(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 691 443**

(51) Int. CI.:

A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2011 PCT/US2011/036803**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2011 WO11146480**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2011 E 11784086 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2571514**

(54) Título: **Mutantes de biglicano y agentes terapéuticos relacionados y métodos de uso**

(30) Prioridad:

17.05.2010 US 345557 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2018

(73) Titular/es:

BROWN UNIVERSITY (100.0%)
Brown Technology Partnerships Horace Mann Building 47 George Street, Third Floor
Providence, RI 02912, US

(72) Inventor/es:

FALLON, JUSTIN, R.;
AMENTA, ALISON, R.;
MCKECHNIE, BETH, A.;
DECHENE, MICHELLE y
YILMAZ, ATILGAN

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Mutantes de biglicano y agentes terapéuticos relacionados y métodos de uso

Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/345.557, presentada el 17 de mayo de 2010. Las enseñanzas completas de la solicitud referenciada se incorporan expresamente en el presente documento por referencia.

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene una lista de secuencias que se ha presentado en formato ASCII mediante EFS-Web y se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Dicha copia en ASCII, creada el 17 de mayo de 2011, se denomina BURF012WO1.txt. y tiene un tamaño 14.904 bytes.

Antecedentes de la invención

El complejo proteico asociado a distrofina (DAPC) une el citoesqueleto a la matriz extracelular y es necesario para mantener la integridad de la célula muscular/membrana plasmática. El DAPC central consiste en la distrofina de la molécula de armazón citoesquelético y los subcomplejos transmembrana de distroglicano y sarcoglicano. El DAPC también sirve para localizar moléculas de señalización clave en la superficie de la célula, al menos, en parte, a través de sus sintrofinas asociadas (Brenman, y col., (1996) Cell. 84: 757-767; Bredt, et al. (1998), *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 14592). Las mutaciones en la distrofina o en cualquiera de los sarcoglicanos dan como resultado distrofias musculares caracterizadas por la ruptura de la membrana de la célula muscular, la pérdida de miofibras y la fibrosis (Hoffman, et al., 1987. *Cell.* 51: 919; Straub y Campbell (1997) *Curr Opin Neurol.* 10: 168). Además, las mutaciones en la proteína de la matriz extracelular laminina-α2, que se asocia con el DAPC en la superficie celular, es la base de una distrofia muscular congénita grave (Helbling-Leclerc, et al. (1995*) Nat Genet.* 11: 216).

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

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

La lámina basal sináptica (SBL) se interpone entre las membranas pre y postsinápticas y contiene moléculas importantes para la estructura, función y regulación de la unión neuromuscular (Bowe, M.A & Fallon, J.R., (1995) *Ann. Rev. Neurosci.* 18: 443; Sanes, et al. (1999) *Ann. Rev. Neurosci.* 22: 389). Consiste en un conjunto distinto de moléculas de matriz extracelular que incluyen lamininas especializadas, proteoglicanos y colágenos (Hall, et al (1993) *Neuron* 10: (Suppl.) 99). La SBL también contiene moléculas esenciales para la regulación de la estructura y la función sináptica, incluidas AChE, neuregulinas y agrina. La SBL por lo tanto sirve tanto como una estructura

especializada para mantener la diferenciación localizada de la sinapsis así como un repositorio de moléculas reguladoras esenciales.

La composición molecular de la membrana postsináptica se conoce con considerable detalle. Como se ha señalado anteriormente, la proteína de membrana más abundante es el AChR. La proteína citosólica rapsina asociada al AChR (anteriormente conocida como la proteína de 43 kD) está presente en niveles estequiométricos con el receptor y es probable que forme un enlace clave entre el dominio citosólico del AChR y el citoesqueleto (Froehner, et al (1995) *Nature* 377: 195; Gautam, et al. (1995) *Nature* 377: 232). La membrana postsináptica también está enriquecida en erbB2-4, algunas o todas ellas sirven como receptores de neuregulina (Altiok, et al. (1995) *EMBO J.* 14: 4258; Zhu, et al. (1995) *EMBO J.* 14: 5842). AChR y otras moléculas esenciales para la comunicación nervio-músculo. Los elementos del citoesqueleto se pueden agrupar ampliamente en dos subconjuntos. La distrofina y la utrofina son miembros del DAPC y están unidas a la lámina basal sináptica a través del heterómero transmembrana α-/β-distroglicano. El citoesqueleto postsináptico también está enriquecido en varias moléculas asociadas a la adhesión focal que incluyen α-actinina, vinculina, talina, paxilina y filamina (Sanes, et al (1999) *Ann*. *Rev. Neurosci.* 22: 389). Las últimas proteínas probablemente se comunican, directa o indirectamente, con la matriz extracelular a través de integrinas, algunas de las cuales se enriquecen en las sinapsis (Martin, et al., (1996) *Dev*. *Biol.* 174: 125). La actina está asociada a ambos conjuntos de moléculas del citoesqueleto (Rybakova et al. (1996) *J. Cell Biol.* 135: 661; Amann, et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 28419-23; Schoenwaelder et al. (1999) *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 274). Se consideran a continuación las funciones de estos conjuntos especializados de proteínas.

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

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

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

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

Está claro que el distroglicano y el DAPC desempeñan papeles cruciales en varios procesos en los músculos y en otros tejidos. Existe la necesidad de desarrollar agentes y métodos terapéuticos que modulen las funciones del distroglicano y/o del DAPC.

Sumario de la invención

La invención se refiere al polipéptido terapéutico relacionado con biglicano para su uso como se define en las reivindicaciones 1-7.

El documento WO2008100789 divulga un polipéptido de biglicano humano modificado.

El documento WO2003070195 divulga ensayos para detectar la unión entre MuSK y composiciones de biglicano.

El documento WO2007123848 divulga una composición parenteral acuosa para administrar, tratar o prevenir trastornos o afecciones neuromusculares.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano, que comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos dos sustituciones de restos de aminoácidos en dos restos de serina de un biglicano correspondiente, de modo que el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano no comprende ninguna cadena lateral de glicosaminoglicano (GAG). En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 9 o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, los dos restos de serina están en las posiciones correspondientes a los restos 42 y 47 de la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10 o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11 o un fragmento de la misma.

En determinadas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano activa la quinasa específica muscular (MuSK) en la célula. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano potencia la fosforilación de MuSK inducida por agrina. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano aumenta los niveles de utrofina. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano se une a MuSK. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano se une a un α-sarcoglicano y/o γ-sarcoglicano. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano induce la fosforilación de los sarcoglicanos. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano potencia el agrupamiento inducido por agrina de los receptores de acetilcolina (AChR). En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano comprende una o más LRR en la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a los aminoácidos 38-365 de la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano está codificado por un ácido nucleico que hibrida con la SEQ ID NO: 8.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende: (i) un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para estabilizar complejos proteicos asociados a distrofina (DAPC) en la superficie de una célula, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano o con una composición que comprende un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para activar una membrana postsináptica de una célula, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano o con una composición que comprende un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona además un método para activar MuSK en una célula, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano o con una composición que comprende un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano.

En algunas de las realizaciones anteriores, la célula es una célula muscular.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para tratar una afección asociada a un complejo proteico asociado a la distrofina anormal (DAPC) en células de un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano o una composición que comprende un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano. Por ejemplo, la afección puede ser una distrofia muscular seleccionada de la distrofia muscular de Duchenne, Distrofia Muscular de Becker, Distrofia Muscular Congénita, Distrofia muscular de cinturas y distrofia miotónica.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para tratar una afección caracterizada por una unión neuromuscular o sinapsis anormal en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano o una composición que comprende un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano. Tal afección puede ser una enfermedad neuromuscular o neurológica.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una afección asociada a una deficiencia de colágeno VI, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un

polipéptido terapéutico relacionado con biglicano o una composición que comprende un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano. La afección asociada a una deficiencia de colágeno VI puede ser miopatía de Bethlem, distrofia muscular congénita de Ullrich o distrofia de Sorsby de fondo de ojo.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación también proporciona un método para producir cualquiera de los polipéptidos relacionados con biglicano descritos en el presente documento, que comprende: (a) proporcionar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido y (b) cultivar la célula en condiciones que permiten la producción de dicho polipéptido. El método puede comprender además una etapa de (c) purificar el polipéptido.

En determinados aspectos, la divulgación proporciona un método para detectar la unión entre MuSK y un biglicano, que comprende: (a) fijar el biglicano a un soporte sólido, (b) poner en contacto el biglicano con una proteína de fusión que comprende un ectodominio MuSK y un dominio Fc y (c) analizar la unión del biglicano a la proteína de fusión.

Breve descripción de las Figuras

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

La Figura 2 muestra el alineamiento de secuencias entre las secuencias DAG-125 de Torpedo (SEQ ID NO: 1-3) y biglicano humano (SEQ ID NO: 4-6).

La Figura 3 es un diagrama de la estructura de biglicano. La prepro-región, que está ausente en el biglicano maduro corresponde a los aminoácidos 1-37 de la SEQ ID NO: 9; la región N-terminal rica en cisteína corresponde a los aminoácidos 38-80 de la SEQ ID NO: 9; la región LRR corresponde aproximadamente a los aminoácidos 81-314 de la SEQ ID NO: 9; y la región C-terminal rica en cisteína corresponde a los aminoácidos 315-368 de la SEQ ID NO: 9. Los círculos representan sitios de unión para las cadenas laterales de condroitín sulfato. "S-S" indica unión de disulfuro intracatenaria.

La figura 4 muestra la forma no glicanada (NG) y la forma de proteoglicano (PG) de biglicano. Se analizó el material final mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie. Los pesos moleculares de la escalera se indican a la izquierda del gel. La flecha a la izquierda del gel indica la forma no glicanada (NG) de biglicano y la flecha a la derecha del gel indica la forma de proteoglicano (PG) de biglicano.

La Figura 5 muestra el análisis de la forma NG y la forma PG de biglicano. Se analizó el material final mediante ensayo de chips en un Bioanalyzer 2100 Protein 80 de Agilent. 2 µg de proteína total cargada por pocillo. El panel superior muestra una imagen de pseudogel. Los paneles inferiores son electroferogramas de los patrones y de cada muestra. Los picos inferiores a 4 kd y superiores a 95 kd son picos de sistema utilizados para la calibración de los chips.

La Figura 6 muestra el análisis de biglicano S5A, S10A por SDS-PAGE. Se analizó el material final mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie. Los pesos moleculares de la escalera se indican a la izquierda del gel. El doble mutante His-Biglicano (S5A, S10A), designado SA, se cargó en el gel en dos cantidades diferentes, indicadas encima de cada carril.

La Figura 7 muestra el análisis final de biglicano S5A, S10A en un Bioanalyzer 2100 de Agilent. Se cargaron 2 µg de His-Biglicano (S5A, S10A) en un chip Protein 80. El panel superior es la imagen de pseudogel. El panel derecho muestra el electroferograma. Las bandas inferiores a 6 kd y superiores a 95 kd son picos de sistema utilizados para la calibración.

La Figura 8 muestra el análisis de transferencia de western de biglicano recombinante no glicanado (NG) y mutante S5A, S10A. Las muestras se procesaron en una SDS PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sondearon con un anticuerpo de biglicano. El carril marcado como "ser-al" contiene el biglicano S5A; S10A. Las posiciones de aminoácidos indicadas son las de la proteína madura.

La Figura 9 muestra la actividad biológica de biglicano NG y S5A-S10A en un bioensayo de cultivo celular. Panel superior: Los miotubos primarios de pollo se trataron con 1U de agrina purificada y concentraciones variables de biglicano NG o S5A-S10A. A continuación, se contó el número de grupos de AChR por segmento de miotubo en cultivos por triplicado como se describe en (Nastuk et al., 1991, PMID 1660286). El nivel de agrupamiento de AChR inducido por agrina solo se indica por la línea de puntos horizontal. Panel inferior: se muestran los efectos de PG, NG y S5A-S10A en el agrupamiento de AChR.

Las Figuras 10 a y b muestran que el biglicano S5A-S10A disminuye el daño muscular en ratones mdx, (a) se inyectaron ratones Mdx a P18 semanalmente por vía intraperitoneal durante dos semanas con vehículo o con biglicano S5A-S10A y se midieron los niveles de creatina quinasa sérica (sCK). Los niveles de sCK se redujeron más de 2 veces en los animales inyectados con biglicano, ($p < 0.01$; $n = 4$). (b) Se inyectaron ratones Mdx a P18 y P25 con las cantidades indicadas de biglicano recombinante humano S5A-S10A (T2-rhBGN) marcado con his. El suero se cosechó en P32. (ANOVA p=0,002; comparación por pares post hoc $p < 0,05$.)

La Figura 11a-c muestra la eficacia funcional del rhBGN S5A-S10A. A los ratones Mdx se les administró 10 mg/kg de SA-rhBGN durante 3 meses en los intervalos indicados. Se realizaron las mediciones de contracción excéntrica en músculo aislado. A los ratones Mdx se les administró T2-rhBGN (10 mg/kg) o vehículo durante 3 meses a intervalos de 7, 14 o 21 días (Q7, Q14, Q21, respectivamente). Se midieron las propiedades fisiológicas

del músculo del diafragma mediante la evaluación ex vivo de la caída de fuerza sobre 5 contracciones musculares excéntricas sucesivas (CEC). (a) Mediciones de disminución de fuerza después de la dosificación a intervalos de 7 días, (b) Histogramas de la disminución de fuerza medida en el 5 ° ECC para cada condición de frecuencia de dosis (n=5 o 6/grupo). (c) Los animales a los que se les administró T2-rhBGN cada 7 días tuvieron una mejoría dramática > 50 % en la función muscular en el 5° ECC (p = 0,007). También hubo una mejoría significativa en el 3° y 4° ECC (p = 0.01, 0,005, respectivamente).

La Figura 12a-c muestra los efectos de SA-rhBGN en miofibras *in vivo*. Se inyectó a ratones Mdx por vía intraperitoneal vehículo o las dosis indicadas de SA-rhBGN a P18 y se determinó el porcentaje de miofibras con núcleos localizados centralmente para el sóleo(b). Se realizó la misma medición para los músculos del diafragma dos semanas después (a). Los niveles de utrofina en la membrana de las células musculares también aumentaron de una manera dependiente de la dosis, medido en el Tibial anterior (c). (*p<0,05)

Las Figuras 13A y B muestran que la administración de biglicano al tejido muscular de un ratón deficiente en biglicano restaura los niveles de colágeno VI. A. El biglicano recombinante inyectado se localiza en la superficie de las células musculares. Esta imagen muestra dos campos de visión que muestran inmunomarcaje del músculo cuádriceps derecho de un ratón deficiente en biglicano con un anticuerpo de biglicano, cuatro días después de la inyección con 50 µg de proteoglicano de biglicano recombinante purificado. La microscopía de luz del campo que muestra los depósitos de tinta china se muestra en los paneles superiores. Se detectó el proteoglicano de biglicano recombinante purificado inyectado con el anticuerpo 2A5. Los paneles inferiores muestran la inmunofluorescencia de biglicano en los mismos campos que los paneles superiores y muestran que el biglicano inyectado persiste en el músculo y se localiza en las membranas de la fibra muscular. Se observaron resultados similares en 6 animales. B. El biglicano recombinante inyectado regula positivamente los niveles de colágeno VI *in vivo*. Esta imagen muestra dos campos de visión que muestran inmunomarcaje del músculo cuádriceps derecho de un ratón deficiente en biglicano con un anticuerpo contra el colágeno VI que se muestra cuatro días después de la inyección con 50 µg de proteoglicano de biglicano recombinante purificado. La microscopía de luz de los mismos campos muestra los depósitos de tinta china (identificando el lugar de la inyección). Los paneles inferiores muestran la inmunofluorescencia de colágeno en los mismos campos que los paneles superiores y muestran que el proteoglicano de biglicano recombinante purificado inyectado regula positivamente la expresión de colágeno VI en las membranas de la fibra muscular. Se observaron resultados similares en seis animales.

La Figura 14 representa los resultados de ensayos de transferencia de lectina de formas recombinantes de biglicano NG, PG y SA. Panel superior, Tinción de Ponceau e imágenes de transferencia de lectina. Panel inferior, sumario de resultados.

La Figura 15 representa los resultados del análisis de glicosilación ligada a N de las formas NG y SA de biglicano.

La Figura 16 muestra el primer paso de un protocolo para purificar biglicano mutante sin etiquetar. En esta etapa de captura, se utilizó una columna de intercambio de aniones. El gel de Coomassie insertado muestra que el biglicano se eluyó en el primer pico.

La Figura 17 muestra el segundo paso de un protocolo para purificar biglicano mutante sin etiquetar. Esta etapa de purificación elimina las impurezas a granel usando cromatografía de interacción hidrófoba. El gel de Coomassie insertado muestra que el biglicano se eluyó en el primer pico.

Las Figuras 18a y b muestran el aislamiento de líneas celulares clonales CHO-S estables que expresan TVN-102 (rhBGN S5A-S10A sin etiquetar). (a) Dos líneas celulares CHO-S estables que producen TVN-102 en los pasos indicados en los matraces de agitación, (b.) Transferencia Western de los sobrenadantes del clon 4 que muestra la homogeneidad del producto TVN-102.

La Figura 19 muestra el análisis por SDS-PAGE de la purificación de TVN-102 a partir de una línea clonal de CHO-S. Calle 1: Medio condicionado de una línea de CHO-S estable que expresa TVN-102. Calle 2: Fracciones agrupadas de la columna de intercambio iónico. Calle 3: Fracciones agrupadas de la columna de HIC. Gel teñido con azul de Coomassie; 10 µg de proteína total/carril. La pureza final de TVN-102 fue> 90 % según el Bioanalizador Agilent.

Las Figuras 20 a y b muestran que los bioensayos y los ensayos de proteínas muestran actividad cuantificable y reproducible de biglicano recombinante. (a) Un ensayo de bioactividad de cultivo celular muestra cuatro preparaciones purificadas separadas de biglicano recombinante: 1: rhBGN S5A-S10A marcado con his; 2, 3: dos purificaciones independientes de BGN murino recombinante S5A-S10A; 4: rhBGN humano S5A-S10A. Todas las muestras fueron a 0,05 µg/ml (1,4 nM). (-): no biglicano. (b) Un ensayo de unión a proteínas donde las preparaciones indicadas de NG, S5A-S10A (marcado T2 en la figura) o rhBGN PG se revistieron en placas de pocillos múltiples y a continuación se sondearon con una fusión Fc del ectodominio MuSK. Téngase en cuenta que tanto rhBGN NG como S5A-S10A se unen a MuSK mientras que rhBGN PG no.

Descripción detallada de la invención

I. <u>Descripción general</u>

La presente divulgación proporciona composiciones y métodos relacionados con biglicano para tratar y/o prevenir enfermedades o afecciones asociadas a un DAPC disfuncional, una estructura celular inestable, un defecto en las uniones o sinapsis neuromusculares, o una deficiencia de colágeno VI. Dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, distrofias musculares, tal como Duchenne, de cinturas, otras miopatías, trastornos neuromusculares y

trastornos neurológicos.

Adicionalmente, en vista de la amplia distribución tisular de los DAPC y los distroglicanos, es probable que el biglicano desempeñe un papel en la regulación de la señalización a través de la membrana citoplásmica y/o en el mantenimiento de la integridad de las membranas citoplasmáticas de células distintas a las células musculares. Por ejemplo, el distroglicano u otros componentes del DAPC son abundantes en cerebro, riñón y corazón. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona, de manera más general, composiciones relacionadas con biglicano y métodos terapéuticos para enfermedades o trastornos asociados a una anormalidad de un complejo de proteína de membrana con el que el polipéptido relacionado con biglicano interacciona, por ejemplo, el receptor DAPC o MuSK.

Como se sabe que el distroglicano es un receptor utilizado por los microorganismos para entrar en las células (por ejemplo, fiebre de Lassa y virus de la fiebre de la coriomeningitis), los agentes terapéuticos relacionados con biglicano descritos en este documento pueden usarse para tratar y/o prevenir infecciones por tales microorganismos. Sin querer limitarse a un mecanismo de acción específico, los agentes terapéuticos relacionados con biglicano pueden obstaculizar o inhibir la unión del microorganismo a distroglicano.

Se ha demostrado que tanto el biglicano humano (por ejemplo, en Fischer et al. as “bone small proteoglycan” J. Biol. Chem. 264: 4571 (1996); N.º de acceso al GenBank J04599; SEQ ID NO: 9) como DAG-125 aislado del órgano eléctrico de *Torpedo* interactúan con los componentes del DAPC. Basándose en las homologías de secuencia entre las dos proteínas y actividades biológicas similares (descritas adicionalmente en este documento), se cree que el biglicano humano (SEQ ID NO: 9) puede ser el ortólogo humano del DAG-125 de *Torpedo*. Como alternativa, el ortólogo humano del DAG-125 de *Torpedo* puede ser una proteína altamente relacionada con el biglicano humano. Por razones de claridad, el término "biglicano" como se usa en el presente documento pretende incluir el biglicano humano (SEQ ID NO: 9) y DAG-125 de *Torpedo*, así como sus homólogos.

II Definiciones

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

"GAG" se refiere a glicosaminoglicanos, usados indistintamente en este documento con "mucopolisacáridos", que son cadenas de polisacáridos largas, no ramificadas, compuestas de unidades repetidas de disacáridos. Uno de los dos azúcares es siempre un amino azúcar (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina). Los glicosaminoglicanos están unidos covalentemente a un resto de serina de una proteína central, para formar una molécula de proteoglicano.

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

El término "biglicano" se refiere a polipéptidos que tienen al menos una actividad biológica de biglicano humano o de DAG-125 de *Torpedo*. Los biglicanos preferidos incluyen DAG-125 de *Torpedo* (que comprende las SEQ ID NO: 1-3), biglicano humano (SEQ ID NO: 9), así como homólogos y fragmentos de los mismos. Los homólogos preferidos son proteínas o péptidos que tienen al menos aproximadamente el 70 % de identidad, al menos aproximadamente el 75 % de identidad, al menos aproximadamente el 80 % de identidad, al menos aproximadamente el 85 % de identidad, al menos aproximadamente el 90 % de identidad, al menos aproximadamente el 95 % de identidad, y aún más preferentemente, al menos aproximadamente el 98 o 99 % de identidad. Homólogos aún más preferidos son aquellos que tienen un cierto porcentaje de homología (o identidad) con biglicano humano o DAG-125 de *Torpedo* y tienen al menos una actividad biológica de estas moléculas. El término biglicano no se limita al biglicano de longitud completa, sino que también incluye fragmentos (porciones) que tienen al menos una actividad de biglicano. Biglicano, como se usa el término en el presente documento, se refiere a formas del polipéptido tanto con como sin las cadenas laterales de GAG.

La expresión "biglicano humano de tipo salvaje" se refiere a la proteína descrita en Fischer et al. J. Biol. Chem. 264: 4571 (1989), que tiene N.º de acceso al GenBank J04599 y la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9. Una secuencia de ADNc que codifica la proteína de biglicano humano de tipo salvaje se expone en la SEQ ID NO: 7 y el marco de lectura abierto de la misma como la SEQ ID NO: 8.

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

Tal como se describe en el presente documento, la expresión "agente terapéutico relacionado con biglicano" se refiere a un polipéptido de tipo biglicano en el que los dos restos de aminoácidos correspondientes a los dos restos de serina glicanados de una proteína de biglicano de tipo salvaje (por ejemplo, DAG-125 de Torpedo o biglicano de

mamífero, preferentemente humano) se eliminan o reemplazan por otro aminoácido (preferentemente glicina o un aminoácido con una cadena lateral de alquilo, como alanina) de manera que el polipéptido carece de cadenas laterales de glicosaminoglicano (GAG) (es decir, porque carece de los sitios de glicanación de tipo salvaje). Además, un agente terapéutico relacionado con biglicano tiene una o más de las características y actividades biológicas de un biglicano de tipo salvaje. Por ejemplo, un agente terapéutico relacionado con biglicano puede tener una o más de las siguientes características: un peso molecular de entre aproximadamente 35 y aproximadamente 55 kDa; una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % idéntica a una o más de las SEQ ID NO: 1-6 o a los restos 38-365 de las SEQ ID NO: 9, 10 o 11; y una o más actividades biológicas de biglicano, como se detalla a continuación, bajo la definición correspondiente.

La expresión "agente terapéutico relacionado con biglicano" incluye además porciones de los polipéptidos de tipo biglicano descritos anteriormente y que tienen al menos una actividad biológica de un biglicano de tipo salvaje. La expresión "agente terapéutico relacionado con biglicano" también incluye un péptido mimético o derivado del mismo o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de tipo biglicano.

Una "actividad biológica de biglicano" se refiere a una o más de: la capacidad de mantener la integridad de una membrana plasmática; la capacidad de estabilizar los DAPC en las membranas plasmáticas; la capacidad de unirse a uno o más componentes de los DAPC; por ejemplo, unión a α-distroglicano (en el caso de ciertos biglicanos tales como biglicano humano de tipo salvaje), unión a un componente de sarcoglicano, tal como α-sarcoglicano o γ-sarcoglicano; unión a MuSK; unión a colágeno VI; estimular la formación de uniones neuromusculares, como por estimulación de la diferenciación postsináptica; potenciación de la agregación de AChR, por ejemplo, agregación de AChR inducida por agrina; fosforilación de los componentes de DAPC, por ejemplo, sarcoglicanos; estimulación de la fosforilación de MuSK o potenciación de la fosforilación de MuSK inducida por agrina. En determinadas realizaciones, el biglicano se une a MuSK, a α-sarcoglicano, a γ-sarcoglicano y a colágeno VI, pero no se une a α-distroglicano.

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

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

El término "DAPC" se refiere a "complejo de proteína asociado a distrofina", un complejo de membrana, expuesto en la Figura 1, que comprende distrofina, α-y β-distroglicanos y el complejo transmembrana de sarcoglicano.

Los "sarcoglicanos" salen en diferentes formas, incluidos los sarcoglicanos α, β, gamma, delta y épsilon. Algunos sarcoglicanos son específicos para ciertos tejidos, por ejemplo, los sarcoglicanos α y delta son específicos del músculo esquelético.

Las "proteínas asociadas a la distrofina" incluyen proteínas o glicoproteínas, tales como α-distroglicano, distrobrevina, sarcospan y las sintrofinas.

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

El término "SLRP" se refiere a pequeño proteoglicano rico en repeticiones de leucina.

El término "MuSK" usado indistintamente en el presente documento con "quinasa específica muscular", se refiere a una proteína tirosina quinasa, que se expresa en músculo normal y denervado, así como en otros tejidos incluyendo corazón, bazo, ovario o retina. (Véase Valenzuela, D., et al., 1995, *Neuron* 15: 573-584). La tirosina quinasa se ha denominado alternativamente "Dmk" para "quinasa de musculo denervado". Por lo tanto, los términos MuSK y Dmk pueden usarse de manera indistinta. La proteína parece estar relacionada con la familia Trk de tirosina quinasas y se describe adicionalmente en la patente de los Estados Unidos Nº 5.814.478.

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

Aplicado a polipéptidos, la expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están óptimamente alineadas, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hendidura predeterminados, comparten al menos un 80 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, una identidad de secuencia del 99 por ciento). Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de

aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen sulfuro es cisteína y metionina. Los grupos preferidos de sustitución conservativa de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

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

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

Un "miotubo" es una célula multinucleada alargada (tres o más núcleos) que contiene algunas miofibrillas ubicadas periféricamente. Se forman *in vivo* o *in vitro* mediante la fusión de mioblastos y eventualmente se convierten en fibras musculares maduras que tienen núcleos localizados periféricamente y la mayor parte de su citoplasma lleno de miofibrillas.

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un episoma, es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extracromosómica. Los vectores apropiados son aquellos capaces de replicación autónoma y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos operativamente se denominan, en el presente documento,"vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de "plásmidos" que se refieren generalmente a bucles de ADN bicatenario circulares que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. En la presente memoria descriptiva, "vector", salvo que se especifique otra cosa, significa "plásmido", ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la divulgación también proporciona otras formas de vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes y que se conocen en la técnica a continuación.

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

Los términos "quimérico", "fusión" y "compuesto" se usan para indicar una proteína, dominio peptídico o secuencia nucleotídica o una molécula que contiene al menos dos porciones componentes que son mutuamente heterólogas en el sentido de que, por otra parte, no se encuentran directamente (covalentemente) unidas en la naturaleza. Más

específicamente, las porciones componentes no se encuentran en el mismo polipéptido o gen continuo en la naturaleza, al menos no en el mismo orden u orientación o con el mismo espaciamiento presente en la proteína quimérica o el dominio compuesto. Tales materiales contienen componentes derivados de al menos dos proteínas o genes diferentes o de al menos dos porciones no adyacentes de la misma proteína o gen. Las proteínas compuestas y las secuencias de ADN que las codifican, son recombinantes en el sentido de que contienen al menos dos porciones constituyentes que,por lo demás, no se encuentran directamente unidas (covalentemente) entre sí en la naturaleza.

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

La expresión "activar una membrana postsináptica" se refiere a la estimulación de la transferencia de una señal en la unión neuromuscular, en general, de una célula nerviosa a una célula muscular. La activación generalmente incluye la estimulación de la agregación de AChR en la membrana celular en la unión neuromuscular; y/o la fosforilación de MuSK. La activación da como resultado la inducción de la diferenciación postsináptica.

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

III. Polipéptidos terapéuticos relacionados con biglicano

Un aspecto de la presente divulgación proporciona agentes terapéuticos relacionados con biglicano para su uso en el mantenimiento de la integridad de las membranas de células plasmáticas, en particular, agentes terapéuticos relacionados con biglicano que estabilizan complejos proteicos asociados a distrofina (DAPC) en estas membranas, evitando así la desintegración de las membranas. La presente divulgación también proporciona agentes terapéuticos relacionados con biglicano que estimulan la formación de uniones neuromusculares, tal como estimulando la diferenciación de la membrana postsináptica y, más en general, agentes terapéuticos relacionados con biglicano que estimulan la formación de sinapsis.

En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos relacionados con biglicano incluyen un polipéptido mutante de biglicano que comprende al menos dos sustituciones de restos de aminoácidos en dos restos de serina (por ejemplo, en los restos 42 y 47 de la SEQ ID NO: 9) de manera que el polipéptido de biglicano no comprende ninguna cadena lateral de glicosaminoglicano (GAG). Por ejemplo, el polipéptido mutante de biglicano puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10 o un fragmento de la misma. La SEQ ID NO: 10 es una secuencia consenso, en donde los restos 42 y 47 pueden estar independientemente ausentes o pueden ser cualquier aminoácido excepto serina o treonina. En determinadas realizaciones, los restos 42 y 47 de la SEQ ID NO: 10 están ambos presentes. En determinadas realizaciones, el polipéptido mutante de biglicano comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11 o un fragmento de la misma. La SEQ ID NO: 11 es similar a la SEQ ID NO: 9, pero incluye las mutaciones S42A y S47A.

Los polipéptidos mutantes de biglicano sujeto pueden producirse usando cualquier técnica adecuada. Numerosas técnicas de este tipo son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede lograr la modificación de la secuencia de ADN que codifica biglicano alterando uno o más nucleótidos empleando mutagénesis dirigida al sitio. En general, la técnica de mutagénesis específica de sitio es bien conocida en la técnica como se ejemplifica por publicaciones (Carter et al., 1986, Biochem J., 237(1): 1-7; Sambrook, et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Como se apreciará, la técnica normalmente emplea un vector fagémido que existe tanto en una forma monocatenaria como en una doble cadena. Como alternativa, los mutantes pueden generarse usando PCR ™. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis dirigida al sitio incluyen vectores tales como el fago M13 (Messing et al., 1981) o pUC 119. Estos vectores están fácilmente disponibles comercialmente y su uso es generalmente bien conocido por los expertos en la materia. Como alternativa, los métodos de mutagénesis dirigida al sitio que emplean plásmidos o fagémidos bicatenarios y similares también son bien conocidos en la técnica y además se pueden usar.

En una realización particular, un agente terapéutico relacionado con biglicano se une a uno o más componentes del DAPC. El agente terapéutico de biglicano se une preferentemente a un componente de sarcoglicano, tal como α-sarcoglicano. En una realización incluso más preferida, el agente terapéutico de biglicano se une a un componente del complejo de sarcoglicano, por ejemplo, seleccionado de α-sarcoglicano, γ-sarcoglicano y δ-sarcoglicano. El componente del sarcoglicano al que se une el polipéptido relacionado con biglicano es preferentemente α-sarcoglicano. En general, los péptidos terapéuticos relacionados con biglicano entran en contacto con uno o más componentes del DAPC, por ejemplo, para estabilizar de ese modo el complejo y reducir la desestabilización de la membrana plasmática resultante de un complejo anormal de DAPC, como los que se observan en las distrofias musculares.

En determinadas realizaciones, el agente terapéutico relacionado con biglicano se une a MuSK, a α-sarcoglicano, a γ-sarcoglicano y a colágeno VI, pero no se une a α-distroglicano. Incluso en realizaciones en las que el biglicano no se puede unir α-distroglicano, todavía hay mecanismos por los cuales el biglicano podría influir en α-distroglicano

indirectamente. Los siguientes mecanismos deben considerarse teorías no vinculantes: 1) el biglicano puede unir colágeno VI y reclutar otros ligandos para alfa-DG; este mecanismo podría ocurrir en tejidos musculares o no musculares, 2) el biglicano podría unirse a MuSK y, por lo tanto, reclutar indirectamente α-distroglicano, y 3) ya que el biglicano es conocido por dimerizar, el biglicano mutante incapaz de unirse al α-distroglicano podría heterodimerizarse con el proteoglicano de biglicano endógeno y así reclutar α-distroglicano.

En otras realizaciones, los agentes terapéuticos relacionados con biglicano se unen al receptor de tirosina quinasa MuSK. Tales compuestos se pueden unir a MuSK y/o a un componente del complejo de sarcoglicano, por ejemplo, a α-sarcoglicano. En realizaciones preferidas, un agente terapéutico relacionado con biglicano activa MuSK e induce la fosforilación de α y/o γ-sarcoglicano.

Los sujetos terapéuticos relacionados con biglicano preferentemente se unen específicamente a una o más de las moléculas citadas anteriormente, es decir, no se unen de forma significativa o a un nivel detectable a otras moléculas para producir un efecto indeseable en la célula. Los agentes terapéuticos relacionados con biglicano se unen preferentemente con una constante de disociación de 10^{-6} o menos, y aún más preferentemente con una constante de disociación de 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}, o 10^{-13} M o menos. La constante de disociación puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

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

En otras realizaciones preferidas, los agentes terapéuticos relacionados con biglicano tienen una o más actividades biológicas de biglicano, además de, o en lugar de, poder unir uno o más componentes del DAPC y/o MuSK. Por ejemplo, un agente terapéutico relacionado con biglicano puede estimular la formación de uniones neuromusculares, en particular, la diferenciación de la membrana postsináptica, que incluye la inducción de la agregación de AChR y o la estimulación de la fosforilación de tirosina inducida por agrina de MusK.

En determinadas realizaciones, un agente terapéutico relacionado con biglicano potencia el agrupamiento de AChR inducido por agrina de forma bifásica, con una potenciación a bajas concentraciones y una despotenciación a niveles superiores. Opcionalmente, el agente terapéutico relacionado con biglicano no inhibe el agrupamiento de AChR inducido por agrina a altas concentraciones.

En determinadas realizaciones, un agente terapéutico relacionado con biglicano disminuye el daño muscular *in vivo*.

El agente terapéutico relacionado con biglicano puede ser una proteína o un derivado de la misma, un péptido mimético o derivado del mismo, o un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido mutante de biglicano). En general, el agente terapéutico relacionado con biglicano tiene las características requeridas, por ejemplo, unión a α-sarcoglicano y/u otros componentes del DAPC.

En determinadas realizaciones, el agente terapéutico relacionado con biglicano comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: IQAIEFEDL (SEQ ID NO:1); LGLGFNEIR (SEQ ID NO:2); y TSYHGISLFNNPVNYWDVL (SEQ ID NO:3), o secuencias de amino ácidos relacionadas con las mismas, tales como secuencias de aminoácidos del ortólogo de mamífero de la proteína de *Torpedo* a partir de la cual se obtuvieron estas secuencias de aminoácidos. El agente terapéutico relacionado con biglicano preferentemente contiene estas tres secuencias o secuencias relacionadas con las mismas. Por ejemplo, el agente terapéutico relacionado con biglicano puede comprender una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos, que forman parte de biglicano humano: IQAIELEDL (SEQ ID NO:4); LGLGHNQIR (SEQ ID NO:5); y AYYNGISLFNNPVPYWEVQ (SEQ ID NO:6).

Aunque las composiciones que incluyen, y los métodos que usan, DAG-125 de *Torpedo* están dentro del alcance de la presente divulgación, las composiciones y los métodos preferidos son los que se refieren a homólogos mamíferos, incluidos los vertebrados, de DAG-125 de *Torpedo*, denominados en el presente documento ortólogos de DAG-125 de *Torpedo*. Los ortólogos preferidos de DAG-125 de *Torpedo* son ortólogos humanos, de roedores, murinos, caninos, felinos, ovinos y bovinos. El ortólogo de mamíferos de DAG-125 es biglicano.

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

Por lo tanto, los polipéptidos proporcionados en el presente documento también pueden ser miembros de la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP), también denominados "proteoglicanos de dermatán sulfato pequeños o no reductores" debido a su incapacidad para interactuar con hialuronano, o debido a su tipo de glicosaminoglicanos, respectivamente. Los SLRP están organizados en tres clases basadas en su organización de proteínas y genómica. Todos los SLRP se caracterizan por un dominio central que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR) flanqueadas a ambos lados por pequeños grupos de cisteína. Los SLRP se describen, por ejemplo, en Iozzo et al. (1998) *Ann. Rev. Biochem.* 67:609, específicamente incorporado al presente documento como referencia.

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

Los SLRP adecuados para su uso en los métodos de la presente invención incluyen mutantes de SLRP de Clase I, tales como biglicano y decorina. Las secuencias de aminoácidos parciales de DAG-125, el proteoglicano de *Torpedo* que se mostró que se unía a α-distroglicano (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.864.236) muestra una fuerte homología con biglicano humano: se encontró una identidad del 78 % en una secuencia total de 37 aminoácidos. El biglicano de roedores, cerdos y seres humanos son > 95 % idénticos. La decorina y biglicano de seres humanos son únicamente un 55 % idénticos. Tal homología es consistente con decorina y biglicano teniendo funciones compartidas y únicas. Por lo tanto, aunque DAG-125 de *Torpedo* tiene una secuencia de aminoácidos que se parece más a la del biglicano humano, basándose en la similitud de estructura y función entre biglicano y decorina, este último proteoglicano y sus derivados también pueden usarse para practicar los métodos del presente documento.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los genes y proteínas de biglicano y decorina de diversas especies están disponibles públicamente, como en GenBank. Por ejemplo, el biglicano humano se puede encontrar con el número de acceso de GenBank J04599 (hPGI humano que codifica el proteoglicano I de hueso pequeño (biglicano), descrito en Fisher et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 4571; las SEQ ID NO: 7 -9 y M65154; el biglicano de vaca se puede encontrar con el número de acceso de GenBank L07953; el biglicano de rata se puede encontrar con el número de acceso de GenBank U17834, el biglicano de ratón se puede encontrar con los números de acceso de GenBank L20276 y X53928; el biglicano de oveja se puede encontrar con el número de acceso de GenBank AF034842; la decorina humana se puede encontrar con el número de acceso de GenBank M14219; el decorina de conejo se puede encontrar con el número de acceso de GenBank 147020; la decorina de pollo se puede encontrar con el número de acceso de GenBank P28675; la decorina de caballo se puede encontrar con el número de acceso de GenBank AF038; la decorina bovina se puede encontrar con el número de acceso de GenBank P21793; la decorina de oveja se puede encontrar con el número de acceso de GenBank AF125041; y la decorina de rata se puede encontrar con el número de acceso de GenBank Q01129. Las secuencias de biglicano y decorina y otros SLRP pueden encontrarse en GenBank.

La decorina y biglicano tienen una y dos cadenas de glicosaminoglicanos (GAG), respectivamente. Su composición es específica de tejido y puede regularse a varios niveles (Hocking et al., (1998) *Matrix Biol* 17: 1-19). Por ejemplo, el GAG de biglicano de la piel y el cartílago es predominantemente dermatán sulfato, mientras que el biglicano sintetizado en el hueso es un proteoglicano de condroitín sulfato. No se han comunicado las cadenas laterales de heparán sulfato. Tanto el núcleo de proteína como el tipo de célula contribuyen a la glicosilación distintiva de estos SLRP.

En determinadas realizaciones específicas, los agentes terapéuticos relacionados con biglicano incluyen proteínas de fusión. Por ejemplo, un polipéptido de tipo biglicano o una porción del mismo se puede fusionar a una porción de inmunoglobulina. Como alternativa, la proteína de fusión puede ser una combinación entre dos o más porciones de proteoglicanos, por ejemplo, una porción de una molécula de biglicano fusionada a una porción de una molécula de decorina.

En determinadas realizaciones específicas, el agente terapéutico relacionado con biglicano incluye porciones y fragmentos de biglicano. Una porción normalmente tiene al menos 5, 10, 15 o 20 aminoácidos de longitud. Las

porciones preferidas son suficientes para ejercer una actividad biológica, tal como la interacción con un componente del DAPC. Las porciones pueden comprender o consistir en uno o más dominios específicos de una proteína. Los dominios de biglicano y decorina incluyen dos regiones ricas en cisteína (incluidas en los aminoácidos 40-50 N- y C-terminal del biglicano maduro) y repeticiones ricas en leucina (LRR). La "región LRR" se refiere a la región de biglicano que contiene las repeticiones y consiste esencialmente en los aminoácidos 81-314. Cada repetición individual se denomina en el presente documento "LRR". Se cree que las LRR median las interacciones proteína: proteína y, por lo tanto, pueden ser suficientes para estabilizar los DAPC y las membranas postsinápticas. Basándose al menos en la observación de que biglicano se une a MuSK, se cree que las LRR están involucradas en la mediación de la interacción de biglicano con MuSK y pueden estar implicadas en la mediación de la fosforilación de MuSK.

En una realización específica, la presente divulgación proporciona un agente terapéutico relacionado con biglicano que consiste en una porción de biglicano capaz de unirse a un sarcoglicano. Se ha demostrado que el dominio de unión al α-sarcoglicano del biglicano humano se localiza en el dominio N-terminal de la proteína biglicano madura, es decir, en los aminoácidos 38-80, y más específicamente, en los aminoácidos 38-58 de la SEQ ID NO: 9. También se ha demostrado que el dominio C-terminal rico en cisteína media la interacción con el γ-sarcoglicano. Por consiguiente, un agente terapéutico relacionado con biglicano puede incluir porciones (fragmentos) de biglicano que consisten en el dominio N-terminal o C-terminal rico en cisteína, es decir, en los aminoácidos 38-80 y 315-368 de la SEQ ID NO: 9. También se describen en este documento las combinaciones de ciertos dominios de biglicano. Por ejemplo, los fragmentos de biglicano pueden consistir en al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos. Las porciones cortas de agentes terapéuticos relacionados con biglicano se denominan "agentes terapéuticos relacionados con mini-biglicanos".

El biglicano humano de tipo salvaje consiste en 368 aminoácidos (SEQ ID NO: 9), de los cuales los aminoácidos 1-19 constituyen un péptido señal (número de acceso de GenBank NP 001702 y Fisher et al., anteriormente citados). Por lo tanto, el biglicano humano de tipo salvaje sin un péptido señal consiste en los aminoácidos 20-368 de la SEQ ID NO: 9. La proteína madura de biglicano consiste en los aminoácidos 38-368 de la SEQ ID NO: 9, ya que los aminoácidos 1-37, que son un pre-propéptido, se escinden durante el procesamiento. Los aminoácidos 38-80 corresponden a la región N-terminal rica en cisteína. Acerca de los aminoácidos 81-314, corresponden a la región de repeticiones ricas en leucina, que contiene 10 repeticiones de aproximadamente 24 o 23 aminoácidos. El marco de lectura abierto en el ADNc que codifica biglicano humano corresponde a los nucleótidos 121-1227 de la SEQ ID NO: 7 y se representa como la SEQ ID NO: 8. La secuencia de nucleótidos que codifica una forma madura de biglicano consiste en los nucleótidos 232-1227 de la SEQ ID NO: 7.

El agente terapéutico relacionado con biglicano puede estar relacionado con una forma madura del núcleo de biglicano, es decir, sin el péptido señal, o con el biglicano de longitud completa con el péptido señal, siempre que las dos serinas glicanadas del núcleo de biglicano sean eliminadas o reemplazadas por otros aminoácidos como se describe en el presente documento.

Los agentes terapéuticos relacionados con biglicano preferidos están codificados por secuencias de nucleótidos que son al menos aproximadamente 70 %, preferentemente al menos aproximadamente 80 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 99 % idénticas a la secuencia de nucleótidos de un SLRP, por ejemplo, biglicano, u ortólogo del mismo, o parte del mismo.

Los ácidos nucleicos preferidos divulgados en el presente documento incluyen los que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 70 %, preferentemente al menos aproximadamente 80 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, o incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 99 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de un SLRP, por ejemplo, biglicano (p. ej., la SEQ ID NO: 7 u 8 que codifica biglicano humano) o DAG-125 u ortólogo del mismo, parte del mismo, siempre que las dos serinas glicanadas del núcleo de biglicano sean eliminadas o reemplazadas por otros aminoácidos como se describe en el presente documento. En una realización, el ácido nucleico codifica un polipéptido que contiene una o más de las SEQ ID NO: 1-3 o las SEQ ID NO: 4-6 o 9.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con un ácido nucleico que codifica un agente terapéutico relacionado con biglicano, por ejemplo, que tiene una o más de las SEQ ID NO: 1 a 6 o 9, o un complemento de las mismas. Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN, por ejemplo, 6,0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por un lavado de SSC 2,0 x a 50 °C, son conocidas por los expertos en la materia o se pueden se encontrar en Protocolos actuales en Biología Molecular, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado puede seleccionarse de una baja rigurosidad de aproximadamente SSC 2,0 x a 50 °C hasta una alta rigurosidad de aproximadamente SSC 0,2 x a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variarse, o la temperatura o la concentración salina pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra

variable. En realizaciones preferidas, un ácido nucleico que codifica un polipéptido relacionado con biglicano se unirá a una de las SEQ ID NO: 1 a 6 o a un complemento de las mismas o a un ácido nucleico que codifica un SLRP en condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo a aproximadamente 2,0 x SSC y aproximadamente 40 ºC. En una realización particularmente preferida, un ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación hibridará con una secuencia de nucleótidos que codifica una de las SEQ ID NO: 1 a 6 o 9, tal como un ácido nucleico que tiene la SEQ ID NO: 7 u 8, o un complemento del mismo en condiciones de alta rigurosidad.

Diversos métodos para preparar los polipéptidos y ácidos nucleicos desvelados en el presente documento son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido o ácido nucleico puede aislarse a partir de un tejido o el compuesto puede producirse de forma recombinante o sintética. Las proteínas aisladas de tejido son preferentemente al menos aproximadamente 70 %, preferentemente al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % y más preferentemente, al menos aproximadamente 99 % puras. Por consiguiente, los polipéptidos preferidos pueden contener menos de aproximadamente 1 %, e incluso más preferentemente menos de aproximadamente 0,1 % de material del que se extrajo el polipéptido.

El polipéptido terapéutico relacionado con biglicano también se puede producir de forma recombinante. Por lo general, un gen que codifica la proteína se inserta en un plásmido o vector y la construcción resultante se transfecta a continuación en células apropiadas, en las que la proteína se expresa a continuación y a partir de la cual la proteína se purifica finalmente. Los métodos para producir y purificar los biglicanos se analizan en Mercado *et al.* ("Biglycan regulates the expression and sarcolemmal localization of dystrobrevin, syntrophin, and nNOS." Faseb J. 2006). Los polipéptidos relacionados con biglicano también se pueden purificar de acuerdo con el método del Ejemplo 3. En algunas realizaciones, el método del Ejemplo 3 se combina con etapas de purificación adicionales. Estas etapas pueden utilizar, por ejemplo, resinas de intercambio iónico.

Por consiguiente, la presente descripción se refiere además a métodos de producción de las proteínas divulgadas. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica una proteína de interés puede cultivarse en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión de la proteína. Las células autólogas pueden cultivarse en, por ejemplo, matraces de agitación o biorreactores. La proteína puede ser secretada, mediante la inclusión de una secuencia de señal de secreción, y aislada de una mezcla de células y medio que contiene la proteína. Como alternativa, la proteína puede retenerse citoplasmáticamente y las células se cosechan, se lisan y se aísla la proteína. Un cultivo celular incluye células hospedadoras, medio y (generalmente) subproductos celulares. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Las proteínas pueden aislarse del medio de cultivo celular, de las células hospedadoras o de ambos. Se conocen procedimientos en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación por inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de la proteína.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana o una célula de roedor. Ejemplos de líneas celulares hospedadoras incluyen células HEK 293 (riñón embrionario humano) o células CHO (ovario de hámster chino) tales como células CHO-S.

Por lo tanto, puede usarse una secuencia codificante para un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano para producir una forma recombinante de la proteína a través de procesos celulares microbianos o eucariotas. La unión de la secuencia de polinucleótidos a una construcción génica, tal como un vector de expresión, y la transformación o transfección en hospedadoras, ya sean eucariotas (levaduras, de aves, de insectos o de mamíferos) o procariotas (células bacterianas), son procedimientos convencionales.

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

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

La proteína se puede producir en células eucariotas, por ejemplo, células de mamífero, células de levadura, célula de insecto (sistema de baculovirus) o en células procariotas.

Las células que pueden usarse para producir un agente terapéutico relacionado con biglicano pueden modificarse

adicionalmente para aumentar el nivel y/o la actividad de una enzima que cataliza modificaciones postraduccionales, por ejemplo, glicosilaciones o sulfonaciones. Por ejemplo, una célula puede transformarse o cotransfectarse con una construcción de expresión que codifica una sulfotransferasa, por ejemplo, una condroitín sulfotransferasa, por ejemplo, una condroitín-6-sulfotransferasa (C6ST; Fukuta et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 18575), o una sulfotransferasa implicada del sistema nervioso (NSIST), descrito en Nastuk et al. (1998) *J. Neuroscience* 18: 7167.

En algunas realizaciones, una proteína recombinante como se describe en el presente documento, tal como biglicano o decorina, se produce como epítopo marcado, lo que facilita la coinmunoprecipitación y los estudios de unión. Una etiqueta apropiada es la etiqueta his. Por ejemplo, una proteína, como se describe en el presente documento, puede producirse en una célula eucariota usando el sistema de expresión del virus vaccinia/bacteriófago T7. Un virus vaccinia recombinante, vBGN4 que codifica el polipéptido relacionado con biglicano, por ejemplo, una proteína madura de biglicano, se puede expresar como una proteína de fusión de polihistidina bajo el control del promotor del fago T7 y se expresa, por ejemplo, en células HT-1080 y células UMR106, como se describe en Hocking et al. (1996) *J Biol Chem* 271: 19571-7. También hay beneficios en el uso de una proteína sin etiquetar, ya que una proteína no etiquetada es generalmente menos propensa a generar una respuesta inmunitaria cuando se administra a un sujeto.

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

Este método se ha utilizado para cultivar una amplia variedad de tipos celulares, incluidos astrocitos, osteoclastos, red trabecular y células epiteliales de colon (Chambers et al., (1993) *PNAS* 90: 5578-82; Groves et al., (1993) *Dev. Biol.* 159: 87-104; Whitehead et al., (1993) *PNAS* 90: 587-91; Noble et al., (1995) *Transgenic Res. 4:* 215-25; Tamm et al., (1999) *Invest. Ophtamol. Vis. Sci.* 40: 1392-403. Esta técnica es muy adecuada para la producción de líneas celulares musculares. Por ejemplo, en un solo estudio, se derivaron 65 líneas celulares musculares de animales que variaban en edad desde recién nacidos hasta cuatro semanas (Morgan et al., (1994) *Dev. Biol.* 162 486-98). Estas líneas se mantuvieron durante más de 80 generaciones. De manera destacable, no solo formaron miotubos cuando se cambiaron a condiciones no permisivas en cultivo, sino que también formaron músculo cuando se implantaron en ratones hospedadores. El método transgénico H-2K^{b}/tsA58 también fue utilizado por D. Glass y colaboradores para producir una línea celular muscular MuSK $^{-/-}$ (Sugiyama et al., (1997) J. *Cell Biol.* 139: 181-91).

Para producir líneas celulares inmortalizadas condicionalmente, los ratones que tienen una mutación específica, por ejemplo, una deficiencia en biglicano o MuSK, se pueden cruzar con ratones heterocigotos H-2K^{b}/tsA58 transgénicos. Los cruces son sencillos ya que solo se necesita una copia del gen para una actividad completa. Las células musculares de animales neonatales se pueden cultivar en placas y cultivar en condiciones permisivas (33°C con interferón). Las células proliferativas se pueden clonar y las muestras de cada línea se cambian a la temperatura no permisiva y se evalúa su capacidad para formar miotubos. Las líneas celulares tipo salvaje; decorina$^{-/-}$; biglicano-/o; y decorina$^{-/-}$ biglicano$^{-/o}$ son ejemplos de líneas celulares que se pueden obtener utilizando esta técnica.

Los compuestos descritos en el presente documento también pueden ser péptidos miméticos que se pueden preparar, por ejemplo, basándose en la estructura de biglicano.

Ciertos métodos para tratar sujetos con un agente terapéutico relacionado con biglicano comprenden la administración de las proteínas descritas en el presente documento al sujeto. Sin embargo, las proteínas también se pueden producir en un sujeto, mediante técnicas de terapia génica. Por lo tanto, por ejemplo, un sujeto puede recibir una inyección en un músculo (por ejemplo, cuando el sujeto tiene una distrofia muscular) de un vector que codifica una proteína terapéutica relacionada con biglicano, de modo que el vector es capaz de entrar en las células musculares y expresarse en ellas. Como alternativa, el vector puede ser un vector viral, que está provisto con la cápside viral y el virus infecta las células, por ejemplo, las células musculares y por lo tanto libera el vector. Los métodos y vectores para terapia génica son bien conocidos en la técnica. Los métodos ilustrativos se exponen a continuación.

Los vectores de expresión de mamífero preferidos contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamífero adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección por resistencia a fármacos tanto en células procariotas como en células eucariotas. Como alternativa, pueden usarse derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión

transitoria de proteínas en células eucariotas. Los ejemplos de otros sistemas de expresión virales (que incluyen retrovirales) se pueden encontrar a continuación en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y la transformación de los organismos hospedadores son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como para células eucariotas, así como los procedimientos de recombinación generales, véase Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 2ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser deseable expresar las proteínas de fusión recombinantes por el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de dichos sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tales como el pBlueBac III que contiene -gal).

En otras realizaciones más, las construcciones de expresión objeto se derivan mediante la inserción del gen objeto en vectores virales que incluyen retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adenoasociados y virus-1 de herpes simple, o plásmidos recombinantes bacterianos o eucariotas. Como se describe con mayor detalle en lo sucesivo, tales realizaciones de las construcciones de expresión objeto se contemplan específicamente para su uso en diversos protocolos de terapia génica *in vivo* y *ex vivo*.

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

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

Otro sistema de administración de genes virales utiliza vectores derivados de adenovirus. El genoma de un adenovirus se puede manipular de modo que codifique un producto génico de interés, pero se inactiva en términos de su capacidad de replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal (véase, por ejemplo, Berkner et al., (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld et al., (1991) Science 252:431-434; y Rosenfeld et al., (1992) Cell 68:143-155). Vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus de tipo Ad 5 dl324 u otras cepas de adenovirus (p.ej., Ad2, Ad3, Ad7 etc.) son bien conocidos por los expertos en la materia. Los adenovirus

recombinantes pueden ser ventajosos en ciertas circunstancias porque no son capaces de infectar células que no se dividen y pueden usarse para infectar una amplia variedad de tipos de células, incluido el epitelio de las vías respiratorias (Rosenfeld et al., (1992) citado anteriormente), células endoteliales (Lemarchand et al., (1992) PNAS USA 89:6482-6486), hepatocitos (Herz y Gerard, (1993) PNAS USA 90:2812-2816) y células musculares (Quantin et al., (1992) PNAS USA 89: 2581-2584). Adicionalmente, la partícula de virus es relativamente estable y susceptible de purificación y concentración, y como se ha descrito anteriormente, puede modificarse para afectar el espectro de infectividad. Además, el ADN adenoviral introducido (y ADN extraño contenido en el mismo) no se integra en el genoma de una célula hospedadora pero permanece episomal, evitando así posibles problemas que pueden ocurrir como resultado de la mutagénesis por inserción en situaciones donde el ADN introducido se integra en el genoma del hospedador (p.ej., ADN retroviral). Además, la capacidad de carga del genoma adenoviral para ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases) con respecto a otros vectores de administración génica (Berkner et al., citado anteriormente; Haj-Ahmand and Graham (1986) J. Virol. 57: 267). La mayoría de los vectores adenovirales con defectos de replicación actualmente en uso y por lo tanto favorecidos para su uso en los métodos descritos en el presente documento, se eliminan para todos o parte de los genes virales E1 y E3, pero retienen hasta el 80 % del material genético adenovírico (véase, por ejemplo, Jones et al., (1979) Cell 16:683; Berkner et al., citado anteriormente; y Graham et al., en Methods in Molecular Biology, E.J. Murray, Ed. (Humana, Clifton, NJ, 1991) vol. 7. pp. 109-127). La expresión del gen quimérico insertado puede estar bajo el control de, por ejemplo, el promotor E1A, el promotor tardío principal (MLP) y las secuencias líder asociadas, el promotor E3 viral, o secuencias promotoras añadidas exógenamente.

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

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

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

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

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

Los ácidos nucleicos que codifican proteínas relacionadas con biglicano también se pueden administrar a un sujeto como ADN "desnudo", como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.679.647 y patentes relacionadas por Carson et al., en WO 90/11092 y Felgner et al. (1990) Science 247: 1465.

En entornos clínicos, los sistemas de administración de genes se pueden introducir en un paciente por cualquiera de una serie de métodos. Por ejemplo, una preparación farmacéutica del sistema de administración génica puede introducirse sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección intravenosa y la transducción específica de la construcción en las células diana ocurre predominantemente a partir de la especificidad de la transfección proporcionada por el vehículo de suministro del gen, por el tipo de célula o por la expresión de tipo de tejido debido a las secuencias reguladoras de la transcripción que controlan la expresión del gen, o una combinación de los mismos. En otras realizaciones, la administración inicial del gen recombinante es más limitada, siendo la introducción en el animal bastante localizada. Por ejemplo, el vehículo de suministro de genes se puede introducir mediante catéter (véase la patente de Estados Unidos 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (por ejemplo, Chen et al., (1994) PNAS USA 91: 3054-3057).

El gen que codifica el péptido terapéutico relacionado con biglicano puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. Estos son bien conocidos en la técnica.

Los métodos para determinar si un compuesto tiene una actividad biológica de una proteína de biglicano de tipo salvaje son conocidos en la técnica. Se pretende que una actividad biológica de una proteína de biglicano de tipo salvaje se refiera a una o más de: la capacidad de mantener la integridad de una membrana plasmática; la capacidad de estabilizar los DAPC en las membranas plasmáticas; la capacidad de unirse a uno o más componentes de los DAPC; por ejemplo, unión a α-distroglicano, unión a un componente de sarcoglicano, tal como α-sarcoglicano; fosforilación de α-sarcoglicano; unión a MuSK; unión al colágeno VI que estimula la formación de uniones neuromusculares, como por estimulación de la diferenciación postsináptica; estimulación de la agregación de AChR; estimulación de la fosforilación de MuSK o potenciación de la fosforilación de MuSK inducida por agrina. Dichos métodos pueden adaptarse adicionalmente para rastrear bibliotecas de compuestos para identificar compuestos que tienen una o más de las actividades descritas anteriormente.

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

Los agentes terapéuticos relacionados con biglicano también se pueden probar en varios modelos animales, en particular, los ratones mdx, que son distrofina negativos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.612.038).

IV. Métodos de tratamiento

La presente divulgación proporciona métodos terapéuticos y profilácticos para el tratamiento de trastornos que incluyen trastornos musculares, neuromusculares, neurológicos y relacionados con colágeno VI. Los métodos terapéuticos están destinados a eliminar o al menos reducir al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno y preferentemente curar la enfermedad o trastorno. Los métodos profilácticos incluyen aquellos destinados a prevenir la aparición de una enfermedad o trastorno, es decir, un método que está destinado a combatir la aparición de la enfermedad o trastorno.

Se demostró que el biglicano de tipo salvaje se une a α-distroglicano y a sarcoglicanos y por lo tanto funciona como un enlace entre varios componentes del DAPC. Adicionalmente, se descubrió que los niveles de biglicano son altos en células musculares de ratones que carecen de distrofina (ratones mdx, que son un modelo de distrofia muscular). Debido a que se sabe que la ausencia de distrofina en las células musculares desestabiliza la membrana citoplasmática, la regulación positiva del biglicano en las células musculares distrofina negativas puede ser un mecanismo compensatorio para la ausencia de distrofina. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para prevenir y tratar enfermedades o trastornos que están asociados a la inestabilidad o la organización de la membrana plasmática, en particular, una inestabilidad resultante de un DAPC anormal en la membrana plasmática. Debido a que el DAPC se encuentra en la membrana de las células musculares, las enfermedades que pueden tratarse usando los métodos de la presente invención incluyen enfermedades del músculo, tales como distrofias musculares y atrofia muscular.

En ese sentido, un camino prometedor para el tratamiento y potencialmente una cura para la distrofia muscular es la activación de un mecanismo compensatorio endógeno basado en la expresión regulada de la utrofina. La utrofina es un homólogo de la distrofina que comparte numerosas propiedades estructurales y funcionales con ella. Sin embargo, tanto en el músculo normal como en el de Duchenne, la utrofina solo se expresa en una fracción de la membrana muscular: la unión neuromuscular y la unión miotendinosa. La mayor parte de la membrana no tiene utrofina. Sin embargo, en modelos animales se ha demostrado que la expresión forzada de utrofina en músculos que carecen de distrofina conduce a la restauración del DAPC en la membrana muscular y al rescate del fenotipo

distrófico. Debido a que el gen de utrofina es normal en pacientes con Duchenne, un método para activar su expresión en músculo y/o dirigirlo a la membrana muscular podría servir para restaurar el DAPC en la membrana y así promover la salud de las células musculares.

Varias líneas de evidencia, muchas de ellas derivadas de observaciones realizadas por los inventores, indican que el pequeño proteoglicano de biglicano rico en leucina podría usarse en un método para regular la expresión y localización de utrofina. Se ha demostrado que la proteína agrina puede causar una regulación positiva de la expresión de utrofina y dirigirla a que se localice en dominios específicos de la superficie celular. El receptor de señalización para agrina es el receptor tirosina quinasa MuSK. Se ha observado que la agrina también puede inducir la fosforilación de tirosina de α- y γ-sarcoglicano en miotubos cultivados. También se observó que el biglicano también puede regular la fosforilación de tirosina de α- y γ-sarcoglicano. Además, el receptor tirosina quinasa MuSK es necesario para esta fosforilación de tirosina inducida por biglicano de estas proteínas. Además, el biglicano puede unirse a MuSK. Estas observaciones indican que el biglicano puede actuar directamente para organizar el DAPC, incluida la utrofina, en la superficie de la célula muscular.

Por lo tanto, la presente solicitud proporciona el tratamiento de estos trastornos con agentes terapéuticos relacionados con biglicano que regulan positivamente la utrofina, activan MuSK y/o inducen la fosforilación de sarcoglicanos.

Simplemente para ilustrar, los agentes terapéuticos relacionados con biglicano (p. Ej., polipéptidos, péptidos o péptidos miméticos) pueden administrarse a pacientes con distrofia muscular u otras afecciones en las que el músculo se atrofia para regular positivamente la expresión génica de utrofina endógena y/o promover la localización de utrofina en la membrana muscular. En dichas realizaciones, el polipéptido terapéutico relacionado con biglicano puede administrarse en forma de un polipéptido en sí mismo o como parte de una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada a una secuencia de anticuerpo humanizado o a una entidad vehículo similar. Los polipéptidos terapéuticos relacionados con biglicano pueden administrarse mediante procedimientos basados en ácidos nucleicos que incluyen ADN de plásmido, en vectores virales o en otras modalidades en las que las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos terapéuticos relacionados con biglicano se introducen en los pacientes. La administración de un agente terapéutico relacionado con biglicano puede servir para curar las fibras musculares desde dentro dirigiendo la expresión incrementada y la localización regulada de la utrofina a la superficie de la célula muscular con la restauración concomitante del resto del complejo proteico asociado a la distrofina.

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

Los pacientes con distrofia muscular de Duchenne también tienen problemas de diafragma, lo que indica un papel para la distrofina, y posiblemente los DAPC en los diafragmas. Por lo tanto, los compuestos descritos en el presente documento también encontrarían una aplicación en trastornos asociados a anomalías del diafragma.

Cabe señalar que las enfermedades que pueden tratarse o prevenirse incluyen no solo aquellas en las que el biglicano es anormal, sino más generalmente cualquier enfermedad o afección que esté asociada a un defecto que pueda mejorarse o curarse con biglicano. En particular, enfermedades que se caracterizan por un defecto o una anomalía en cualquier componente del DAPC o componente asociado al mismo, que dan como resultado, por ejemplo, una membrana inestable, puede tratarse o prevenirse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, siempre que los productos terapéuticos relacionados con biglicano puedan curar al menos parcialmente el defecto resultante del componente deficiente. En particular, las enfermedades que se pueden tratar de acuerdo con los métodos en el presente documento incluyen cualquier enfermedad asociada a un DAPC inestable, que puede volverse más estable por la presencia de un agente terapéutico relacionado con biglicano.

Adicionalmente, ya que el biglicano demostró unirse y fosforila MuSK, un receptor que es conocido por mediar la estimulación inducida por agrina de la formación de la unión neuromuscular, en particular la diferenciación de la membrana postsináptica, para potenciar la agregación de AChR inducida por agrina y para corregir una agregación de AChR inducida por agrina defectuosa en miotubos de ratones biglicano negativos, mediante su adición a los miotubos, la presente divulgación también proporciona métodos para prevenir y tratar enfermedades o trastornos de las uniones neuromusculares, tales como trastornos neuromusculares.

A. Enfermedades y trastornos a modo de ejemplo

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

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

Otro tipo de distrofia que se puede tratar de acuerdo con los métodos del presente documento incluye la distrofia muscular congénita (CMD), una enfermedad muscular muy incapacitante de inicio clínico temprano, que es la causa más frecuente de hipotonía neonatal grave. Sus manifestaciones se notan al nacer o en los primeros meses de vida y consisten en hipotonía muscular, a menudo asociada a hitos motores retrasados, contracturas severas y tempranas y deformidades articulares. La creatina quinasa sérica se eleva, hasta 30 veces por encima de los valores normales, en la etapa temprana de la enfermedad y a continuación disminuye rápidamente. Los cambios histológicos en las biopsias musculares consisten en una gran variación en el tamaño de las fibras musculares, algunas fibras necróticas y regeneradoras, marcado aumento en el tejido de colágeno endomisial y sin características ultraestructurales específicas. El diagnóstico de CMD se ha basado en el cuadro clínico y los cambios morfológicos en la biopsia muscular, pero no se puede hacer con certeza, ya que otros trastornos musculares pueden presentar características clínico-patológicas similares. Dentro del grupo de enfermedades clasificadas como CMD, se han individualizado diversas formas. Las dos formas más comunes son la occidental y la japonesa, la última se asocia con trastornos mentales graves y generalmente se conoce como distrofia muscular congénita de Fukuyama (FCMD).

Se ha caracterizado recientemente una forma de distrofia muscular congénita (CMD) causada por mutaciones en el gen de la cadena 2 alfa de la laminina. La laminina es una proteína que se asocia con los DAPC. Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona métodos para tratar enfermedades que están asociadas a moléculas anormales que normalmente se asocian con los DAPC.

Otras distrofias musculares incluyen la distrofia muscular de cinturas (LGMD), que representa una clase de trastornos clínicamente y genéticamente heterogéneos. Estas distrofias se heredan como rasgos autosómicos dominantes o recesivos. Una forma autosómica dominante, LGMD1A, se mapeó en 5q31-q33, M. C. et al., Am. J. Hum. Genet. 50:1211, 1992; Yamaoka, L. Y. et al., Neuromusc. Disord.4:471, 1994), mientras que seis genes implicados en las formas autosómicas recesivas se mapearon en 15q15.1(LGMD2A)(Beckmann, J. S. et al., C. R. Acad. Sci. Paris 312:141, 1991), 2p16-p13 (LGMD2B)(Bashir, R. et al., Hum. Mol. Genet. 3:455, 1994), 13q12 (LGMD2C)(Ben Othmane, K. et al., Nature Genet. 2:315, 1992; Azibi, K. et al., Hum. Mol. Genet. 2:1423, 1993), 17q12-q21.33 (LGMD2D)(Roberds, S. L. et al., Cell 78:625, 1994; McNally, E. M., et. al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 91:9690, 1994), 4q12 (LG1MD2E)(Lim, L. E., et. al., Nat. Genet. 11:257, 1994; Bonnemann, C. G. et al. Nat. Genet. 11:266, 1995), y más recientemente en 5q33-q34 (LGMD2F) (Passos-Bueno, M. R., et. al., Hum. Mol. Genet. 5:815, 1996). Los pacientes con LGMD2C, 2D y 2E tienen una deficiencia de componentes del complejo de sarcoglicano como resultado de mutaciones en los genes que codifican gamma, alfa- y beta -sarcoglicano, respectivamente. El gen responsable de LGMD2A se ha identificado como la calpaína específica del músculo, mientras que aún se desconocen los genes responsables de LGMD1A,2B y 2F.

Aún otros tipos de distrofias musculares que pueden tratarse según los métodos descritos en el presente documento incluyen la miopatía distal de Welander (WDM), que es una miopatía autosómica dominante con inicio en el adulto tardío caracterizada por una lenta progresión de la debilidad muscular distal. El trastorno se considera una enfermedad modelo para las miopatías distales hereditarias. La enfermedad está ligada al cromosoma 2p13. Otra distrofia muscular es la miopatía de Miyoshi, que es una distrofia muscular distal que es causada por mutaciones en el gen recientemente clonado de disferlina, símbolo del gen DYSF (Weiler et al., (1999) Hum *Mol* Genet 8: 871-7). Aún otras distrofias incluyen Miopatía Hereditaria Distal, Hipotonía Congénita Benigna, Enfermedad del Núcleo Central, Miopatía Nemalínica y miopatía Miotubular (centronuclear).

Otras enfermedades que pueden tratarse o prevenirse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen aquellas caracterizadas por atrofia tisular, por ejemplo, atrofia muscular, que no sea atrofia muscular como resultado de distrofias musculares, siempre que la atrofia se detenga o disminuya tras el tratamiento con un agente terapéutico relacionado con biglicano. Adicionalmente, la presente divulgación también proporciona métodos para revertir las atrofias tisulares, por ejemplo, atrofias musculares. Esto puede lograrse, por ejemplo,

proporcionando al tejido atrofiado un agente terapéutico relacionado con biglicano.

Las atrofias musculares pueden ser el resultado de la denervación (pérdida de contacto del músculo con su nervio) debido a un traumatismo del nervio; neuropatía degenerativa, metabólica o inflamatoria (p. Ej., Síndrome de GuillianBarre), neuropatía periférica o daño a los nervios causado por toxinas o drogas ambientales. En otra realización, la atrofia muscular es el resultado de la denervación debida a una neuronopatía motora. Tales neuronopatías motoras incluyen, pero sin limitación: enfermedad de neuronas motoras adultas, incluida la esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig); atrofias musculares espinales infantiles y juveniles y neuropatía motora autoinmunitaria con bloqueo de conducción multifocal. En otra realización, la atrofia muscular es el resultado del desuso crónico. Tal atrofia por desuso puede deberse a condiciones que incluyen, pero sin limitación: parálisis debido a un accidente cerebrovascular, lesión de la médula espinal; inmovilización del esqueleto debido a un traumatismo (como fractura, esguince o luxación) o reposo prolongado en la cama. En otra realización más, la atrofia muscular es consecuencia de estrés metabólico o insuficiencia nutricional, que incluyen, pero sin limitación, la caquexia del cáncer y otras enfermedades crónicas, el ayuno o la rabdomiolisis, trastornos endocrinos tales como, pero sin limitación, trastornos de la glándula tiroides y diabetes.

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

Además, los agentes terapéuticos relacionados con biglicano pueden ser útiles en el tratamiento de miopatías adquiridas (tóxicas o inflamatorias). Las miopatías que se producen como consecuencia de una enfermedad inflamatoria del músculo, incluyen, pero sin limitación, polimiositis y dermatomiositis. Las miopatías tóxicas pueden deberse a agentes, que incluyen, pero sin limitación,amiodarona, cloroquina, clofibrato, colchicina, doxorrubicina, etanol, hidroxicloroquina, organofosfatos, perhexilina y vincristina.

Las distrofias neuromusculares incluyen distrofia miotónica. La distrofia miotónica (DM; o enfermedad de Steinert) es una enfermedad neuromuscular autosómica dominante que es la forma más común de distrofia muscular que afecta a los adultos. El cuadro clínico en la DM está bien establecido pero es excepcionalmente variable (Harper, P. S., Myotonic Dystrophy, 2ª ed., W. B. Saunders Co., London, 1989). Aunque generalmente se considera una enfermedad del músculo, con miotonía, debilidad progresiva y desgaste, la DM se caracteriza por anomalías en varios otros sistemas. Los pacientes con DM a menudo sufren de defectos de conducción cardíaca, afectación del músculo liso, hipersomnia, cataratas, respuesta anormal a la glucosa y, en hombres, calvicie prematura y atrofia testicular (Harper, P. S., Myotonic Dystrophy, 2ª ed., W. B. Saunders Co., London, 1989). La forma más leve, que ocasionalmente es difícil de diagnosticar, se ve en la mediana edad o en la vejez y se caracteriza por cataratas con poca o ninguna implicación muscular. La forma clásica, que muestra miotonía y debilidad muscular, aparece con mayor frecuencia en la vida adulta temprana y en la adolescencia. La forma más grave, que ocurre congénitamente, se asocia con hipoplasia muscular generalizada, retraso mental y alta mortalidad neonatal. Esta enfermedad y el gen afectado se describen adicionalmente en la patente de los Estados Unidos Nº 5.955.265.

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

Las distrofias y miopatías musculares descritas anteriormente son trastornos del músculo esquelético. Sin embargo, la presente divulgación también se refiere a trastornos de la musculatura lisa, por ejemplo, miopatías cardíacas, que incluyen cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía dilatada y cardiomiopatía restrictiva. Al menos ciertos músculos lisos, por ejemplo, el músculo cardíaco, son ricos en sarcoglicanos. Las mutaciones en los sarcoglicanos pueden provocar inestabilidad del sarcolema a nivel del miocardio (véase, por ejemplo, Melacini (1999) *Muscle Nerve* 22: 473). Por ejemplo, los modelos animales en los que un sarcoglicano está mutado muestran aumento de la creatina quinasa cardíaca. En particular, se ha demostrado que los ratones deficientes en delta-sarcoglicano (Sgcd) desarrollan cardiomiopatía con áreas focales de necrosis como el sello histológico en el músculo cardíaco y esquelético. Los animales también mostraron una ausencia del complejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN) en las membranas esqueléticas y cardíacas. La pérdida del complejo SG-SSPN del músculo liso vascular se asoció con irregularidades de la vasculatura coronaria. Por lo tanto, la alteración del complejo SG-SSPN en el músculo liso vascular perturba la función vascular, lo que inicia la cardiomiopatía y exacerba la distrofia muscular (Coral-Vazquez et al. (1999) *Cell* 98: 465).

De forma similar a los ratones delta-sarcoglicanos negativos, los ratones que carecían de γ-sarcoglicano mostraron cambios pronunciados en los músculos distróficos en edad temprana (Hack et al. (1998) J *Cell Biol* 142: 1279). A las 20 semanas de edad, estos ratones desarrollaron cardiomiopatía y murieron prematuramente. Adicionalmente, los mionúcleos apoptóticos eran abundantes en el músculo esquelético que carecía de γ-sarcoglicano, lo que sugiere

que la muerte celular programada contribuye a la degeneración de la miofibra. La tinción vital con tinte azul de Evans reveló que los músculos que carecían de γ-sarcoglicano desarrollaron alteraciones de la membrana como las observadas en el músculo deficiente en distrofina. También se demostró que la pérdida de γ-sarcoglicano producía una reducción secundaria del sarcoglicano beta y delta con retención parcial de sarcoglicano α y épsilon, lo que indica que los sarcoglicanos beta, γ y delta funcionan como una unidad. Debido a que los otros componentes del complejo de membrana citoplásmica eran funcionales, el complejo podría estabilizarse mediante la presencia de un agente terapéutico relacionado con biglicano.

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

Adicionalmente, también se encontró cardiomiopatía en sujetos que tienen Distrofia Muscular de Duchenne (asociada a una distrofina mutada) u otros tipos de distrofias musculares, como la Distrofia Muscular de cinturas. Por ejemplo, la cardiomiopatía dilatada estaba presente en un caso autosómico dominante y en tres pacientes autosómicos recesivos o esporádicos avanzados, de los cuales se encontró que dos tenían deficiencia de alfa sarcoglicano. Dos de estos tres pacientes y otros tres casos mostraron anomalías en el ECG que se sabe que son características de las distrofinopatías. Se encontró una fuerte asociación entre la ausencia de sarcoglicano alfa y la presencia de cardiomiopatía dilatada. En seis casos autosómicos dominantes hubo alteraciones de la conducción auriculoventricular (AV), que aumentaron en gravedad con la edad y en presencia concomitante de debilidad muscular. Fue necesaria la implantación de marcapasos en algunos de estos pacientes (ver van der Kooi (1998) *Heart* 79: 73).

Los agentes terapéuticos relacionados con biglicano también se pueden usar para tratar o prevenir cardiomiopatía, por ejemplo, cardiomiopatía dilatada, de origen viral, por ejemplo, que resulta de una infección por enterovirus, por ejemplo, un virus Coxsackie B3. Se ha demostrado que la proteasa 2A de virus Coxsackie purificada escinde distrofina *in vitro* y durante la infección por virus Coxsackie de miocitos cultivados y en corazones de ratón infectados, llevando a una función alterada de la distrofina (Badorff et al. (1999) *Nat Med* 5: 320. La escisión de la distrofina produce una alteración de las glucoproteínas α-sarcoglicano y β-distroglicano asociadas a la distrofina. Por lo tanto, la cardiomiopatía podría prevenirse o revertirse mediante la administración de un agente terapéutico relacionado con biglicano a un sujeto que haya sido infectado con un virus que causa cardiomiopatía, por ejemplo, mediante la disrupción de distrofina o una proteína asociada a la misma. La administración del agente terapéutico podría reestabilizar o reorganizar la membrana citoplásmica de las células cardíacas afectadas.

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

Los trastornos neurológicos que pueden tratarse según los métodos descritos en el presente documento incluyen polimiositis y trastornos neurogénicos. Otra enfermedad neurológica que se puede tratar es la enfermedad de Alzheimer.

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

Aún otras enfermedades o trastornos que pueden tratarse con los métodos del presente documento incluyen los que están asociados a una interacción anormal entre un proteoglicano y otra molécula (que no sean los de DAPC o MuSK), por ejemplo, un factor del complemento, tal como C1q. Por ejemplo, se ha demostrado que C1q interactúa con biglicano (Hocking y otros (1996) J. *Biol*. *Chem.* 271: 19571). También se sabe que la unión de C1q a las superficies celulares media una serie de actividades biológicas que incluyen el aumento de la fagocitosis y la estimulación de la producción de superóxido. Por lo tanto, debido a que el biglicano se une a C1q, se puede usar un agente terapéutico relacionado con biglicano para inhibir la unión de C1q a su receptor sobre las superficies celulares para inhibir una o más de tales actividades biológicas. Además, también puede usarse un agente terapéutico relacionado con biglicano que inhibe la interacción entre C1q u otro componente del complemento y una superficie celular para inhibir la necrosis mediada por el complemento de las células y tejidos que contienen tales células.

Adicionalmente, esta aplicación proporciona métodos para prevenir o inhibir infecciones de células por microorganismos, por ejemplo, virus. Por ejemplo, se ha demostrado que el distroglicano es un receptor a través del cual ciertos microorganismos entran en células eucariotas {*Science* (1998) 282: 2079). Por lo tanto, administrando a

un sujeto un compuesto que, directa o indirectamente, hace que el sitio en las moléculas de distroglicano al que se une el microorganismo no esté disponible, puede inhibirse la entrada del microorganismo en la célula. Este método puede usarse, por ejemplo, para prevenir o inhibir la infección por el virus de la fiebre de Lassa y por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), así como la infección por otros arenavirus, incluidos Oliveros y Mobala. Se demostró que α-distroglicano soluble bloquea tanto la infección por LCMV como la infección por LFV {*Science* (1998) 282: 2079).

Además de cultivos celulares, por ejemplo, establecidos a partir de pacientes que tienen, por ejemplo, una distrofia muscular, pueden usarse varios modelos animales para seleccionar el agente terapéutico relacionado con biglicano más apropiado para tratar una enfermedad. En particular,para identificar un agente terapéutico para su uso en la prevención o tratamiento de una distrofia muscular o cardiomiopatía asociada a un componente del DAPC mutado o ausente, se pueden usar o ratones que tienen versiones mutadas de estas proteínas, o que tienen mutaciones nulas en los genes que codifican estas proteínas. Por ejemplo, se pueden usar ratones que tienen un sarcoglicano alterado, tal como delta -sarcoglicano. Tales ratones son descritos, por ejemplo, Coral-Vazquez et al. (1999) *Cell* 98: 465. Como alternativa, se pueden usar ratones deficientes en distrofina (ratones mdx) o en sarcoglicanos α o γ. Tales ratones se han descrito en el presente documento y en la bibliografía. Se pueden producir ratones adicionales de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. En una realización ilustrativa para identificar agentes terapéuticos, se administran diferentes agentes terapéuticos a ratones sin delta-sarcoglicano y se evalúa el efecto de los agentes terapéuticos estudiando la función cardíaca. Otro modelo animal que se puede usar para este propósito es el hámster cardiomiopático que no expresa delta-sarcoglicano debido a una deleción genómica. Esta rata es un modelo animal para la cardiomiopatía autosómica recesiva y se describe adicionalmente en Sakamoto et al. *FEBS* Lett 1999 (1999) 44: 124.

Los agentes terapéuticos de biglicano también se pueden usar para tratar trastornos de colágeno VI, como se analizó en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2005-0043221. En la solicitud de PCT 2005-0043221, se demostró que los ratones deficientes en biglicano exhibían una sorprendente reducción en los niveles de colágeno VI, tal como se determina mediante inmunofluorescencia. Como se muestra en el Ejemplo 2, la administración de biglicano a un ratón con deficiencia de colágeno VI dio como resultado niveles aumentados de colágeno VI en el músculo. Por lo tanto, los biglicanos descritos en el presente documento también se pueden usar para elevar los niveles de colágeno VI, tratando así los trastornos del colágeno VI.

En general, el trastorno del colágeno VI es uno en el que el sujeto produce un nivel o actividad del colágeno VI bajo, distinto de cero. En algunas realizaciones, el trastorno se caracteriza por una mutación que reduce, pero no elimina por completo, la actividad del colágeno VI. En algunas realizaciones, el trastorno se caracteriza por una reducción en la estabilidad del colágeno VI. En determinadas realizaciones, el trastorno se caracteriza por bajos niveles de proteína de colágeno VI, distintos de cero. Por ejemplo, una mutación heterocigótica (por ejemplo, una haploinsuficiencia) puede dar como resultado niveles reducidos de colágeno VI. Se espera que la administración de un agente terapéutico de biglicano aumente el nivel de colágeno VI, tratando así el trastorno del colágeno VI.

Por lo tanto, los trastornos específicos del colágeno VI que se pueden tratar de acuerdo con los métodos divulgados en este documento incluyen los siguientes. La miopatía de Bethlem es causada, al menos en parte, por mutaciones en los genes de colágeno VI. En algunas realizaciones, la miopatía de Bethlem es causada por una haploinsuficiencia (Pepe G *et al.,* "COL6A1 genomic deletions in Bethlem myopathy and Ullrich muscular dystrophy." Ann Neurol. 2006 Jan;59(1): 190-5; Baker *et al.* "Molecular consequences of dominant Bethlem myopathy collagen VI mutations" Ann Neurol. Octubre de 2007;62(4):390-405). La función del colágeno VI también se ve comprometida en la distrofia muscular congénita de Ullrich y en la distrofia de Sorsby de fondo de ojo. Al igual que la miopatía de Bethlem, los pacientes con UCMD pueden tener una copia de colágeno VI de tipo salvaje (Jimenez-Mallebrera *et al.,* "A comparative analysis of collagen VI production in muscle, skin and fibroblasts from 14 Ullrich congenital muscular dystrophy patients with dominant and recessive COL6A mutations" Neuromuscul Disord. Octubre de 2006; 16(9-10):571-82). En determinadas realizaciones, un trastorno relacionado con el colágeno VI puede tratarse administrando un agente terapéutico de biglicano como se describe en el presente documento.

V. Dosis efectiva y administración de composiciones terapéuticas

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

Otra forma de administrar un agente terapéutico relacionado con biglicano a un sujeto es preparando células que

expresen y secreten la proteína terapéutica de interés relacionada con biglicano, insertando las células en una matriz y administrando esta matriz al sujeto en la ubicación deseada. Por lo tanto, también pueden encapsularse las células diseñadas de acuerdo con esta divulgación, por ejemplo, usando materiales y métodos biocompatibles convencionales, antes de la implantación en el organismo hospedador o paciente para la producción de una proteína terapéutica. Véase, por ejemplo, Hguyen et al., Tissue Implant Systems and Methods for Sustaining viable High Cell Densities within a Host, patente de Estados Unidos n.º 5.314.471 (Baxter International, Inc.); Uludag and Sefton, 1993, J Biomed. Mater. Res. 27(10):1213-24 (HepG2 cells/hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate membranes); Chang et al., 1993, Hum Gene Ther 4(4):433-40 (mouse Ltk-cells expressing hGH/immunoprotective permselective alginate microcapsules; Reddy et al., 1993, J Infect Dis 168(4):1082-3 (alginate); Tai y un, 1993, FASEB J 7(11):1061-9 (mouse fibroblasts expressing hGH/alginate-poly-L-lysine-alginate membrane); Ao et al., 1995, Transplanataion Proc. 27(6):3349, 3350 (alginate); Rajotte et al., 1995, Transplantation Proc. 27(6):3389 (alginate); Lakey et al., 1995, Transplantation Proc. 27(6):3266 (alginate); Korbutt et al., 1995, Transplantation Proc. 27(6):3212 (alginate); Dorian et al., patente de Estados Unidos n.º 5.429.821 (alginate); Emerich et al., 1993, Exp Neurol 122(1):37-47 (polymer-encapsulated PC12 cells); Sagen et al., 1993, J Neurosci 13(6):2415-23 (bovine chromaffin cells encapsulated in semipermeable polymer membrane and implanted into rat spinal subarachnoid space); Aebischer et al., 1994, Exp Neurol 126(2):151-8 (polymer-encapsulated rat PC12 cells implanted into monkeys; véase también Aebischer, WO 92/19595); Savelkoul et al., 1994, J Immunol Methods 170(2):185-96 (encapsulated hybridomas producing antibodies; encapsulated transfected cell lines expressing various cytokines); Winn et al., 1994, PNAS USA 91(6):2324-8 (engineered BHK cells expressing human nerve growth factor encapsulated in an immunoisolation polymeric device and transplanted into rats); Emerich et al., 1994, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 18(5):935-46 (polymer-encapsulated PC12 cells implanted into rats); Kordower et al., 1994, PNAS USA 91(23):10898-902 (polymer-encapsulated engineered BHK cells expressing hNGF implanted into monkeys) y utler et al WO 95/04521 (encapsulated device). Las células pueden introducirse a continuación en forma encapsulada en un animal hospedador, preferentemente un mamífero y más preferentemente un sujeto humano que lo necesite. Preferentemente, el material de encapsulación es semipermeable, lo que permite la liberación en el hospedador de las proteínas secretadas producidas por las células encapsuladas. En muchas realizaciones, la encapsulación semipermeable hace que las células encapsuladas estén aisladas inmunológicamente del organismo hospedador en el que se introducen las células encapsuladas. En esas realizaciones, las células que se van a encapsular pueden expresar una o más proteínas terapéuticas de la especie hospedadora y/o a partir de proteínas virales o proteínas de especies distintas de la especie hospedadora.

Como alternativa, el agente terapéutico relacionado con biglicano es un ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica relacionada con biglicano. Por lo tanto, un sujeto que lo necesite, puede recibir una dosis de vector viral que codifica la proteína de interés, que puede dirigirse específicamente a un tejido específico, por ejemplo, un tejido distrófico. El vector puede administrarse en forma desnuda, o puede administrarse como una partícula viral (descrita adicionalmente en el presente documento). Para este fin, se han desarrollado diversas técnicas para la modificación de tejidos y células diana *in vivo*. Se han desarrollado varios vectores virales, tal como se describe anteriormente, que permiten la transfección y, en algunos casos, la integración del virus en el hospedador. Véase, por ejemplo, Dubensky et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7529-7533; Kaneda et al., (1989) Science 243.375-378; Hiebert et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3594-3598; Hatzoglu et al. (1990) J. Biol. Chem. 265, 17285-17293 y Ferry, et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8377-8381. El vector puede administrarse mediante inyección, por ejemplo, intravascular o intramuscularmente, inhalación u otro modo parenteral. También se pueden usar métodos de administración no virales tales como la administración del ADN a través de complejos con liposomas o mediante inyección, catéter o biolística.

En otra realización más, las células se obtienen de un sujeto, se modifican *ex vivo,* y se introducen en el mismo sujeto o en un sujeto diferente. Los métodos adicionales de administración de los compuestos terapéuticos se exponen a continuación.

A. Toxicidad

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes terapéuticos relacionados con biglicano puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población de organismos modelo) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción LD_{50}/ED_{50}. Se prefieren compuestos que muestren elevados índices terapéuticos. Aunque pueden usarse compuestos que muestren efectos secundarios tóxicos, ha de tenerse cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado para minimizar el daño potencial a células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y de estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. En particular, cuando se administra el agente terapéutico para potenciar la agregación del AChR, es deseable establecer la dosis que dará como resultado la estimulación, si se desea o la inhibición, si se desea. Las pruebas pueden continuar en pruebas médicas. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferentemente dentro del intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de

dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en los métodos del presente documento, puede estimarse inicialmente la dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración circulante en plasma que incluye la IC_{50} (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

B. Composiciones farmacéuticas

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

Para dicha terapia, los agentes terapéuticos relacionados con biglicano pueden formularse para varias cargas de administración, que incluyen administración sistémica y tópica o localizada. Técnicas y formulaciones en general se pueden encontrar en Remmington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA. Para administración sistémica, puede usarse una inyección, que incluye intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para la inyección, los agentes terapéuticos relacionados con biglicano pueden formularse en soluciones líquidas, por ejemplo, en tampones fisiológicamente compatibles como la solución de Hank o la solución de Ringer. Además, los compuestos pueden formularse en forma sólida y se vuelven a disolver o suspender inmediatamente antes de su uso. También se incluyen formas liofilizadas.

Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos pueden estar recubiertos. Los métodos de recubrimiento de comprimidos son bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p.ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, aromatizantes, colorantes y agentes edulcorantes, según corresponda.

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

Los compuestos pueden formularse para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o contenedores multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden comprender agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el principio activo puede encontrarse en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes de su uso.

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

Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también pueden formularse como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implante (por

ejemplo, subcutáneo o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos adecuados o hidrófobos (por ejemplo en forma de una emulsión en aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles, por ejemplo, una sal muy poco soluble.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosa o transdérmicos. Para administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación agentes penetrantes adecuados para la barrera que va a permearse. Dichos agentes penetrantes se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, sales biliares y derivados del ácido fusídico, además, se pueden usar detergentes para facilitar la penetración. La administración transmucosal puede realizarse a través de aerosoles nasales o usando supositorios. Para la administración tópica, los agentes terapéuticos relacionados con biglicano se formulan en pomadas, salvas, geles o cremas, tal como se conoce de manera general en la técnica. Se puede usar una solución de lavado localmente para tratar una lesión o inflamación para acelerar la cicatrización.

En entornos clínicos, se puede introducir un sistema de administración de genes para el gen terapéutico que codifica un proteoglicano como se describe en el presente documento en un paciente por cualquiera de una serie de métodos, cada uno de los cuales es familiar en la técnica. Por ejemplo, una preparación farmacéutica del sistema de administración génica puede introducirse sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección intravenosa y la transducción específica de la proteína en las células diana ocurre predominantemente a partir de la especificidad de la transfección proporcionada por el vehículo de suministro del gen, por el tipo de célula o por la expresión de tipo de tejido debido a las secuencias reguladoras de la transcripción que controlan la expresión del gen receptor, o una combinación de los mismos. En otras realizaciones, la administración inicial del gen recombinante es más limitada, siendo la introducción en el animal bastante localizada. Por ejemplo, el vehículo de suministro de genes se puede introducir mediante catéter (véase la patente de Estados Unidos 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (por ejemplo, Chen et al. (1994) *PNAS* 91: 3054-3057). Un gen que codifica una proteína relacionada con biglicano puede administrarse en una construcción de terapia génica mediante electroporación usando técnicas descritas, por ejemplo, por Dev et al. ((1994) *Cancer Treat Rev* 20:105-115).

Un modo de administrar ADN a las células musculares incluye el uso de vectores de virus adeno-asociados recombinantes, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos N.º 5.858.351. Como alternativa, los genes se han administrado al músculo por inyección directa de ADN plasmídico, tal como lo describen Wolff et al. (1990) *Science* 247: 1465-1468; Acsadi et al. (1991) *Nature* 352:815-818; Barr y Leiden (1991) *Science* 254:1507-1509. Sin embargo, este modo de administración generalmente da como resultado niveles sostenidos pero generalmente bajos de expresión. Se espera que los niveles de expresión bajos pero sostenidos sean eficaces para practicar los métodos en el presente documento.

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

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

VI. Usos a modo de ejemplo adicionales para lo agentes terapéuticos relacionados con biglicano

Los agentes terapéuticos relacionados con biglicano también se pueden usar como un suplemento para un cultivo celular o tisular (por ejemplo, un sistema para el crecimiento de órganos). Cualquier tipo de célula puede beneficiarse de estos suplementos. La cantidad de compuesto a añadir a los cultivos se puede determinar en experimentos a pequeña escala, por ejemplo, incubando las células u órganos con cantidades crecientes de un agente terapéutico relacionado con biglicano específico. Las células preferidas incluyen células eucariotas, por ejemplo, células musculares o neuronas.

Otros tejidos preferidos incluyen tejido atrófico. Por lo tanto, tal tejido puede incubarse *in vitro* con una cantidad eficaz de un agente terapéutico relacionado con biglicano para revertir la atrofia del tejido. En una realización, se obtiene un tejido atrófico de un sujeto, el tejido se cultiva *ex vivo* con un agente terapéutico relacionado con biglicano en una cantidad y durante un tiempo suficiente para revertir la atrofia del tejido y el tejido se puede readministrar a continuación en el mismo sujeto o en un sujeto diferente.

Como alternativa, los agentes terapéuticos relacionados con biglicanos pueden agregarse a cultivos *in vitro* de células o tejidos obtenidos de un sujeto que tiene una distrofia muscular u otra enfermedad que puede tratarse con un agente terapéutico relacionado con biglicano, para mejorar su crecimiento o supervivencia *in vitro*. La capacidad

de mantener células, tales como células cerebrales o células musculares de sujetos que tienen una distrofia muscular u otra enfermedad, es útil, por ejemplo,para desarrollar terapias para tratar la enfermedad.

VII. Ensayos de unión a proteínas

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para detectar la unión entre biglicano y MusK. Uno de tales ensayos se describe en el Ejemplo 5 a continuación. El biglicano puede estar en solución o adherido a un soporte sólido como una placa multipocillo o una columna. En algunas realizaciones, la unión del péptido se determina mediante ELISA, co-inmunoprecipitación, transferencia de gel o espectrometría de masas. En algunas realizaciones, el método comprende además comparar la unión con la de una muestra de control positiva. En algunas realizaciones, la unión del péptido indica que el péptido de biglicano está activo.

El biglicano puede ser de tipo salvaje, tal como la secuencia endógena de biglicano humano o de ratón. En algunas realizaciones, el péptido de biglicano porta una mutación relativa a la secuencia de biglicano humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 9). En algunas realizaciones, el péptido de biglicano es la SEQ ID NO: 11.

El polipéptido de ectodominio MuSK comprende el ectodominio MuSK o una porción del mismo y opcionalmente otras secuencias MuSK o secuencias exógenas, pero no comprende MuSK de longitud completa. En algunas realizaciones, el péptido del ectodominio MuSK comprende un dominio Fc.

En algunos aspectos, la aplicación proporciona un método para identificar un agente que modula la interacción entre MuSK y biglicano, que comprende poner en contacto biglicano con una proteína de MuSK que comprende un ectodominio MuSK o una porción del mismo suficiente para unirse a biglicano y un compuesto de prueba en condiciones en las que el biglicano y la proteína de MuSK interactúan en ausencia del compuesto de prueba, en el que una diferencia en el nivel de unión entre el biglicano y la proteína de MuSK en presencia del compuesto de prueba con respecto a la ausencia del compuesto de prueba indica que el compuesto de prueba es un agente que modula la interacción entre biglicano y MuSK.

VIII. EJEMPLOS

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera. Los contenidos de todas las referencias citadas (incluyendo referencias bibliográficas, patentes emitidas, solicitudes de patentes publicadas) citados a lo largo de esta solicitud se incorporan expresamente en el presente documento por referencia.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las habilidades en la técnica. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. la patente de Estados Unidos n.º 4.683.195); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods in Enzymology Vol. (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

Ejemplo I: Preparación y caracterización de diferentes formas de biglicano

El biglicano es una proteína de matriz extracelular que se expresa tanto como una forma de proteoglicano (PG) como una forma no glicanada (NG). La forma de proteoglicano de biglicano contiene una o dos cadenas laterales de glicosaminoglicano que pueden agregarse en la serina 5 o en la serina 10 (la numeración se basa en la secuencia del polipéptido maduro).

Se usó tecnología de ADN recombinante para crear una forma mutante de biglicano donde las dos serinas que pueden ser el sitio de la adición de GAG están mutadas a alaninas. Este mutante se denomina "S5A-S10A" o simplemente "SA". También hicimos una construcción de tipo salvaje. Todos fueron etiquetados con 6-HIS y se basaron en la secuencia de biglicano humano. El prefijo "His" se utiliza para denotar la presencia de esta etiqueta.

Produjimos y analizamos tres formas de biglicano (PG, NG, S5A-S10A). Todas las formas de biglicano se produjeron en células HEK293 y se purificaron mediante una combinación de cromatografía de níquel y de intercambio iónico. Estas preparaciones fueron >90 % puras como se muestra en la Fig. 4 y 5. Específicamente, la Figura 4 muestra la forma no glicanada (NG) y la forma de proteoglicano (PG) de biglicano analizadas por SDS-PAGE seguida de tinción

con Coomassie. La Figura 5 muestra el análisis de la forma NG y la forma PG de biglicano según se analiza mediante el ensayo de chips en un Bioanalyzer 2100 Protein 80 de Agilent. Para la forma NG de biglicano, la masa aparente era 55.9 kd y la pureza era del 92.6 %. Para la mezcla de formas NG y PG de biglicano, la masa aparente fue de 58.9 kd, y la pureza fue del 74 %. Para la forma PG de biglicano, la masa aparente era 60 kd y no se determinó la pureza.

La pureza de la preparación de S5A-S10A también fue > 90 % como se muestra en las Figs. 6 y 7. Específicamente, la Figura 6 muestra el análisis de biglicano S5A, S10A analizado por SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie. La Figura 7 muestra el análisis final de biglicano S5A, S10A mediante un Bioanalyzer 2100 de Agilent. La masa aparente era 46.3 kd y la pureza era del 93.2 %.

Los datos de transferencia Western muestran que el S5A-S10A migró más rápidamente en geles SDS que el NG, de acuerdo con la presencia de glicosilación ligada a O en S5 y/o S10 (figura 8). La Figura 8 muestra el análisis de transferencia de western de biglicano recombinante no glicanado (NG) y mutante S5A, S10A. Las muestras se procesaron en una SDS PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sondearon con un anticuerpo de biglicano, “ser-al” es doble mutante de los dos sitios de adición de GAG (S5A; S10A). Las posiciones de aminoácidos son para proteínas maduras. Obsérvese que la movilidad del mutante S5A;S10A fue más rápida que la del (tipo salvaje) no glicanado. Estos datos indican que una o ambas serinas se modifican en el no glicanado.

Obsérvese que la movilidad relativa de la muestra de NG es diferente en la Figura 6 debido al uso de sistemas de gel para generar esta Figura en comparación con la de las Figuras 4 y 5. Todas las muestras de NG tienen la misma movilidad cuando se separan en el mismo sistema.

El análisis de glicosilo por cromatografía de gases de los carbohidratos totales del NG y del S5A-S10A reveló que había diferencias importantes entre ellos (Tabla 1). De forma destacable, la glicosilación total de S5A-S10A fue del 57 % de la de NG. No se detectó ácido idurónico o glucurónico en el NG, lo que indica que no hubo GAG presente en la preparación del NG. A efectos de comparación, tanto el ácido idurónico como el glucurónico están altamente enriquecidos en el proteoglicano PG (véase Tabla 1 a continuación).

Los métodos para determinar la composición de glicosilo por GC-MS (Tabla 1) se llevaron a cabo de la siguiente manera. Las muestras (para proporcionar ~ 125 µg basándose en la información de muestra no dializada) asignadas para el análisis de la composición de monosacáridos se colocaron en tubos con tapón de rosca, se añadieron 10 µg de inositol como patrón interno y se liofilizaron. A continuación, se prepararon metilglicósidos a partir de las muestras secas mediante metanolisis con HCl 3 M en metanol a 100°C durante 2 h seguido de re-N-acetilación con piridina y anhídrido acético en metanol (para detección de amino azúcares). Las etapas de metanolisis y re-N-acetilación anteriores se repitieron dos veces. A continuación, las muestras fueron per-O-trimetilsililadas (TMS) con un reactivo Tri-Sil (Thermo Scientific) a 80°C durante 0,5 h. Estos procedimientos se llevaron a cabo como se describe previamente en Merkle y Poppe (1994) *Methods Enzymol*. 230: 1-15; York, et al. (1985) *Methods Enzymol.* 118:3-40. El análisis de los metilglicósidos TMS se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard Serie II 5890 equipado con una columna capilar de sílice fundida Supelco EC-1 (30 mx 0,25 mm DI) e interconectado a un Hewlett Packard 5970 MSD.

Tabla 1. Análisis de la composición de glicosilo de las glicoformas de biglicano por GC-MS. "Mutante" indica S5A-S10A.

Muestra	**Resto glicosilo**	**Masa (µg)**	**Mol %**
No glicanado	Ácido irudónico	nd	-
	Fucosa (Fuc)	0,21	17,1
	Xilosa (Xil)	0,10	8,7
	Ácido Glucurónico (GlcA)	nd	-
	Ácido Galacturónico (GalA)	nd	-
	Manosa (Man)	0,46	34,8
	Galactosa (Gal)	0,29	21,6
	N-Acetil Galactosamina (GalNAc)	nd	-
	N-Acetil Glucosamina (GlcNAc)	0,29	17,8
	N-Acetil Manosamina (ManNAc)	nd	-
	Total	1,34	100,0
	Porcentaje de carbohidratos totales en peso	1,07	
Proteoglicano	Ácido irudónico	5,28	12,5
	Fucosa (Fuc)	0,86	1,9
	Xilosa (Xil)	0,50	1,2

	Ácido Glucurónico (GlcA)	10,18	18,6
	Ácido Galacturónico (GalA)	0,30	0,5
	Manosa (Man)	0,17	0,3
	Galactosa (Gal)	3,14	6,2
	N-Acetil Galactosamina (GalNAc)	28,00	44,8
	N-Acetil Glucosamina (GlcNAc)	7,92	12,7
	N-Acetil Manosamina (ManNAc)	0,89	1,4
	Total	57,23	100,0
	Porcentaje de carbohidratos totales en peso	45,78	
Proteína mutante =	Ácido irudónico	nd	-
	Fucosa (Fuc)	0,02	3,9
	Xilosa (Xil)	0,02	3,5
	Ácido Glucurónico (GlcA)	nd	-
	Ácido Galacturónico (GalA)	nd	-
	Manosa (Man)	0,09	14,4
	Galactosa (Gal)	0,02	2,6
	N-Acetil Galactosamina (GalNAc)	nd	-
	N-Acetil Glucosamina (GlcNAc)	0,61	75,5
	N-Acetil Manosamina (ManNAc)	nd	-
	Total	0,77	100,0
	Porcentaje de carbohidratos totales en peso	0,61	

nd = No detectado.

Las diferentes formas de biglicano se caracterizaron adicionalmente por transferencia de lectina (Figura 14). Las muestras recombinantes de biglicano NG (no glicanado), PG (proteoglicano), SA (mutante) y los controles BSA, carboxipeptidasa Y (a), transferrina (b) y asialofetuina (d) fueron teñidas por Ponceau, S. Fetuina (c) apenas se tiñó mediante Ponceau S, tal vez porque esta glicoproteína está altamente glicosilada y sialilada. El PG se tiñó mediante AMA y ADS. SA fue ligeramente teñido mediante AGN y AMA y fuertemente teñido mediante ASN y ADS. Estos resultados indican que los glicanos en la proteína NG y SA tienen manosa terminal, ácido siálico unido (2-6) y (2-3) a Gal o GalNAc, y Galβ (1-4)GlcNAc o GlcNAc terminal, mientras que los glicanos de la proteína PG contienen estructuras enlazadas con ácido siálico (2-3) a Gal y Galβ (1-4) GlcNAc o GlcNAc terminal.

La transferencia de lectina se llevó a cabo usando el kit de diferenciación de glicanos DIG (Roche). Brevemente, la muestra y los controles se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa (1 µg de la muestra, control positivo y negativo). Las membranas se sumergieron en una solución de bloqueo (suministrada por el kit) seguido de incubación con lectinas marcadas con digoxigenina a 1 µg/ml en TBS. La actividad de unión se visualizó usando 750 mU de anti-Digoxigenina de oveja conjugada con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario y nitro azul tetrazolio/ 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato como reactivo de revelado de color. Se usaron como controles positivos carboxipeptidasa Y (a, AGN positiva), Transferrina (b, ASN positiva), Fetuina (c, AMA positiva) y Asialofetuina (d, APN y ADS positiva). Se usó albúmina sérica bovina (BSA) como control negativo. Se usó tinción con Ponceau S para la detección de proteína en la membrana.

Además, se determinó la posición de la glicosilación ligada a N en diferentes formas de biglicano (Figura 15). Hay 2 sitios potenciales de N-glicosilación en la proteína SA; Asn^{248} y Asn^{288} se encuentran dentro de las secuencias de consenso N-X-S/T para N-glicosilación. El biglicano mutante SA se digirió con tripsina y los glicopéptidos se desglicosilaron con PNGasa F en $H_2{}^{18}O$ convirtiendo los restos de asparagina glicosilada en restos de ácido aspártico. Un péptido glicosilado muestra un aumento de 3 Da en masa en comparación con el correspondiente péptido no glicosilado. Los sitios de glicosilación Asn^{248} y Asn^{288} de SA demostraron ser glicosilados por LC-MS/MS junto con un método de supervisión de listado de masa principal y búsqueda de base de datos usando el algoritmo TurboSequest. El resumen de péptidos de sitio de glicosilación ligada a N de SA se muestra en la Figura 15. Estos resultados indicaron que están completamente glicosilados dos sitios potenciales de glicosilación ligada a N de SA. Vale la pena señalar que la numeración de aminoácidos en SA es diferente de la de NG. Sin embargo, la secuencia peptídica que incluye sitios de N-glicosilación es idéntica entre las dos muestras y la numeración en la muestra NG es consistente con la encontrada en la base de datos UniProt.

Para realizar el análisis de glicosilación ligada a N, se redujeron cincuenta microgramos del biglicano SA con 25 mM de DTT durante 1 h a 55 ºC y se carboxiamidometilaron con 90 mM de yodoacetamida en la oscuridad durante 45 minutos. La muestra dializada seca se resuspendió en bicarbonato de amonio 50 mM (NH_4HCO_3) y se digirió con 2,5 µg de tripsina a 25°C durante 20 h. Después de la desactivación de la tripsina a 100°C durante 5 min, la muestra se desglicosiló a continuación con 2 µg de PNGaseF en 36 µL de agua ^{18}O ($H_2{}^{18}O$) y 2 µL de NH_4HCO_3 1 M.

Los péptidos marcados se resuspendieron con 200 µL de fase móvil A (ácido fórmico al 0,1 % en agua). La muestra se cargó luego en un nanospray capilar cónico columna/emisor (360x75x15 µm, PicoFrit, New Objective, Woburn, MA) se autoenvasó con resina de fase inversa C18 (10.5 cm, Waters, Milford, MA) en un aparato de bomba de presión de nitrógeno durante 10 min a 1000 psi (~ 5 uL de carga) y luego se separó mediante un gradiente lineal de 160 min de fase B móvil creciente a un caudal de ~ 500 nL/min directamente en el espectrómetro de masas.

El análisis LC-MS/MS se realizó en un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Discoverer (Thermo Scientific) equipado con fuentes de iones nanospray. Los datos resultantes se buscaron contra la secuencia SA recombinante utilizando el algoritmo TurboSequest (Proteome Discoverer 1.1, Thermo Scientific). Los parámetros de SEQUEST se ajustaron para permitir 30,0 ppm de tolerancia de masa de ión precursor y 0,8 Da de tolerancia de ión de fragmento con masa monoisotópica. Los péptidos trípticos se permitieron hasta con dos sitios de escisión internos omitidos y las modificaciones diferenciales de 57,02146 Da, 15,9949 Da y 2,98826 Da se permitieron para la cisteína alquilada, la oxidación de metioninas y el ácido aspártico marcado con ^{18}O-, respectivamente.

Para la muestra NG, se siguieron todos los procedimientos anteriores, excepto los pasos iniciales. Se redujeron cuarenta microgramos deNG con 25 mM de DTT durante 1 h a 55 ºC y se carboxiamidometilaron con 90 mM de yodoacetamida en la oscuridad durante 45 minutos. La muestra dializada seca se resuspendió en bicarbonato de amonio 50 mM (NH_4HCO_3) y se digirió con 2 µg de tripsina a 25°C durante 20 h. Después de la desactivación de la tripsina a 100°C durante 5 min, la muestra se desglicosiló a continuación con 2 µg de PNGaseF en 36 µL de agua ^{18}O ($H_2{}^{18}O$) y 2 µL de NH_4HCO_3 1M.

Conjuntamente, estos datos indican que las formas "no glicanadas" y mutante SA del biglicano sí contienen algunos restos de carbohidratos, pero estos difieren de la forma del proteoglicano de biglicano.

La comparación de bioactividad de NG y S5A-S10A mostró actividades distintas. S5A-S10A muestra una respuesta bifásica (potenciación y despotenciación), mientras que NG muestra una respuesta trifásica (potenciación, despotenciación e inhibición (figura 9). La Figura 9 (panel superior) muestra la actividad biológica de biglicano NG y S5A-S10A en un bioensayo de cultivo celular. Los miotubos primarios de pollo se trataron con 1U de agrina purificada y concentraciones variables de biglicano NG o S5A-S10A. A continuación, se contó el número de grupos de AChR por segmento de miotubo en cultivos por triplicado como se describe en (Nastuk et al., 1991, PMID 1660286). El nivel de agrupamiento de AChR inducido por agrina solo se indica por la línea de puntos horizontal. Obsérvese que S5A-S10A muestra potenciación a bajas concentraciones (≤0.05 µg/ml) y la despotenciación en todas las concentraciones más altas. Por el contrario, el biglicano NG muestra una potenciación a ≤0.05µg/ml, pero a continuación demuestra la despotenciación y la inhibición a concentraciones más altas. En comparación con SA y NG, PG muestra un efecto marcadamente diferente en el agrupamiento de AChR (ver panel inferior).

Encontramos que S5A-S10A estaba activo *in vivo*. La inyección sistémica de S5A-S10A a ratones mdx disminuyó el daño de las células musculares según se evaluó mediante la medición de los niveles de creatina quinasa sérica (figura 10). La Figuras 10 muestra que el biglicano S5A-S10A reduce el daño muscular en ratones mdx. En la Figura 10a, se inyectaron ratones Mdx a P18 semanalmente por vía intraperitoneal durante dos semanas con vehículo o con biglicano S5A-S10A y se midieron los niveles de creatina quinasa sérica (sCK). Los niveles de sCK se redujeron más de 2 veces en los animales inyectados con biglicano, ($p < 0.01$; $n = 4$). La Figura 10b muestra que la reducción en sCK depende de la dosis de biglicano S5A-S10A administrada.

La Figura 11 muestra la eficacia funcional del rhBGN S5A-S10A. A los ratones Mdx se les administró 10 mg/kg de SA-rhBGN por inyección intraperitoneal durante 3 meses en los intervalos indicados. Se realizaron las mediciones de contracción excéntrica en músculo aislado. Se ajustó la longitud del músculo para lograr una respuesta de contracción máxima y se midió esta longitud (Lo). Se calculó la disminución de la fuerza de contracción excéntrica para cada tétanos de un protocolo ECC estándar de estímulo supramáximo 700 ms, alargamiento total Lo/10; velocidad de alargamiento 0,5Lo/s. En la Figura 11 se muestra una respuesta de frecuencia de dosis en la mejora de la función muscular.

La Figura 12 muestra los efectos de SA-rhBGN en miofibras *in vivo*. Se inyectó a ratones Mdx por vía intraperitoneal con las dosis indicadas de SA-rhBGN a P18 y se determinó el porcentaje de miofibras con núcleos localizados centralmente para el sóleo. Se realizó la misma medición para los músculos del diafragma dos semanas después. Se prepararon secciones congeladas y se tiñeron tal como se describió previamente (Mercado et al., Faseb J. 2006). Los niveles de utrofina en la membrana de las células musculares también aumentaron de una manera dependiente de la dosis, medido en el Tibial anterior. Las secciones se observaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse E800 de Nikon (Melville, NY) y las imágenes se tomaron con el software Scanalytics IP Lab Spectrum (Fairfax, VA) o NIS Elements (Nikon). Para puntuar el porcentaje de núcleos centralmente localizados, se contaron todas las miofibras

seccionadas transversalmente fuera de focos necrosis/regenerativos en secciones teñidas con H&E con un objetivo 20X.

Ejemplo 2: La administración de biglicano causa un aumento en los niveles de colágeno VI en un ratón con niveles deficientes de colágeno VI.

En ratones deficientes en biglicano con colágeno VI de tipo salvaje, se reducen los niveles de colágeno VI. Para probar la eficacia del biglicano recombinante para restaurar los niveles de colágeno VI *in vivo* en este sistema, se utilizó un enfoque de rescate. Se inyectó biglicano recombinante por vía intramuscular en ratones deficientes en biglicano y se evaluó la expresión de colágeno VI. Se inyectó biglicano no glicanado o proteoglicano recombinante purificado en los músculos del cuádriceps femoral derecho de animales de cinco semanas de edad deficientes en biglicano (seis animales en total). El vehículo solo se inyectó en el cuádriceps izquierdo para permitir la comparación dentro de los animales. En cada caso, el sitio de inyección se visualizó mediante la inclusión de 1,0 % de tinta china en la solución. La figura 13a muestra que el proteoglicano de biglicano recombinante inyectado localiza apropiadamente el perimisio y el epimisio el sitio de inyección.

El biglicano inyectado tuvo un efecto sorprendente sobre la expresión del colágeno VI en el músculo deficiente en biglicano. Cuatro días después de la inyección observamos un aumento de la expresión de colágeno VI que estaba estrechamente colocalizado con áreas de tinción de biglicano (figura 13b). No se observó regulación positiva en el colágeno VI en el músculo inyectado con vehículo (datos no mostrados). La expresión de colágeno VI también se reguló positivamente mediante el polipéptido de biglicano no glicanado (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados muestran que el polipéptido de biglicano puede administrarse al músculo *in vivo* donde mejora los niveles de expresión de colágeno VI en el intersticio y en la superficie de la célula muscular. Además, este rescate se puede lograr con las formas no glicanada o proteoglicano del biglicano.

Ejemplo 3: Purificación de rhBGN S5A-S10A.

El rhBGN S5A-S10A sin etiquetar se purificó de acuerdo con el siguiente esquema. En primer lugar, se descongelaron alícuotas congeladas de biglicano mutante a 4°C. Una vez que se descongelaron por completo, se centrifugaron estas muestras para eliminar cualquier material particulado. Los sobrenadantes se filtraron a continuación a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm. La muestra filtrada se diluyó a continuación a 1:3 con agua desionizada.

Se aplicó biglicano mutante a 1 ml de columna de intercambio aniónico HiTrap QFF (GE LifeSciences) a 1 ml/min. La columna se equilibró inicialmente en tampón QFF A (Tris 20 mM, pH 8,5; NaCl 50 mM). La muestra no unida se eliminó por lavado de la columna usando QFF A y se recogieron fracciones de 4 ml durante la aplicación de la muestra y el lavado. El biglicano mutante se eluyó en la primera porción de un gradiente de dos etapas (0-50 % B en 40 volúmenes de columna; 50-100 % B en 5 volúmenes de columna; el tampón QFF B consiste en Tris 20 mM, pH 8,5; NaCl 1 M). Se recogieron fracciones de 1 ml y se tomaron muestras para análisis de SDS-PAGE y tinción con Coomassie. Se agruparon las fracciones que contenían biglicano mutante para la siguiente etapa de purificación. La Figura 16 muestra el perfil de elución y la tinción con Coomassie obtenida para la etapa de purificación por intercambio aniónico.

Se combinaron a 1:1 las fracciones agrupadas del intercambio aniónico con citrato sódico 1 M para una concentración final de citrato sódico de 500 mM. La proteína se aplicó a una columna HIC (cromatografía de interacción hidrofóbica) HiTrap ButylS FF (GE LifeSciences) a 1 ml/min. La columna se equilibró inicialmente en tampón HIC A (Tris 20 mM, pH 8,5; NaCl 200 mM; citrato de sodio 500 mM). La muestra no unida se eliminó por lavado de la columna usando HIC A y se recogieron fracciones de 4 ml durante la aplicación de la muestra y el lavado. El biglicano mutante se eluyó sobre un gradiente de 100-0 % B en más de 20 volúmenes de columna. (el tampón HIC B consiste en Tris 20 mM, pH 8,5; NaCl 200 mM.) Se recogieron fracciones de 0,75 ml y se tomaron muestras para análisis de SDS-PAGE y tanto para tinción con plata como para tinción con Coomassie. La Figura 17 muestra el perfil de elución y la tinción con Coomassie obtenida para la etapa de purificación HIC.

Ejemplo 4: Construcción de una línea CHO que exprese establemente rhBGN S5A-S10A.

Se construyó una línea celular CHO-S para expresar rhBGN S5A-S10A sin etiquetar utilizando protocolos convencionales. Brevemente, se insertó rhBGN en un vector pCEP4. El vector se transfectó en las células CHO usando lipofectamina y las células establemente transfectadas se aislaron usando selección de higromicina. Esta línea celular se mantiene en condiciones que son totalmente compatibles para su transferencia en condiciones de GMP y para su uso en humanos.

La Figura 18a muestra la expresión de TVN-102 a partir de dos líneas celulares clonales estables cultivadas en matraces de agitación. El TVN-102 producido por las líneas celulares se secreta eficientemente y es homogéneo (figura 18b). El TVN-102 es estable en los medios a 37°C durante al menos 5 días y la bioactividad se conserva durante al menos 2 semanas de almacenamiento a 4°C. Toda la cromatografía se llevó a cabo en una FPLC AKTA-100A. En la figura 19 se muestra un gel de proteína de TVN-102 purificado. Todas las resinas y los métodos

utilizados están diseñados para ser compatibles con los requisitos reglamentarios y la ampliación y todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente. Después de dos pasos de cromatografía, el material TVN-102 tiene una pureza > 90 % según el análisis mediante Bioanalyzer de Agilent. La espectroscopia de masas del material purificado muestra que la proteína está intacta. El material es bioactivo según se juzga por un ensayo de potenciación de agrina basado en células (Fig. 20).

Ejemplo 5: Ensayos de unión a proteínas y bioactividad para biglicano

Este ejemplo muestra un bioensayo de cultivo celular y un bioensayo de unión a proteínas para evaluar la actividad biológica de las proteínas recombinantes. De forma destacable, ambos ensayos son selectivos para la actividad de las formas NG/S5A-S10A del biglicano recombinante. El bioensayo (figura 20a) se basa en la capacidad de biglicano NG o S5A-S10A para potenciar la actividad inducida por agrina en miotubos cultivados. El ensayo de miotubos se describió anteriormente en el Ejemplo 1 y la Figura 9.

El ensayo de unión a proteínas (Figura 20b) se basa en la unión de biglicano al ectodominio de MuSK RTK. La figura 20a muestra que 4 preparaciones independientes de biglicano recombinante muestran bioactividad comparable. La Figura 20b muestra que tanto el biglicano NG como S5A-S10A se unen a MuSK, mientras que el biglicano PG recombinante no lo hace. Los experimentos mostrados en la Figura 20b se realizaron de la siguiente manera. Se analizó la unión de MuSK a tres formas diferentes de biglicano mediante ELISA. Las formas de biglicano indicadas se inmovilizaron en plástico y se sondearon con una fusión Fc del ectodominio de MuSK recombinante en PBS. La fusión de Fc ligada se detectó con anticuerpo secundario anti-ratón conjugado (KPL) con HRP (peroxidasa de rábano picante) desarrollado con TMB (tetrametilbenzidina). Se usaron absorbancias a 450 nm para generar las curvas de unión.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Brown

<120> MUTANTES DE BIGLICANO Y AGENTES TERAPÉUTICOS RELACIONADOS Y MÉTODOS DE USO

<130> BURF-012-WO1

<140> (sin asignación,aún)
<141> 17/05/2011

< 150> 61/345.557
<151> 17/05/2010

<160> 11

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> *Torpedo californica*

<400> 1

Ile Gln Ala Ile Glu Phe Glu Asp Leu
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> *Torpedo californica*

<400> 2

Leu Gly Leu Gly Phe Asn Glu Ile Arg
1 5

<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> *Torpedo californica*

<400> 3

Thr Ser Tyr His Gly Ile Ser Leu Phe Asn Asn Pro Val Asn Tyr Trp
1 5 10 15

Asp Val Leu

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Ile Gln Ala Ile Glu Leu Glu Asp Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Leu Gly Leu Gly His Asn Gln Ile Arg
1 5

<210> 6
<211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Ala Tyr Tyr Asn Gly Ile Ser Leu Phe Asn Asn Pro Val Pro Tyr Trp
1 5 10 15

Glu Val Gln

<210> 7
<211> 1685
< 212 >ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

gagtagctgc tttcggtccg ccggacacac cggacagata gacgtgcgga cggcccacca 60

ccccagcccg ccaactagtc agcctgcgcc tggcgcctcc cctctccagg tccatccgcc 120

atgtggcccc tgtggcgcct cgtgtctctg ctggccctga gccaggccct gccctttgag 180

cagagaggct tctgggactt caccctggac gatgggccat tcatgatgaa cgatgaggaa 240

gcttcgggcg ctgacacctc aggcgtcctg gacccggact ctgtcacacc cacctacagc 300

gccatgtgtc ctttcggctg ccactgccac ctgcgggtgg ttcagtgctc cgacctgggt 360

ctgaagtctg tgcccaaaga gatctccccc gacaccacgc tgctggacct gcagaacaac 420

gacatctccg agctccgcaa ggatgacttc aagggtctcc agcacctcta cgccctcgtc 480

ctggtgaaca acaagatctc caagatccat gagaaggcct tcagcccact gcggaagctg 540

cagaagctct acatctccaa gaaccacctg gtggagatcc cgcccaacct acccagctcc 600

ctggtggagc tccgcatcca cgacaaccgc atccgcaagg tgcccaaggg agtgttcagc 660

gggctccgga acatgaactg catcgagatg ggcgggaacc cactggagaa cagtggcttt 720

gaacctggag ccttcgatgg cctgaagctc aactacctgc gcatctcaga ggccaagctg 780

actggcatcc ccaaagacct ccctgagacc ctgaatgaac tccacctaga ccacaacaaa 840

atccaggcca tcgaactgga ggacctgctt cgctactcca agctgtacag gctgggccta 900

ggccacaacc agatcaggat gatcgagaac gggagcctga gcttcctgcc caccctccgg 960

gagctccact tggacaacaa caagttggcc agggtgccct cagggctccc agacctcaag 1020

ctcctccagg tggtctatct gcactccaac aacatcacca aagtgggtgt caacgacttc 1080

tgtcccatgg gcttcggggt gaagcgggcc tactacaacg gcatcagcct cttcaacaac 1140

cccgtgccct actgggaggt gcagccggcc actttccgct gcgtcactga ccgcctggcc 1200

atccagtttg gcaactacaa aaagtagagg cagctgcagc caccgcgggg cctcagtggg 1260

ggtctctggg gaacacagcc agacatcctg atggggaggc agagccagga agctaagcca 1320

gggcccagct gcgtccaacc cagcccccca cctcaggtcc ctgaccccag ctcgatgccc 1380

catcaccgcc tctccctggc tcccaagggt gcaggtgggc gcaaggcccg gcccccatca 1440

catgttccct tggcctcaga gctgcccctg ctctcccacc acagccaccc agaggcaccc 1500

catgaagctt ttttctcgtt cactcccaaa cccaagtgtc caaagctcca gtcctaggag 1560

aacagtccct gggtcagcag ccaggaggcg gtccataaga atggggacag tgggctctgc 1620

cagggctgcc gcacctgtcc agaacaacat gttctgttcc tcctcctcat gcatttccag 1680

ccttg 1685

<210> 8
<211> 1104
< 212 >ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

atgtggcccc tgtggcgcct cgtgtctctg ctggccctga gccaggccct gcctttgag 60

cagagaggct tctgggactt caccctggac gatgggccat tcatgatgaa cgatgaggaa 120

gcttcgggcg ctgacacctc aggcgtcctg gacccggact ctgtcacacc cacctacagc 180

gccatgtgtc ctttcggctg ccactgccac ctgcgggtgg ttcagtgctc cgacctgggt 240

ctgaagtctg tgcccaaaga gatctcccct gacaccacgc tgctggacct gcagaacaac 300

gacatctccg agctccgcaa ggatgacttc aagggtctcc agcacctcta cgccctcgtc 360

ctggtgaaca acaagatctc caagatccat gagaaggcct tcagcccact gcggaagctg 420

cagaagctct acatctccaa gaaccacctg gtggagatcc cgcccaacct acccagctcc 480

ctggtggagc tccgcatcca cgacaaccgc atccgcaagg tgcccaaggg agtgttcagc 540

gggctccgga acatgaactg catcgagatg ggcgggaacc cactggagaa cagtggcttt 600

gaacctggag ccttcgatgg cctgaagctc aactacctgc gcatctcaga ggccaagctg 660

actggcatcc ccaaagacct ccctgagacc ctgaatgaac tccacctaga ccacaacaaa 720

atccaggcca tcgaactgga ggacctgctt cgctactcca agctgtacag gctgggccta 780

ggccacaacc agatcaggat gatcgagaac gggagcctga gcttcctgcc caccctccgg 840

gagctccact tggacaacaa caagttggcc agggtgccct cagggctccc agacctcaag 900

ctcctccagg tggtctatct gcactccaac aacatcacca aagtgggtgt caacgacttc 960

tgtcccatgg gcttcggggt gaagcgggcc tactacaacg gcatcagcct cttcaacaac 1020

cccgtgccct actgggaggt gcagccggcc actttccgct gcgtcactga ccgcctggcc 1080

atccagtttg gcaactacaa aaag 1104

<210> 9
<211> 368
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ala Arg Val Pro Ser Gly Leu Pro Asp Leu Lys Leu Leu Gln Val
```

```
    290                 295                 300

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

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

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

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

<210> 10
<211> 368
<212> PRT
<213> mutante de biglicano de *Homo sapiens*

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 42
<223> Xaa puede estar ausente o puede ser cualquier aminoácido excepto Ser o Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 47
<223> Xaa puede estar ausente o puede ser cualquier aminoácido excepto Ser o Thr

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11
<211> 368
<212> PRT
<213> mutante de biglicano de *Homo sapiens*

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido terapéutico relacionado con biglicano para su uso en el tratamiento de una distrofia muscular seleccionada de Distrofia Muscular de Duchenne, Distrofia Muscular de Becker, Distrofia Muscular Congénita, Distrofia Muscular de Cinturas y miotónica en un sujeto que lo necesite, donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 90 % a los aminoácidos 38-365 de la SEQ ID NO: 9, en donde la secuencia de aminoácidos comprende una alanina en cada una de las posiciones correspondientes a los restos 42 y 47 de la SEQ ID NO: 9.

2. El polipéptido terapéutico relacionado con biglicano de la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el polipéptido no comprende ninguna cadena lateral de glicosaminoglicano (GAG).

3. El polipéptido terapéutico relacionado con biglicano de las reivindicaciones 1 o 2, para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 38-365 de la SEQ ID NO: 11.

4. El polipéptido terapéutico relacionado con biglicano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso de acuerdo con [[según]] una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el polipéptido:

(i) activa la quinasa específica muscular (MuSK) en la célula.; y/o
(ii) potencia la fosforilación de MuSK inducida por agrina; y/o
(iii) regula positivamente los niveles de utrofina.; y/o
(iv) se une a MuSK.; y/o
(v) se une a un α-sarcoglicano y/o un γ-sarcoglicano.; y/o
(vi) induce la fosforilación de sarcoglicanos.; y/o
(vii) potencia el agrupamiento inducido por agrina de receptores de acetilcolina (AChR).

5. El polipéptido terapéutico relacionado con biglicano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso de acuerdo con [[según]] una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en donde el polipéptido está codificado por un ácido nucleico que hibrida con la SEQ ID NO: 8.

6. El polipéptido terapéutico relacionado con biglicano de la reivindicación 1, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la distrofia muscular es Distrofia Muscular de Duchenne.

7. El polipéptido terapéutico relacionado con biglicano de la reivindicación 3, para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la distrofia muscular es Distrofia Muscular de Duchenne.

Figura 1

Biglicano y el complejo de Distrofina

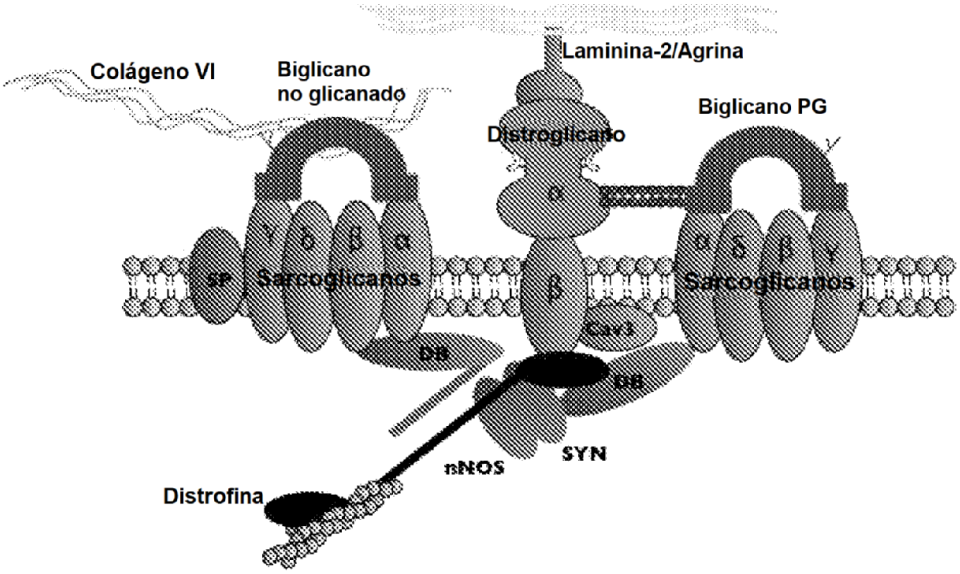


Figura 2

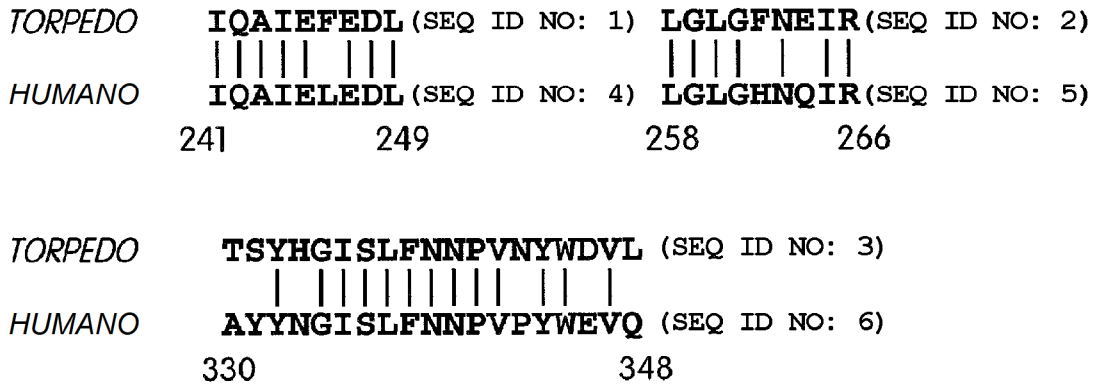
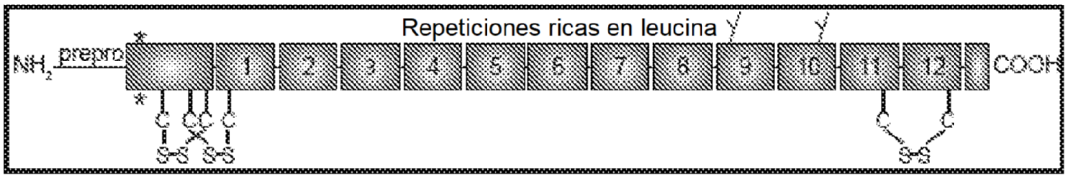

TORPEDO
IQAIEFEDL (SEQ ID NO: 1)
LGLGFNEIR (SEQ ID NO: 2)
HUMANO
IQAIELEDL (SEQ ID NO: 4)
LGLGHNQIR (SEQ ID NO: 5)
241
249
258
266
TORPEDO
TSYHGISLFNNPVNYWDVL (SEQ ID NO: 3)
HUMANO
AYYNGISLFNNPVPYWEVQ (SEQ ID NO: 6)
330
348

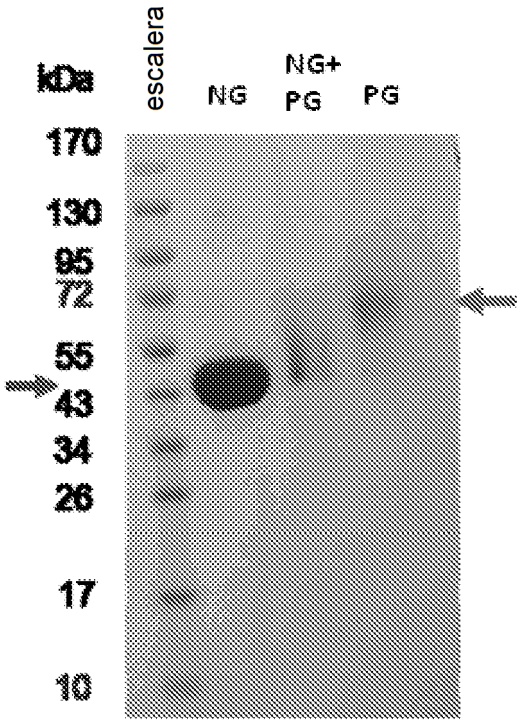
Figura 3

Estructura del biglicano



- Sitios de unión de GAG
- Y- carbohidrato ligado a N

Figura 4



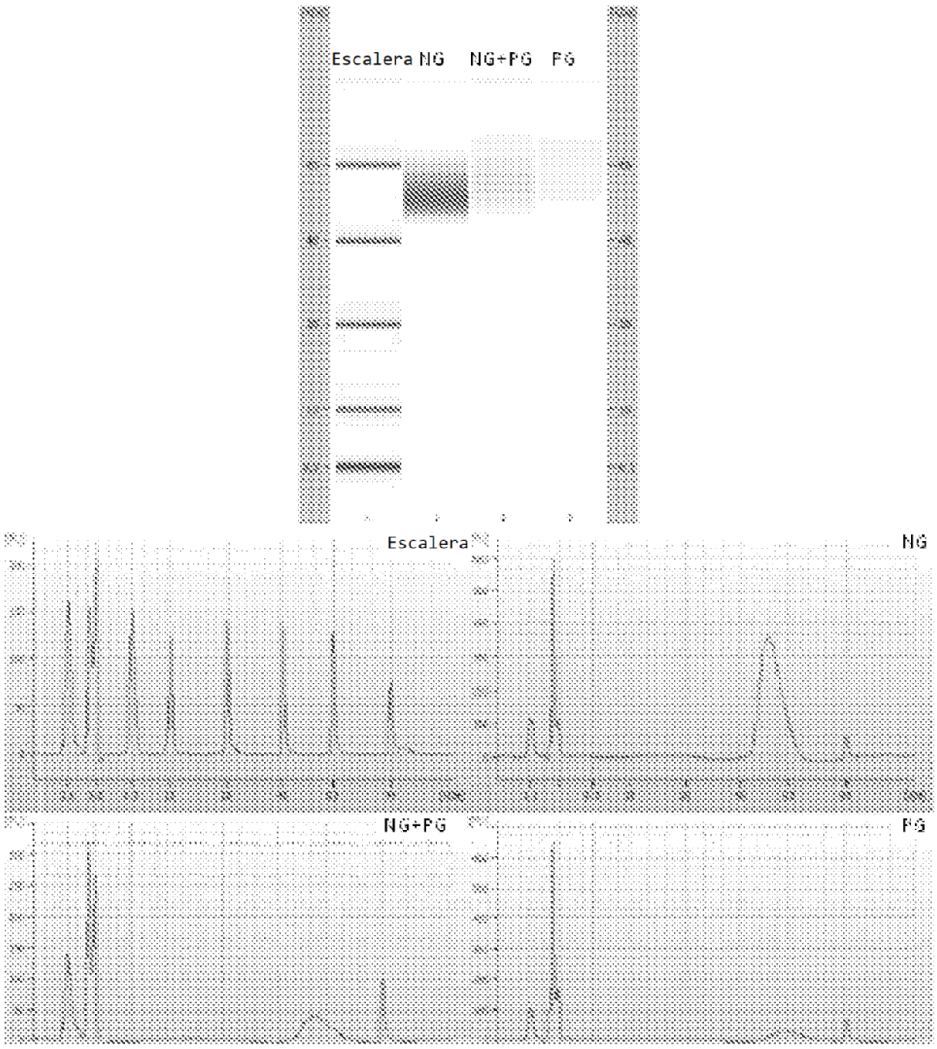


Figura 5

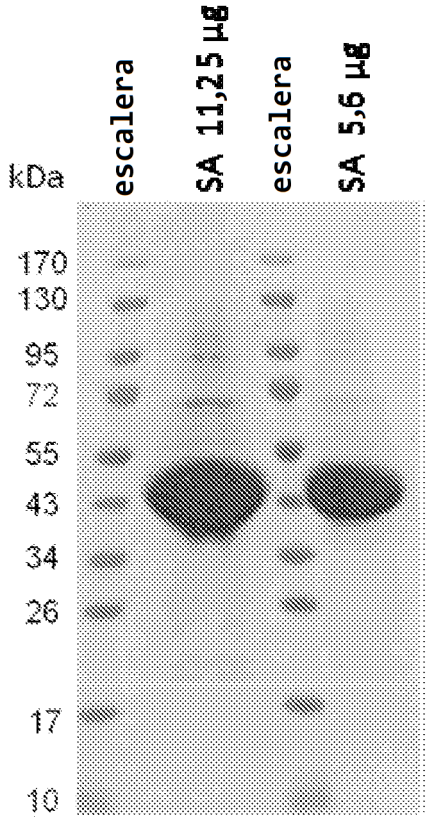

kDa
escalera
SA 11,25 µg
escalera
SA 5,6 µg
170
130
95
72
55
43
34
26
17
10

Fig 6.

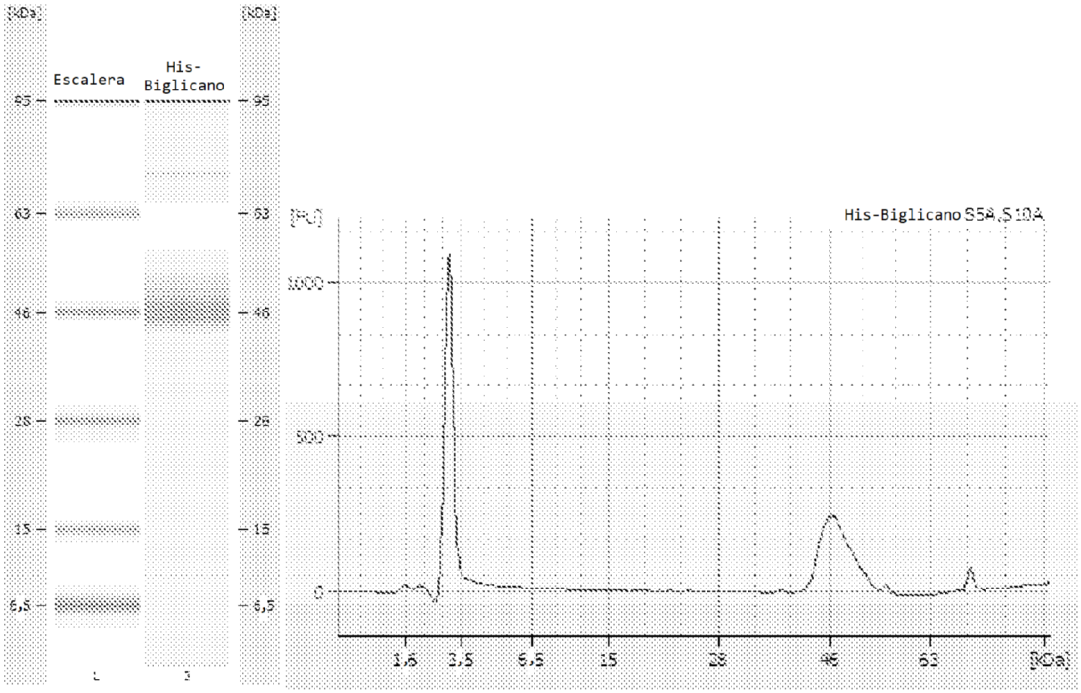

[kDa]
Escalera
His-
Biglicano
95
63
46
28
15
6,5
[kDa]
95
63
46
28
15
6,5
[R.U.]
His-Biglicano S5A,S10A
1000
500
0
1,6
3,5
6,5
15
28
46
63
[kDa]

Fig 7.

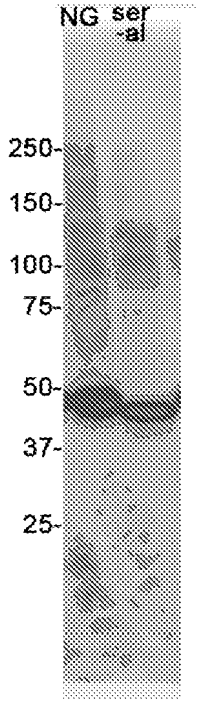
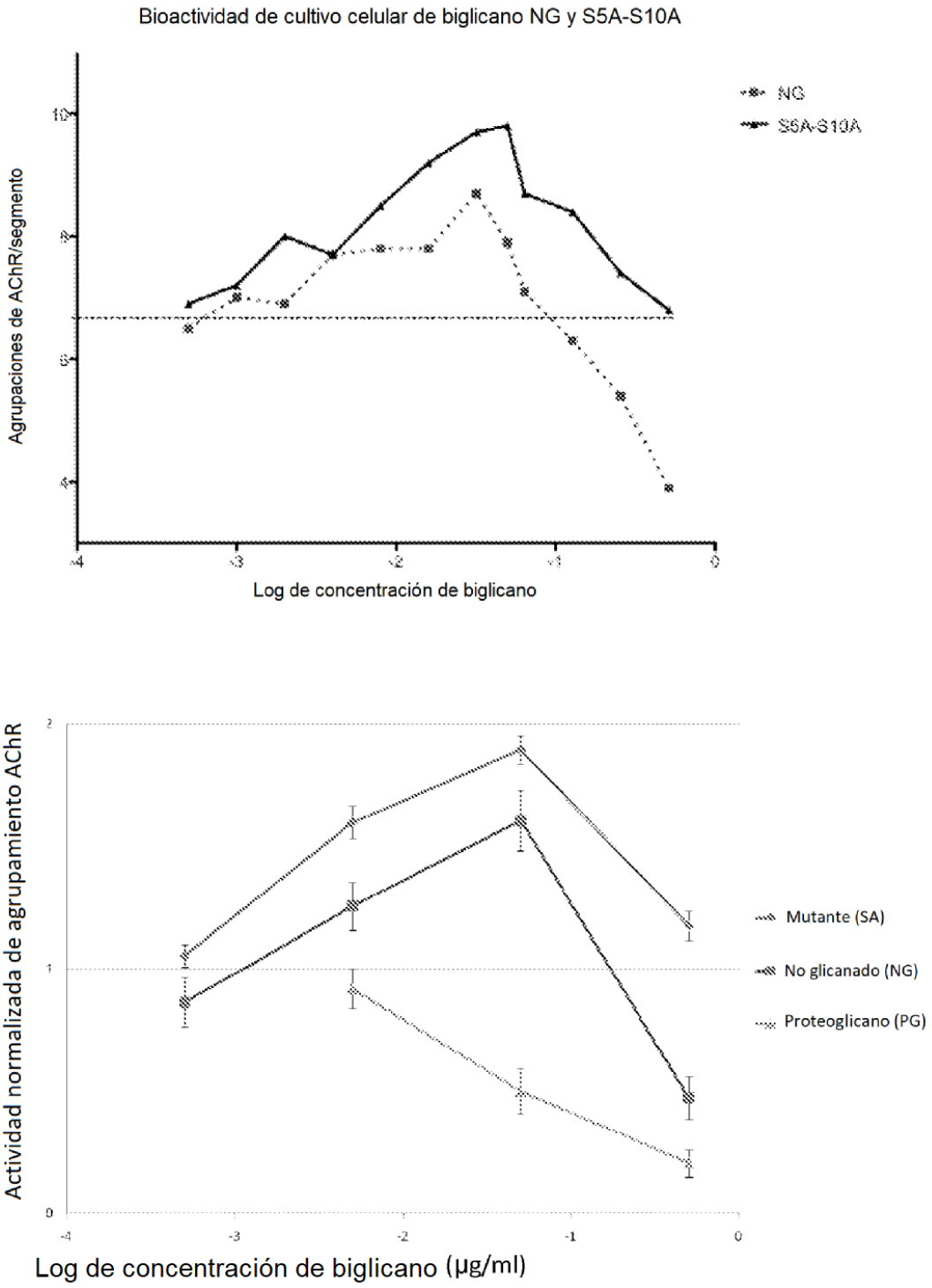
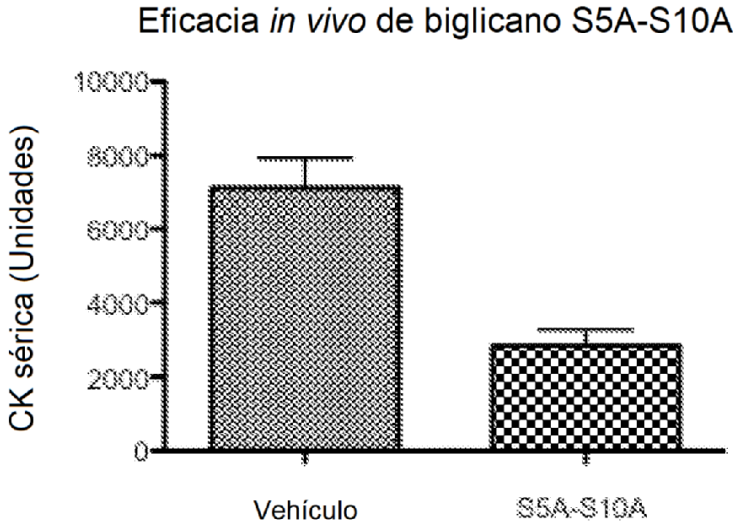


Fig. 8.

Figura 9. Bioactividad de biglicano NG y S5A-S10A en un bioensayo de cultivo celular



(a)


Eficacia *in vivo* de biglicano S5A-S10A
CK sérica (Unidades)
10000
8000
6000
4000
2000
0
Vehículo
S5A-S10A

(b)

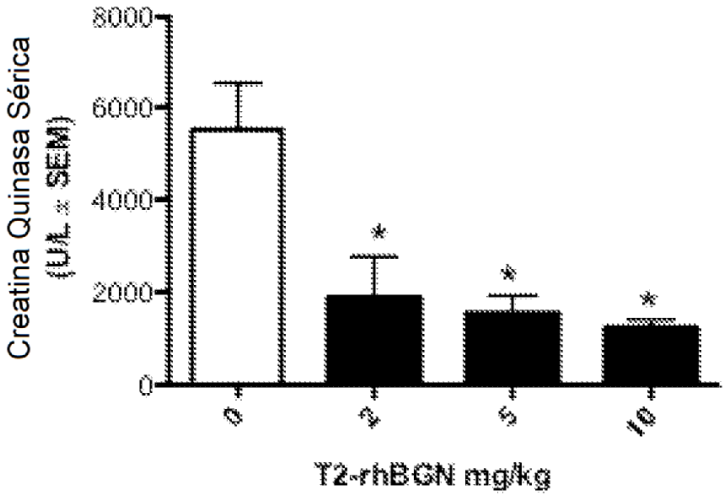
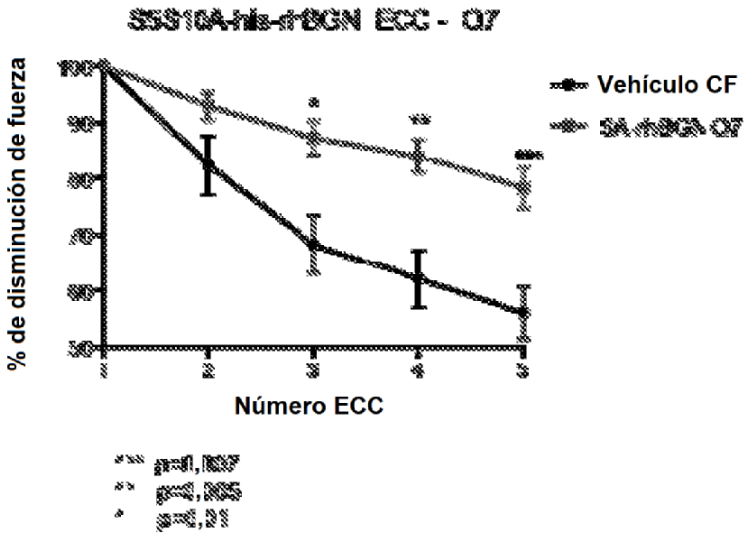
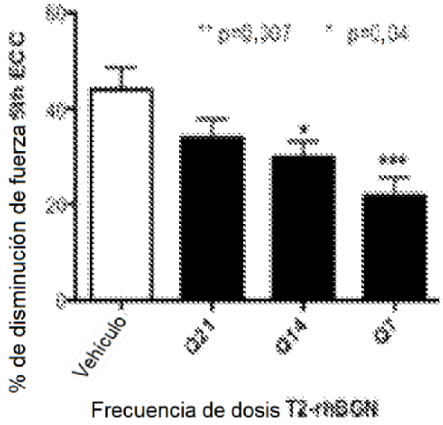

Creatina Quinasa Sérica
(U/L ± SEM)
8000
6000
4000
2000
0
*
*
*
0
2
5
10
T2-rhBGN mg/kg

Fig. 10

(a)



(b)



(c)

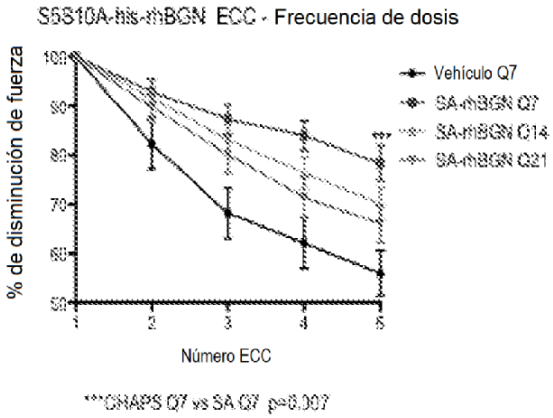


Figura 11.

Mejora de la salud muscular en ratones mdx inyectados con SA-rhBGN

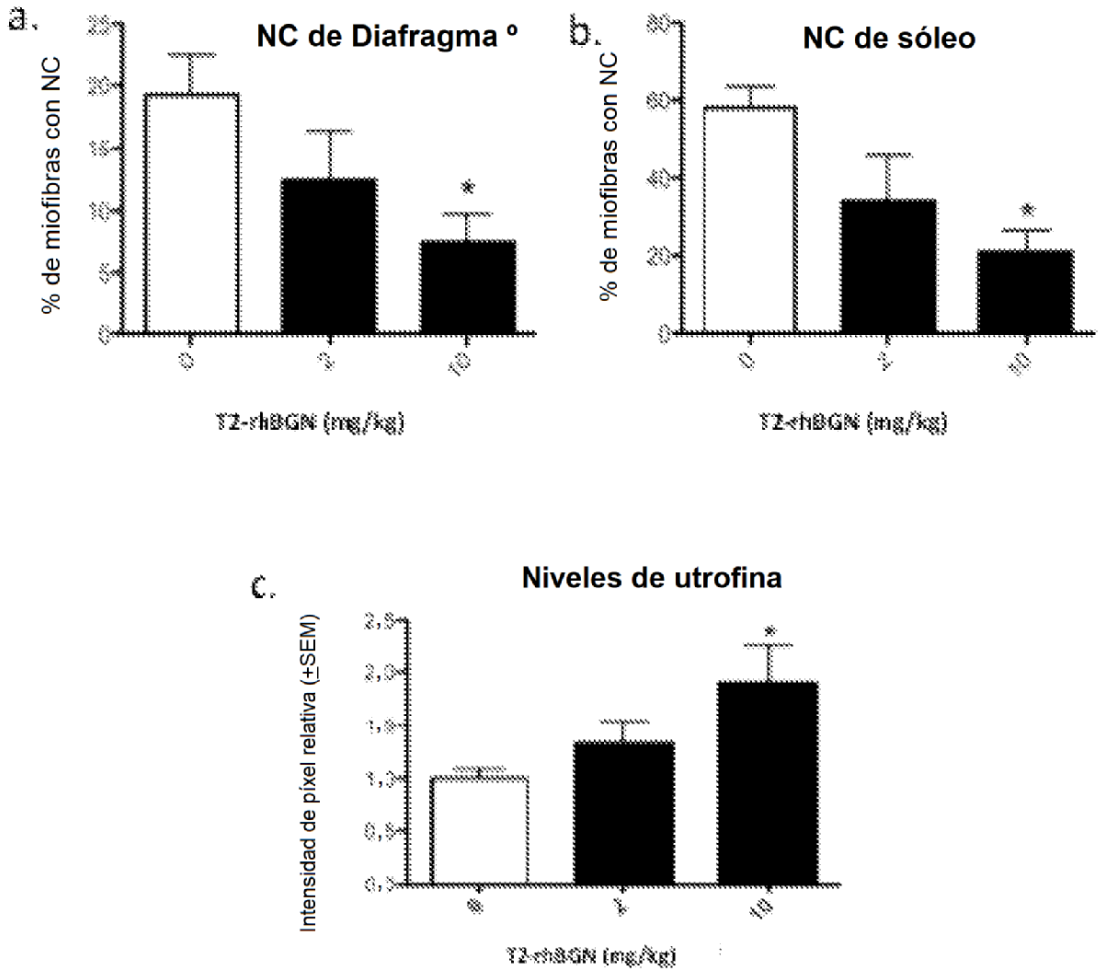
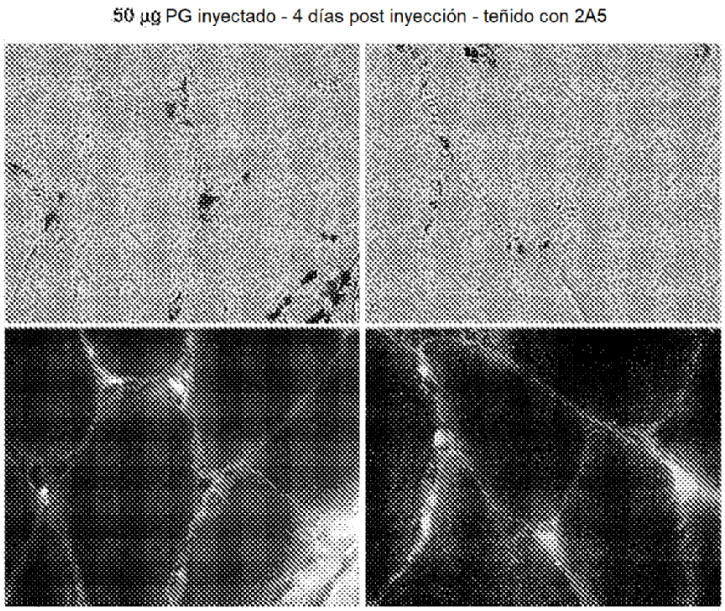


Fig. 12.

Figura 13

A.


50 µg PG inyectado - 4 días post inyección - teñido con 2A5

B.

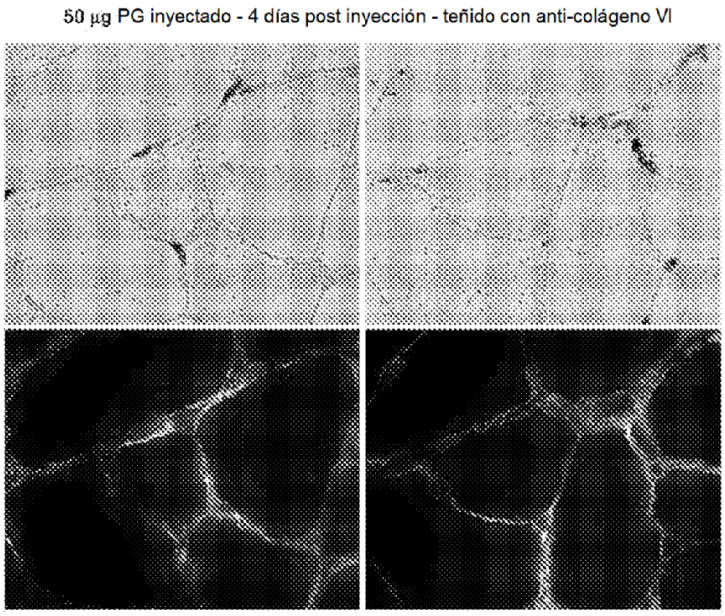
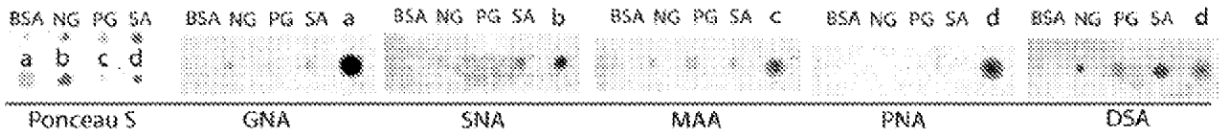

50 µg PG inyectado - 4 días post inyección - teñido con anti-colágeno VI

Figura 14



Lectina	**Preferencia de unión**	**Proteoglicano (PG)**	**No glicanado (PG)**	**Mutante (SA)**
AGN (Aglutinina de Galanthus nivalis)	Manosa terminal; (1 - 3), (1-6) o (1-2)	-	+	+
ASN (Aglutinina de Sambucus nigra)	Ácido siálico unido a Gal o GalNAc (2-6)	-	+	+
AMA (Aglutinina de Maackia amurensis)	Ácido siálico unido a Gal (2-3)	+	+	+
PNA (Aglutinina de cacahuete)	Galβ(1-3)GalNAc	-	-	-
ADS (Aglutinina de Datura stramonium)	Galβ(1-4)GlcNAc o GLcNac terminal	+	+	+

Figura 15

Biglicano No glicanado (NG)		
Sequon	**Posición del péptido**	**Secuencia del péptido[a]**
Asn^{270}	267-280	(R)MIEN@GSLSFLPTLR(E)
Asn^{311}	301-314	(K)LLQVVYLHSNN@ITK(V)

Biglicano mutante (SA)		
Sequon	**Posición del péptido**	**Secuencia del péptido[a]**
Asn^{270}	267-280	(R)MIEN@GSLSFLPTLR(E)
Asn^{311}	301-314	(K)LLQVVYLHSNN@ITK(V)

[a]An @ indica el sitio de N-glicosilación

Sequon → Asn-X-Ser o Asn-X-Thr

Figura 16

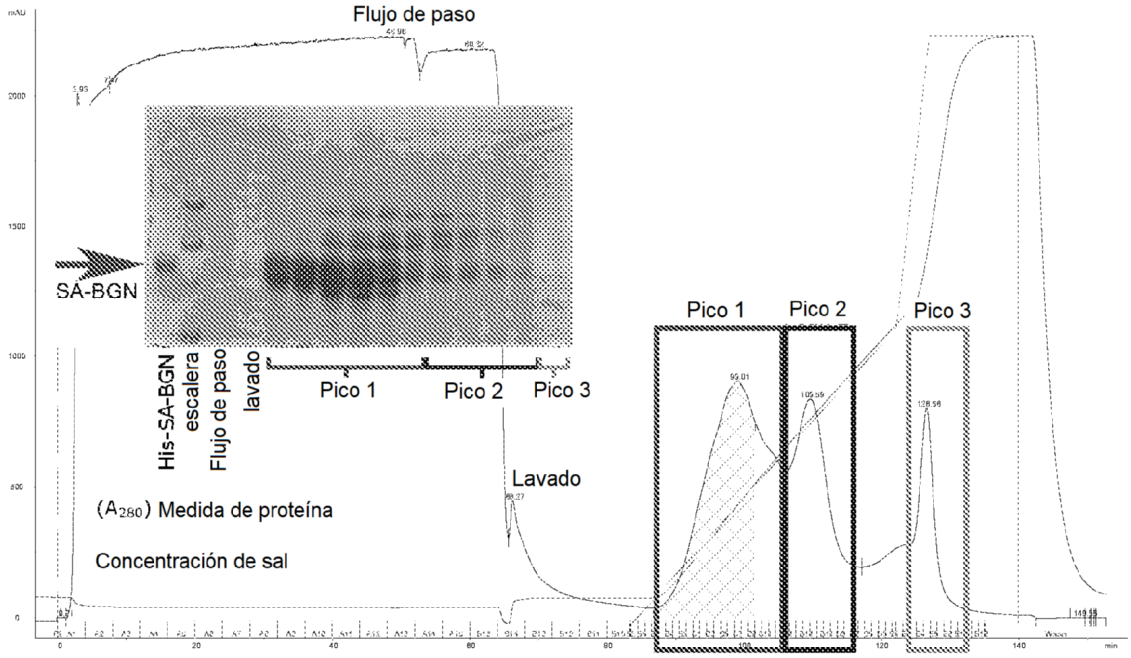

Flujo de paso
SA-BGN
His-SA-BGN
escalera
Flujo de paso
lavado
Pico 1
Pico 2
Pico 3
Lavado
(A280) Medida de proteína
Concentración de sal
Pico 1
Pico 2
Pico 3
min

Figura 17

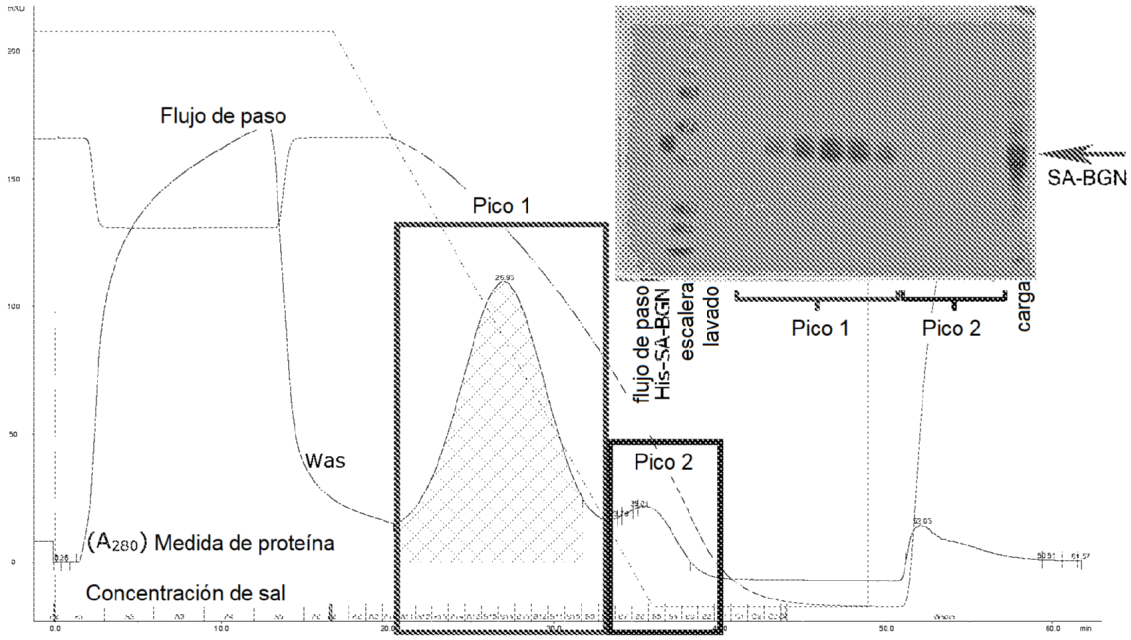

Flujo de paso
Pico 1
Was
Pico 2
(A280) Medida de proteína
Concentración de sal
SA-BGN
flujo de paso His-SA-BGN
escalera lavado
Pico 1
Pico 2
carga

Figura 18

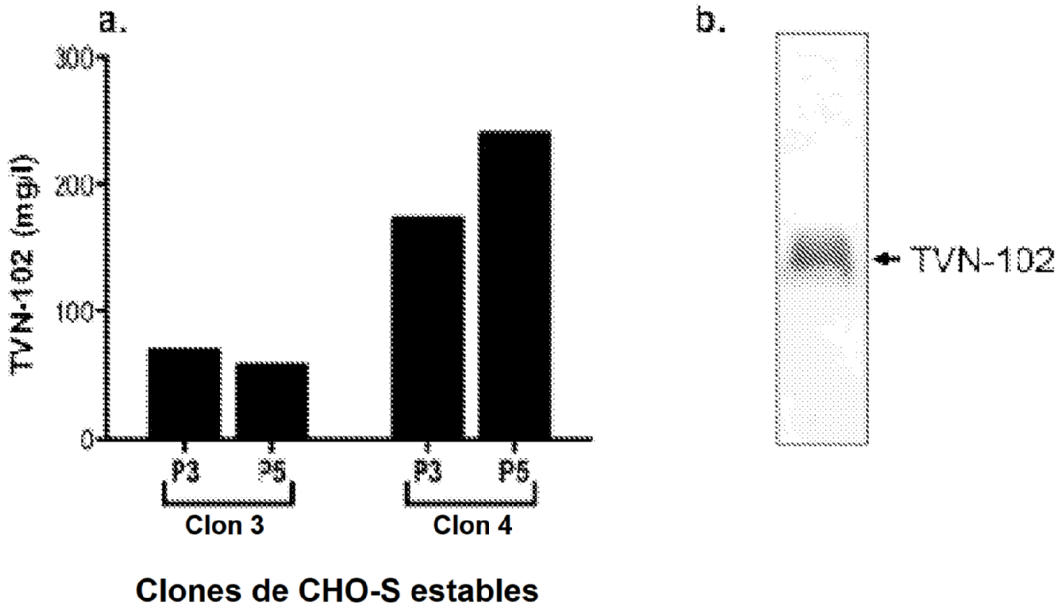

a.
300
200
100
0
TVN-102 (mg/l)
P3
P5
P3
P5
Clon 3
Clon 4
Clones de CHO-S estables
b.
TVN-102

Figura 19

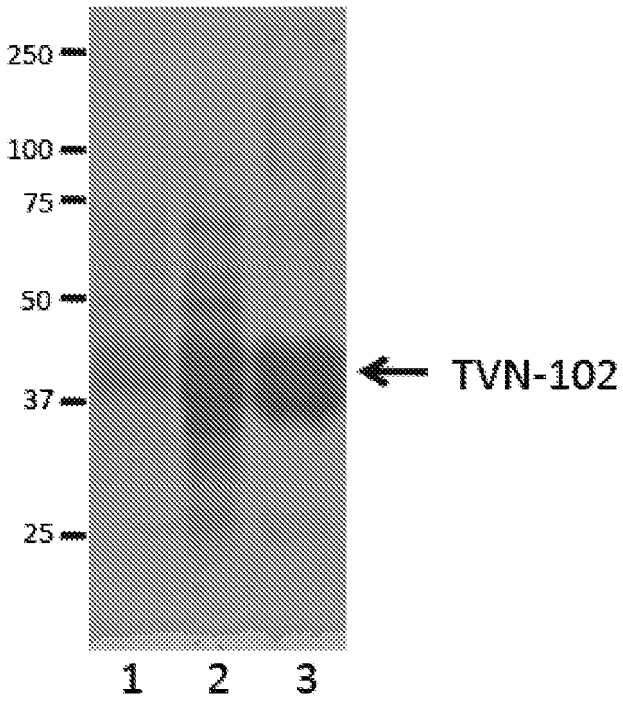
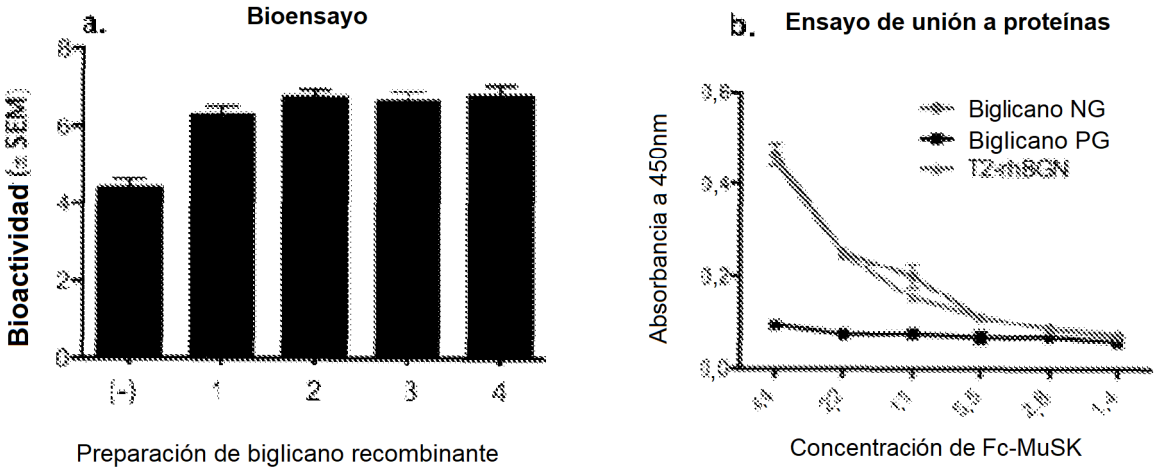


Figura 20


a.
Bioensayo
Bioactividad (± SEM)
(-)
1
2
3
4
Preparación de biglicano recombinante
b.
Ensayo de unión a proteínas
Absorbancia a 450nm
Biglicano NG
Biglicano PG
Concentración de Fc-MuSK