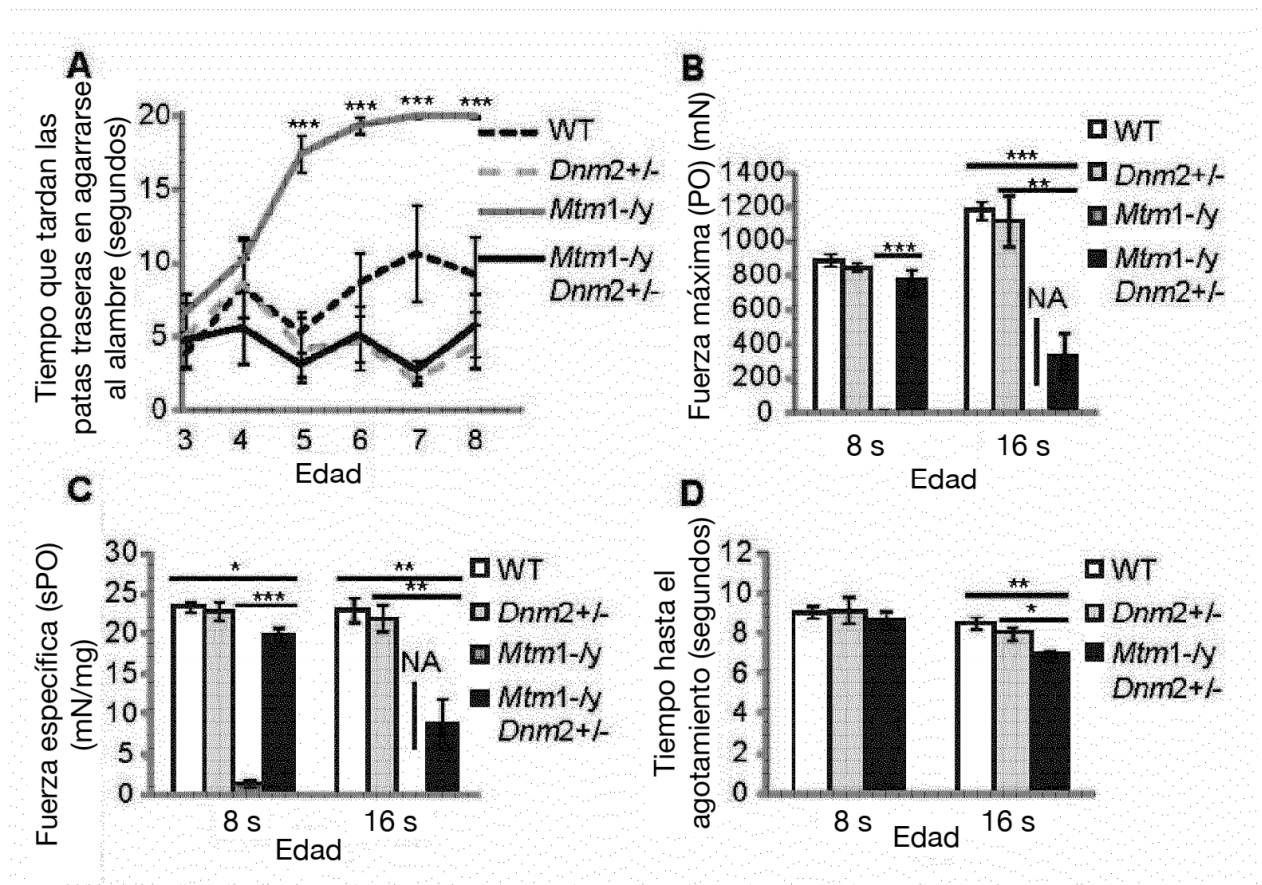


Figura 4

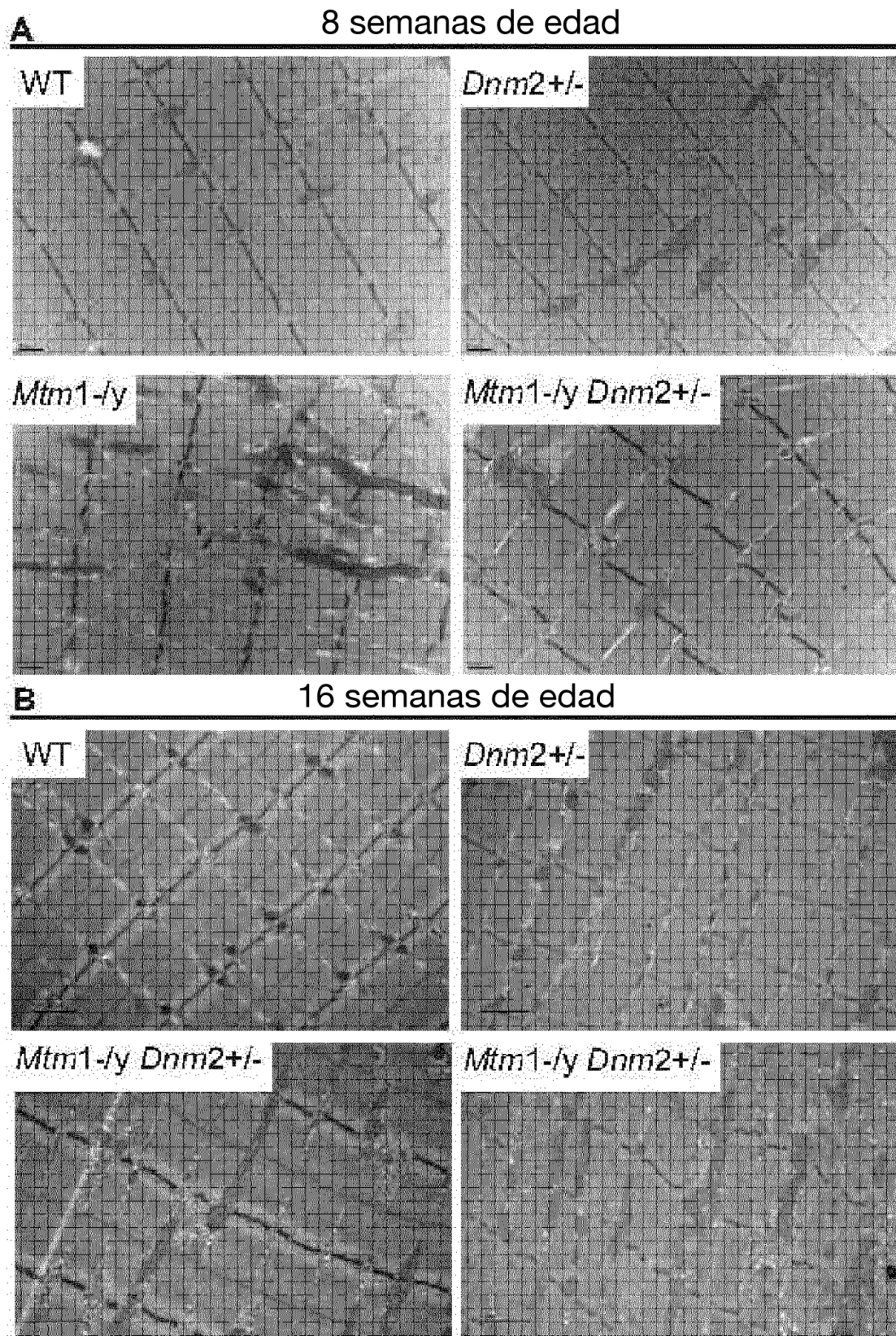


Figura 5

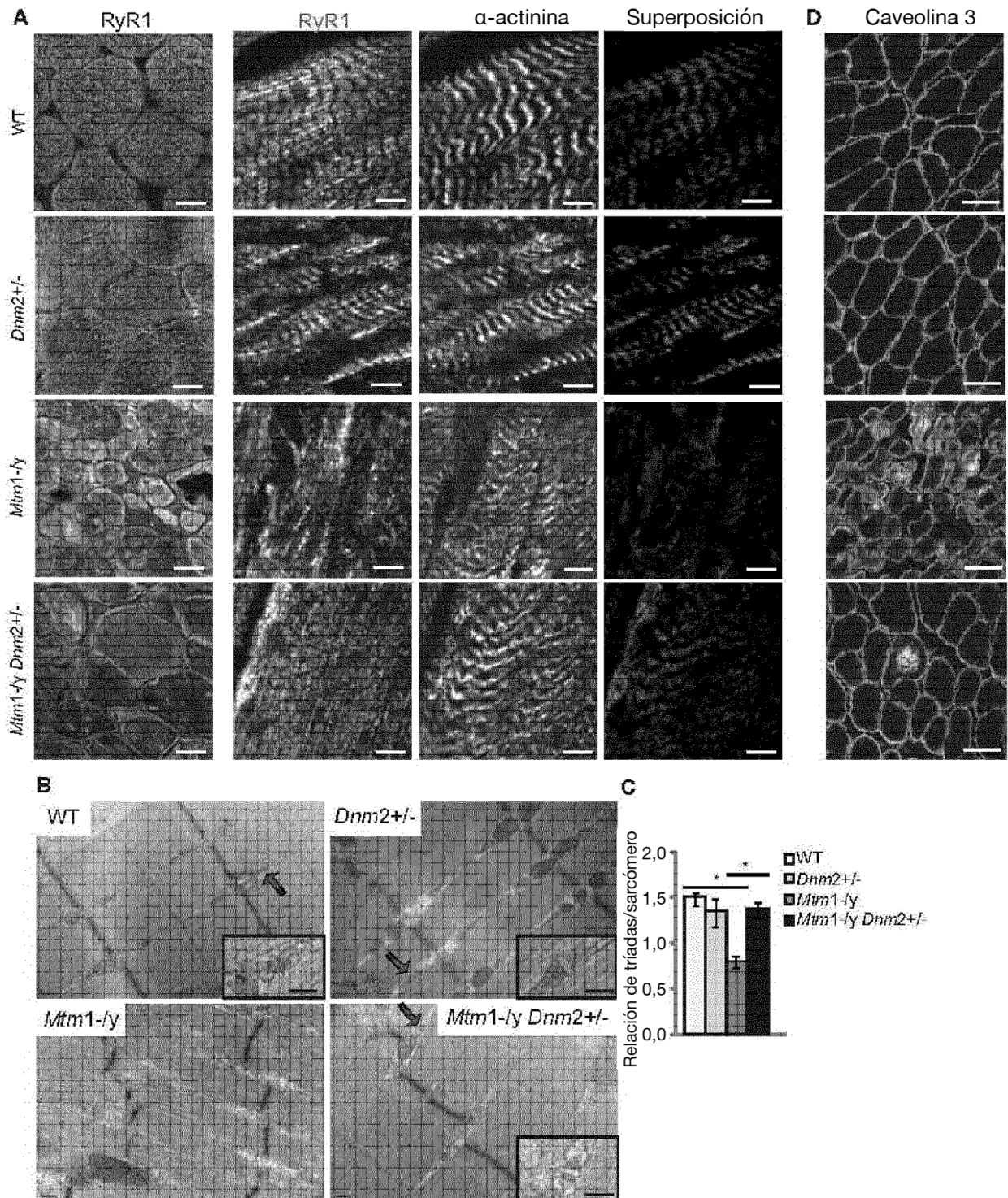


Figura 6

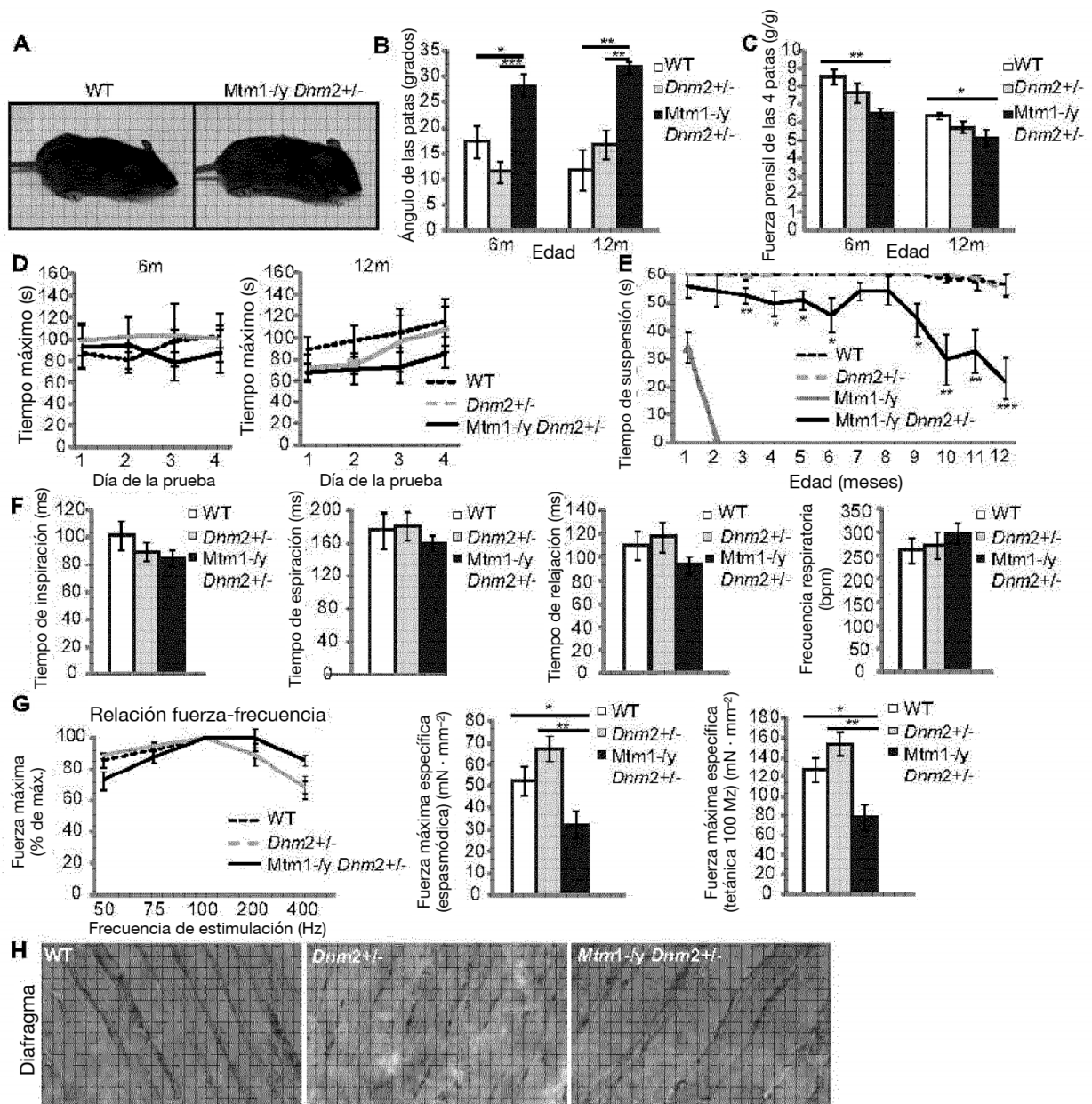


Figura 7

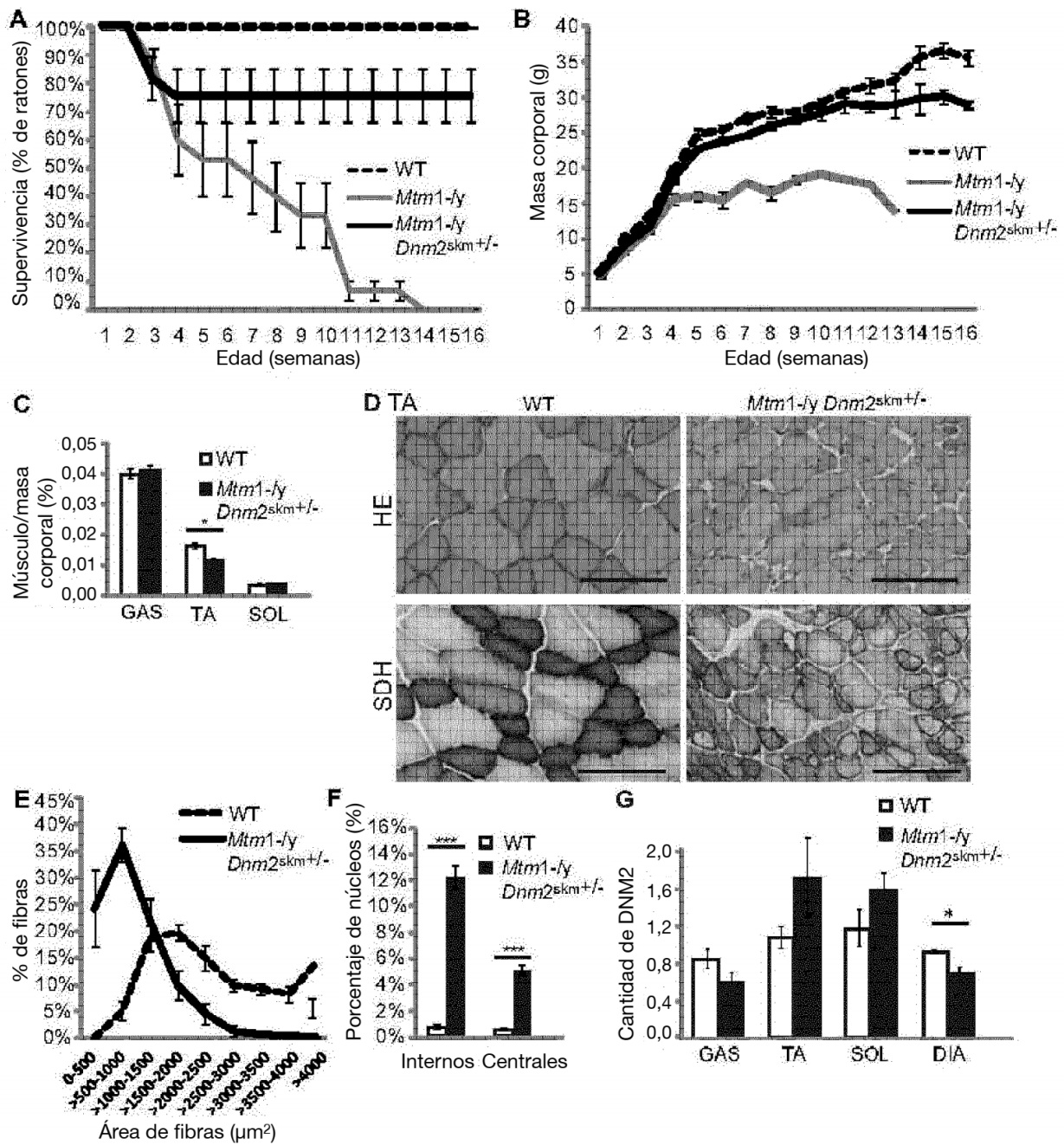


Figura 8

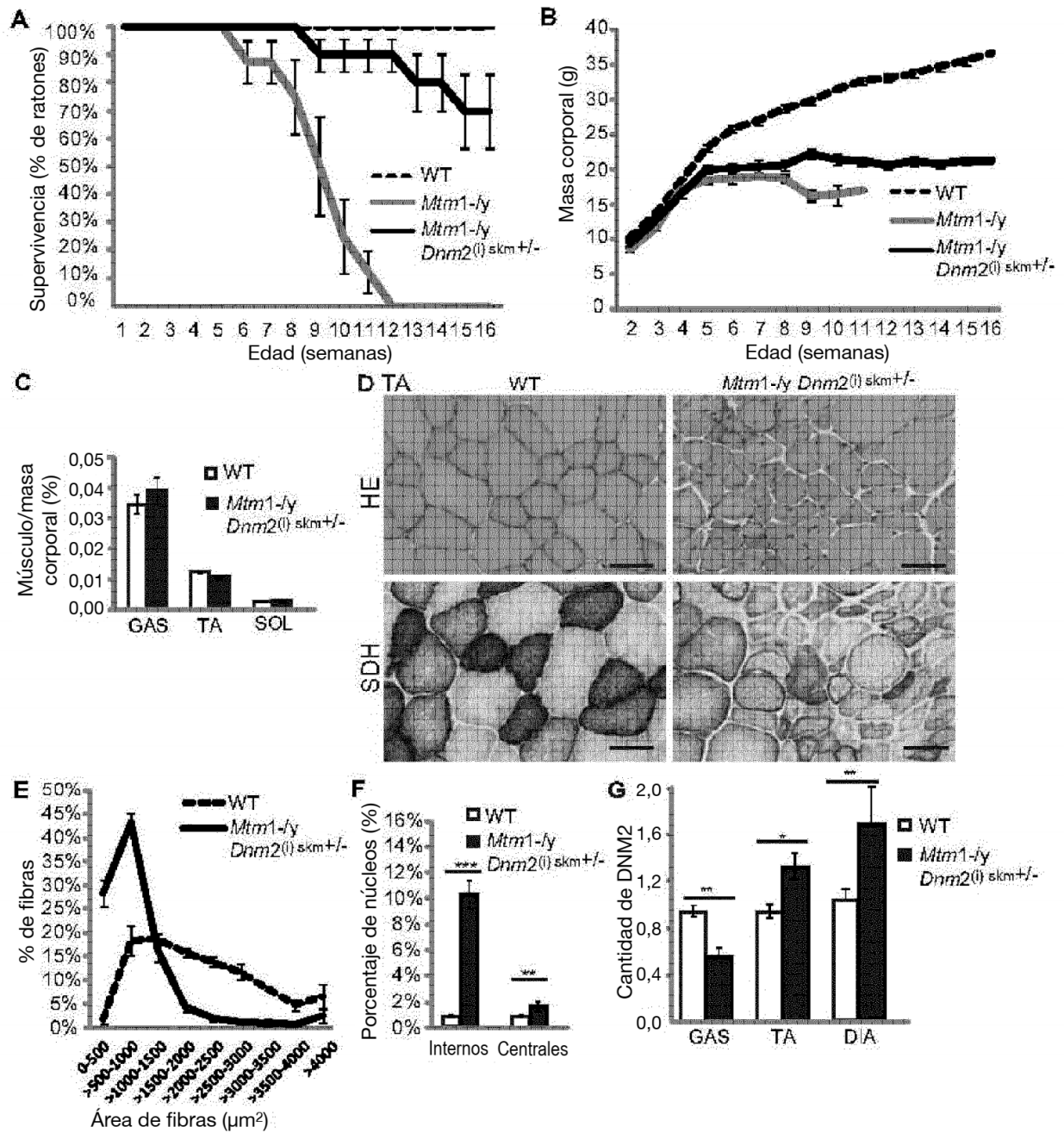


Figura 9

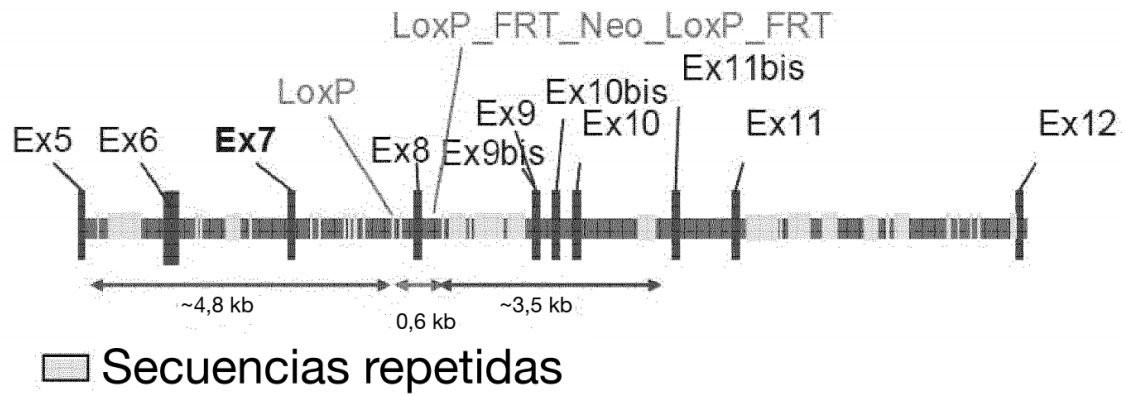


Figura 10

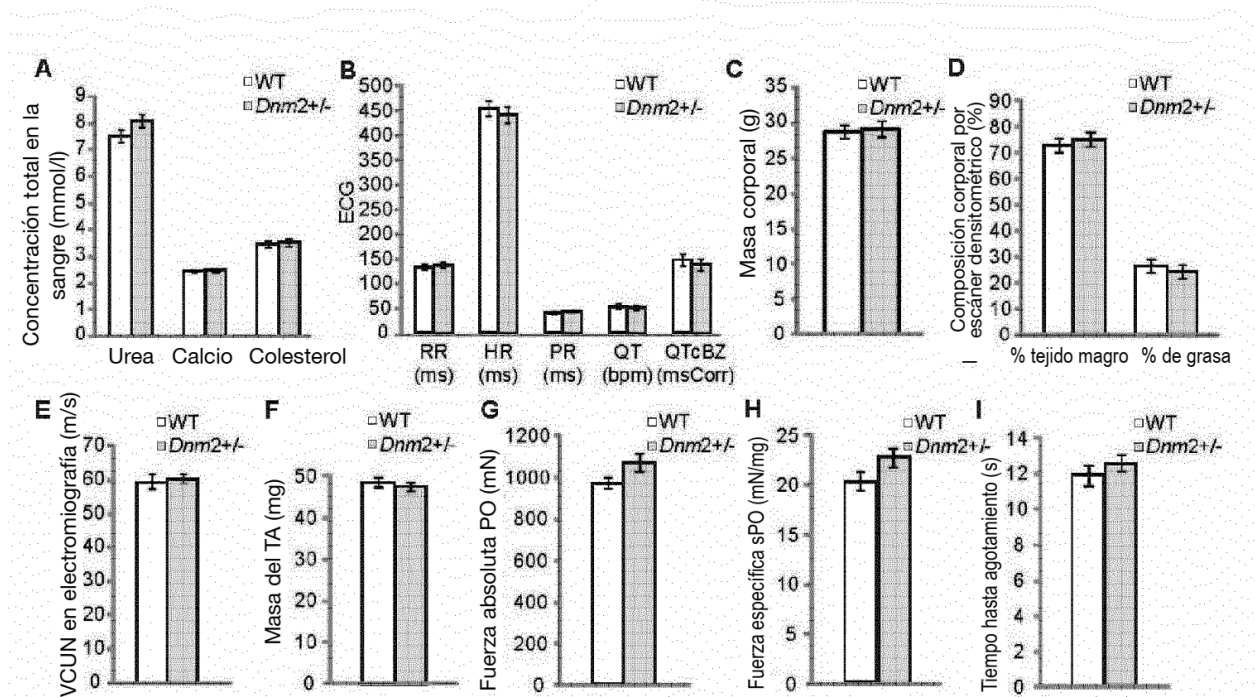


Figura 11

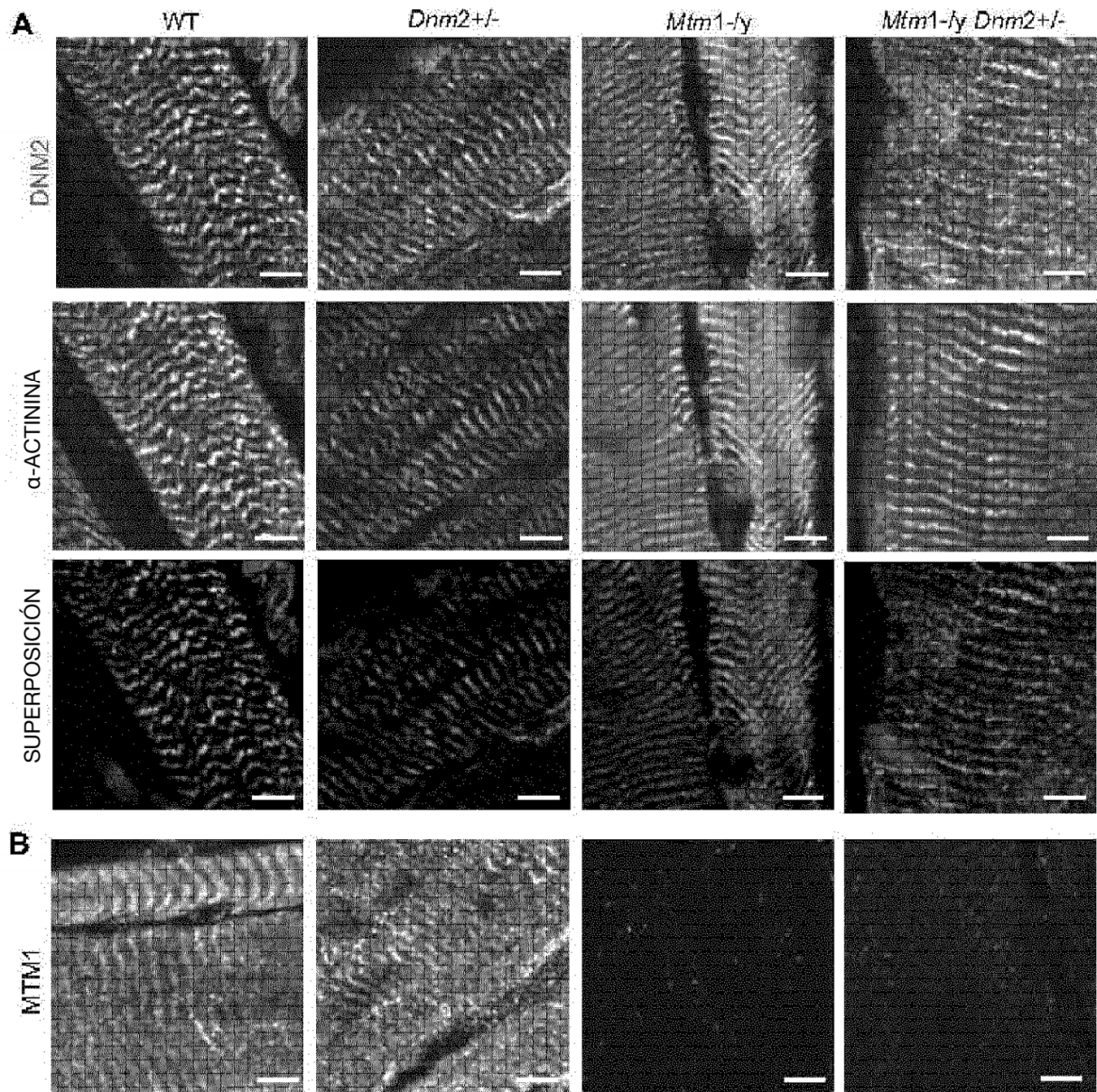


Figura 12

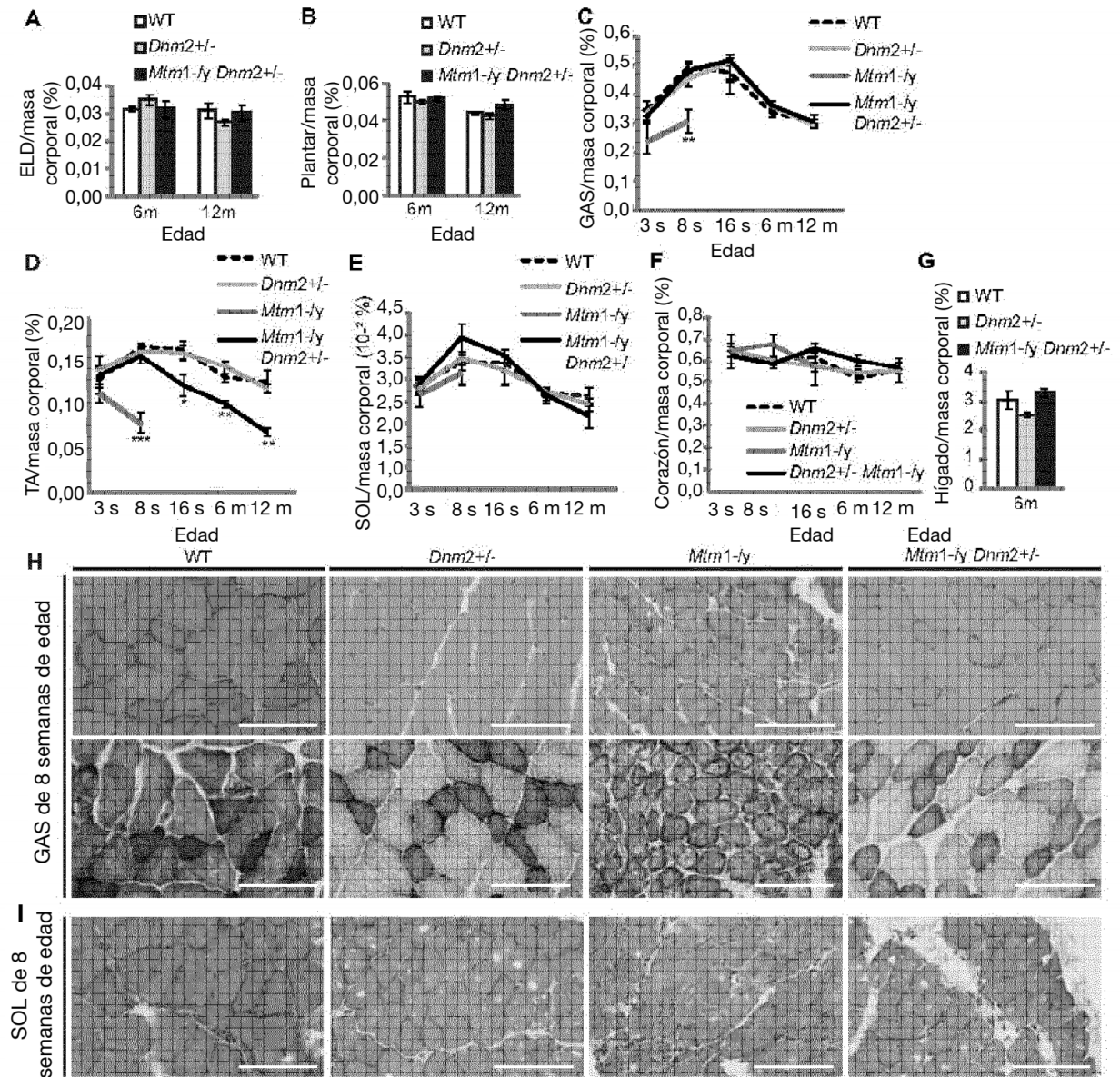


Figura 13

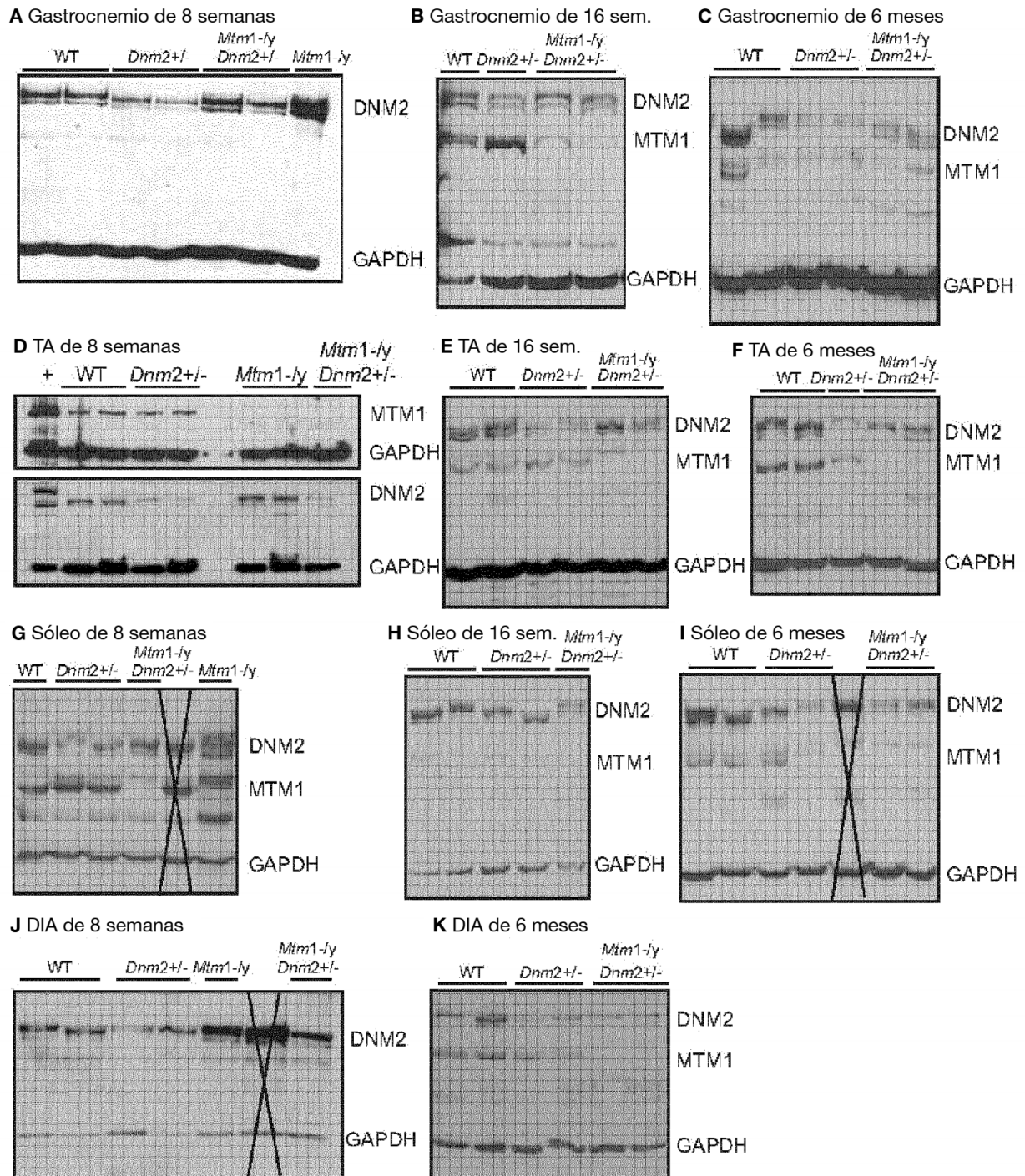


Figura 14

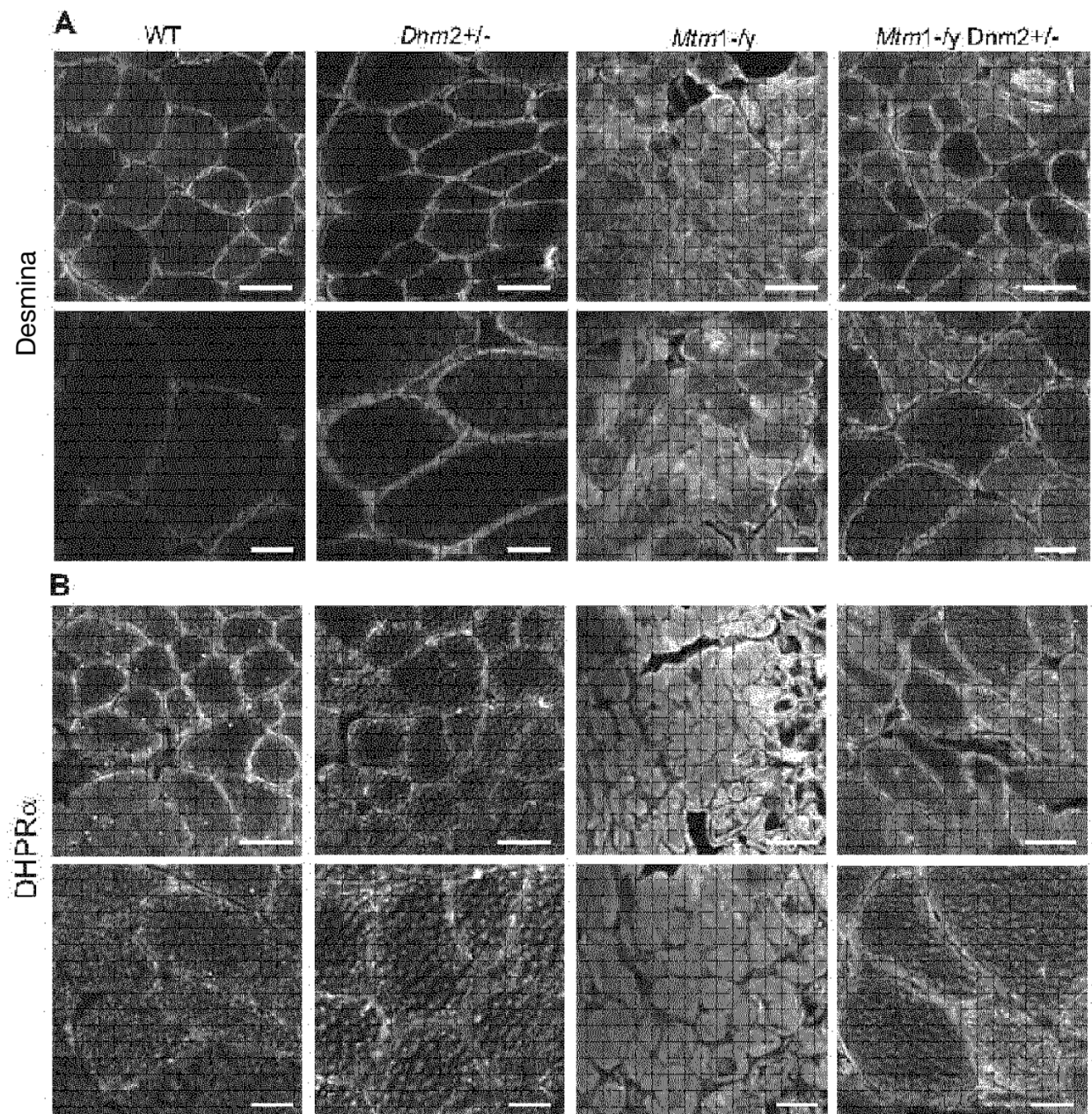


Figura 15

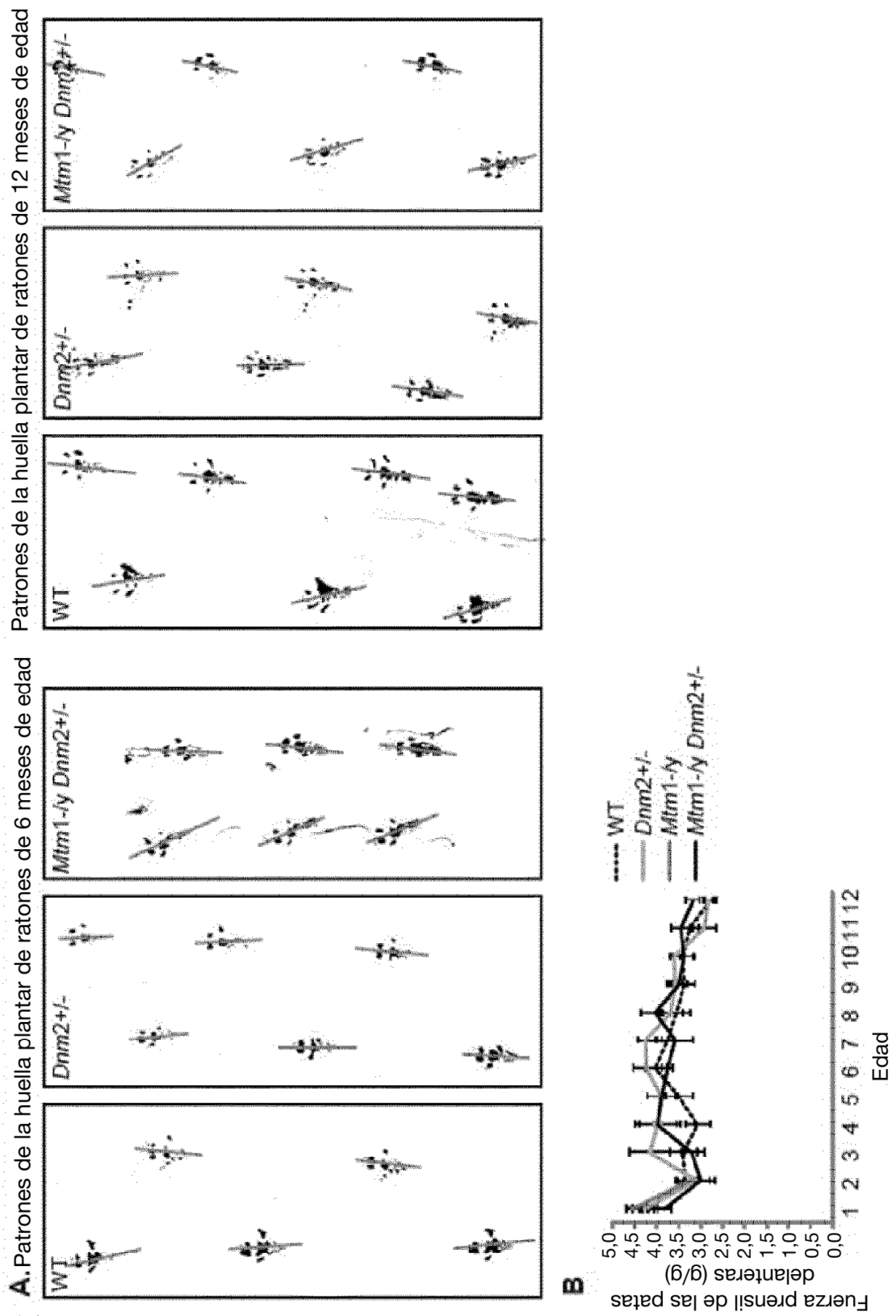


Figura 16

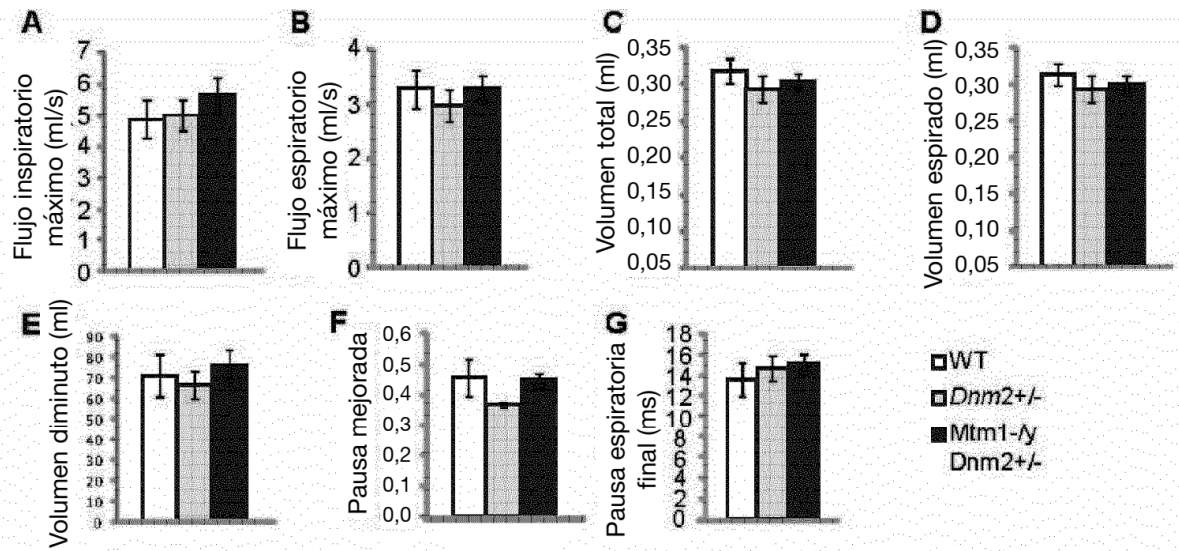


Figura 17

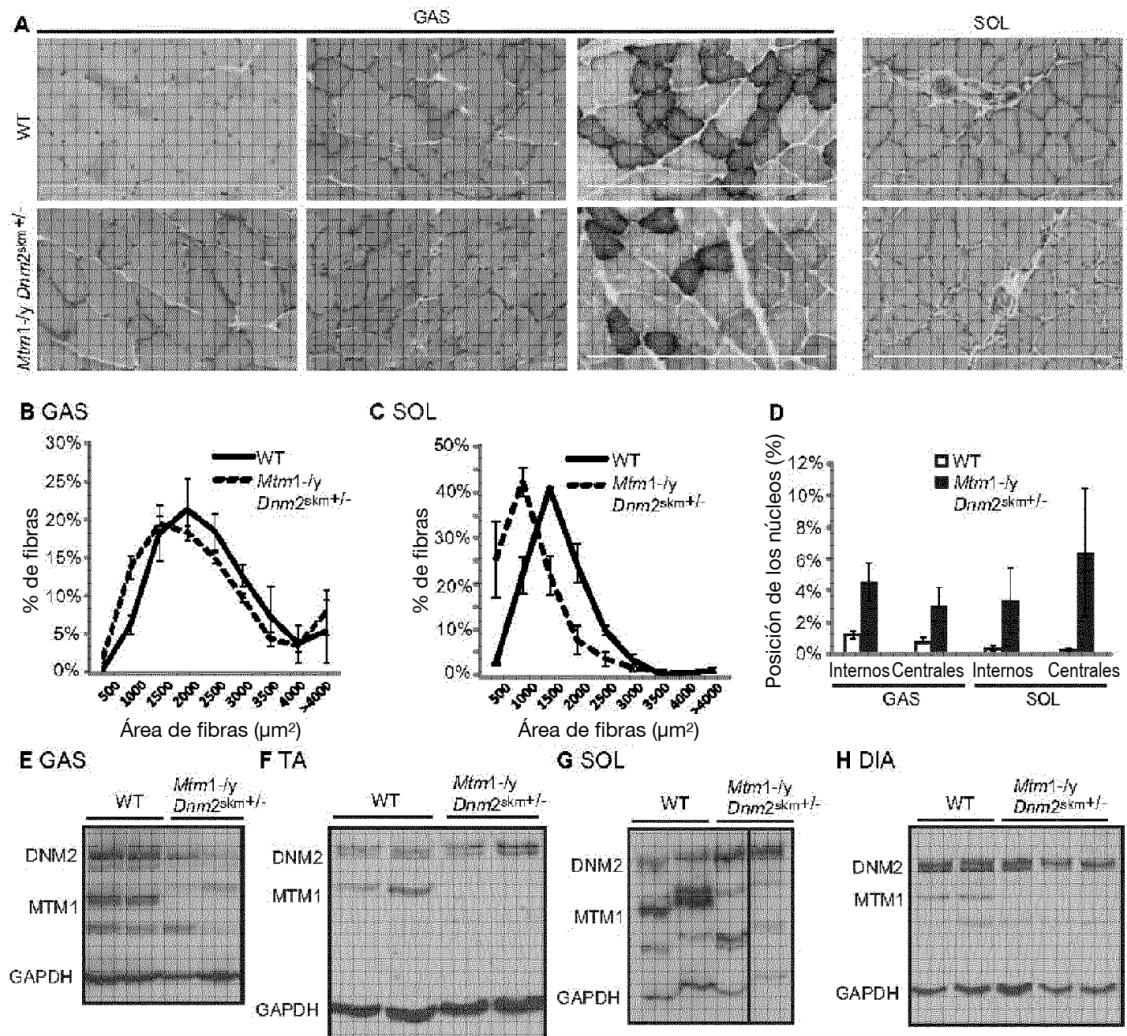


Figura 18

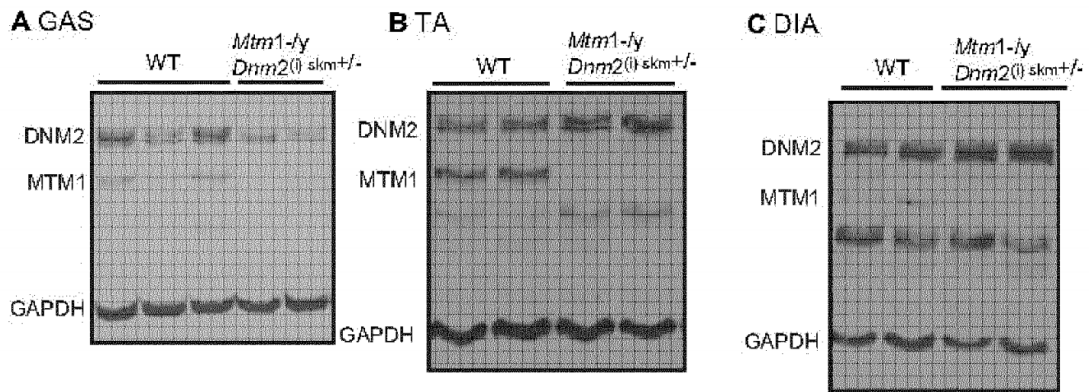
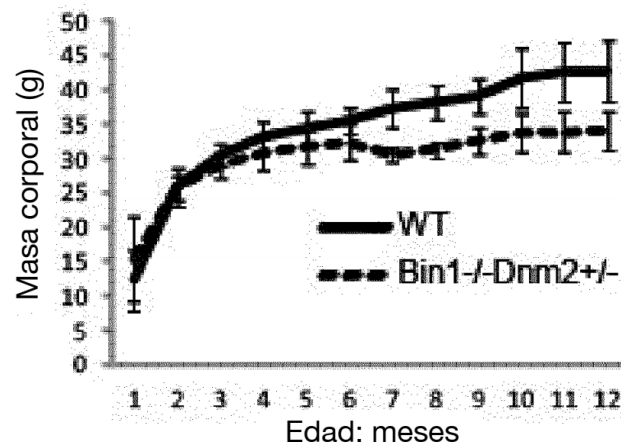


Figura 19

A. Masa corporal (machos)



B. Ratones de tipo silvestre y *Bin1*^{-/-} *Dnm2*^{+/-} de 10 semanas de edad

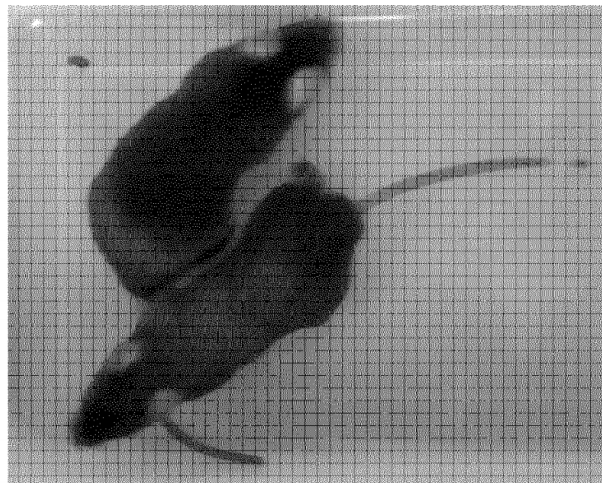
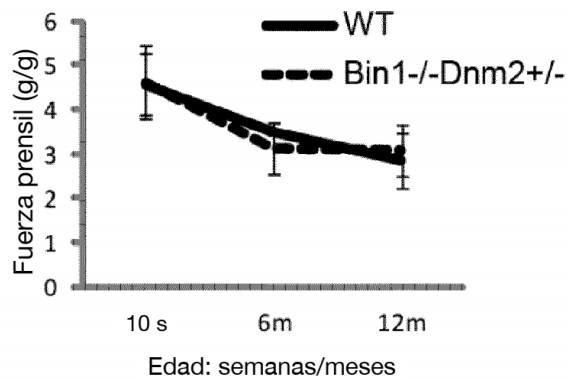
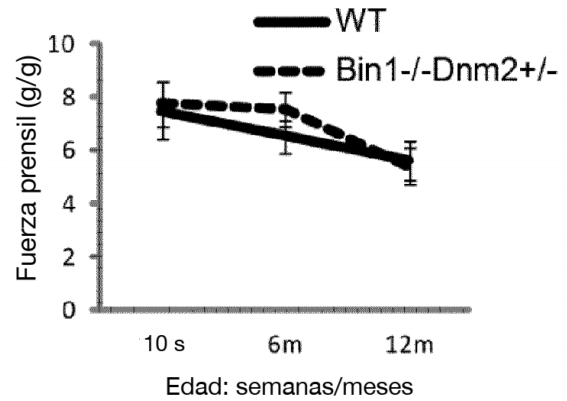


Figura 20

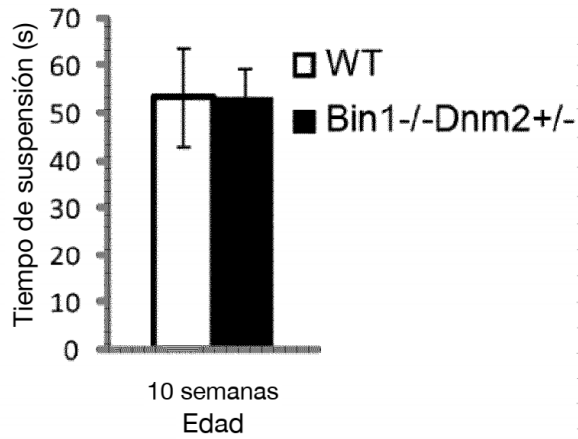
A. Prueba PRENSIL (2 patas)



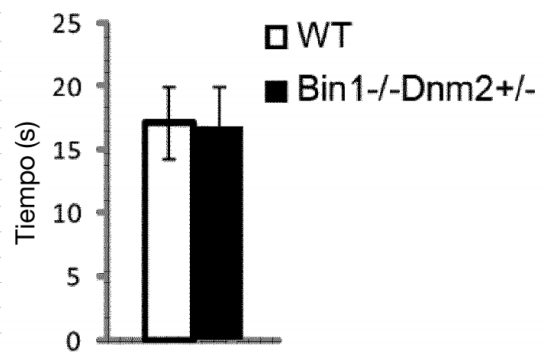
B. Prueba PRENSIL (4 patas)



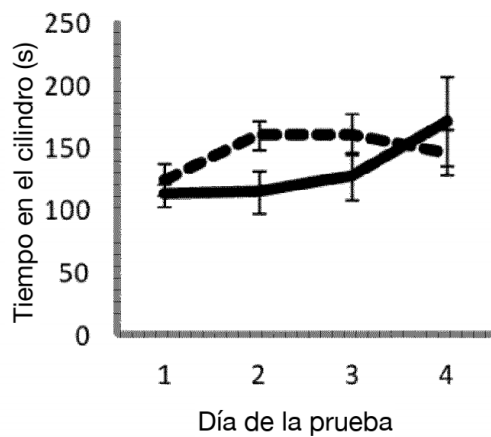
C. Prueba de suspensión



D. Prueba de la cuerda (6 meses)



E. Prueba del cilindro giratorio (6 meses)



F. Prueba del cilindro giratorio (12 meses)

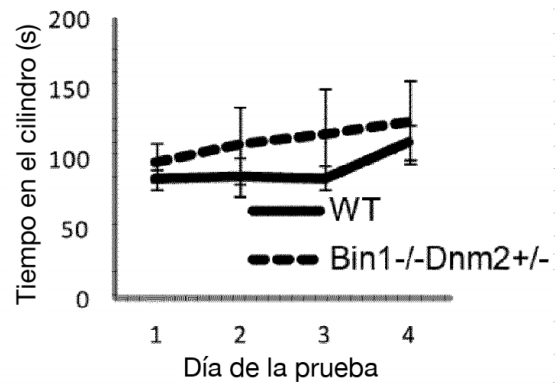
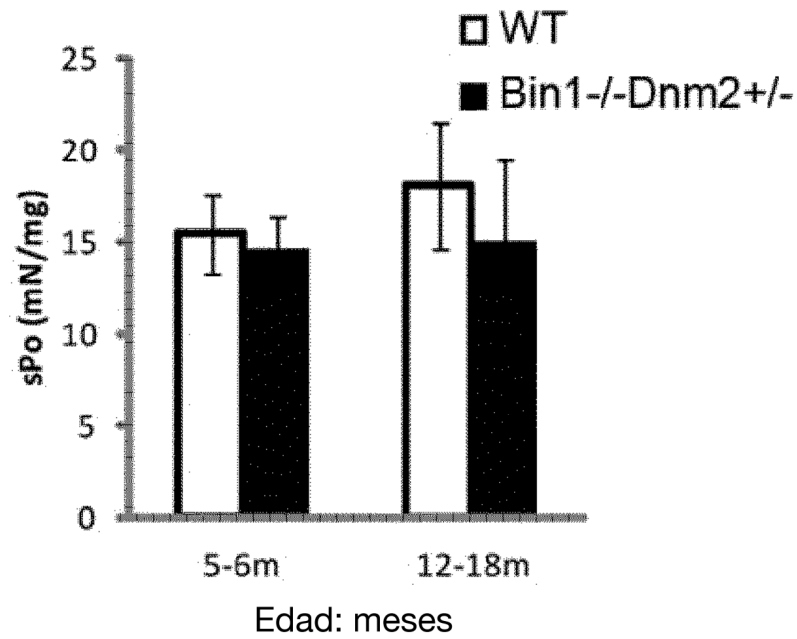


Figura 21

G. Fuerza específica del músculo



H. Propensión al agotamiento

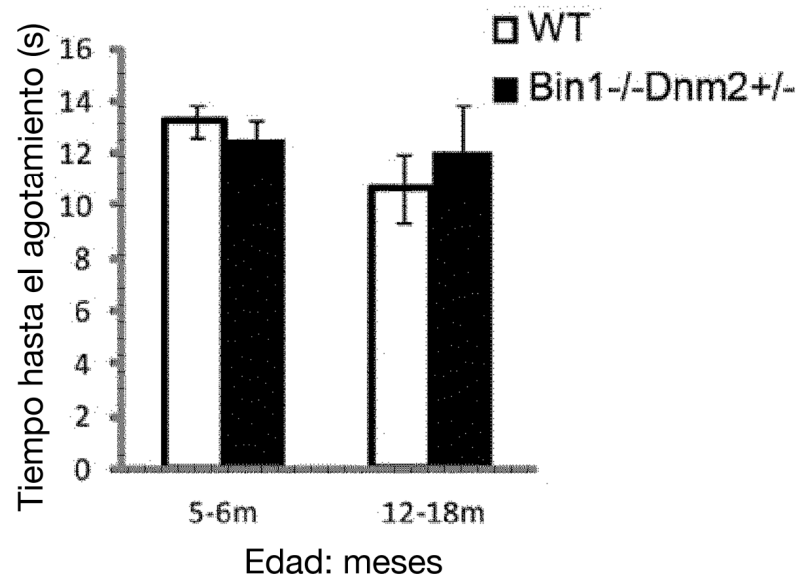


Figura 21 continuación

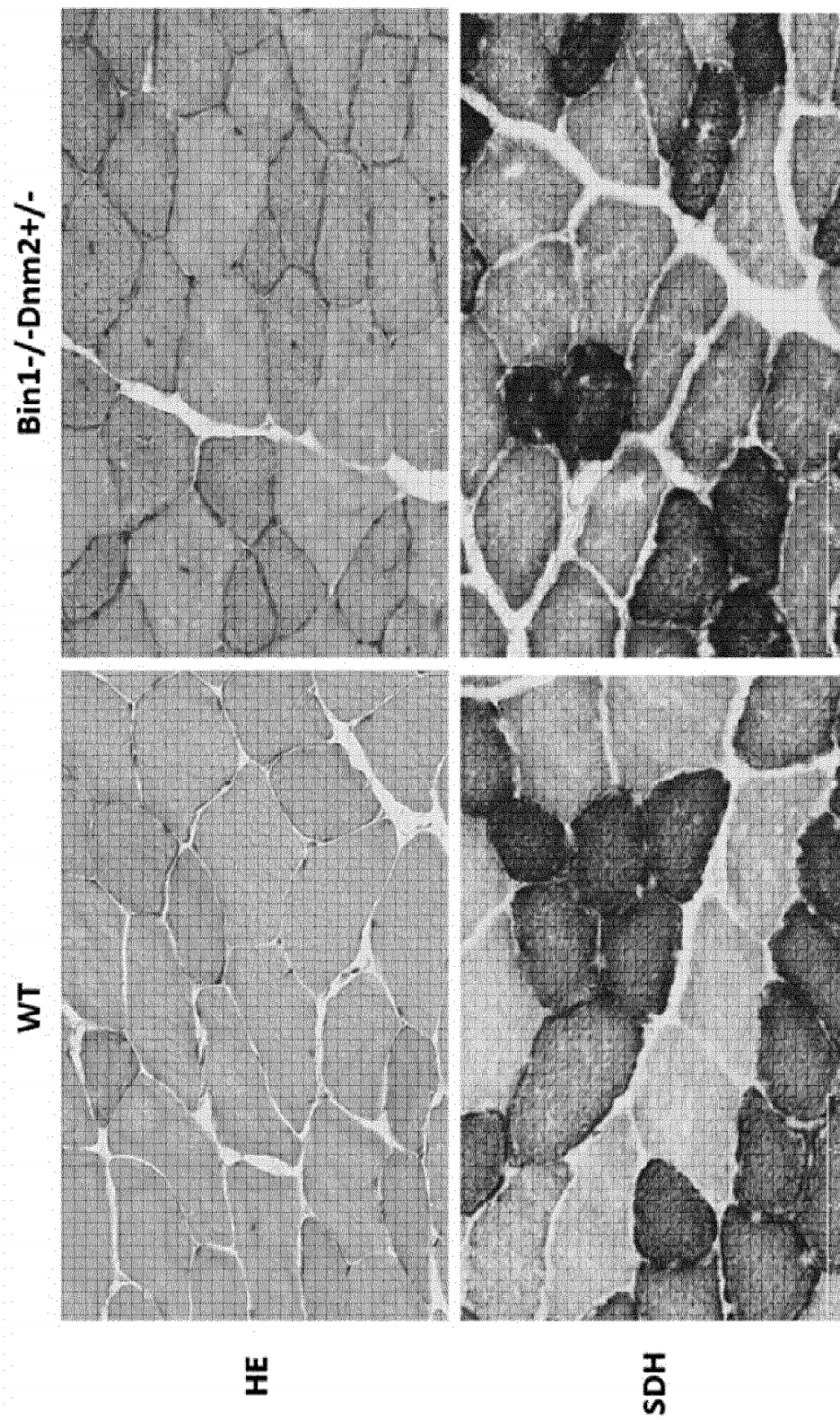
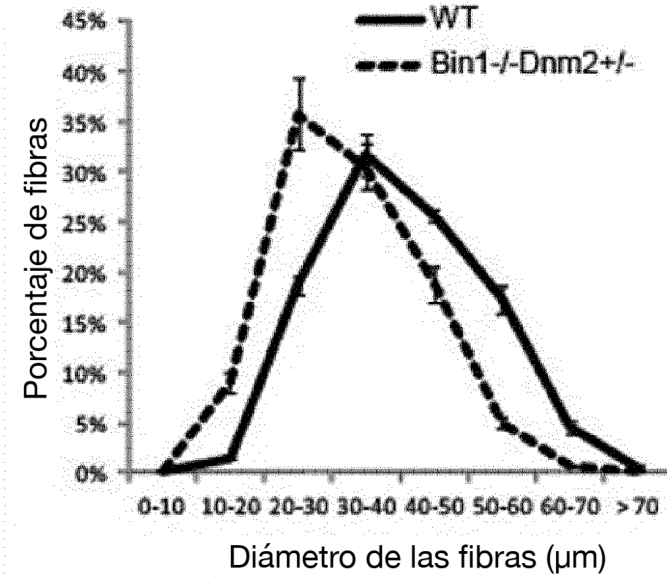


Figura 22

A. Tamaño de las fibras



B. Posición de los núcleos

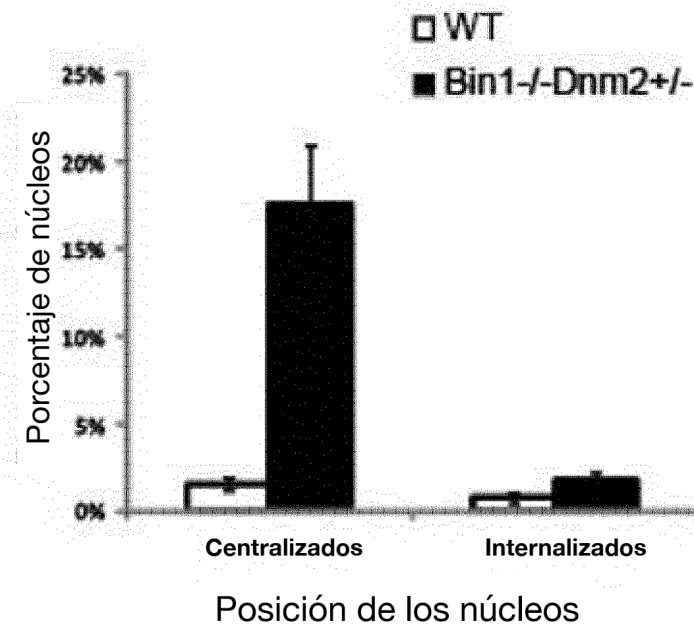


Figura 23

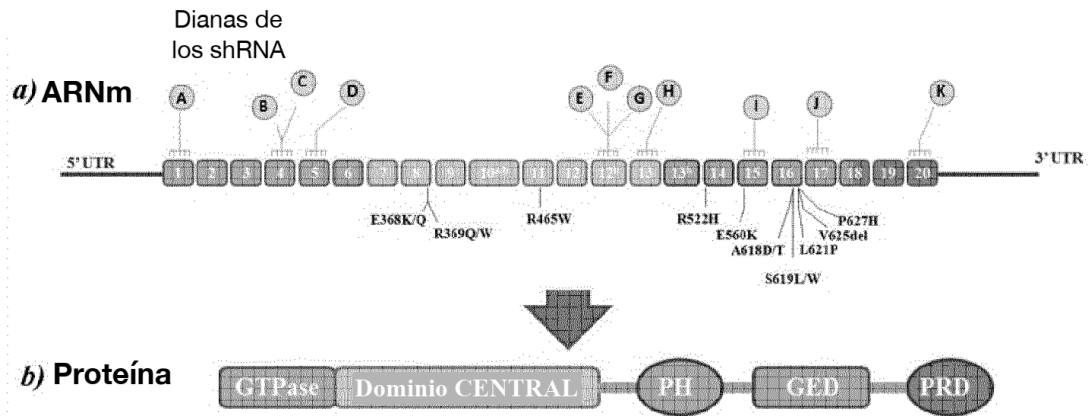


Figura 24

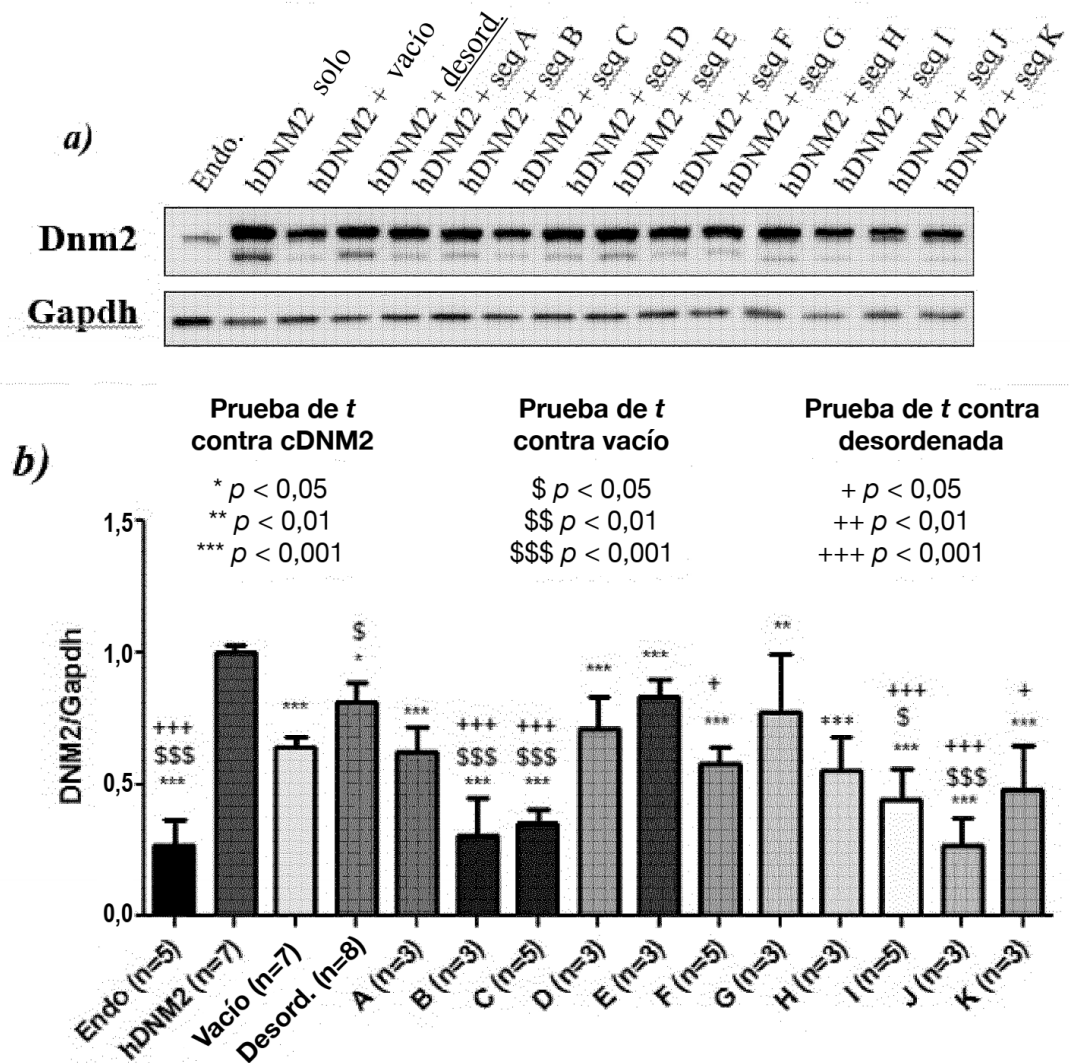


Figura 25

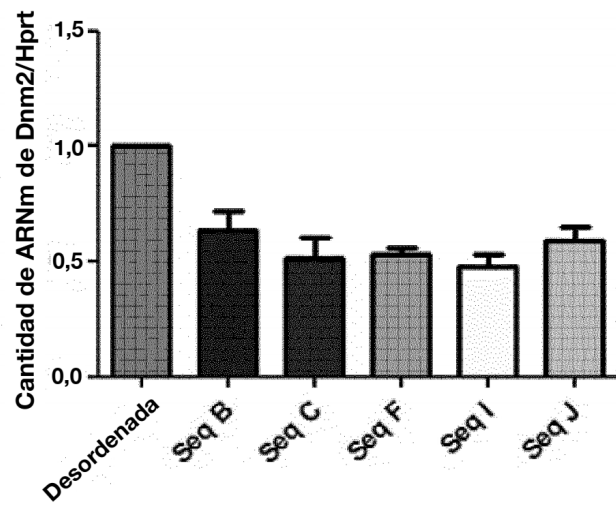


Figura 26



WT inyectado con AAV
shDNM2 n.º C frente a desordenada

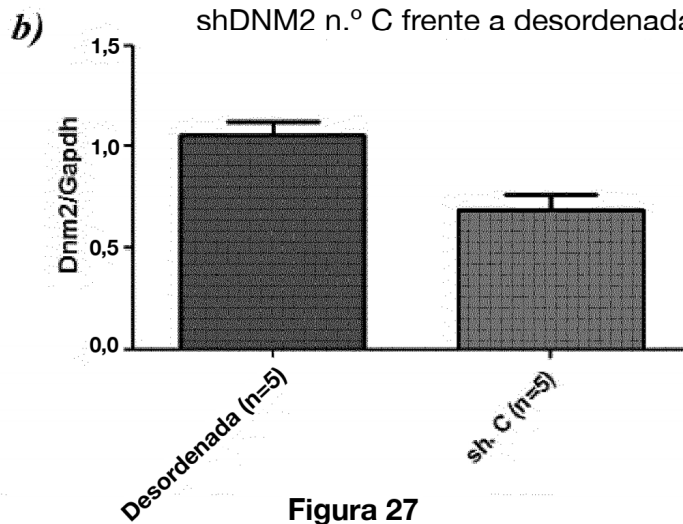


Figura 27

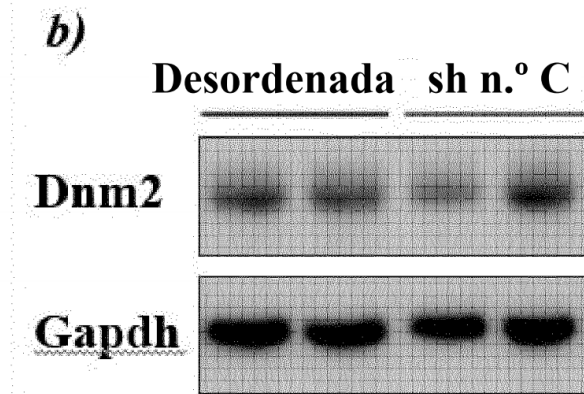
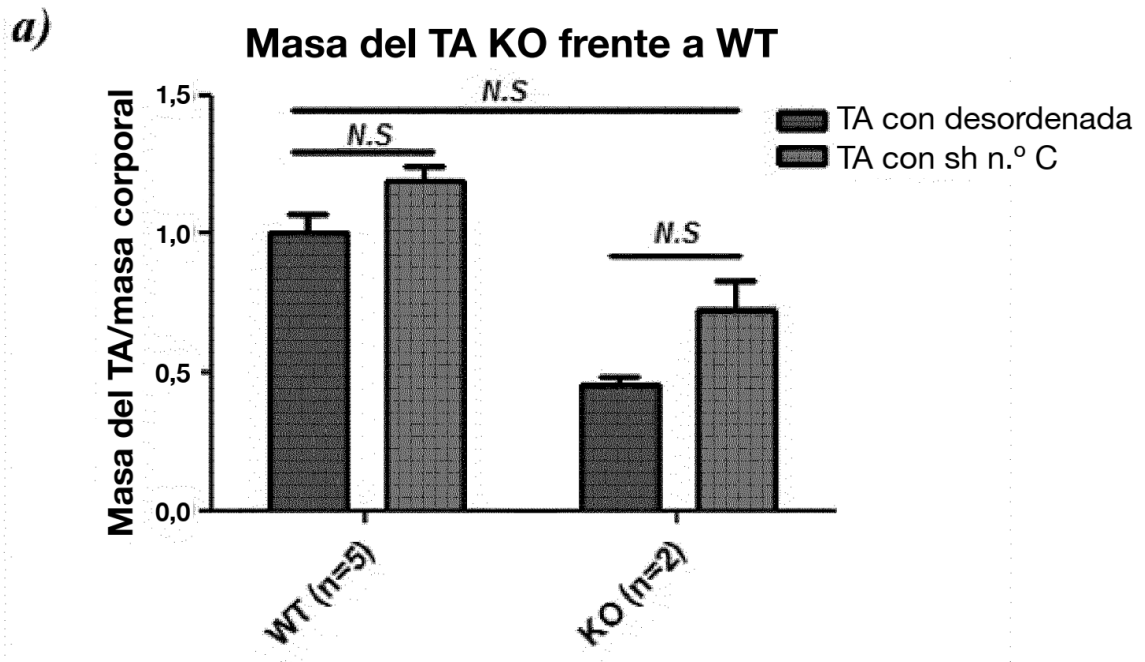
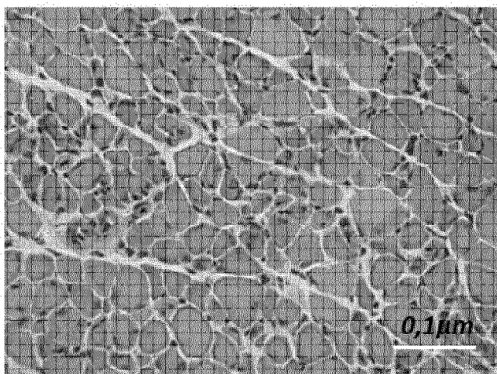


Figura 28

Gastrocnemio de Mtm1-/y KO con
desordenada



Gastrocnemio de Mtm1-/y KO con
shDnm2 n.º C

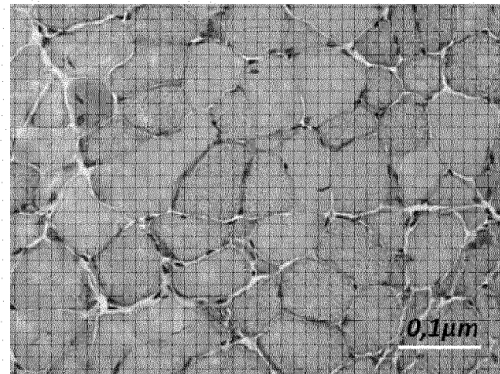


Figura 29

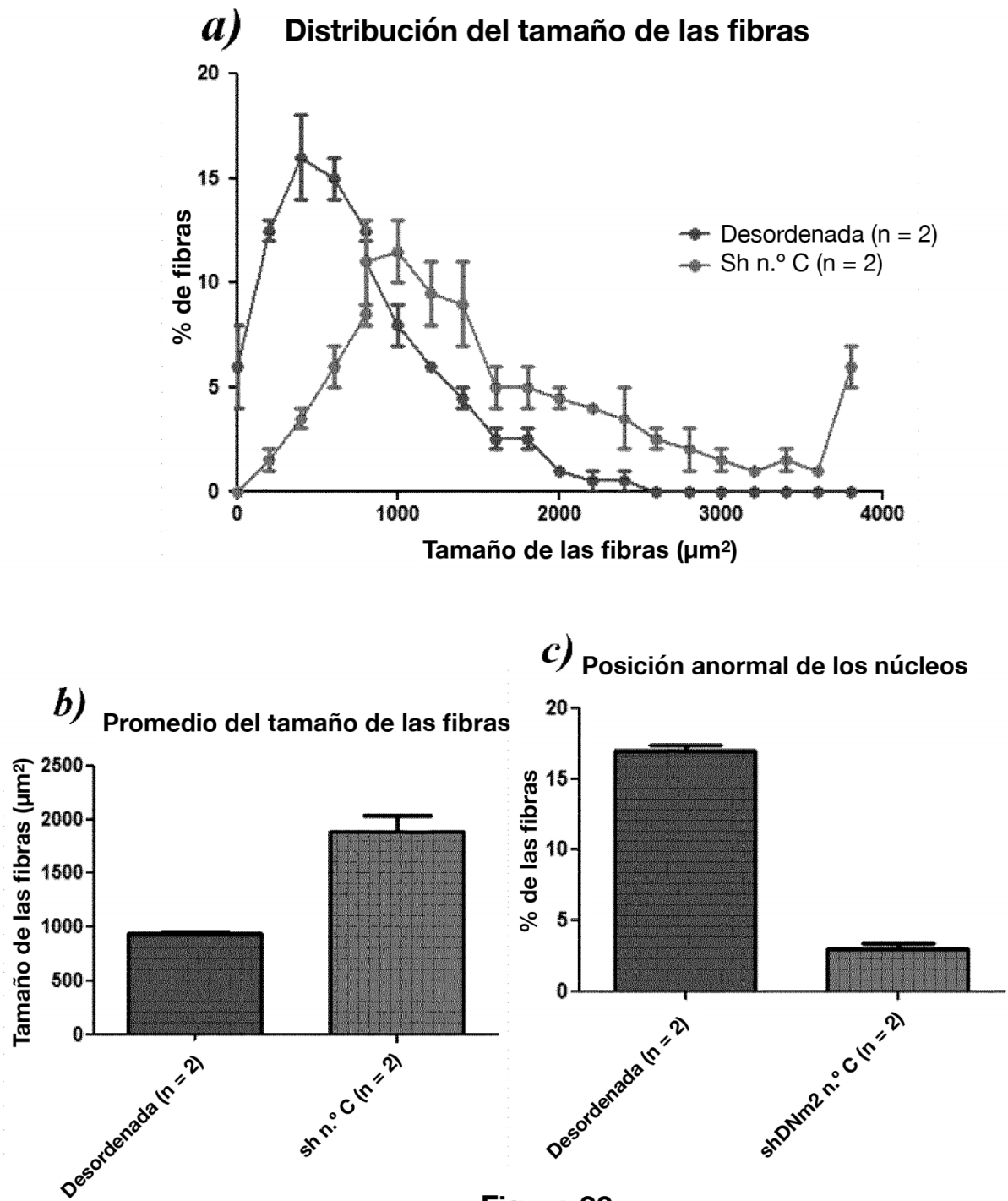


Figura 30