

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 571**

51 Int. Cl.:

C12N 15/864	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)
C12N 15/113	(2010.01)
C12N 9/16	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
C12N 15/86	(2006.01)
A61K 38/46	(2006.01)
A61K 38/48	(2006.01)
C12N 9/64	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2014 PCT/FR2014/050866**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14167253**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2014 E 14721468 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2984172**

54 Título: **Sistema de expresión para una terapia genética selectiva**

30 Prioridad:

11.04.2013 FR 1353306

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2019

73 Titular/es:

**GENETHON (50.0%)
1 bis rue de l'Internationale,
91002 Evry, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BUJ BELLO, ANA MARIA y
RICHARD, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 698 571 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema de expresión para una terapia genética selectiva

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a la terapia genética, en particular al tratamiento de enfermedades que afectan a los músculos esqueléticos, como por ejemplo la miopatía miotubular causada por mutaciones en el gen MTM1.

10 En este contexto, se describe un sistema de expresión que comprende un transgén que codifica la miotubularina, que permitirá asegurar la producción de una cantidad terapéuticamente eficaz de la misma al nivel de los músculos esqueléticos, y de una cantidad tóxicamente aceptable de la misma a nivel del corazón.

15 Estado anterior de la técnica

La miopatía miotubular relacionada con el cromosoma X (“X-linked myotubular myopathy” o XLMTM, OMIN 310400) es la forma más severa y más frecuente de un grupo de enfermedades denominadas miopatías centronucleares. Los sujetos enfermos ya están afectados en el transcurso de su vida fetal, muestran una reducción de la movilidad en el transcurso de la gestación y en el nacimiento presentan una miopatía que parece no progresiva [1,2,3]. Tienen una debilidad muscular y una hipotonía generalizadas, que conducen a una insuficiencia respiratoria y muchos mueren en el transcurso de los primeros años de vida a pesar del tratamiento médico intensivo. De manera más atípica, las formas menos severas de miopatía miotubular también se producen en sujetos masculinos y femeninos con síntomas leves durante la infancia que empeoran en el transcurso de la primera o segunda décadas [4].

25 Los músculos esqueléticos de los sujetos enfermos contienen pequeñas fibras con una distribución alterada de los orgánulos, tales como los núcleos y las mitocondrias, que de manera característica se encuentran en el centro de las fibras o, en los casos menos graves, se colocan en collar en la región subsarcolemal [4,5].

30 La enfermedad se debe a mutaciones inactivantes en el gen MTM1 expresado de forma ubicua, que codifica una fosfoinosítido fosfatasa denominada miotubularina [6].

35 En la actualidad existen modelos animales de la enfermedad en pez cebra, ratón y perro [7,8,9,10]. Los estudios realizados en estos modelos han mostrado que, en el músculo esquelético, la miotubularina desempeña un papel en diversos mecanismos, incluyendo la organización del túbulo T y del filamento intermedio, el acoplamiento de excitación-contracción, la transmisión de la unión neuromuscular, la supervivencia y la proliferación de células satélite [11,12,13,14].

40 La terapia de reemplazo génico por medio de un vector representa un posible enfoque terapéutico para la miopatía miotubular. Por lo tanto, como prueba de concepto se presentó de que una única inyección intramuscular de un vector viral adeno-asociado (AAV) recombinante en un ratón que presentaba una deficiencia sintomática específica del músculo en miotubularina (mKO) era capaz de mejorar la patología y la función de los músculos diana [15].

45 La cuestión del tratamiento de las patologías musculares sigue siendo crucial. La transferencia de genes, en particular con la ayuda de vectores obtenidos a partir de virus asociados a los adenovirus que resultan ser herramientas particularmente adecuadas para la transfección muscular, constituye una estrategia particularmente prometedora. Se trata de administrar al sujeto enfermo una copia del gen intacto, destinado a la producción de una proteína funcional que compensa la proteína mutada e inactiva producida por el sujeto.

50 En el caso de las patologías musculares, la administración se puede realizar mediante inyección local, a nivel muscular, del vector que porta el transgén. Sin embargo, a nivel clínico, una administración sistémica es preferente, lo que implica que el transgén se pueda volver a encontrar a nivel de los diferentes tejidos del organismo.

55 De una manera convencional, el transgén se coloca bajo el control de secuencias reguladoras que gobiernan su expresión, en particular con respecto al nivel de expresión o la especificidad tisular de la expresión. Por lo tanto y en el caso de la terapia genética de una enfermedad muscular, puede ser preferente un promotor que gobierne una expresión de forma más específica en el músculo. A modo de ejemplo, se ha desarrollado un promotor sintético C5-12, bien conocido por el experto en la materia, que se supone que favorece la expresión de los genes al nivel de los músculos.

60 Sin embargo, existe una necesidad evidente de desarrollar nuevas herramientas de terapia genética que permitan el tratamiento de las enfermedades neuromusculares, lo que conduce a la producción de cantidades eficaces de proteína al nivel de los tejidos diana lo que permite compensar la falta de actividad de las proteínas mutadas, y que además no sean peligrosos para los pacientes tratados.

Beggs *et al.*, (Neuromuscular Disorders, vol. 22, n.º 9-10, 2012, p. 907) desvelaron la inyección intravenosa, en un ratón KO *Mtm1*, de un vector AAV9 expresa la miotubularina bajo el control del promotor de la desmina, sin informar de sus efectos a nivel cardiaco.

5 Objeto de la invención

La presente invención se basa en la puesta de manifiesto, por los inventores, de que después de la administración sistémica, un sistema de expresión destinado a la producción de la proteína de interés al nivel de un tejido diana, de forma ventajosa los músculos esqueléticos, puede comprender de manera simultánea una expresión al nivel de los otros tejidos y órganos potencialmente tóxica, haciendo que el sistema no sea adecuado para un uso terapéutico.

Se describen soluciones técnicas para este problema recientemente identificado, que se refieren en particular a las filtraciones cardiacas relacionadas con la expresión de un transgén con enfoque muscular esquelético.

15 Más ampliamente, se trata, por lo tanto, para un sistema de expresión dado:

- de determinar si éste presenta una toxicidad;
- de determinar en cuál(s) tejido(s) éste presenta una toxicidad;
- proporcionar medios para reducir esta toxicidad a un nivel aceptable.

20 Por lo tanto, las proteínas a las que se refiere son aquellas que, cuando se expresan a partir de un sistema de expresión, presentan una toxicidad en al menos un tejido, en particular en un tejido en Adriana.

25 De manera ventajosa, el sistema de expresión se administra de manera sistémica en el organismo, en particular en un animal, incluso de forma más ventajosa en el ser humano.

30 De manera preferente, el análisis de la toxicidad se realiza en un organismo que presenta una copia defectuosa de la secuencia que codifica la proteína de interés, a saber, en un organismo que presentaba patología a tratar, por ejemplo, un modelo animal de tipo "Desactivación genética" (KO). En efecto, si en el contexto de la presente solicitud, se pudo observar una toxicidad cardiaca para sistemas de expresión que codifican la miotubularina o la calpaína 3, en el caso de la miotubularina, ésta no se detectó más que en los ratones KO. En otros términos, un análisis de toxicidad que, de acuerdo con la práctica habitual, se hubiera realizado en un animal sano, no habría puesto de manifiesto esta toxicidad.

35 Por lo tanto y de manera general, se describe un sistema de expresión que comprende una secuencia que codifica una proteína, dicho sistema de expresión permitiendo:

- la expresión a un nivel terapéuticamente aceptable de la proteína en el o los tejidos diana; y
- la expresión a un nivel tóxicamente aceptable de la proteína en otros tejidos distintos a los tejidos diana, es decir, en los tejidos no diana.

40 De forma más precisa, la presente invención se refiere a un sistema de expresión para administración sistémica que comprende una secuencia que codifica la miotubularina, bajo el control de:

- 45 - una secuencia promotora que permite la expresión a un nivel terapéuticamente aceptable de miotubularina en los músculos esqueléticos y que presenta una actividad promotora a un nivel tóxicamente aceptable incluso nulo en el corazón; o
- una secuencia promotora que permite la expresión a un nivel terapéuticamente aceptable de miotubularina en los músculos esqueléticos, y una secuencia diana de un ARNmi expresado en el corazón.

50 El tejido diana se define de forma ventajosa como el tejido o el órgano en el que la proteína debe desempeñar un papel terapéutico, en particular en el caso en el que el gen nativo que codifica esta proteína es defectuoso. De acuerdo con la invención, el tejido diana tiene como objeto los músculos estriados esqueléticos, denominados en lo sucesivo músculos esqueléticos, es decir, el conjunto de los músculos implicados en la motricidad, incluyendo el diafragma. Estos músculos están afectados en particular en las patologías denominadas miopatías. Otro tejido diana de interés potencial es el tejido nervioso periférico, que también puede estar afectado en las enfermedades neuromusculares. De acuerdo con la invención, los tejidos diana comprenden los músculos esqueléticos.

55 Los tejidos no diana se definen de forma ventajosa como los tejidos u órganos en los que la proteína no tiene papel terapéutico que desempeñar, y opcionalmente en los que la presencia de la proteína en cantidad superior a la cantidad endógena se puede considerar perjudicial, incluso mortal, y por lo tanto tóxica.

60 Los tejidos que se deben proteger en particular de esta toxicidad funcional son de forma ventajosa:

- 65 - el corazón o músculo estriado cardiaco;
- el hígado;

- el cerebro;
- los pulmones;
- el riñón; y/o
- los músculos lisos, en particular el tracto gastrointestinal.

5 Por lo tanto, de forma ventajosa se trata de órganos vitales o de tejidos en los que los sistemas de expresión genética tienen tendencia a acumularse.

10 En el contexto de la invención, el músculo cardíaco aparece como un tejido particularmente de interés, como se demuestra al menos para la miotubularina y la calpaína 3. De acuerdo con la invención, el sistema de expresión permite por lo tanto una expresión a un nivel tóxicamente aceptable de la proteína en el corazón.

15 Por lo tanto, se describe un sistema de expresión que comprende una secuencia que codifica una proteína, dicho sistema de expresión permitiendo:

- la expresión a un nivel terapéuticamente aceptable de la proteína en los tejidos diana que comprenden los músculos esqueléticos y/o el tejido nervioso periférico; y
- la expresión a un nivel tóxicamente aceptable de la proteína en otros tejidos que no son los tejidos diana, en particular en el corazón.

20 De acuerdo con una primera característica, el sistema de expresión comprende una secuencia que codifica una proteína, que corresponde a un transgén. En el contexto de la invención, por "transgén" se hace referencia a una secuencia, de forma ventajosa un marco de lectura abierto, proporcionado en posición trans con la ayuda del sistema de expresión de acuerdo con la invención.

25 De acuerdo con un modo de realización particular, esta secuencia constituye una copia, idéntica o equivalente, de una secuencia endógena presente al nivel del genoma del organismo en el que se introduce el sistema de expresión. De acuerdo con un modo de realización particular, la secuencia endógena presenta una o varias mutaciones que hacen que la proteína codificada sea poco o nada funcional incluso ausente (defecto de expresión o de actividad de la proteína endógena), en particular a nivel de los tejidos diana, en particular de los músculos esqueléticos. En otros términos y de manera ventajosa, el sistema de expresión de acuerdo con la invención está destinado a su administración a un sujeto que presenta una copia defectuosa de la secuencia que codifica la proteína y que presenta una patología asociada. En este contexto, la proteína codificada por la secuencia portada por el sistema de expresión de acuerdo con la invención por lo tanto se puede definir como una proteína en la que la mutación produce una enfermedad neuromuscular.

35 De acuerdo con otro modo de realización, se trata de una secuencia que codifica una proteína capaz de "compensar" el defecto de una proteína defectuosa (al nivel de su expresión o de su actividad) en el sujeto al que se le administra el sistema de expresión. Por lo tanto y a modo de ejemplo con respecto a las patologías neuromusculares:

- la utrofina se puede usar para reemplazo de una distrofina mutada y deficiente;
- la decorina, la fibromodulina o el lumicano permiten compensar la fuente muscular observada en el caso de patologías neuromusculares;
- 45 - la activina también permite aumentar la masa muscular en patologías cuya causa no es una mutación de esta proteína.

50 Por lo tanto y de manera más general, la secuencia portada por el sistema de expresión se puede definir como codificante de una proteína que presenta una actividad terapéutica en el contexto de una enfermedad neuromuscular. La noción de actividad terapéutica se define como se menciona a continuación en relación con la expresión "nivel terapéuticamente aceptable".

55 La secuencia que codifica la proteína es una secuencia de ácido nucleico y en particular puede ser un ADN (ácido desoxirribonucleico), un ARN (ácido ribonucleico) o un ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario).

De manera ventajosa, dicha secuencia codifica una proteína funcional, es decir, capaz de asegurar su función nativa o esencial, en particular al nivel del músculo esquelético. Para cada proteína de interés, se puede definir la actividad buscada y la secuencia necesaria para la obtención de esta actividad.

60 De acuerdo con un modo de realización preferente, dicha secuencia codifica la proteína nativa, dicha proteína siendo de forma ventajosa de origen humano. También se puede tratar de un derivado o de un fragmento de esta proteína, con la condición de que este derivado o este fragmento conserven la actividad buscada. De manera ventajosa, por "derivado" o "fragmento" se hace referencia a una secuencia proteica que presenta al menos un 60 %, preferentemente un 70 %, incluso más preferentemente un 80 %, incluso un 90 %, un 95 % o un 99 % de identidad con la secuencia humana de la proteína de interés. Por ejemplo, de ese modo se hace referencia a las proteínas de otro origen (de mamífero no humano...) o proteínas truncadas, incluso mutadas, pero activas. Por lo tanto y en el

contexto de la invención, el término “proteína” se entiende como la proteína entera sea cual sea su origen, así como los derivados y fragmentos funcionales de la misma.

5 En el contexto de la presente solicitud se tiene como objeto en particular las proteínas que permiten la gestión de la carga terapéutica de enfermedades denominadas neuromusculares, que pueden afectar a los músculos esqueléticos y/o al tejido nervioso periférico. De forma más particular se tiene como objeto las proteínas que permiten la gestión de la carga terapéutica de enfermedades que afectan a los músculos esqueléticos, denominadas “miopatías” de forma genérica.

10 De acuerdo con un aspecto particular, estas enfermedades están causadas por mutaciones en al menos un gen que comprende la no producción de la proteína o la producción de una proteína total o parcialmente no funcional. Por lo tanto, el sistema de expresión permite producir esta proteína en una forma activa y en una cantidad que permite compensar al menos parcialmente el defecto de la proteína nativa, u otra proteína capaz de compensar el defecto de la proteína nativa. La administración del sistema de expresión permite de ese modo mejorar incluso restaurar un fenotipo normal a nivel del o de los tejidos diana, en particular a nivel de los músculos esqueléticos en términos de
15 movilidad y respiración.

Una proteína que presenta un interés totalmente particular en el contexto de la presente invención es la miotubularina de origen humano (SEQ ID NO: 1), murino (SEQ ID NO: 2) o canino (SEQ ID NO: 3). Cualquier
20 secuencia que codifique estas proteínas, derivados o fragmentos funcionales a nivel terapéutico de las mismas, se puede usar por lo tanto en el contexto del sistema de expresión de acuerdo con la invención. Por lo tanto y a modo de ejemplo, las secuencias de nucleótidos correspondientes (ADNc) sonda secuencias SEQ ID NO: 4, 5 (o 14) y 6, respectivamente.

25 De manera conocida, las mutaciones en el gen *MTM1* conllevan una enfermedad muscular denominada miopatía miotubular (MTM o XLMTM). Por lo tanto y de acuerdo con la estrategia de reemplazo o de transferencia genética, la provisión en trans de una secuencia que codifica una miotubularina terapéutica, por ejemplo, nativa, Permite tratar esta patología.

30 De acuerdo con otro modo de realización, se describe que la proteína de interés es la calpaína 3 (CAPN3) en la que las mutaciones causan en particular una enfermedad genética autosómica recesiva denominada distrofia periférica de tipo 2A (LGMD 2A o calpainopatía, OMIN 253600). A modo de ejemplo, la calpaína 3 humana presenta la secuencia SEQ ID NO: 7. Por lo tanto y como se ha descrito anteriormente, cualquier secuencia que codifica una calpaína 3 terapéutica, por ejemplo, la de secuencia SEQ ID NO: 7 o un derivado o fragmento de la misma, puede
35 estar presente en un sistema de expresión tal como se ha descrito. Por ejemplo, se puede tratar de la secuencia de ADNc representada por la secuencia SEQ ID NO: 8 o los nucleótidos 307 a 2772 de la misma que corresponden al marco de lectura abierto.

40 Un listado no exhaustivo de proteínas implicadas en patologías que afectan a los músculos esqueléticos es la siguiente: Sarcoglicanos (α , β , γ , δ), Distrofina, Disferlina (DYSF), Selenoproteína 1 (SEPN1), Amffisina 2 (BIN1), dinamina 2 (DNM2), cofilina 2 (CFL2), troponina T (TNNT1), tropomiosina 3 (TPM3), ACTA1, contactina 1 (CNTN1), TRIM32, Rapsina (RASPIN), DOK7, Agrina (AGRN), COLQ, CHAT, receptores de Acetilcolina (CHRNE, CHRNA1, CHRNB1, CHRND), GFPT1, MUSK.

45 De acuerdo con un modo de realización particular, la secuencia contenida en el sistema de expresión no codifica una proteína de la familia de los sarcoglicanos, en particular el de a-sarcoglicano, de forma más precisa la secuencia que se describe en el documento Mendell *et al.*, (Annals of Neurology, Vol. 68, N.º 5, pp 629-638, 2010).

50 De acuerdo con otro modo de realización particular, la secuencia contenida en el sistema de expresión no codifica una proteína de tipo distrofina, en particular una minidistrofina, y en particular la que se describe en el documento Wang *et al.*, (Gene Therapy, Vol. 15, N.º 22, pp 1489-1499, 2008).

De forma más general se hace referencia a cualquier proteína que presente una actividad terapéutica en una enfermedad neuromuscular, por ejemplo en la que la mutación causa una enfermedad a nivel de uno o varios tejidos
55 diana, y en el caso en el que su producción a partir de un sistema de expresión presenta una toxicidad en al menos un tejido, de forma ventajosa un tejido no diana, en particular al nivel del corazón, y de manera más exhaustiva en al menos un tejido elegido entre el siguiente grupo: el corazón, el hígado, el cerebro, los pulmones, el riñón y los músculos lisos.

60 De acuerdo con la invención, el sistema de expresión debe permitir la expresión a un nivel terapéuticamente aceptable de la miotubularina en los músculos esqueléticos.

Además, debe permitir la expresión a un nivel tóxicamente aceptable de la miotubularina al nivel del corazón.

En el contexto de la presente invención, la expresión “expresión de la proteína” se puede entender como “producción de la proteína”. Por lo tanto, el sistema de expresión debe permitir a la vez la transcripción y la traducción de la proteína a los niveles que se han definido anteriormente.

5 Los niveles que se definen en el contexto de la invención, es decir “terapéuticamente aceptable” y “tóxicamente aceptable” están relacionados efectivamente con la cantidad de proteína y también con su actividad.

La evaluación de la cantidad de proteína producida en un tejido dado se puede realizar por detección inmunológica con la ayuda de un anticuerpo dirigido contra dicha proteína, por ejemplo, por transferencia de Western o ELISA.

10 Como alternativa, se puede realizar la cuantificación de los ARN mensajeros correspondientes, por ejemplo, por PCR o RT-PCR. Esta cuantificación se puede realizar en una muestra del tejido, incluso sobre varias muestras. Por lo tanto y en el caso en el que los tejidos diana son los músculos esqueléticos, se puede realizar a nivel de un tipo muscular o de varios tipos musculares (por ejemplo, cuádriceps, diafragma, tibial anterior, tríceps, ...).

15 En el contexto de la invención, por “nivel terapéuticamente aceptable”, se hace referencia al hecho de que la proteína producida a partir del sistema de expresión de acuerdo con la invención permite mejorar el estado patológico del paciente en cuestión, en particular en términos de duración de vida y calidad de vida. Por lo tanto y con respecto a una patología que afecta a los músculos esqueléticos, se trata de mejorar el estado muscular del sujeto afectado con la enfermedad, incluso restaurar un fenotipo muscular aproximado al de un sujeto sano. Como se ha mencionado anteriormente, el estado muscular, de forma ventajosa definido por la fuerza, tamaño, histología y funcionalidad de los músculos, se puede valorar con uno de los siguientes métodos: realización de biopsia, medición de la fuerza, de la tonicidad, del volumen, o de la movilidad de los músculos, examen clínico, formación de imágenes médicas, biomarcadores, ...

25 Por lo tanto, los criterios que permiten evaluar un beneficio terapéutico al nivel de los músculos esqueléticos y que se pueden evaluar en diferentes momentos después del tratamiento son en particular:

- el aumento de la esperanza de vida;
- el aumento de la fuerza muscular
- 30 - la mejora del aspecto histológico; y/o
- la mejora de la funcionalidad del diafragma.

En el contexto de la invención, por “nivel tóxicamente aceptable”, se hace referencia al hecho de que la proteína producida a partir del sistema de expresión de acuerdo con la invención no comprende alteración mayor del tejido no diana, en particular al nivel histológico, fisiológico y/o funcional. En particular, la expresión de la proteína no debe ser letal. De forma ventajosa, la cantidad de proteína producida en el tejido no diana no debe superar el nivel endógeno de dicha proteína en este tejido, en particular en comparación con un sujeto sano. Como ya se ha mencionado, la toxicidad a nivel de un tejido se puede evaluar a nivel histológico, fisiológico y funcional. En el caso particular del corazón y a modo de ilustración, la toxicidad funcional de una proteína se puede evaluar mediante el estudio de la morfología y la función cardíaca, mediante examen clínico, electrofisiología, formación de imágenes, biomarcadores, la monitorización de la esperanza de vida o mediante análisis histológicos, en particular la detección de fibrosis y/o infiltrados celulares, por ejemplo, mediante correlación con rojo Sirio o hematoxilina/eosina.

45 De manera ventajosa, el nivel de eficacia y/o de toxicidad del sistema de expresión de acuerdo con la invención se evalúa *in vivo* en el animal, de forma ventajosa incluso más ventajosa en un animal que presenta una copia defectuosa del gen que codifica la proteína y por lo tanto afectado con la patología asociada.

Preferentemente, el sistema de expresión se administra de manera sistémica, por ejemplo, mediante inyección intravenosa.

50 Se describe un sistema de expresión que comprende al menos una secuencia que permite:

- evitar la expresión o disminuir el nivel de expresión de la proteína en los tejidos no diana, en particular En aquellos en los que la expresión de la proteína es tóxica; y/o
- 55 - mantener la expresión o aumentar el nivel de expresión de la proteína en el o los tejidos diana.

Se describe un sistema de expresión que comprende al menos una secuencia que permite:

- evitar la expresión o disminuir el nivel de expresión de la proteína en los tejidos que no son los músculos esqueléticos y/o el tejido nervioso periférico, de forma ventajosa en aquellos en los que la expresión de la proteína es tóxica; y/o
- 60 - mantener la expresión o aumentar el nivel de expresión de la proteína en los músculos esqueléticos y/o el tejido nervioso periférico.

65 En el contexto de la invención, la expresión “evitar la expresión” se refiere de forma ventajosa al caso en el que, incluso en ausencia de dicha secuencia, no hay expresión, mientras que la expresión “disminuir el nivel de

expresión " se refiere al caso en el que la expresión se disminuye (o se reduce) por la contribución de dicha secuencia.

5 De manera similar, la expresión " mantener la expresión " se refiere de forma ventajosa al caso en el que, incluso en ausencia de dicha secuencia, hay expresión a un nivel comparable, mientras que la expresión " aumentar el nivel de expresión " se refiera al caso en el que hay un aumento de la expresión por la contribución de dicha secuencia.

En el contexto de la presente solicitud, se destacaron al menos tres medios, combinados opcionalmente, que permiten alcanzar el objetivo buscado:

- 10
- el uso de una secuencia capaz evitar la expresión o de reducir el nivel de expresión en la proteína en los tejidos no diana, sin reducir el nivel de expresión en el o los tejidos diana;
 - el uso de una secuencia promotora capaz de asegurar un nivel de expresión elevado en el o los tejidos diana y bajo, incluso nulo, en los tejidos no diana, en particular en aquellos en los que se demuestra que la expresión de la proteína es tóxica;
 - 15 - el uso de un vector, de forma ventajosa viral, que presenta un tropismo adecuado, en ese caso para el o los tejidos diana que para los tejidos no diana, en particular para los cuales se demuestra que la expresión de la proteína es tóxica.

20 De manera característica, un sistema de expresión de acuerdo con la invención comprende una secuencia promotora que gobierna la transcripción de la secuencia que codifica la miotubularina, de forma ventajosa colocada en la posición 5' de este transgén y que se relaciona funcionalmente con la misma. De manera característica, ésta permite asegurar un nivel de expresión terapéuticamente aceptable de la miotubularina en los músculos esqueléticos.

25 También se puede tratar de promotores naturales o sintéticos (artificiales), inducibles o constitutivos. De la misma manera, pueden ser de cualquier origen, en particular humano, del mismo origen que el transgén en presencia o de otro origen.

30 De acuerdo con un primer modo de realización, esta secuencia promotora correspondía un promotor denominado ubicuo o no selectivo, es decir, que presenta una baja especificidad tisular y que asegura un nivel de expresión globalmente similar en los diferentes tejidos, así como en los tejidos diana que no son diana. A modo de ejemplo se pueden mencionar: el promotor del citomegalovirus (pCMV), el promotor de *Mtm1*.

35 De acuerdo con un modo de realización particular, il se trata de un promotor adecuado para los músculos esqueléticos y/o para el tejido nervioso periférico pero que se puede expresar en otros tejidos, en particular en otros músculos. A modo de ejemplo se pueden mencionar: el promotor de la desmina, de forma ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 11, el promotor de la alfa-actina esquelética, de la creatina quinasa muscular (MCK), el promotor sintético C5-12, el promotor sinapsina I (Syn) o el promotor CK6. En relación a los músculos esqueléticos, también se pueden mencionar los promotores troponina, factor 5 miogénico (Myf5), rápido 1/3 de cadena Ligera de miosina (MLC1/3f), diferenciación miogénica 1 (Myod1), miogenina (Myog), gen 7 de caja emparejada (Pax7), MEF2. En relación al tejido nervioso periférico, también se pueden mencionar los promotores P0 y MBP (Proteína Básica de Mielina).

45 De acuerdo con un modo de realización ventajoso, la secuencia promotora del sistema de expresión se elige por su actividad promotora diferencial entre los tejidos diana y no diana, en el caso superior en los tejidos diana. En este caso en concreto, esta secuencia permite por lo tanto aumentar la expresión de la proteína en los tejidos diana, de forma ventajosa los músculos esqueléticos y/o el tejido nervioso periférico, siempre evitando la expresión en los tejidos no diana, en particular en los que la expresión de la proteína es tóxica.

50 A modo de ejemplo y en el caso en el que los tejidos diana son los músculos esqueléticos, el promotor es de forma ventajosa un promotor denominado específico de músculo. De acuerdo con otra característica ventajosa, dicho promotor presenta una actividad promotora baja incluso nula en los tejidos no diana, en particular en el corazón, permitiendo una expresión a un nivel tóxicamente aceptable de la proteína en estos tejidos.

55 De acuerdo con un modo de realización particular, dicha secuencia promotora puede corresponder al promotor del gen de la calpaína 3, de forma ventajosa de origen humano, incluso de forma más ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 12. Otra secuencia promotora adecuada es la del ARNmi 206 (miR206), de forma ventajosa de origen humano, incluso de forma más ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 13.

60 Por lo tanto y en el contexto de la solicitud, se mostró al menos para la calpaína 3, que un sistema de expresión que comprende la secuencia que codifica esta proteína, colocada bajo el control del promotor de la calpaína 3 o del ARNmi 206, era capaz de asegurar la expresión a un nivel terapéuticamente aceptable de la proteína en los músculos esqueléticos, y a un nivel tóxicamente aceptable de la proteína en el corazón y el hígado.

65

De acuerdo con otro aspecto, por lo tanto se describe un sistema de expresión que comprende una secuencia que codifica una proteína, colocada bajo el control de un promotor que presenta la secuencia SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13. También se hace referencia a secuencias promotoras obtenidas a partir de las secuencias SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 o que corresponden a un fragmento de las mismas pero que presentan una actividad promotora comparable, en particular en términos de especificidad tisular y opcionalmente de eficacia.

En el caso en el que esta secuencia promotora no permite la expresión a un nivel tóxicamente aceptable de la proteína en los tejidos no diana, está asociada de forma ventajosa a una secuencia que tiene como función reducir el nivel de expresión en la proteína en los tejidos no diana, de forma ventajosa en los tejidos no diana en los que se ha demostrado que expresión de la proteína es tóxica.

Por lo tanto y a modo de ejemplo, tanto en el caso de la miotubularina como en el de la calpaína 3, se mostró que el uso de un promotor de la desmina presentaba una toxicidad cardíaca. Por el contrario, y de acuerdo con la invención, el uso de un promotor de la desmina, de forma ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 11, asociada al menos una secuencia diana del ARNmi-208a, de forma ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 10, permite a la vez:

- Un nivel de expresión terapéuticamente aceptable de la proteína a nivel del tejido diana, de forma ventajosa los músculos esqueléticos;
- un nivel de expresión tóxicamente aceptable de la proteína al nivel de los tejidos no diana, de forma ventajosa el corazón, incluso el hígado.

Como ya se ha mencionado, dicha secuencia es capaz de evitar la expresión o de reducir el nivel de expresión en la proteína en los tejidos no diana, de forma ventajosa en el o los tejidos no diana en los que la expresión de la proteína es tóxica. Esta acción se puede ejercer de acuerdo con diferentes mecanismos, en particular:

- al nivel de la transcripción de la secuencia que codifica la proteína;
- a nivel de los transcritos que resultan de la transcripción de la secuencia que codifica la proteína, por ejemplo, mediante su degradación;
- al nivel de la traducción de los transcritos en la proteína.

Una secuencia de ese tipo es de forma ventajosa una diana para una molécula pequeña de ARN elegida entre el siguiente grupo:

- los microARN (" microARNs);
- pequeños ARN de interferencia endógenos (endogenous small interfering RNA o siRNAs);
- pequeños fragmentos del ARN de transferencia (ARNt);
- ARN de las regiones intergénicas;
- ARN ribosómico (ARNr);
- pequeños ARN nucleares (ARNsn);
- pequeños ARN nucleolares (ARNsno);
- ARN interactúan con las proteínas piwi (ARNpi);

De manera ventajosa, esta secuencia permite mantener la expresión, incluso aumentar el nivel de expresión de la proteína en el o los tejidos diana, de forma ventajosa en los músculos esqueléticos.

Preferentemente, una secuencia de ese tipo se elige por su eficacia en el tejido no diana en el que se considera que la expresión de la proteína es tóxica. La eficacia de esta secuencia puede ser variable en función de los tejidos, por lo tanto, puede ser necesario asociar varias de estas secuencias, elegidas por su eficacia en el conjunto de los tejidos no diana que son objeto en los que se demuestra su toxicidad.

De acuerdo con un modo de realización preferente, esta secuencia es una secuencia diana para un microARN (ARNmi). De manera conocida, una secuencia de ese tipo elegida con criterio permite reprimir la expresión genética de forma específica en tejidos seleccionados.

Por lo tanto y de acuerdo con un modo de realización particular, el sistema de expresión de acuerdo con la invención comprende una secuencia diana para un microARN (ARNmi) expresado un presente en el o los tejidos no diana en los que se demuestra que la expresión de la proteína es tóxica, por ejemplo, en el corazón. De manera adecuada, la cantidad de este ARNmi presente en el tejido diana, de forma ventajosa en los músculos esqueléticos, Es inferior a la presente en el tejido no diana, incluso si este ARNmi no se expresa en el tejido diana. De acuerdo con un modo de realización particular, el ARNmi se expresa de forma específica en el tejido no diana objeto, por ejemplo, el corazón.

De manera conocida por el experto en la materia, la presencia o el nivel de expresión, en particular en un tejido dado, de un ARNmi de interés se puede evaluar por PCR, de forma ventajosa por RT-PCR, o por transferencia Northern.

Los diferentes ARNmi Identificados en la actualidad, así como su secuencia diana y su especificidad tisular, Son conocidos por el experto en la materia y se describen por ejemplo en el documento WO 2007/000668.

De acuerdo con un modo de realización particular, el sistema de expresión de acuerdo con la invención comprende la secuencia diana del ARNmi-208a (también denominado miR208a, SEQ ID NO: 9). De forma ventajosa, esta secuencia, idéntica en el ser humano, el perro y el ratón, presenta la secuencia SEQ ID NO: 10 de 22 pb. De forma muy evidente, cualquier secuencia derivada o truncada, reconocida por el ARNmi-208a se puede usar en el contexto de la invención. Por lo tanto, en el contexto de la solicitud se mostró que el uso de esta secuencia diana, tanto con respecto a la miotubularina como la calpaína 3, permitía resolver el problema de su toxicidad cardíaca incluso hepática en el caso de la calpaína 3.

Como ya se ha mencionado, una secuencia diana para un microARN se puede usar sola o en combinación con otras secuencias, de forma ventajosa secuencias diana para un microARN, idénticas son diferentes. Esta secuencia se puede usar en tándem o en orientación inversa.

De acuerdo con un modo de realización preferente, en particular para la secuencia diana del ARNmi-208a, se puede usar una (1) o varias, en particular dos (2) o cuatro (4) secuencias. De forma ventajosa, éstas se usan en tándem, es decir, todas en la misma orientación. En el caso en el que se usa en varias secuencias diana, éstas se pueden separar mediante un espaciador de ADN de secuencia aleatoria, de manera conocida por el experto en la materia.

De manera ventajosa, en el caso de una secuencia diana de un ARNmi, en particular del miR208a, ésta se coloca en la posición 3' de la secuencia que codifica la proteína, e incluso de forma más ventajosa se inserta en la región en la posición 3' UTR (" Región Sin Traducir ") del sistema de expresión, de forma ventajosa del ADNc que codifica la proteína. Incluso de forma más ventajosa y en el caso en el que el sistema de expresión comprende una señal de poliadenilación en la posición 3' del ADNc que codifica la proteína, esta secuencia se inserta entre el codón de parada del marco de lectura abierto y la señal de poliadenilación.

En el contexto de la invención, se llevó a la conclusión de que al menos una secuencia diana del ARNmi-208a era adecuada para obtener un nivel tóxicamente aceptable de proteína al menos en el corazón, en particular con respecto a la miotubularina y la calpaína 3.

De acuerdo con un modo de realización particular, el sistema de expresión comprende:

- una secuencia que codifica la miotubularina Colocada bajo el control de un promotor, de forma ventajosa el de la desmina, incluso de forma más ventajosa el de la desmina humana (SEQ ID NO: 11);
- al menos una secuencia diana de un ARNmi expresado en el corazón, de forma ventajosa ARNmi-208a, de forma ventajosa una sola secuencia día natal como la secuencia SEQ ID NO: 10.

De acuerdo con otro modo de realización, se describe un sistema de expresión que comprende:

- una secuencia que codifica la calpaína 3 colocada bajo el control de un promotor, de forma ventajosa el de la desmina, incluso de forma más ventajosa el de la desmina humana (SEQ ID NO: 11), o el de la calpaína 3, incluso de forma más ventajosa el de la calpaína 3 humana (SEQ ID NO: 12), o el del ARNmi206, incluso de forma más ventajosa el del ARNmi206 humano (SEQ ID NO: 13);
- al menos una secuencia diana de un ARNmi expresado en el corazón, de forma ventajosa el ARNmi-208a, incluso de forma más ventajosa dos secuencias diana en tándem.

Por lo tanto, los diferentes tipos de secuencias que se han detallado anteriormente se pueden combinar en un mismo sistema de expresión.

De acuerdo con la invención, un sistema de expresión o casete de expresión comprende los elementos necesarios para la expresión del transgén presente. Además, las secuencias tal como se han definido anteriormente permiten asegurar y modular la expresión del transgén, un sistema de ese tipo puede comprender otras secuencias tales como:

- una señal de poliadenilación, por ejemplo, la poliA del SV40 o de la hemoglobina en particular humana, de forma ventajosa insertada en la posición 3' de la secuencia codificante, incluso en la posición 3' de la secuencia diana del ARNmi;
- secuencias para estabilizar los transcritos, tales como el intrón 1 de la hemoglobina en particular humana;
- secuencias de amplificación o " potenciador ";

Un sistema de expresión de acuerdo con la invención se puede introducir a tanto en una célula, un tejido o un organismo, en particular en el ser humano. De manera conocida por el experto en la materia, la introducción se puede realizar *ex vivo* o *in vivo*, por ejemplo, por transfección o transducción. De acuerdo con otro aspecto, se describe una célula o un tejido, de forma ventajosa de origen humano, que comprende un sistema de expresión de acuerdo con la invención.

5 El sistema de expresión de acuerdo con la invención, en este caso un ácido nucleico aislado, se puede administrar en el estado en un sujeto, es decir, en forma de un ADN desnudo. Para facilitar la introducción de este ácido nucleico en las células, éste se puede asociar a diferentes medios químicos tales como sistemas de dispersión coloidal (complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas) o sistemas basados en lípidos (emulsiones de aceite en agua, micelas, liposomas).

10 Como alternativa y de acuerdo con otro modo de realización preferente, el sistema de expresión de acuerdo con la invención comprende un plásmido o un vector. De manera ventajosa, un vector de ese tipo es un vector viral. Los vectores virales usados normalmente en terapia genética en los mamíferos, en particular en el ser humano, son conocidos por el experto en la materia. Los vectores virales de ese tipo se eligen de forma ventajosa entre el siguiente listado: vector obtenido a partir del virus del herpes, vector baculoviral, vector lentiviral, vector retroviral, vector adenoviral y vector viral adeno-asociado o AAV ("virus adeno-asociado").

15 De manera preferente, se trata de un vector viral adeno-asociado o AAV ("virus adeno-asociado"), que corresponde bien a serotipos naturales (AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 y AAV9), a variantes de los mismos o a serotipos artificiales. De manera conocida por el experto en la materia, también se pueden usar vectores AAV quiméricos.

20 De forma ventajosa, el sistema de expresión de acuerdo con la invención se inserta entre dos secuencias ITR ("Inverted Terminal Repeat") del vector AAV.

25 Con respecto a una administración sistémica para la cual el sistema de expresión de acuerdo con la invención adquiere todo su sentido, son particularmente preferentes los vectores AAV de serotipo 8 o 9. Por ejemplo se puede tratar de vectores AAV2/8 o AAV2/9.

De manera conocida por el experto en la materia, las partículas virales recombinantes se pueden obtener, por ejemplo, por tri-transfección de células 293 HEK o mediante el sistema de baculovirus. Las titulaciones de vector se expresan clásicamente en términos de 100 o más virales por ml (vg/ml).

30 De acuerdo con un modo de realización preferente, el sistema de expresión de acuerdo con la invención comprende un vector que presenta un tropismo adecuado, en este caso tanto para el o los tejidos diana como para los tejidos no diana, en particular aquellos en los que se ha demostrado que la expresión de la proteína es tóxica. Se puede tratar de un vector AAV que contienen a cápside seleccionada para hacer de diana/transducir poco o nada, los tejidos no diana tales como el corazón, incluso para hacer de diana/transducir de forma específica los tejidos diana, en particular los músculos esqueléticos.

40 Como se deduce a partir de lo que se ha mencionado anteriormente, los sistemas de expresión de acuerdo con la invención, en particular en forma de vectores AAV recombinantes o de partículas virales recombinantes, tienen aplicaciones evidentes, en particular en el campo terapéutico.

45 Por lo tanto y de acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere al uso del sistema de expresión que se describe como medicamento. En otros términos, también se hace referencia a una composición farmacéutica que comprende un sistema de expresión de ese tipo. De manera adecuada, ésta puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable e inerte, de forma ventajosa adecuado para una administración sistémica, por ejemplo, intravenosa. A una composición de ese tipo se pueden añadir diversos excipientes, estabilizantes, y otros compuestos adecuados conocidos por el experto en la materia.

50 La presente invención puso de manifiesto el interés del sistema de expresión que se describe en el caso en el que su administración no se realiza de manera local al nivel de los tejidos diana, sino al contrario de manera general al nivel de todo el cuerpo, llevando su administración a nivel de los tejidos no diana.

Por lo tanto y de manera ventajosa, un sistema de expresión de acuerdo con la invención se administra por una de las siguientes vías: administración enteral, parenteral, oral, intravenosa, intra-arterial y por inhalación.

55 De manera preferente, se trata de una administración sistémica, de forma ventajosa una inyección intravenosa. Se debe indicar que una administración sistémica se puede realizar en las proximidades de un sitio de tratamiento, por ejemplo, en las proximidades de un músculo esquelético.

60 De acuerdo con un modo de realización particular, no se trata de una administración loco-regional. De forma más precisa, de ese modo se puede excluir una inyección intravascular en particular intravenosa (realizada bajo presión, y en presencia de un torniquete, en las proximidades de un músculo diana), tal como se lo describe por ejemplo Petrov *et al.*, (Methods Mol Biol 2011; 709: 277-86), o intra-arterial (catéter en una arteria y hinchamiento de las venas en las proximidades así como de la arteria, torrente arriba, para evitar la difusión) tal como lo describe por ejemplo Gonin *et al.*, (J Gene Med 2005; 7: 782-791).

65

5 Cuando la composición de acuerdo con la invención se va a inyectar, ésta se presenta preferentemente en forma líquida. La concentración eficaz, en este caso el sistema de expresión de acuerdo con la invención, la cantidad que se va a inyectar y la frecuencia de las inyecciones las determina el experto en la materia. Una administración única se puede considerar suficiente. Un efecto terapéutico se busca de forma ventajosa para un periodo de duración de al menos 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 5 años o más.

10 Los medicamentos de este tipo están destinados en particular a la terapia genética, en particular para el tratamiento de las enfermedades neuromusculares e incluso de forma más particular las enfermedades que afectan esencialmente a los músculos esqueléticos (miopatías). Más generalmente, la invención permite mejorar en particular la función muscular en un sujeto.

Los pacientes a tratar son de forma ventajosa mamíferos, en particular seres humanos.

15 Una enfermedad que se tiene como objeto en particular en el contexto de la invención es la miopatía centronuclear, de forma más precisa la miopatía miotubular relacionada con el cromosoma X (XLMTM). Además, que se pueden tratar otras miopatías centronucleares y enfermedades neuromusculares asociadas a la miotubularina, tales como ciertas formas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

20 La distrofia de las cinturas de tipo 2A (LGMD2A) también se puede tratar con un sistema de expresión tal como se ha descrito.

25 De forma más general, un listado exhaustivo de las patologías que se tienen como objeto es el siguiente: distrofia muscular congénita con déficit de selenoproteína N, distrofia muscular congénita con déficit primario de merosina, distrofia muscular congénita de tipo Ullrich, distrofia muscular de Duchenne (DMD) o de Becker (BMD), miopatía congénita de núcleo central, miopatía congénita de múltiples mininúcleos, miopatías centronucleares autosómicas, miopatía con desproporción de tipos de fibras, miopatía con bastoncillos, síndromes miasténicos congénitos, otras enfermedades neuromusculares asociadas a las miotubularinas, distrofia de las cinturas de tipo 2B o 2D, miopatía distal de tipo Miyoshi, disferlinopatías, sarcoglicanopatías.

30 De acuerdo con un modo de realización particular, la patología no es la distrofia muscular de Duchenne (DMD) o de Becker (BMD), incluso la LGMD2D.

35 Por lo tanto, lo que se espera del medicamento de acuerdo con la invención es a la vez una mejora de la patología, así como de la calidad de vida y de la longevidad del paciente, a la vez que se evitan los efectos secundarios potenciales al nivel de los otros tejidos de un tratamiento de este tipo.

40 Como se va a demostrar a modo de ejemplo, la presente solicitud puso de manifiesto la posible toxicidad cardiaca de los tratamientos mediante terapia genética de las enfermedades musculares y propone soluciones técnicas que permitan superar este problema.

Ejemplos de realización

45 La invención y las ventajas que resultan de la misma se destacarán mejor a partir de los ejemplos de realización que siguen a continuación, con el apoyo de las figuras adjuntas. Sin embargo, éstos no tienen ningún alcance limitante.

La presente invención se ilustra con respecto al gen de la miotubularina (*Mtm1*) et de la calpaína 3 (*CAPN3*). Sin embargo, la estrategia que se describe se puede aplicar a cualquier transgén que codifique una proteína de interés al nivel de los músculos esqueléticos en los que se desvela una toxicidad en particular cardiaca.

50 Figura 1: Esquema de las construcciones vectoriales:

- A/ casete de expresión de *Mtm1* desprovisto de secuencias diana para el ARNm-208a;
- B/ casete de expresión que contiene 1, 2 o 4 secuencias diana para el ARNm-208a (cajas) en la posición 3' del gen *Mtm1*.

55 Figura 2: Sección transversal del corazón de un ratón XLMTM tratado con la ayuda de un vector AAV-pDES-*Mtm1*. Las zonas de fibrosis se desvelan en color rojo gracias a una coloración con rojo Sirio.

Figura 3:

- 60 - en la parte superior: distribución del vector en los músculos esqueléticos (músculo tibial anterior = TA; cuádriceps = QUA; tríceps = TRI) y en el corazón de un ratón de tipo silvestre (WT), 1 mes después de la administración intravenosa de los vectores (vg/genoma diploide).
- en la parte inferior: nivel de proteína MTM1 en los músculos esqueléticos y el corazón de un ratón de tipo silvestre (WT), 1 mes después de la administración de los vectores. Los valores indican la tasa de multiplicación con respecto a los niveles endógenos. Como controles, los ratones se inyectaron con la ayuda o bien de PBS o bien del vector AAV8 vacío (AAV-MCS).

Figura 4: Curva de supervivencia (a la izquierda) y curva de masa corporal (a la derecha) de ratón KO (“ Knock Out”) *Mtm1* inyectado con la ayuda de PBS, AAV8-Des-MCS, AAV8-Des-Mtm1 o AAV8-Des-Mtm1-miRHT1. Los ratones de tipo silvestre (WT) recibieron PBS como control.

Figura 5: Análisis de las actividades promotoras de *CAPN3* y miR-206 *in vivo*:

A/ Análisis histológico del músculo cardiaco después de inyección de PBS o de los vectores AAV2/9-desm-CAPN3 (pdes.C3), AAV2/9-pC3-CAPN3 (pC3.C3), AAV2/9-pmiR206-CAPN3 (p206.C3) y coloración con rojo Sirio (parte superior, escala = 500 μ m) o Hematoxilina Floxina Azafrán (HPS) (en la parte inferior, escala = 100 μ m).

B/ Evaluación del nivel de ADN vectorial por qPCR en el corazón de ratones de tipo silvestre WT después de inyección.

C/ Evaluación del nivel de ARNm *CAPN3* por qPCR en el corazón de ratones de tipo silvestre WT después de inyección. La línea "H" corresponde al nivel endógeno de ARNm *CAPN3* en el corazón de ratones de tipo silvestre WT.

D/ Análisis de enzimas séricas. Los ensayos de alanina aminotransferasa (ALT) se realizaron en sueros de ratones WT tratados con pC3.C3, a la izquierda o p206.C3, a la derecha. La media y el error típico de la media (ETM) para cada condición se indican con un círculo y una barra vertical, respectivamente.

Figura 6: Análisis de la actividad de miR-208aT *in vivo*:

A/ Análisis histológico del músculo cardiaco, 35 días después de inyección de PBS o de dosis idénticas de los vectores AAV2/9-desm-CAPN3 (pdes.C3) o AAV2/9-desmina-CAPN3-miR208aT (pdes.C3-T) y tinción con rojo Sirio (en la parte superior, escala = 500 μ m) o HPS (en la parte inferior, escala = tiene micrómetros).

B/ Evaluación del nivel de ADN vectorial por qPCR en el corazón de ratón WT después de inyección (en la parte superior) y del nivel de ARNm del transgén *CAPN3* (en la parte inferior). La línea "H" corresponde al nivel endógeno de ARNm *CAPN3* en el corazón de ratones de tipo silvestre WT.

C/ Análisis de la expresión de la calpaína 3 mediante transferencia de Western en el músculo esquelético y en el corazón de ratones WT inyectados con PBS o con vectores AAV2/9-desmina-CAPN3 (pdes.C3) o AAV2/9-desm-CAPN3-miR208aT (pdes.C3-T). La proteína completa se indica con una flecha y sus productos de escisión (60, 58 y 55 kDa) con un corchete.

D/ Cuantificación de los niveles de ARNm de miR-208a (miR208a), HOP (Hop) y connexina 40 (Cnx40) en el corazón de ratones WT inyectados con AAV2/9-desmina-CAPN3 (pdes.C3) o AAV2/9-desmina-CAPN3-miR208aT (pdes.C3-T). La cantidad de ARN en la condición pdes.C3-T se proporciona como porcentaje con respecto al nivel de ARN en la condición pdes.C3.

Figura 7: Análisis histológico de la eficacia de la transferencia de la calpaína 3 en los músculos esqueléticos de ratones con déficit de calpaína 3:

A/ Las secciones transversales de los músculos TA de ratones C3KO se tiñeron con HPS, 4 o bien con PBS o con vectores ($1,2 \times 10^{13}$ vg/kg) AAV2/9-desmina-CAPN3-miR208aT (pdes.C3-T), AAV2/9-pC3-CAPN3-miR208aT (pC3.C3-T), AAV2/9-pmiR206-CAPN3-miR208aT (p206.C3-T). Escala = 100 μ m.

B/ Número de fibras centronucleadas (CNF/mm²) medido en secciones teñidas con HPS en músculos TA (a la izquierda) o PSO (a la derecha) de ratones C3KO inyectados con la ayuda de PBS o de los vectores ($1,2 \times 10^{13}$ vg/kg) AAV2/9-desmina-CAPN3-miR208aT (pdes.C3-T), AAV2/9-pC3-CAPN3-miR208aT (pC3.C3-T), AAV2/9-pmiR206-CAPN3-miR208aT (p206.C3-T). Una diferencia con un valor P < 0,05 se indica con un asterisco. TA: músculo tibial anterior; PSO: músculo *Psoas*.

I) MATERIAL Y MÉTODOS

1) Generación de vectores AAV recombinantes:

El vector rAAV-Des-Mtm1 se construyó coronando el marco de lectura abierto del gen murino *Mtm1* (SEQ ID NO: 14) cadena abajo del promotor humano de la desmina (SEQ ID NO: 11) en un vector AAV de serotipo 2. Las secuencias diana (1, 2 o 4 secuencias, miRHT1, miRHT2 y miRHT4, respectivamente) del ARNm-mi-208a de 22 pb (SEQ ID NO: 10), cada una separada por espaciadores de ADN, se añadieron en la región 3'UTR del ADNc de *Mtm1*. Un vector vacío (rAAV-Des-MCS) también se generó como control. Las partículas virales recombinantes de serotipo 8 (AAV8) se obtuvieron usando un protocolo de tri-transfección de las células 293 HEK como se ha descrito anteriormente (15). Las titulaciones de vector se expresan entre menos de no más virales por ml (vg/ml).

De manera similar, el vector rAAV-desm-CAPN3 (o AAV-desmina-CAPN3 o AAV-pDes-CAPN3) se construyó usando el ADNc de la calpaína 3 humana (SEQ ID NO: 8) bajo el control del promotor humano de la desmina (SEQ ID NO: 11). Los vectores rAAV-pC3-CAPN3 y rAAV-pmiR206-CAPN3 se obtuvieron sustituyendo este promotor por la región promotora de la calpaína 3 humana (SEQ ID NO: 12) o la del ARNm206 (SEQ ID NO: 13), respectivamente. Los vectores AAV-desm-CAPN3-miR208aT, AAV-pC3-CAPN3-miR208aT y AAV-pmiR206-CAPN3-miR208aT se obtuvieron añadiendo 2 secuencias diana para el ARNm208a (SEQ ID NO: 9) en tándem (miR208aT),

en la posición 3' del gen de la calpaína 3. Se produjeron partículas virales recombinantes de serotipo 1 (AAV1), 8 (AAV8) y/o 9 (AAV9).

2) Experimentos *in vivo*:

Los ratones se trataron de acuerdo con las legislaciones Francesa y Europea con respecto a la experimentación animal. En este estudio, se usaron ratones de tipo silvestre WT C57B1/6 (Laboratoires Charles River) y una línea de ratón inactivada de manera constitutiva para la miotubularina (desactivación genética) KO-*Mtm1*, también denominada BS53d4-129pas. Para la calpaína 3, se usó el modelo murino C3KO, descrito por Laure *et al.*, (Febs J., 2010, 277: 4322-4337).

Los vectores recombinantes, a las dosis indicadas, se inyectaron en la arena de la cola de los ratones tal como se ha indicado (edades de 3 semanas a 2 meses). Como control se administró un volumen equivalente de tampón salino (PBS). La situación clínica y el peso de los animales se siguieron cada semana para los animales WT y tres veces a la semana para los ratones mutantes. Los ratones se sacrificaron en los momentos indicados.

3) Transferencia de Western:

Los músculos congelados en isopentano se cortaron en secciones transversales de 30 µm y se sometieron a lisis en hielo en un tampón que contenía NaCl 150 mM, Tris HCl 10 mM (pH 7,4), EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, fluoruro de sodio 100 mM, pirofosfato de sodio 4 mM, ortovanadato de sodio 2 mM, Triton X100 al 1 %, e IGEPAL al 0,5 % suplementado con un cóctel completo de inhibidores de proteasas (Roche). Los extractos musculares se incubaron 1 h y se centrifugaron a 4 °C a 12.000 x g durante 30 min. Las concentraciones de proteínas en el sobrenadante se determinaron con la ayuda del kit Bio-Rad "kit de ensayo de proteína". Las proteínas se sometieron a una migración en SDS-PAGE y, después de transferencias sobre una membrana de nitrocelulosa, se incubaron con anticuerpos policlonales dirigidos contra la miotubularina (p2348 [15]) y GAPDH (N.º MAB374, Millipore). Las bandas proteicas se visualizaron mediante fluorescencia de infrarrojos usando el sistema "Odyssey Imaging System" (LICOR Biotechnology Inc.) y se cuantificaron con la ayuda del programa "Odyssey Infrared Imaging System Software" (Application software, versión 1.2, 2003).

Para la detección de la calpaína 3, se usó un protocolo similar: Los músculos se homogeneizaron mediante FastPrep usando el siguiente tampón de lisis [Tris 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EGTA 2 mM, un 0,1 % de Triton X-100, E64 2 µM (Sigma)] e inhibidores de proteasas (cóctel completo de inhibidor de proteasa mini; Roche Applied Sciences; 25 µl por mg de tejido). Las muestras de ensayo se trataron con 250 U/100 µl de Benzona (Calbiochem) durante 30 min a 4 °C para digerir el ADN. Los elementos de lisado muscular se mezclaron con el tampón de carga [NuPage LDS (Invitrogen), TNT 3M (Sigma)], seres naturalizaron durante 10 minutos a 70 °C y se centrifugaron brevemente. Los sobrenadantes se separaron mediante gel de poliacrilamida NuPAGE Bis-Tris en gradiente de un 4-12 % (Invitrogen). Después de la transferencia, las membranas se hibridaron con anticuerpos contra la calpaína 3 (anticuerpo monoclonal de ratón, Novocastra NCL-CALP-12A2, dilución a 1/200), a 4 °C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Por último, las membranas se incubaron con IRDye ® para su revelación en el escáner de infrarrojos Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA).

4) PCR:

4-1- Miotubularina:

El aislamiento del ADN a partir de músculos se realizó usando el kit "Gentra Puregene Tissue Kit" (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se determinó usando un espectrofotómetro Nanodrop ND-8000 (Nanodrop Technologies, Francia), y se usaron 80 ng de ADN para cada muestra de ensayo como matriz para la PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real Taqman se realizó sobre cada muestra de ensayo para a la vez una parte del esqueleto común para el vector rAAV2/X para determinar las copias del genoma viral, y del gen murino de la titina, para estandarizar el número de gen o masculinos presentes en cada muestra de ensayo. Los cebadores usados para la amplificación de los vectores rAAV fueron: 5'- CTCCATCACTAGGGGTTCCCTTG -3' (directo; SEQ ID NO: 15), 5'-GTAGATAAGTAGCATGGC -3' (inverso; SEQ ID NO: 16). Las sondas MGB se marcaron de manera doble (FAM-NFQ): 5'- TAGTTAATGATTAACCC -3' (sonda; SEQ ID NO: 17). Los cebadores y una sonda usados para la titina fueron: 5'-AAAACGAGCAGTGACGTGAGC-3' (directo; SEQ ID NO: 18), 5'-TTCAGTCATGCTAGCGC-3' (inverso; SEQ ID NO: 19), y 5'-TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC-3' (sonda; SEQ ID NO: 20) (Applied Biosystem). La amplificación es de la titina se realizaron usando 80 ng de ADN diluido en una mezcla "Absolute QPCR ROX Mix" (Thermo Fischer scientific), 0,1 µM de sondas Taqman y 0,2 µM de cebadores (directo e inverso), en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de los ciclos consistieron en: una etapa de activación de la ADN Polimerasa Thermo-Start a 95 °C durante 15 min, seguido por 40 ciclos de 2 etapas, 15 s de desnaturalización a 95 °C y 60 s de hibridación y de extensión a 60 °C. Las aplicaciones de los rAAV se realizaron usando 0,1 µM de sondas Taqman, 0,3 µM de cebador inverso y 0,5 µM de cebador directo en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de los ciclos consistieron en: una etapa de activación de la ADN Polimerasa Thermo-Start a 95 °C durante 15 min, seguido por 40 ciclos de 2 etapas, 15 s de desnaturalización a 95 °C y 60 s de hibridación y de extensión a 54 °C. La PCR se realizó sobre un termociclador 7900 HT (Applied Biosystem). Una gama de dilución

estándar de un plásmido que contenía las secuencias de un esqueleto de rAAV y de la titina se usó sobre cada placa de PCR en tiempo real como control de número de copias. Todas las muestras de ensayo y los controles se duplicaron. Los datos se expresan el número de copias del genoma viral por genoma diploide.

5 4-2- Calpaína 3:

Los músculos se extrajeron con la ayuda del método Trizol (Invitrogen). En el transcurso de la extracción, una fracción de la muestra de ensayos y conservó para extracción de ADN en vista de la cuantificación por PCR cuantitativa. El ARN total se extrajo del extractor residual tratado con el kit "ADN-free" (Ambion) para eliminar el ADN residual.

Para la cuantificación de la expresión de los microARN endógenos, 20 ng de ARN total se sometieron a una transcripción inversa usando el kit "microARN TaqMan transcription inverse" (Applied Biosystems) y se analizaron con el ensayo Taqman microARN ID511 para miR-208a (Applied Biosystems). La normalización de las masas de ensayo se realizó con la expresión de snoRNA202 con el ensayo ID1232 (Applied Biosystems).

Para la amplificación de los ARNm de la calpaína 3 endógena o transgénica, un µg de ARN se transcribió mediante transcripción inversa usando hexámeros aleatorios y oligodT y el kit Verso ADNc (Abgene) o el kit "RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis" (Fermentas). La PCR en tiempo real se realizó con el método TaqMan® usando el sistema ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) y la solución "Absolute QPCR Rox Mix" (ABgene) con la ayuda de los siguientes pares de cebadores (.f et .r) y la sonda Taqman (.p): para la cuantificación de la calpaína transgénica: CAPN3sfr.f (SEQ ID NO: 21) 5' CGCCTCCAAGGCCCGT_3'; CAPN3sfr.r (SEQ ID NO: 22) 5' GGCGGAAGCGCTGGCT_3'; MGBTUCAPN3.p (SEQ ID NO: 23) 5' CTACATCAACATGAGAGAGGT_3; para la cuantificación de la calpaína humana: CAPN3.f (SEQ ID NO: 24) 5' CGCCTCCAAGGCCAGG_3', CAPN3.r (SEQ ID NO: 25) 5' GGCGGAAGCGCTGGGA_3 y CAPN3.p (SEQ ID NO: 26) 5' TACATCAACATGCGGGAGGT_3. Una dilución en serie de un ARN de control se usó en cada experimento y se trató con las muestras de ensayos experimentales para rodear la variabilidad de la eficacia de la preparación de ADNc y de la PCR con el fin de estar en condiciones de comparar los diferentes experimentos. Este ARN ase preparó mediante una reacción de transcripción *in vitro* a partir de un plásmido portador de una calpaína 3 ADNc mutada y amplificable con todos los pares de cebadores.

El análisis de la expresión de la connexina 40 y HOP se realizó usando los siguientes ensayos TaqMan® Gene Expression (Applied Biosystems): para Cnx40; Gja-5 [*Mus musculus*]: Mm00433619_s1 y hop: HOP homeobox [*Mus musculus*]: Mm00558630_m1. Los resultados de qRT-PCR se expresan en unidades arbitrarias con respecto a la expresión del gen murino ubicuo ácido fosfoproteína ribosómica (P0 GI: 15029771; MH181PO.F (SEQ ID NO: 27): 5' CTCCAAGCAGATGCAGCAGA_3' / M267PO.R (SEQ ID NO: 28): 5' ACCATGATGCGCAAGGCTAT_3' / M225PO.p (SEQ ID NO: 29): 5' CCGTGGTGCTGATGGGCAAGAA_3').

40 5) Histología:

Las criosecciones transversales (8 µm de grosor) de los músculos cardíaco, hepático o esqueléticos se tiñeron con la ayuda de hematoxilina y eosina (HE), rojo Sirio o Hematoxilina Floxina Azafrán (HFS) usando protocolos convencionales.

45 Las secciones se montaron con el medio Eukitt (LABONORD). Las imágenes digitales se capturaron con la ayuda de una cámara CCD (Sony). Los análisis morfométricos de los músculos esqueléticos para definir los números de fibras centronucleadas (CNF/mm²) se realizaron con la ayuda del software Histolab (Microvision, Evry).

50 6) Medición de la actividad de ALT:

Se tomaron muestras de sangresin coagulante. Después de centrifugación (8000g, 10 min, 4 °C), los sueros se analizaron con la ayuda del dispositivo VITROS DT60 (Ortho Clinical Diagnostics, Reino Unido) con la ayuda de los casetes "Vitros ALT DT slides" para la determinación de la tasa de alanina aminotransferasa (ALT).

55 II) RESULTADOS

A - MIOTUBULARINA

60 1) Toxicidad cardíaca de la construcción AAV-pDES-Mtm1:

A partir del documento de Buj-Bello *et al.*, [15] se conocía el efecto beneficioso de una inyección intramuscular única del gen de la miotubularina (Mtm1) colocado bajo el control del promotor de CMV en un vector AAV2/1.

65 Un enfoque de terapia genética por vía sistémica en ratones KO ("Desactivación Genética") *Mtm1* se intentó y mostró que la administración de un vector AAV8 (rAAV-Des-Mtm1) de expresa la miotubularina bajo el control del promotor humano de la desmina (Fig. 1A) en un ratón mutante tenía éxito para un periodo de vida prolongado de al

menos 6 meses, una mejora notable de la patología en los músculos estriados en todo el cuerpo incluyendo el diafragma, y una actividad motora normalizada (los resultados no se muestran).

5 Sin embargo, después de una administración sistémica del vector AAV8-DES-Mtm1 en ratones KO *Mtm1*, se observó que el nivel de proteína miotubularina era muy elevado en el corazón en comparación con los músculos esqueléticos (los resultados no se muestran). Además, se observó la presencia de infiltrados inflamatorios y de fibrosis en el corazón de los ratones XLMTM tratados con la ayuda de AAV en diferentes momentos después de la inyección viral (Figura 2).

10 2) Desarrollos de sistemas de expresión sin toxicidad cardiaca

En vista de la dificultad para predecir la biodistribución y la expresión del transgén a partir de un vector AAV8 después de administración sistémica, en particular en el ser humano, se desarrollaron nuevos vectores que portaban secuencias reguladoras que aumentan la especificidad muscular, para evitar los efectos secundarios potenciales a nivel cardíaco.

15 Se desarrollaron tres construcciones virales (rAAV-Des-*Mtm1*-miRHT1; rAAV-Des-*Mtm1*-miRHT2 y rAAV-Des-*Mtm1*-miRHT4), tal como se muestran en la Figura 1B, que comprenden respectivamente 1, 2 o 4 secuencias diana para el ARNmi-208a. Esta secuencia presenta la secuencia SEQ ID NO: 10 y está constituida por 22 pares de bases. De manera notable, esta secuencia está conservada en el ser humano, el perro y el ratón.

20 3) Producción muscular y cardiaca de MTM1 después de inyección en un ratón WT

25 Con el objeto de seleccionar el vector de expresión más adecuado para MTM1, una dosis única de 3×10^{13} genomas virales (vg)/kg de estos vectores se administró en la vena de la cola del ratón de tipo silvestre (WT para "tipo silvestre") con edades de 3 semanas. Un vector vacío (AAV-Des-MCS) y PBS ("Solución Salina Tamponada con Fosfato") se usaron como controles internos.

30 La distribución vectorial y el nivel proteico de miotubularina en el corazón y en diferentes músculos esqueléticos (Tibial anterior = TA; cuádriceps = QUA; tríceps = TRI) se evaluaron 1 mes después de la inyección. Los resultados mediante transferencia de Western demuestran que todos estos vectores son capaces de disminuir el nivel de miotubularina producida a partir de los vectores de manera específica en el corazón. Además, una sola secuencia diana del ARNmi208a es suficiente para reducir la expresión en este tejido (Figura 3 y Tabla 1).

35 Tabla 1: Cuantificación semicuantitativa de la proteína MTM1 al nivel de los músculos esqueléticos y al nivel del corazón, 1 meses después de la liberación del vector en un rato WT.

		PBS	Mtm1	miRHT1	miRHT2	miRHT4
Músculos esqueléticos	TA	1	50	70	100	30
	QUA	1	45	45	50	15
	TRI	1	20	17	30	10
Corazón		1	> 90	1,6	1,1	0,7

4) Validación de la construcción vectorial después de inyección en un ratón mutado *Mtm1*

40 Sobre la base de los resultados precedentes, la construcción rAAV-Des-*Mtm1*-miRHT1 se seleccionó para la continuación de los experimentos. Los ratones de tipo silvestre (WT para "tipo silvestre") y con mutación en el gen *Mtm1* (KO para "Knock Out") recibieron 3×10^{13} vg/kg de AAV-Des-*Mtm1*, rAAV-Des-*Mtm1*-miRHT1 y rAAV-Des-MCS, respectivamente, o PBS a la edad de 3 semanas, y se siguieron a nivel clínico durante 1 mes.

45 Todos los ratones mutantes que recibieron AAV8-Des-*Mtm1*-miRHT1 sobrevivieron hasta el final del estudio, con una curva de crecimiento similar a la de los ratones KO tratados con la ayuda de AAV8-Des-*Mtm1*, lo que indica que la inclusión de la secuencia miRHT1 no influyen la eficacia terapéutica del transgén (Fig. 4).

50 La histología del corazón de los ratones WT y KO se analizó 1 mes después del tratamiento, mediante tinción con hematoxilina-eosina y con rojo Sirio. Se conservaron regiones de fibrosis en el corazón de 7 ratones KO de 9 tratados con AAV8-Des-*Mtm1*, pero no en los ratones KO tratados con AAV8-Des-*Mtm1*-miRHT1 (n = 10). La administración del vector AAV8-Des-*Mtm1* no comprendió fibrosis en los animales WT 1 mes después de la inyección (n = 8).

En conclusión, estos resultados indican que la inclusión de una sola secuencia diana de ARNmi208a es suficiente para reducir la toxicidad cardíaca de una construcción AAV8-Des-*Mtm1*.

Se realizaron experimentos similares con respecto a la calpaína 3 (CAPN3):

B - CALPAÍNA 3 (sin tener en cuenta la invención)

A partir del documento Bartoli *et al.*, (Molecular Therapy, 2006, Vol. 13, N.º 2, 250-259) se conocía el efecto beneficioso y la no toxicidad de construcciones de tipo AAV portadoras del gen de la calpaína 3 colocado bajo el control de promotores denominados específicos de músculo, después de administración intramuscular o local. Sin embargo, los experimentos realizados en el contexto de la invención desvelaron la toxicidad de las construcciones de este tipo después de administración sistémica:

1) Toxicidad cardíaca de las construcciones AAV-desm-CAPN3:

La transformación de los ratones WT se siguió, después de la inyección intravenosa de diferentes construcciones, y se presenta en la tabla 2 que sigue a continuación:

Tabla 2: Consecuencias de las inyecciones intravenosas de diferentes AAV a diferentes dosis

Serotipo	Dosis (vg/kg)	Número de muertes	Aspecto histológico del corazón a los 35 días
AAV9	4,0 x 10 ¹¹	0/3	fibrosis
"	1,0 x 10 ¹²	0/9	fibrosis
"	1,6 x 10 ¹³	5/7	fibrosis
"	4,3 x 10 ¹³	2/6	fibrosis
AAV8	7,0 x 10 ¹²	2/4	fibrosis
AAV1	1,6 x 10 ¹³	0/3	fibrosis

Para todos los AAV sometidos a ensayo, se observa una destrucción del tejido cardíaco en caso de administración sistémica, excluyendo el uso de objeto terapéutico de estos sistemas de expresión genética.

2) Reducción de la toxicidad cardíaca de las construcciones AAV-desm-CAPN3 o reemplazo del promotor:

Dos vectores se construyeron intercambiando el promotor de la desmina por el de CAPN3 (AAV2/9-pC3-CAPN3) o miR-206 (AAV2/9-pmiR206-CAPN3). Después de la preparación viral de los vectores, las consecuencias *in vivo* de las modificaciones introducidas por inyección intravenosa (6 x 10¹² vg/kg) se analizaron en ratones C57BL/6 (WT) con edades de 2 meses.

35 días después de la inyección, no se observó ninguna fibrosis cardíaca en los ratones tratados con los vectores AAV2/9-pC3-CAPN3 y AAV2/9-pmiR206-CAPN3, a diferencia de los ratones inyectados con AAV2/9-desm-CAPN3 (Fig. 5A), a pesar de un nivel de transducción similar (Fig. 5B). El nivel de la ARNm del transgén CAPN3 en el corazón de ratones tratados con AAV2/9-desm-CAPN3 era aproximadamente 15 veces más elevado que el nivel endógeno (Fig. 5C), mientras que permanece más bajo para los ratones tratados con AAV2/9-pC3-CAPN3 y AAV2/9-pmiR206-CAPN3 (un 13 % y un 30 %, respectivamente, Fig. 5C), lo que correlaciona el efecto perjudicial de estos dos últimos vectores.

Además, se verificó que estos dos promotores no presentaban toxicidad hepática midiendo durante 5 semanas el nivel de actividad de alanina aminotransferasa (ALT) en ratones WT que habían recibido una inyección de 10¹³ vg/kg. No se observó ningún aumento de actividad enzimática en los animales inyectados con respecto a los inyectados con PBS (Fig. 5D).

En conclusión, los promotores CAPN3 y miR-206 reducen la toxicidad cardíaca del transgén CAPN3, sin producir toxicidad hepática.

3) Reducción de la toxicidad cardíaca de las construcciones AAV-desm-CAPN3 por adición de dos secuencias diana de miR208a:

Dos secuencias diana de ARNmi208a (SEQ ID NO: 10) se clonaron en tándem en un casete miR208aT. A continuación, éste se introdujo en la región 3'UTR de la construcción AAV2/9-desm-CAPN3, para proporcionar la construcción AAV2/9-desm-CAPN3-miR208aT.

Después de inyección de una dosis de 6×10^{12} vg/kg, no se observó ninguna fibrosis cardiaca en los ratones tratados, a diferencia de los ratones inyectados con AAV2/9-desm-CAPN3 (Fig. 6A), a pesar de un nivel de transducción similar y un nivel de ARNm 5 veces más elevado con respecto al nivel endógeno de la calpaína 3 en el corazón (Fig. 6B). Al nivel proteico, la calpaína 3 no se expresa normalmente al nivel del miocardio y no se detecta (Fig. 6C). En los ratones WT inyectados con AAV2/9-desm-CAPN3, la proteína completa no se detecta, pero los fragmentos que resultan de su escisión (60, 58 y 55 kDa) si se detectan (Fig. 6C). Por el contrario, no se observa ni la proteína completa, ni fragmentos de escisión en el corazón de ratón WT inyectados con AAV2/9-desm-CAPN3-miR208aT (Fig. 6C), lo que indica una regulación a nivel de traducción (Fig. 6D).

En conclusión, estos resultados muestran que miR208aT es capaz de reducir la toxicidad cardiaca del transgén CAPN3.

4) Combinación de las dos estrategias:

Se construyeron nuevos vectores asociando los promotores CAPN3 y miR-206 y 2 copias de la secuencia diana de miR-208a: AAV2/9-pC3-CAPN3-miR208aT y AAV2/9-pmiR206-CAPN3-miR208aT. Los ratones C3KO (desactivación genética para la calpaína 3) recibieron una inyección de $1,2 \times 10^{13}$ vg/kg de estos vectores.

Como se observó anteriormente en ratones silvestres, ninguno de los 3 vectores (AAV2/9-desm-CAPN3-miR208aT, AAV2/9-pC3-CAPN3-miR208aT y AAV2/9-pmiR206-CAPN3-miR208aT) resultó ser tóxico para el corazón, 3 meses después de la inyección (los resultados no se muestran).

Por el contrario, un examen histológico y morfológico de los músculos esqueléticos de ratones C3KO con una edad de 4 semanas y a los que se les inyectó con ayuda de estos vectores desveló un efecto positivo de la expresión de la calpaína 3 en los signos patológicos del modelo murino. Los músculos del tibial anterior (TA) inyectados con la ayuda de estos vectores mostraron características histológicas mejoradas con respecto a los inyectados con PBS (Fig. 7A). Un análisis morfométrico de secciones de músculos de TA coloreados con HPS desveló una disminución significativa de las fibras centronucleadas (CNF) en los músculos inyectados con la ayuda del vector (Fig. 9B a la izquierda). Con los músculos PSO (músculo ilio-*psoas*) se obtuvieron resultados similares e incluso si la disminución observada con AAV2/9-pC3-CAPN3-miR208aT y AAV2/9-pmiR206-CAPN3-miR208aT no era estadísticamente significativa.

En conclusión, estos resultados indican que la expresión de la calpaína 3 en los músculos esqueléticos transducidos con la ayuda de estos vectores recombinantes puede corregir los signos patológicos de un ratón con déficit de calpaína 3, sin presentar toxicidad cardiaca.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jungbluth H, Wallgren-Pettersson C, Laporte J (2008) Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis* 3: 26.
2. Wallgren-Pettersson C, Clarke A, Samson F, Fardeau M, Dubowitz V, *et al.*, (1995) The myotubular myopathies: differential diagnosis of the X linked recessive, autosomal dominant, and autosomal recessive forms and present state of DNA studies. *J Med Genet* 32: 673-679.
3. Herman G, Finegold M, Zhao W, de Gouyon B, Metznerberg A (1999) Medical complications in longterm survivors with X-linked myotubular myopathy. *J Pediatr* 134: 206-214.
4. Bevilacqua J, Bitoun M, Biancalana V, Oldfors A, Stoltenburg G, *et al.*, (2009) "Necklace" fibers, a new histological marker of late-onset MTM1-related centronuclear myopathy. *Acta Neuropathol* 117: 283-291.
5. Fardeau M (1992) Congenital myopathies. En: Detchant MFLWo, editor. *Skeletal muscle pathology*. Edinburgh: Churchill Livingstone. pp. 1488-1531.
6. Laporte J, Hu LJ, Kretz C, Mandel JL, Kioschis P, *et al.*, (1996) A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet* 13: 175-182.
7. Dowling JJ, Vreede AP, Low SE, Gibbs EM, Kuwada JY, *et al.*, (2009) Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet* 5:e1000372.
8. Buj-Bello A, Laugel V, Messaddeq N, Zahreddine H, Laporte J, *et al.*, (2002) The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15060-15065.
9. Pierson CR, Dulin-Smith AN, Durban AN, Marshall ML, Marshall JT, *et al.*, (2012) Modeling the human MTM1 p.R69C mutation in murine Mtm1 results in exon 4 skipping and a less severe myotubular myopathy phenotype. *Hum Mol Genet* 21: 811-825.
10. Beggs AH, Bohm J, Snead E, Kozlowski M, Maurer M, *et al.*, (2010) MTM1 mutation associated with X-linked myotubular myopathy in Labrador Retrievers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14697-14702.
11. Al-Qusairi L, Weiss N, Toussaint A, Berbey C, Messaddeq N, *et al.*, (2009) T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 18763-18768.

12. Hnia K, Tronchere H, Tomczak KK, Amoasii L, Schultz P, *et al.*, (2011) Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *J Clin Invest* 121: 70-85.

5 13. Dowling JJ, Joubert R, Low SE, Durban AN, Messaddeq N, *et al.*, (2012) Myotubular myopathy and the neuromuscular junction: a novel therapeutic approach from mouse models. *Dis Model Mech*.

14. Lawlor MW, Alexander MS, Viola MG, Meng H, Joubert R, *et al.*, (2012) Myotubularin-deficient myoblasts display increased apoptosis, delayed proliferation, and poor cell engraftment. *Am J Pathol* 181: advanced online.

10 15. Buj-Bello A, Fougereousse F, Schwab Y, Messaddeq N, Spehner D, *et al.*, (2008) AAV-mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis. *Hum Mol Genet* 17: 2132-2143.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> GENETHON CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> SISTEMA DE EXPRESIÓN PARA UNA TERAPIA GENÉTICA SELECTIVA

<130> G143-B-33520 PCT

20 <150> FR 13.53306

<151> 11-04-2013

<160> 29

25 <170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 603

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> N.º de Registro NCBI: NP_000243.1

35 <400> 1

ES 2 698 571 T3

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

Glu Leu Phe Phe Leu Asp Ile His Asn Ile His Val Met Arg Glu Ser
 305 310 315 320
 Leu Lys Lys Val Lys Asp Ile Val Tyr Pro Asn Val Glu Glu Ser His
 325 330 335
 Trp Leu Ser Ser Leu Glu Ser Thr His Trp Leu Glu His Ile Lys Leu
 340 345 350
 Val Leu Thr Gly Ala Ile Gln Val Ala Asp Lys Val Ser Ser Gly Lys
 355 360 365
 Ser Ser Val Leu Val His Cys Ser Asp Gly Trp Asp Arg Thr Ala Gln
 370 375 380
 Leu Thr Ser Leu Ala Met Leu Met Leu Asp Ser Phe Tyr Arg Ser Ile
 385 390 395 400
 Glu Gly Phe Glu Ile Leu Val Gln Lys Glu Trp Ile Ser Phe Gly His
 405 410 415
 Lys Phe Ala Ser Arg Ile Gly His Gly Asp Lys Asn His Thr Asp Ala
 420 425 430
 Asp Arg Ser Pro Ile Phe Leu Gln Phe Ile Asp Cys Val Trp Gln Met
 435 440 445
 Ser Lys Gln Phe Pro Thr Ala Phe Glu Phe Asn Glu Gln Phe Leu Ile
 450 455 460
 Ile Ile Leu Asp His Leu Tyr Ser Cys Arg Phe Gly Thr Phe Leu Phe
 465 470 475 480
 Asn Cys Glu Ser Ala Arg Glu Arg Gln Lys Val Thr Glu Arg Thr Val
 485 490 495
 Ser Leu Trp Ser Leu Ile Asn Ser Asn Lys Glu Lys Phe Lys Asn Pro
 500 505 510
 Phe Tyr Thr Lys Glu Ile Asn Arg Val Leu Tyr Pro Val Ala Ser Met
 515 520 525
 Arg His Leu Glu Leu Trp Val Asn Tyr Tyr Ile Arg Trp Asn Pro Arg
 530 535 540
 Ile Lys Gln Gln Gln Pro Asn Pro Val Glu Gln Arg Tyr Met Glu Leu
 545 550 555 560
 Leu Ala Leu Arg Asp Glu Tyr Ile Lys Arg Leu Glu Glu Leu Gln Leu
 565 570 575
 Ala Asn Ser Ala Lys Leu Ser Asp Pro Pro Thr Ser Pro Ser Ser Pro
 580 585 590
 Ser Gln Met Met Pro His Val Gln Thr His Phe
 595 600

<210> 2
 <211> 603
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<220>
 <223> N.º de Registro NCBI: AAC77821.1

10

<400> 2

ES 2 698 571 T3

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

	115					120					125				
Ser	Arg	Arg	Asp	Met	Phe	Glu	Ile	Leu	Val	Lys	His	Ala	Phe	Pro	Leu
	130					135					140				
Ala	His	Asn	Leu	Pro	Leu	Phe	Ala	Phe	Val	Asn	Glu	Glu	Lys	Phe	Asn
145					150					155					160
Val	Asp	Gly	Trp	Thr	Val	Tyr	Asn	Pro	Val	Glu	Glu	Tyr	Arg	Arg	Gln
				165					170						175
Gly	Leu	Pro	Asn	His	His	Trp	Arg	Ile	Ser	Phe	Ile	Asn	Lys	Cys	Tyr
			180					185				190			
Glu	Leu	Cys	Glu	Thr	Tyr	Pro	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Pro	Tyr	Arg	Thr
	195					200						205			
Ser	Asp	Asp	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Ala	Thr	Phe	Arg	Ser	Arg	Asn	Arg
	210					215					220				
Leu	Pro	Val	Leu	Ser	Trp	Ile	His	Pro	Glu	Asn	Lys	Met	Val	Ile	Met
225					230					235					240
Arg	Cys	Ser	Gln	Pro	Leu	Val	Gly	Met	Ser	Gly	Lys	Arg	Asn	Lys	Asp
			245						250					255	
Asp	Glu	Lys	Tyr	Leu	Asp	Val	Ile	Arg	Glu	Thr	Asn	Lys	Gln	Thr	Ser
			260					265					270		
Lys	Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Ala	Arg	Pro	Ser	Val	Asn	Ala	Val	Ala	Asn
	275					280						285			
Lys	Ala	Thr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Glu	Ser	Asp	Asp	Ala	Tyr	Gln	Asn	Ser
	290					295					300				
Glu	Leu	Ser	Phe	Leu	Asp	Ile	His	Asn	Ile	His	Val	Met	Arg	Glu	Ser
305					310					315					320
Leu	Lys	Lys	Val	Lys	Asp	Ile	Val	Tyr	Pro	Asn	Ile	Glu	Glu	Ser	His
			325						330					335	
Trp	Leu	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Thr	His	Trp	Leu	Glu	His	Ile	Lys	Leu
			340					345					350		
Val	Leu	Thr	Gly	Ala	Ile	Gln	Val	Ala	Asp	Gln	Val	Ser	Ser	Gly	Lys
	355					360						365			
Ser	Ser	Val	Leu	Val	His	Cys	Ser	Asp	Gly	Trp	Asp	Arg	Thr	Ala	Gln
	370					375					380				
Leu	Thr	Ser	Leu	Ala	Met	Leu	Met	Leu	Asp	Ser	Phe	Tyr	Arg	Thr	Ile
385					390					395					400
Glu	Gly	Phe	Glu	Ile	Leu	Val	Gln	Lys	Glu	Trp	Ile	Ser	Phe	Gly	His
			405						410					415	
Lys	Phe	Ala	Ser	Arg	Ile	Gly	His	Gly	Asp	Lys	Asn	His	Ala	Asp	Ala
	420					425						430			
Asp	Arg	Ser	Pro	Ile	Phe	Leu	Gln	Phe	Ile	Asp	Cys	Val	Trp	Gln	Met
	435					440						445			
Ser	Lys	Gln	Phe	Pro	Thr	Ala	Phe	Glu	Phe	Asn	Glu	Gly	Phe	Leu	Ile
	450					455					460				
Thr	Val	Leu	Asp	His	Leu	Tyr	Ser	Cys	Arg	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Phe
465					470					475					480
Asn	Cys	Asp	Ser	Ala	Arg	Glu	Arg	Gln	Lys	Leu	Thr	Glu	Arg	Thr	Val
			485						490					495	
Ser	Leu	Trp	Ser	Leu	Ile	Asn	Ser	Asn	Lys	Asp	Lys	Phe	Lys	Asn	Pro
	500							505				510			
Phe	Tyr	Thr	Lys	Glu	Ile	Asn	Arg	Val	Leu	Tyr	Pro	Val	Ala	Ser	Met
	515					520						525			
Arg	His	Leu	Glu	Leu	Trp	Val	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Arg	Trp	Asn	Pro	Arg
	530					535					540				
Val	Lys	Gln	Gln	Gln	Pro	Asn	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Tyr	Met	Glu	Leu
545					550					555					560
Leu	Ala	Leu	Arg	Asp	Asp	Tyr	Ile	Lys	Arg	Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Leu
			565						570					575	
Ala	Asn	Ser	Ala	Lys	Leu	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser
	580							585					590		
Ser	Gln	Met	Val	Pro	His	Val	Gln	Thr	His	Phe					
	595						600								

5

<210> 3
<211> 603
<212> PRT
<213> *Canis lupus*

<220>
<223> N.º de Registro NCBI : XP_855209.1

<400> 3

Met Ala Ser Ala Pro Thr Ser Lys Tyr Asn Ser His Ser Leu Glu Asn
 1 5 10 15
 Glu Ser Ile Lys Arg Thr Ser Arg Asp Gly Val Asn Trp Asp Leu Ser
 20 25 30
 Glu Ala Val Pro Arg Leu Pro Gly Glu Thr Arg Ile Thr Asp Lys Glu
 35 40 45
 Val Ile Tyr Ile Cys Pro Phe Asn Gly Pro Ile Lys Gly Arg Val Tyr
 50 55 60
 Ile Thr Asn Tyr Arg Leu Tyr Leu Arg Ser Leu Glu Thr Asp Ser Ala
 65 70 75 80
 Leu Ile Leu Asp Val Pro Leu Gly Val Ile Ser Arg Ile Glu Lys Met
 85 90 95
 Gly Gly Ala Thr Ser Arg Gly Glu Asn Ser Tyr Gly Leu Asp Ile Thr
 100 105 110
 Cys Lys Asp Met Arg Asn Leu Arg Phe Ala Leu Lys Gln Glu Gly His
 115 120 125
 Ser Arg Arg Asp Met Phe Glu Ile Leu Thr Arg Tyr Ala Phe Pro Leu
 130 135 140
 Ala His Ser Leu Pro Ile Phe Ala Phe Leu Asn Glu Glu Lys Phe Asn
 145 150 155 160
 Val Asp Gly Trp Thr Val Tyr Asn Pro Val Glu Glu Tyr Arg Arg Gln
 165 170 175
 Gly Leu Pro Asn His His Trp Arg Ile Thr Phe Ile Asn Lys Cys Tyr
 180 185 190
 Glu Leu Cys Asp Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Val Val Pro Tyr Arg Ala
 195 200 205
 Ser Asp Asp Asp Leu Arg Arg Val Ala Thr Phe Arg Ser Arg Asn Arg
 210 215 220
 Ile Pro Val Leu Ser Trp Ile His Pro Glu Asn Lys Thr Val Ile Val
 225 230 235 240
 Arg Cys Ser Gln Pro Leu Val Gly Met Ser Gly Lys Arg Asn Lys Asp
 245 250 255
 Asp Glu Lys Tyr Leu Asp Val Ile Arg Glu Thr Asn Arg Gln Ile Ser
 260 265 270
 Lys Leu Thr Ile Tyr Asp Ala Arg Pro Asn Val Asn Ala Val Ala Asn
 275 280 285
 Lys Ala Thr Gly Gly Gly Tyr Glu Ser Asp Asp Ala Tyr His Asn Ala
 290 295 300
 Glu Leu Phe Phe Leu Asp Ile His Asn Ile His Val Met Arg Glu Ser
 305 310 315 320
 Leu Lys Lys Val Lys Asp Ile Val Tyr Pro Asn Val Glu Glu Ser His
 325 330 335
 Trp Leu Ser Ser Leu Glu Ser Thr His Trp Leu Glu His Ile Lys Leu
 340 345 350
 Val Leu Thr Gly Ala Ile Gln Val Ala Asp Arg Val Ser Ser Gly Lys
 355 360 365
 Ser Ser Val Leu Val His Cys Ser Asp Gly Trp Asp Arg Thr Ala Gln
 370 375 380
 Leu Thr Ser Leu Ala Met Leu Met Leu Asp Ser Phe Tyr Arg Ser Ile
 385 390 395 400
 Glu Gly Phe Glu Ile Leu Val Gln Lys Glu Trp Ile Ser Phe Gly His
 405 410 415
 Lys Phe Ala Ser Arg Ile Gly His Gly Asp Lys Asn His Ala Asp Ala
 420 425 430
 Asp Arg Ser Pro Ile Phe Leu Gln Phe Ile Asp Cys Val Trp Gln Met

ES 2 698 571 T3

	435		440		445														
Ser	Lys	Gln	Phe	Pro	Thr	Ala	Phe	Glu	Phe	Asn	Glu	Arg	Phe	Leu	Ile				
	450					455					460								
Thr	Ile	Leu	Asp	His	Leu	Tyr	Ser	Cys	Arg	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Tyr				
465					470					475					480				
Asn	Cys	Glu	Ser	Ala	Arg	Glu	Lys	Gln	Lys	Val	Thr	Glu	Arg	Thr	Val				
				485						490				495					
Ser	Leu	Trp	Ser	Leu	Ile	Asn	Ser	Asn	Lys	Asp	Lys	Phe	Lys	Asn	Pro				
			500					505					510						
Phe	Tyr	Thr	Lys	Glu	Ile	Asn	Arg	Val	Leu	Tyr	Pro	Val	Ala	Ser	Met				
		515					520					525							
Arg	His	Leu	Glu	Leu	Trp	Val	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Arg	Trp	Asn	Pro	Arg				
	530					535					540								
Ile	Lys	Gln	Gln	Gln	Pro	Asn	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Tyr	Val	Glu	Leu				
545					550					555					560				
Leu	Ala	Leu	Arg	Asp	Glu	Tyr	Ile	Gln	Arg	Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Leu				
				565					570					575					
Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Leu	Pro	Asp	Pro	Ser	Thr	Ser	Pro	Ala	Gly	Pro				
			580				585						590						
Ser	Gln	Met	Met	Pro	His	Val	Arg	Thr	His	Phe									
	595						600												

<210> 4

<211> 3452

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..3452

<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="N.º de Registro NCBI : NM_000252.2" /organismo="*Homo sapiens*"

<400> 4

agagggggcg	gagcagggcc	cggcagccga	gcagcctggc	aacggcggtg	gcgcccggag	60
cccgagagtt	tccaggatgg	cttctgcatc	aacttctaaa	tataattcac	actccttggg	120
gaatgagtct	attaagagga	cgtctcgaga	tggagtcaat	cgagatctca	ctgaggctgt	180
tcctcgactt	ccaggagaaa	cactaatcac	tgacaaagaa	gttatttaca	tatgtccttt	240
caatggcccc	attaagggaa	gagtttacet	cacaaattat	cgtctttatt	taagaagttt	300
ggaaacggat	tcttctctaa	tacttgatgt	tcctctgggt	gtgatctcga	gaattgaaaa	360
aatgggaggc	gcgacaagta	gaggagaaaa	ttcctatggg	ctagatatta	cttgtaaaga	420
catgagaaac	ctgaggttcg	ctttgaaaca	ggaaggccac	agcagaagag	atatgtttga	480
gatcctcacg	agatacgcgt	ttcccctggc	tcacagtctg	ccattatttg	cattttttaa	540
tgaagaaaag	tttaacgtgg	atggatggac	agtttacaat	ccagtgggaag	aatacaggag	600
gcagggcttg	cccaatcacc	attggagaat	aacttttatt	aataagtgtc	atgagctctg	660
tgacacttac	cctgctcttt	tggtgggtcc	gtatcgtgcc	tcagatgatg	acctccggag	720
agttgcaact	tttaggtccc	gaaatcgaat	tccagtctct	tcattggattc	atccagaaaa	780
taagacggtc	attgtgcggt	gcagtcagcc	tcttgtcggg	atgagtggga	aacgaaataa	840

ES 2 698 571 T3

agatgatgag aaatatctcg atgttatcag ggagactaat aaacaaattt ctaaactcac 900
 catttatgat gcaagaccca gcgtaaatgc agtggccaac aaggcaacag gaggaggata 960
 tgaaagtgat gatgcatatc ataacgccga acttttcttc ttagacattc ataatattca 1020
 tgttatgcyg gaatctttaa aaaaagttaa ggacattggt taccctaag tagaagaatc 1080
 tcattggtg tccagtttg agtctactca ttggttagaa catatcaagc tcgttttgac 1140
 aggagccatt caagtagcag acaaagtttc ttcaggaag agttcagtgc ttgtgcattg 1200
 cagtgcagga tgggacagga ctgctcagct gacatccttg gccatgctga tgttggatag 1260
 cttctatagg agcattgaag ggttcgaaat actggtacaa aaagaatgga taagttttgg 1320
 acataaattt gcatctcgaa taggtcatgg tgataaaaac cacaccgatg ctgaccgttc 1380
 tcctattttt ctccagttta ttgattgtgt gtggcaaatg tcaaaacagt tccctacagc 1440
 ttttgaattc aatgaacaat ttttgattat aattttggat catctgtata gttgccgatt 1500
 tggtaactttc ttattcaact gtgaatctgc tcgagaaaga cagaaggta cagaaaggac 1560
 tgtttcttta tggctactga taaacagtaa taaagaaaaa ttcaaaaacc ccttctatac 1620
 taaagaaatc aatcgagttt tatatccagt tgccagtatg cgtcacttgg aactctgggt 1680
 gaattactac attagatgga accccaggat caagcaacaa cagccgaatc cagtggagca 1740
 gcgttacatg gagctcttag ccttacgcga cgaatacata aagcggcttg aggaactgca 1800
 gctgcaccaac tctgccaagc tttctgatcc cccaacttca ccttccagtc cttcgcaaat 1860
 gatgccccat gtgcaaaactc acttctgagg ggggaccctg gcaaccgatt agagctcgaa 1920
 ataaaggcga tagctgactt tcatttgggg catttgtaaa aagtagatta aaatatttgc 1980
 ctccatgtag aacttgaact aacataatct taaactcttg aatatgtgcc ttctagaata 2040
 catattacaa gaaaactaca gggccacac ggcaatcaga agaaaggagc tgagatgagg 2100
 ttttgaaaa ccctgacacc tttaaaaagc agtttttgaa agacaaaatt tagatttaat 2160
 ttacgtcttg agaaatacta tatatacaat atatattttg tgggcttaat tgaacaaca 2220
 ttattttaa atcaaagggg atatatgttt gtggaatgga ttttctgaa gctgcttaac 2280
 agttgctttg gattctctaa gatgaatcca aatgtgaaag atgcatgta ctgccaaaac 2340
 caaattgagc tcagcttctt aggcattacc caaaagcaag gtgtttaagt aattgccagc 2400
 ttttatacca tcatgagtgg tgacttaagg agaaatagct gtatagatga gtttttcatt 2460
 atttgaaat ttagggtag aaaatgtttt ccctaatth tccagagaag cctattttta 2520
 tatttttaa aaactgacag ggcccagtta aatatgattt gcatttttta aatttgccag 2580
 ttttattttc taaattcttt catgagcttg cctaaaattc ggaatggttt tcgggttgty 2640
 gcaaacccca aagagagcac tgtccaagga tgtcgggagc atcctgctgc ttaggggaat 2700
 gttttcgcaa atgttgcctt agtcagttca gctcatctgc caaaatgtag ggtaccgtc 2760

ES 2 698 571 T3

ttggatgcat gagctattgc tagagcatca tccttagaaa tcagtgcgcc agatgtacat 2820
 gtgttgagcg tattcttgaa agtatttgtt ttatgcattt caatttcaat ggtgttggt 2880
 tcccctcccc accccacgcg tgcataaaaa ctggttctac aaatttttac ttgaagtacc 2940
 aggccgtttg ctttttcagg ttgttttgtt ttatagtatt aagtgaaatt ttaaattgcac 3000
 agttctattt gctatctgaa ctaattcatt tattaagtat atttgtaaaa gctaaggctc 3060
 gagttaaacc aatgaagtgt tttacaatga tttgtaaagg actatttata actaatatgg 3120
 ttttgttttc aatgaattaa gaaagattaa atatatcttt gtaaattatt ttatgtcata 3180
 gtttaattgg tctaccaagt aagacatctc aaatacagta gtataatgta tgaattttgt 3240
 aagtataaga aattttatta gacattctct tactttttgt aaatgctgta aatatttcat 3300
 aaattaacaa agtgtcactc cataaaaaga aagctaatac taatagccta aaagattttg 3360
 tgaaatttca tgaaaacttt ttaatggcaa taatgactaa agacctgctg taataaatgt 3420
 attaactgaa acctaaaaaa aaaaaaaaaa aa 3452

5 <210> 5
 <211> 3339
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..3339
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="N.º de Registro NCBI : AF_073996" /organismo="*Mus musculus*"

<400> 5
 cggtgagttc gctttcttgg ctgacctggc tcggagccgg gcattgcggg gatccaggat 60
 tggaaaggtt ccaggatggc ttctgcatca gcatctaagt ataattcaca ctccctggag 120
 aatgaatcca ttaagaaagt gtctcaagat ggagtcagtc aggatgtgag tgagactgtc 180
 cctcggtctc caggggagtt actaattact gaaaaagaag ttatttacct atgtcctttc 240
 aatggcccca ttaaggaag agtttacatc acaaattatc gtctttattt aagaagtttg 300
 gaaacggatt ctgctotaat acttgatgtt cctctgggtg tgatatcaag aattgaatat 360
 atgggagcg cgactagtag aggagaaaat tcctatggtc tagatattac ttgtaaagat 420
 ttgagaaacc tgaggtttgc attgaagcaa gaaggccaca gcagaagaga tatgtttgag 480
 atccttgtaa aacatgcctt tcctctggca cacaatctgc cattatttgc atttgtaaat 540
 gaagagaagt ttaacgtgga tgggtggact gtttataatc cagttgaaga atatagaagg 600
 cagggcctgc ccaatcacca ttggaggata agttttatta acaagtgcta tgagctctgt 660
 gagacatacc ctgctotttt ggtggttccc tatcggacct cagatgatga tcttaggagg 720

ES 2 698 571 T3

atcgcaacgt ttagatcccg aaatcggctt cctgtactgt cgtggattca cccagaaaac	780
aaaatggtca ttatgcgctg cagtcagcct cttgtcggta tgagtggtaa aagaaataaa	840
gatgacgaga aatacctgga tgtgatcagg gaaactaaca aacaaacttc taagctcatg	900
atztatgatg cagcaccag tgtaaatgca gtcgccaaca aggcaacagg aggaggatat	960
gaaagtgatg acgcatatca aaactcagaa ctttccttct tagacattca taatattcat	1020
gttatgcgag aatctttaa aaaagtgaaa gatattgttt atcccaacat agaagaatct	1080
cattggttgt ccagtttga gtctactcat tggttagaac atatcaagct tgttctgacc	1140
ggtgccattc aagtggcaga ccaagtgtct tcaggaaaga gctcgg tact tgtgcaactgc	1200
agtgacggat gggacaggac cgctcagctg acatccttgg ccatgctgat gttggacagc	1260
ttctacagaa ctattgaagg ctttgagata ttggtacaga aagagtggat aagttttggc	1320
cataaatttg catctagaat aggtcatggt gataaaaacc atgctgatgc tgatcgatct	1380
cctatTTTTc ttcagtttat tgactgtgtg tggcagatgt cgaaacagtt cccacagct	1440
tttgagttca atgaaggctt tttgattacc gttttggatc atctgtatag ctgtcgattt	1500
ggtactttct tattcaactg tgactcggct cgagaaagac agaaacttac agaaagaaca	1560
gtttctctat ggtcgctaataacagcaat aaagacaaat tcaaaaacc cttctataca	1620
aaagaaatca atcgggtttt gtatccagtt gccagcatgc gtcacttga actgtgggtg	1680
aattattaca tccgatggaa tcccagggtc aagcagcaac agcccaacc agtggagcag	1740
cgttacatgg agcttttggc cttgcgtgac gattatataa agaggctcga ggaattgcag	1800
ctggccaact ccgccaagct tgctgatgcc ccgcttcga cttccagttc gtcacagatg	1860
gtgccccatg tgcagacgca cttctgagg gactcacttc tggcactgca cttgaactct	1920
agataagtga aatagctgac tctcattctg ggcatgtgga caaagtagat ttaaagtgtc	1980
tgctccatt tagaagttca actaacatct tagacttttg agtatgtgcc ttctgtaata	2040
catatcacia gaaatcgatg gtgtccgtgt ggcaatcata aggaaggagt caagaggggg	2100
ttctgaaaa tctcatact ttttttaca aagcactttt gcaaagataa aacttaaatt	2160
taatttacct ctatataaat tctacatata cagtatgtat tttgtgggct taattgaaat	2220
attatTTTaa atccaggggg gagatttgtt tgcaaaatgt attttctcc agctgcttat	2280
aacagttgct ttggattatc taaaattaat ccaaagtga aagatgggta ttactgccaa	2340
agccaaattg cactctgctt cttcagcaaa ttccaagagc aaggcgttta aataattgcc	2400
aatttttatt ttaccataag tggttaaggta aaaagaaaga tgaacatttc atcattttga	2460
atTTTtGaaa ataaaaggtt ctccatcat ttttcaagag aagcacattt ttatattaag	2520
aaaaagtgat aaggtttgat tttttttcc ctcaacattc tcagctttgc tttctaaatt	2580
atcccatgat ttttgtctaa cactgagtca tactcaggtt gaaggaaacc cataaatagc	2640

actgtgcgag gagctggctg gcttctgctg cttagaggaa tatgttcgca aacatgcctc 2700
 tagtcaattc gccttatctg ctgaagtgtg ggggcaccgc cttgaatgga tgagctatgg 2760
 ctagagcatc tttctttaca gtaatgcccc aggtgtattc tgtttatgtc tctctgttta 2820
 aatgggtgtgc gtgcataaaa acttgctctg cacattatta cttgaagtac tgggcaattt 2880
 gctttttcag gtttttttc attttgttt gtagtatgaa atggaatttt aaatgcacag 2940
 ttctatttga tatccgaact aattcattta gtaaataat ttgtaaaagc taaagttaa 3000
 tcaattaatg ttttacagtg atttgtaaag gattatttat agctaataatg gttttgtttt 3060
 cagtgaatta agagagatta catttatctt tgtaaattat tttatgtcat agcttaatgg 3120
 cctaccaaat gagacatctc aaatataata gtataatgta tggattttgt aagtataaaa 3180
 attattagat attcgtttgc tttttgtaa cactgtaaat atttcataaa ttaaaatgtg 3240
 tcactccata agaagaaaa actaatacta atagttgaca ggaattggtg aaatttcag 3300
 aaaatatttt cattgcaata aatattaaaa gacctgctg 3339

5 <210> 6
 <211> 1841
 <212> ADN
 <213> *Canis lupus*

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..1841
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="N.º de Registro NCBI : XM_850116" /organismo="*Canis lupus*"

<400> 6
 cgggtggcgcc cggaccccca gtttccagta tggcttctgc accaacttct aaatataatt 60
 cacactcctt ggagaacgag tctattaaga ggacttctag ggatggagtt aattgggacc 120
 tgagtgaggc tgttcctcga cttccaggag aaactcgtat cactgacaaa gaagtatttt 180
 acatatgtcc tttcaatggc cccattaagg gaagagttaa catcacaaat tctcgtcttt 240
 atttaagaag tttggaaacg gattctgctc taataactga tgttcctctg ggtgtgatct 300
 ccagaattga aaaaatggga ggcgcgacaa gtagaggaga aaattcgtat ggtctagata 360
 ttacttgtaa agacatgagg aacttgaggt tgcgcctgaa acaggaaggc cacagcagga 420
 gggatatgtt tgagatcctc acaagatacg cctttccctt ggcccacagt ctgccaatat 480
 ttgcatctt aaacgaagaa aagttaaacg tggatgggtg gacagtttat aatccagtcg 540
 aagaatacag aaggcagggc ttgcccaatc accactggag aataactttt atcaacaagt 600
 gctatgagct ctgtgacact tctcctgctc tottggtggt tccatatacgt gcctcagatg 660
 acgatctcag gagagttgca acttttagat ccagaaatcg aattccagtg ctgtcatgga 720

ES 2 698 571 T3

```

ttcatccaga aaacaagacg gtcattgtgc gctgcagcca gcctcttgtc ggaatgagtg      780
gtaaaccgaa taaagatgat gagaagtatc tcgatgttat cagggagact aacagacaaa      840
tttctaaact cacaatctat gatgccagac ccaatgtaa tgccgtggcc aacaaggcaa      900
caggaggagg atatgaaagt gatgatgcat atcataacgc cgaacttttc ttcttagaca     960
ttcataacat tcatgttatg cgggaatcct taaaaaagt caaagacatc gtttatccta    1020
atgtggaaga gtctcactgg ctgtccagtt tggagtctac ccattgggta gaacatatca    1080
agcttgtttt gacgggagcc attcaagtag cagacagagt ttcttcaggg aagagctcag    1140
tgctcgtgca ctgcagcgat ggatgggaca ggactgccc a gctgacgtcc ttggccatgc    1200
tgatgctoga cagcttctat cggagcatcg agggctttga aatattggta caaaaggaat    1260
ggataagttt tggacataag tttgcatcta gaataggtca tggtgataaa aaccacgccg    1320
acgctgaccg gtctcctatt tttctccagt ttattgattg tgtatggcaa atgtcaaaac    1380
agttccctac agcttttgaa ttcaatgaac gatttttgat tacaattttg gatcatctgt    1440
atagttgccg gtttggtacc ttcttgata actgtgaatc tgctcgggaa aacagaaaag    1500
tgacggaacg aacagtatct ttatggtcac tgataaacag taataaggac aaattcaaaa    1560
atcccttcta tactaaagaa atcaatcgag ttttatatcc agttgccagt atgcgtcact    1620
tggaactttg ggtgaattac tacattagat ggaaccccag gatcaagcaa caacagccca    1680
accagtgga gcagcggtag gtggagctgt tggccttgcg tgacgaatac atacagcggc    1740
tcgaggagct gcagctcgcc agctcggcca agctgcccga cccctcgacc tcaccggccg    1800
ggccctogca gatgatgccg cacgtgcgca cacacttctg a                          1841

```

<210> 7
 <211> 821
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> N.º de Registro NCBI: NP_000061.1

10

<400> 7

```

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

```

		115					120					125			
Cys	Trp	Phe	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Cys	Leu	Thr	Leu	Asn	Gln	His	Leu
	130						135					140			
Leu	Phe	Arg	Val	Ile	Pro	His	Asp	Gln	Ser	Phe	Ile	Glu	Asn	Tyr	Ala
145					150					155					160
Gly	Ile	Phe	His	Phe	Gln	Phe	Trp	Arg	Tyr	Gly	Glu	Trp	Val	Asp	Val
				165					170					175	
Val	Ile	Asp	Asp	Cys	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	Gln	Leu	Val	Phe	Thr
			180					185					190		
Lys	Ser	Asn	His	Arg	Asn	Glu	Phe	Trp	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu	Lys	Ala
		195					200					205			
Tyr	Ala	Lys	Leu	His	Gly	Ser	Tyr	Glu	Ala	Leu	Lys	Gly	Gly	Asn	Thr
	210					215					220				
Thr	Glu	Ala	Met	Glu	Asp	Phe	Thr	Gly	Gly	Val	Ala	Glu	Phe	Phe	Glu
225					230					235					240
Ile	Arg	Asp	Ala	Pro	Ser	Asp	Met	Tyr	Lys	Ile	Met	Lys	Lys	Ala	Ile
			245						250					255	
Glu	Arg	Gly	Ser	Leu	Met	Gly	Cys	Ser	Ile	Asp	Asp	Gly	Thr	Asn	Met
			260					265					270		
Thr	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	Ser	Gly	Leu	Asn	Met	Gly	Glu	Leu	Ile	Ala
		275					280					285			
Arg	Met	Val	Arg	Asn	Met	Asp	Asn	Ser	Leu	Leu	Gln	Asp	Ser	Asp	Leu
	290					295					300				
Asp	Pro	Arg	Gly	Ser	Asp	Glu	Arg	Pro	Thr	Arg	Thr	Ile	Ile	Pro	Val
305					310					315					320
Gln	Tyr	Glu	Thr	Arg	Met	Ala	Cys	Gly	Leu	Val	Arg	Gly	His	Ala	Tyr
				325					330					335	
Ser	Val	Thr	Gly	Leu	Asp	Glu	Val	Pro	Phe	Lys	Gly	Glu	Lys	Val	Lys
			340					345					350		
Leu	Val	Arg	Leu	Arg	Asn	Pro	Trp	Gly	Gln	Val	Glu	Trp	Asn	Gly	Ser
			355				360					365			
Trp	Ser	Asp	Arg	Trp	Lys	Asp	Trp	Ser	Phe	Val	Asp	Lys	Asp	Glu	Lys
	370					375					380				
Ala	Arg	Leu	Gln	His	Gln	Val	Thr	Glu	Asp	Gly	Glu	Phe	Trp	Met	Ser
385					390					395					400
Tyr	Glu	Asp	Phe	Ile	Tyr	His	Phe	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Cys	Asn	Leu
			405						410					415	
Thr	Ala	Asp	Ala	Leu	Gln	Ser	Asp	Lys	Leu	Gln	Thr	Trp	Thr	Val	Ser
			420					425					430		
Val	Asn	Glu	Gly	Arg	Trp	Val	Arg	Gly	Cys	Ser	Ala	Gly	Gly	Cys	Arg
		435					440					445			
Asn	Phe	Pro	Asp	Thr	Phe	Trp	Thr	Asn	Pro	Gln	Tyr	Arg	Leu	Lys	Leu
	450					455					460				
Leu	Glu	Glu	Asp	Asp	Asp	Pro	Asp	Asp	Ser	Glu	Val	Ile	Cys	Ser	Phe
465					470					475					480
Leu	Val	Ala	Leu	Met	Gln	Lys	Asn	Arg	Arg	Lys	Asp	Arg	Lys	Leu	Gly
				485					490					495	
Ala	Ser	Leu	Phe	Thr	Ile	Gly	Phe	Ala	Ile	Tyr	Glu	Val	Pro	Lys	Glu
			500					505					510		
Met	His	Gly	Asn	Lys	Gln	His	Leu	Gln	Lys	Asp	Phe	Phe	Leu	Tyr	Asn
		515					520					525			
Ala	Ser	Lys	Ala	Arg	Ser	Lys	Thr	Tyr	Ile	Asn	Met	Arg	Glu	Val	Ser
		530				535					540				
Gln	Arg	Phe	Arg	Leu	Pro	Pro	Ser	Glu	Tyr	Val	Ile	Val	Pro	Ser	Thr
545					550					555					560
Tyr	Glu	Pro	His	Gln	Glu	Gly	Glu	Phe	Ile	Leu	Arg	Val	Phe	Ser	Glu
				565					570					575	
Lys	Arg	Asn	Leu	Ser	Glu	Glu	Val	Glu	Asn	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Arg
			580					585					590		
Pro	Val	Lys	Lys	Lys	Lys	Thr	Lys	Pro	Ile	Ile	Phe	Val	Ser	Asp	Arg
		595					600					605			
Ala	Asn	Ser	Asn	Lys	Glu	Leu	Gly	Val	Asp	Gln	Glu	Ser	Glu	Glu	Gly
	610						615						620		

ES 2 698 571 T3

Lys Gly Lys Thr Ser Pro Asp Lys Gln Lys Gln Ser Pro Gln Pro Gln
 625 630 635 640
 Pro Gly Ser Ser Asp Gln Glu Ser Glu Glu Gln Gln Gln Phe Arg Asn
 645 650 655
 Ile Phe Lys Gln Ile Ala Gly Asp Asp Met Glu Ile Cys Ala Asp Glu
 660 665 670
 Leu Lys Lys Val Leu Asn Thr Val Val Asn Lys His Lys Asp Leu Lys
 675 680 685
 Thr His Gly Phe Thr Leu Glu Ser Cys Arg Ser Met Ile Ala Leu Met
 690 695 700
 Asp Thr Asp Gly Ser Gly Lys Leu Asn Leu Gln Glu Phe His His Leu
 705 710 715 720
 Trp Asn Lys Ile Lys Ala Trp Gln Lys Ile Phe Lys His Tyr Asp Thr
 725 730 735
 Asp Gln Ser Gly Thr Ile Asn Ser Tyr Glu Met Arg Asn Ala Val Asn
 740 745 750
 Asp Ala Gly Phe His Leu Asn Asn Gln Leu Tyr Asp Ile Ile Thr Met
 755 760 765
 Arg Tyr Ala Asp Lys His Met Asn Ile Asp Phe Asp Ser Phe Ile Cys
 770 775 780
 Cys Phe Val Arg Leu Glu Gly Met Phe Arg Ala Phe His Ala Phe Asp
 785 790 795 800
 Lys Asp Gly Asp Gly Ile Ile Lys Leu Asn Val Leu Glu Trp Leu Gln
 805 810 815
 Leu Thr Met Tyr Ala
 820

<210> 8

<211> 3316

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> fuente

<222> 1..3316

<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="N.º de Registro NCBI: NM_000070 " /organismo="*Homo sapiens*"

<400> 8

cactctcttt ctctctcoct ctggcatgca tgctgctggt aggagacccc caagtcaaca 60
ttgcttcaga aatccttttag cactcatttc tcaggagaac ttatggcttc agaetcacag 120
ctcggttttt aagatggaca taacctgtac gaccttctga tgggctttca actttgaact 180
ggatgtggac actttttctct cagatgacag aataactcca acttcccctt tgcagttgct 240
tcctttcctt gaaggtagct gtatcttatt ttctttaaaa agctttttct tccaaagcca 300
cttgccatgc cgaccgtcat tagcgcacct gtggctccaa ggacagcggc tgagccccgg 360
tcoccagggc cagttcctca cccggcccag agcaaggcca ctgaggctgg ggggtggaac 420
ccaagtggca tctattcagc catcatcagc cgcaattttc ctattatcgg agtgaagag 480
aagacattcg agcaacttca caagaaatgt ctagaaaaga aagttcttta tgtggaccct 540
gagttcccac cggatgagac ctctctcttt tatagccaga agttcccctt ccagttcgtc 600
tggaagagac ctccggaaat ttgcgagaat ccccgattta tcattgatgg agccaacaga 660
actgacatct gtcaaggaga gctaggggac tgctggtttc tcgcagccat tgctgctctg 720

ES 2 698 571 T3

accctgaacc agcaccttct tttccgagtc ataccccatg atcaaagttt catcgaaaac 780
 tacgcagggg tcttccactt ccagttctgg cgctatggag agtgggtgga cgtgggtata 840
 gatgactgcc tgccaacgta caacaatcaa ctggttttca ccaagtccaa ccaccgcaat 900
 gagttctgga gtgctctgct ggagaaggct tatgctaagc tccatggttc ctacgaagct 960
 ctgaaaggtg ggaacacccac agaggccatg gaggacttca caggaggggt ggcagagttt 1020
 tttgagatca gggatgctcc tagtgacatg tacaagatca tgaagaaagc catcgagaga 1080
 ggctccctca tgggctgctc cattgatgat ggcacgaaca tgacctatgg aacctctcct 1140
 tctggctctga acatggggga gttgattgca cggatggtaa ggaatatgga taactcactg 1200
 ctccaggact cagacctcga ccccagaggc tcagatgaaa gaccgaccog gacaatcatt 1260
 ccggttcagt atgagacaag aatggcctgc gggctggta gaggtcacgc ctactctgtc 1320
 accgggctgg atgaggtccc gttcaaagggt gagaaagtga agctgggtcg gctgcggaat 1380
 ccgtggggcc aggtggagtg gaacggttct tggagtgata gatggaagga ctggagcttt 1440
 gtggacaaaag atgagaaggc ccgtctgcag caccaggtca ctgaggatgg agagttctgg 1500
 atgtcctatg aggatttcat ctaccattc acaaagttgg agatctgcaa cctcacggcc 1560
 gatgctctgc agtctgacaa gcttcagacc tggacagtgt ctgtgaacga gggccgctgg 1620
 gtaccggggt gctctgccgg aggctgccgc aacttcccag atactttctg gaccaaccct 1680
 cagtaccgtc tgaagctcct ggaggaggac gatgaccctg atgactcgga ggtgatttgc 1740
 agcttcctgg tggccctgat gcagaagaac cggcggaaag accggaagct aggggcccagt 1800
 ctcttcacca ttggcttgcg catctacgag gttcccaaag agatgcacgg gaacaagcag 1860
 cacctgcaga aggacttctt cctgtacaac gcctccaag ccaggagcaa aacctacatc 1920
 aacatgqggg aggtgtccca gcgcttccgc ctgcctcca gcgagtacgt catcgtgcc 1980
 tccacctacg agccccacca ggagggggaa ttcatcctcc gggcttctc tgaaaagagy 2040
 aacctctctg aggaagtga aaataccatc tccgtggatc ggccagtga aaagaaaaa 2100
 accaagccca tcatcttctg ttccgacaga gcaaacagca acaaggagct ggggtgtggac 2160
 caggagtacg aggagggcaa aggcaaaaca agccctgata agcaaaagca gtccccacag 2220
 ccacagcctg gcagctctga tcaggaaagt gaggaacagc aacaattccg gaacattttc 2280
 aagcagatag caggagatga catggagatc tgtgcagatg agctcaagaa ggtccttaac 2340
 acagtctgta acaaacacaa ggacctgaag acacacgggt tcacactgga gtctctgccg 2400
 agcatgattg cgctcatgga tacagatggc tctggaaagc tcaacctgca ggagttccac 2460
 cacctctgga acaagattaa ggctggcag aaaattttca aacactatga cacagaccag 2520
 tccggcacca tcaacagcta cgagatgcga aatgcagtca acgacgcagg attccacctc 2580

ES 2 698 571 T3

aacaaccagc tctatgacat cattaccatg cggtagcgag acaaacacat gaacatcgac 2640
tttgacagtt tcatctgctg cttcgttagg ctggagggca tgttcagagc ttttcatgca 2700
tttgacaagg atggagatgg tatcatcaag ctcaacgttc tggagtggct gcagctcacc 2760
atgtatgcct gaaccaggct ggccctcatcc aaagccatgc aggatcactc aggatttcag 2820
tttcaaccctc tatttcocaaa gccatttacc tcaaaggacc cagcagctac acccctacag 2880
gcttcacaggc acctcatcag tcatgctcct cctccatfff accccctacc catccttgat 2940
cggtcatgcc tagcctgacc ctttagtaaa gcaatgaggt aggaagaaca aacccttgtc 3000
cctttgccat gtggaggaaa gtgcctgcct ctggtccgag ccgcctcggg tctgaagcga 3060
gtgctcctgc ttaccttgct ctaggctgtc tgcagaagca cctgccggtg gcactcagca 3120
cctccttgct ctagagccct ccacacactt cacgctgtcc caccatgggc caggaaccaa 3180
accagcactg ggttctactg ctgtggggta aactaactca gtggaatagg gctggttact 3240
ttgggtgctc caactcataa gtttggctgc attttgaaaa aagctgatct aaataaaggc 3300
atgtgtatgg ctggtc 3316

5 <210> 9
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

 10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="otro ARN" /nota="N.º de Registro: MIMT0000241" /organismo="*Homo sapiens*"

 15 <400> 9
 auaagacgag caaaaagcuu gu 22

 20 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /organismo="*Homo sapiens*"

 30 <400> 10
 acaagcttt tgctcgtctt at 22

 35 <210> 11
 <211> 1050
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..1050
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="Promotor de Desmina" /organismo="*Homo sapiens*"

 <400> 11

ES 2 698 571 T3

cccccacagc tcctctcctg tgccttgttt cccagccatg cgttctcctc tataaatacc 60
 cgctctggta tttgggggtg gcagctgttg ctgccaggga gatggttggg ttgacatgcg 120
 gctcctgaca aaacacaaac ccctgggtgtg tgtgggcgtg ggtggtgtga gtagggggat 180
 gaatcagggg gggggcgggg gaccagggg gcaggagcca cacaaagtct gtgcgggggt 240
 gggagcgcac atagcaattg gaaactgaaa gcttatcaga ccctttctgg aaatcagccc 300
 actgtttata aacttgaggc cccaccctcg acagtaccgg ggaggaagag ggcctgcaact 360
 agtccagagg gaaactgagg ctcagggcca gctcgcccat agacatacat ggcaggcagg 420
 ctttggccag gatccctccg cctgccaggc gtctccctgc cctcccttcc tgcctagaga 480
 cccccaccct caagcctggc tggctcttgc ctgagacca aacctcttcg acttcaagag 540
 aatatttagg aacaaggtgg tttagggcct ttcctgggaa caggccttga ccctttaaga 600
 aatgacccaa agtctctcct tgacaaaaa ggggaccctc aaactaaagg gaagcctctc 660
 ttctgctgtc tcccctgacc ccactcccc ccaccccagg acgaggagat aaccagggct 720
 gaaagaggcc cgcctggggg ctgcagacat gcttgcctgc tgcctggcg aaggattggt 780
 aggcttgccc gtcacaggac ccccgtggc tgactcaggg ggcaggcct cttgcggggg 840
 agctggcctc cccgccccca cggccacggg ccgcccttcc ctggcaggac agcgggatct 900
 tgcagctgtc aggggagggg aggggggggc tgatgtcagg agggatacaa atagtccga 960
 cggttggggg ccctgtctcc cctcgccgca tccactctcc ggccggccgc ctgcccgcg 1020
 cctcctccgt ggcgccgcca gcctcgccc 1050

<210> 12
 <211> 1654
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..1654
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="Promotor de calpaína 3" /organismo="*Homo sapiens*"

10

<400> 12
 cacatgcctc cactctgcca tacttgaaat gtgctcatct ccttacagcc cagggagcag 60
 ctattgtggg tagaagacaa ggtggaggcc aggcaggcac ttccttccc cagagccact 120
 tatgctctca tctaagagcc ctgaaaccag gtgtgacatc ccaggagttg acagacagtc 180

ES 2 698 571 T3

tggttcagta tctaattcca acttctgtct cagatgocca atgtggcatg gctgaatgag 240
 tcaacatata acctgtacag taagtcctca cttaacatca ttgataggty ottgtaaact 300
 gtgactttaa cgaaaacata ccgtgtgctg tagggactta actcttgttt atatcagtta 360
 gcctggtttc actatacagt acatcatttt gcttaaagtc acagcttagy agaacctatc 420
 gatgatgtta agtgaggatt ttctctgctc aggtgcactt tttttttttt ttttaagacgy 480
 agtctctttc tgtcacctgg gctggagtyc agtggcgyga tctgggttca ctacaacctc 540
 tgccctcctgg gttcaagcaa ttcttctgct tcagcctccc aagtagctgy gattacaggy 600
 aocgcgcgcc acacccggyt tatttttgta ttttttagtag agacaggytt tcaactattgt 660
 tggccatgct ggtctcgaac tcctgacctc atgtgatcca cccgcctcgy cctcccaaag 720
 tgcagagatt agagacgyga gccacatgyc ccagcaggyac cacttttttag cagattcagty 780
 cccagtyttc attttgtyga tggggagaga caagaggyty caaggtcaag tgytcaggyta 840
 gagacaggyga ttttctcaaa tgaggactct gctgagtyagc attttccatg cagacatttc 900
 caatgagcgc tgacccaaga acattctaaa aaagatacca aatctaact tgaataatgy 960
 tctgatatcc taaaatttta ggactaaaa tcatgtytctc taaaattcac agaattttt 1020
 tgytagaattc agtacctccc gttcacctca actagctttt ttgcaatatt gttttccatt 1080
 catttgatgy ccagtyagty ggtggtctgt ataactgocct actcaataac atgtcagcag 1140
 ttctcagctt ctttccagty ttcaccttac tcagatactc ctttttccatt ttctggcaac 1200
 accagcactt catggycaaca gaaatgtyccc tagccaggytt ctctctctac catgcyagtyt 1260
 ctcttgctct catactcaca gtytttcttc acatctattt ttagtytttcc tggctcaagc 1320
 atcttcaggy cactgaaaca caacctcac tctctttctc tctccctctg gcatgcatgc 1380
 tgytgtytagg agaccccaaa gtycaactgy cttcagaaat ctttagcac tcatttctca 1440
 ggagaactta tggcttcaga atcacagctc ggtttttaag atggacataa cctgtacgyac 1500
 cttctgatgy gctttcaact ttgaaactgya tgytgacact tttctctcag atgacagaat 1560
 tactccaact tccccttgyc agtygcttcc tttccttgaa ggytagctgya ttttattttc 1620
 tttaaaaagc tttttcttcc aaagccactt gccca 1654

<210> 13

<211> 805

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..805

<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="promotor de ARNmi206" /organismo="*Homo sapiens*"

<400> 13

ES 2 698 571 T3

gggggccaac ttttcctttg gcatatgttt ccccattttc tggcagagaa tcagatacca 60
 caaagttcaa aaccccatct ccctccagcc aggggtggcca tccagaccct gagtggctca 120
 acagctgcca atgtccctca tccttctgag gctcaggcct cacagattgt ggggcaggtg 180
 atgggctagg gggagcagaa gcccgacaaa aggatccttc ccacagtga caatggtgct 240
 tggaatgctg gatgggcagc tgctgccat caacaagcac ccaaaacaga tagacgtaca 300
 gtaggaagta caggagggcc ggtgtgtttc taagcatgag tggctctctg cgtgaatgtg 360
 gaaaatttct ctgttggatt ctctcttctt ttaattttc cttcactgg atcccaaaca 420
 ttaaaaaaga atcacattca aatgcacaa aacagcagc agtgaattaa ttagtagtaa 480
 taacaaagga ctggatagac tgtagctgca caagaataag ccagggaaac gtgtgctgc 540
 ttatctgtga acaaacagta ggaaggattt ggtccaagc agcactgccca ttcctcacia 600
 cagatttatt tcagcatgat ttggtcgggc gggggggatt taggatgagt tgagatccca 660
 gtgatcttct cgctaagagt ttcctgcctg ggcaaggagg aaagatgcta caagtggccc 720
 acttctgaga tgcgggctgc ttctggatga cactgcttc ccagggccaca tgcttcttta 780
 tatcccata tggattactt tgcta 805

<210> 14
 <211> 1812
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..1812
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="ORF MTM1" /organismo="*Mus musculus*"

10

<400> 14
 atggcttctg catcagcatc taagtataat tcacactcct tggagaatga atccattaag 60
 aaagtgtctc aagatggagt cagtcaggat gtgagtgaga ctgtccctcg gctcccaggg 120
 gagttactaa ttactgaaaa agaagttatt tacatatgtc ctttcaatgg cccattaag 180
 ggaagagttt acatcacaaa ttatcgtctt tatttaagaa gtttgaaac ggattctgct 240
 ctaatacttg atgttcctct ggtgtgata tcaagaattg aaaaaatggg aggcgcgaca 300
 agtagaggag aaaattccta tggcttagat attacttgta aagatttgag aaacctgagg 360
 tttgcattga agcaagaagg ccacagcaga agagatatgt ttgagatcct tgtaaaacat 420
 gcctttcctc tggcacacaa tctgccatta tttgcatttg taaatgaaga gaagtttaac 480
 gtggatgggt ggactgttta taatccagtt gaagaatata gaaggcaggg cctgcccaat 540
 caccattgga ggataagttt tattaacaag tgctatgagc tctgtgagac ataccctgct 600

ES 2 698 571 T3

cttttggtgg ttccctatcg gacctcagat gatgatctta ggaggatcgc aacgtttaga 660
tcccgaaatc ggcttctgt actgtcgtgg atccaccag aaaacaaat ggtcattatg 720
cgctgcagtc agcctcttgt cggatatgagt ggtaaaagaa ataaagatga cgagaaatac 780
ctggatgtga tcagggaaac taacaaacaa acttctaagc tcatgattta tgatgcacga 840
cccagtgtaa atgcagtcgc caacaaggca acaggaggag gatatgaaag tgatgcacga 900
tatcaaaact cagaactttc cttcttagac attcataata ttcattgatt gcgagaatct 960
ttaaaaaaag tgaaagatat tgtttatccc aacatagaag aatctcattg gttgtccagt 1020
ttggagtcta ctcatgggtt agaacatata aagcttggtc tgaccgggtc cattcaagtg 1080
gcagaccaag tgtcttcagg aaagagctcg gtacttggtc actgcagtgga cggatgggac 1140
aggaccgctc agctgacatc cttggccatg ctgatgttgg acagcttcta cagaactatt 1200
gaaggctttg agatattggt acagaaagag tggataagtt ttggccataa atttgcactc 1260
agaataggtc atggtgataa aaacctatgct gatgctgata gatctcctat tttcttcag 1320
tttattgact gtgtgtggca gatgtcgaaa cagttcccca cagcttttga gttcaatgaa 1380
ggctttttga ttaccgtttt ggatcatctg tatagctgtc gatttggtac tttcttattc 1440
aactgtgact cggctcgaga aagacagaaa cttacagaaa gaacagtttc tctatggtcg 1500
ctaattaaca gcaataaaga caaattcaaa aacccttctc atacaaaaga aatcaatcgg 1560
gttttgatc cagttgccag catgcgtcac ttggaactgt ggggtgaatta ttacatccga 1620
tggaatccca gggcaagca gcaacagccc aaccagtgag agcagcgtta catggagctt 1680
ttggccttgc gtgacgatta tataaagagg ctcgaggaat tgcagctggc caactccgcc 1740
aagcttgctg atgccccgc ttcgacttcc agttcgtcac agatgggtgcc ccatgtgcag 1800
acgcacttct ga 1812

5 <210> 15
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..22
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="directo de AAV" /organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 15
ctccatcact aggggtcct tg 22

20 <210> 16
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..18
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="inverso de AAV" /organismo="Secuencia artificial"

ES 2 698 571 T3

<400> 16
gtagataagt agcatggc 18

5
<210> 17
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<221> fuente
<222> 1..17
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="sonda de AAV" /organismo="Secuencia artificial"

15
<400> 17
tagttaatga ttaacc 17

20
<210> 18
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<221> fuente
<222> 1..21
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="directo de Titina" /organismo="Secuencia artificial"

30
<400> 18
aaaacgagca gtagcgtgag c 21

35
<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="inverso de Titina" /organismo="Secuencia artificial"

45
<400> 19
tcagtcatg ctgctagcgc 20

50
<210> 20
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55
<220>
<221> fuente
<222> 1..25
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="Sonda de titina" /organismo="Secuencia artificial"

60
<400> 20
tgacggaag cgtctcgtct cagtc 25

65
<210> 21
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 698 571 T3

5
<220>
<221> fuente
<222> 1..16
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="CAPN3sfr.f " /organismo="Secuencia artificial"

<400> 21
cgctccaag gcccg t 16

10
<210> 22
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<221> fuente
<222> 1..16
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="CAPN3sfr.r " /organismo="Secuencia artificial"

20
<400> 22
ggcggagcg ctggct 16

25
<210> 23
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<221> fuente
<222> 1..21
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="MGBTUCAPN3.p " /organismo="Secuencia artificial"

35
<400> 23
ctacatcaac atgagagagg t 21

40
<210> 24
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<221> fuente
<222> 1..16
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="CAPN3.f " /organismo="Secuencia artificial"

50
<400> 24
cgctccaag gccagg 16

55
<210> 25
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<221> fuente
<222> 1..16
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="CAPN3.r " /organismo="Secuencia artificial"

<400> 25
ggcggagcg ctggga 16

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 698 571 T3

5
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="CAPN3.p " /organismo="Secuencia artificial"

10
<400> 26
tacatcaaca tgcgggaggt 20
<210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="MH181PO.F" /organismo="Secuencia artificial"

20
<400> 27
ctccaagcag atgcagcaga 20
<210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="M267PO.R" /organismo="Secuencia artificial"

30
<400> 28
accatgatgc gcaaggctat 20
<210> 29
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35
<220>
<221> fuente
<222> 1..22
<223> /mol_tipo="ADN sin asignar" /nota="M225PO.p" /organismo="Secuencia artificial"

40
<400> 29
cogtggct gatggcaag aa 22
45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sistema de expresión para administración sistémica que comprende una secuencia que codifica la miotubularina, bajo el control de:
- una secuencia promotora que permite la expresión a un nivel terapéuticamente aceptable de miotubularina en los músculos esqueléticos y que presenta una actividad promotora a un nivel tóxicamente aceptable incluso nulo en el corazón; o
 - 10 - una secuencia promotora que permite la expresión a un nivel terapéuticamente aceptable de miotubularina en los músculos esqueléticos, y una secuencia diana de un ARNmi expresado en el corazón.
- 15 2. Sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 1 *caracterizado* por que la miotubularina presenta la secuencia SEQ ID NO: 1, 2 o 3.
3. Sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 *caracterizado* por que comprende al menos una secuencia diana del miR208a, de forma ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 10.
- 20 4. Sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 3 *caracterizado* por que comprende el promotor de la desmina, de forma ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 11.
5. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 *caracterizado* por que comprende la secuencia promotora del gen de la calpaína 3, de forma ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 12, o la secuencia promotora de miR206, de forma ventajosa de secuencia SEQ ID NO: 13.
- 25 6. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes *caracterizado* por que comprende un vector que presenta un tropismo superior para los músculos esqueléticos que para el corazón.
7. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes *caracterizado* por que comprende un vector viral, de forma ventajosa un vector viral adeno-asociado (AAV).
- 30 8. Sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 7 *caracterizado* por que comprende un vector AAV de serotipo 8 o 9.
9. Composición farmacéutica que comprende un sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8.
- 35 10. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como medicamento.
11. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en terapia genética.
- 40 12. Sistema de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad neuromuscular, de forma ventajosa una miopatía, de forma incluso más ventajosa miopatía miotubular (XLMTM).
- 45 13. Sistema de expresión para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 *caracterizado* por que el sistema de expresión se administra por vía sistémica, de forma ventajosa por inyección intravenosa.

A/

rAAV-Des-Mtm1



B/

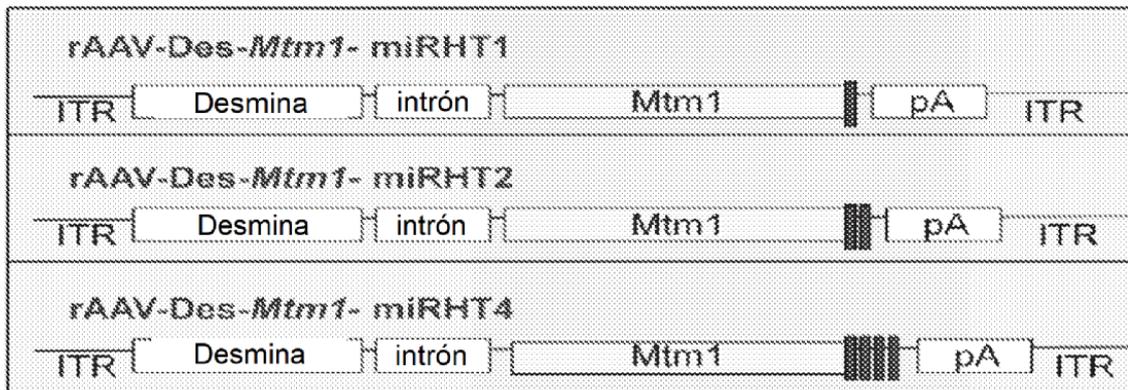


Figura 1

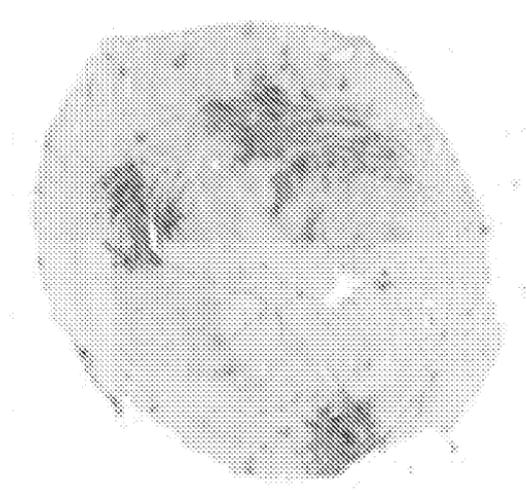


Figura 2

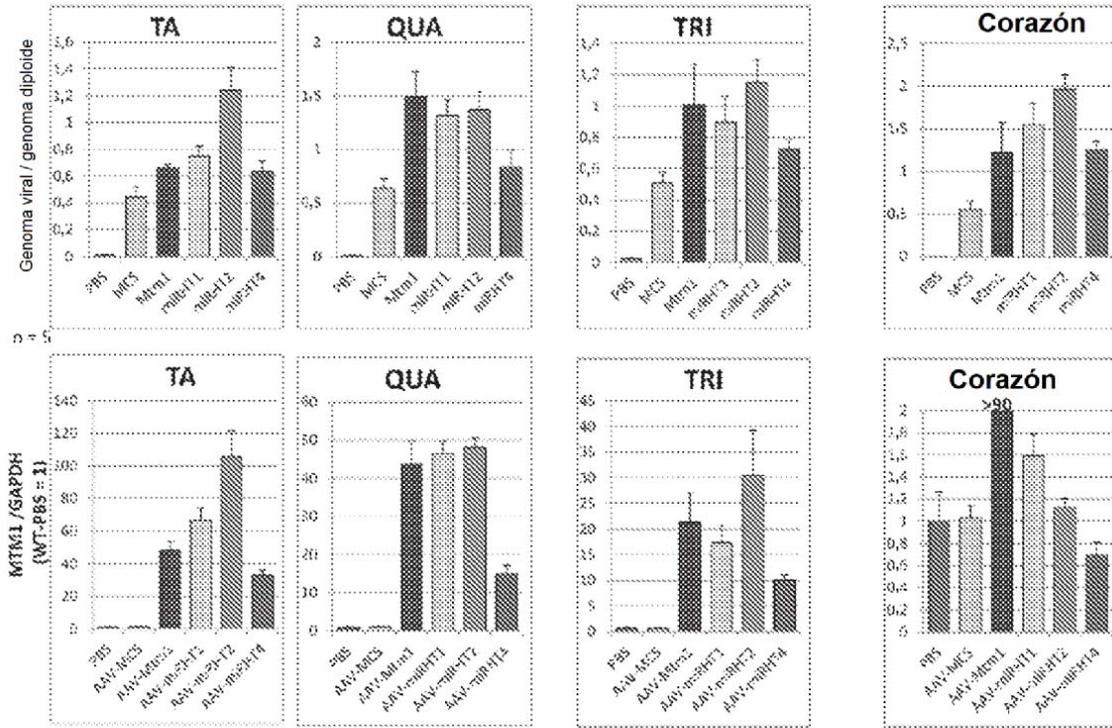


Figura 3

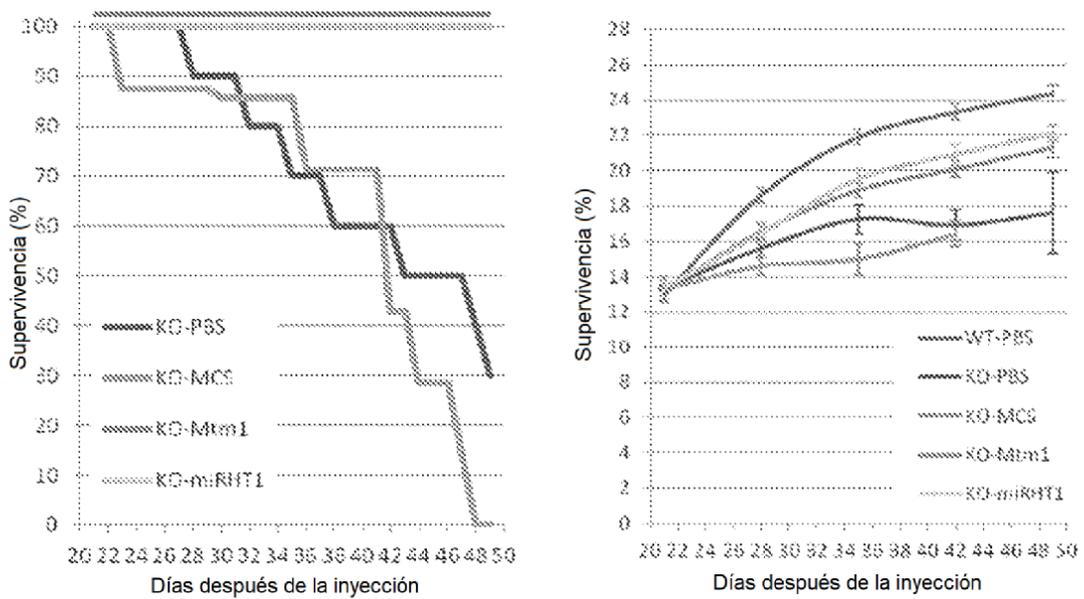


Figura 4

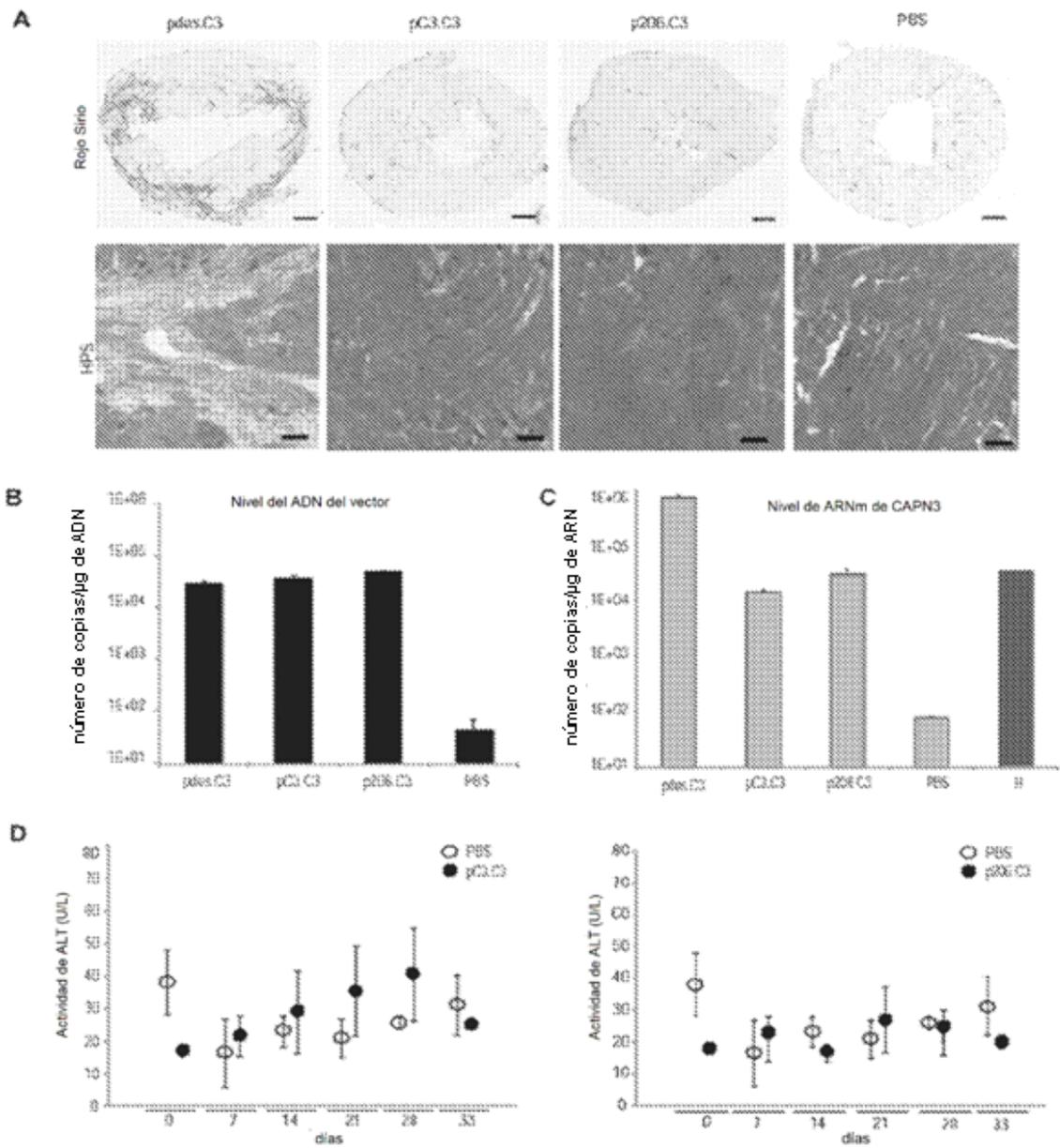


Figura 5

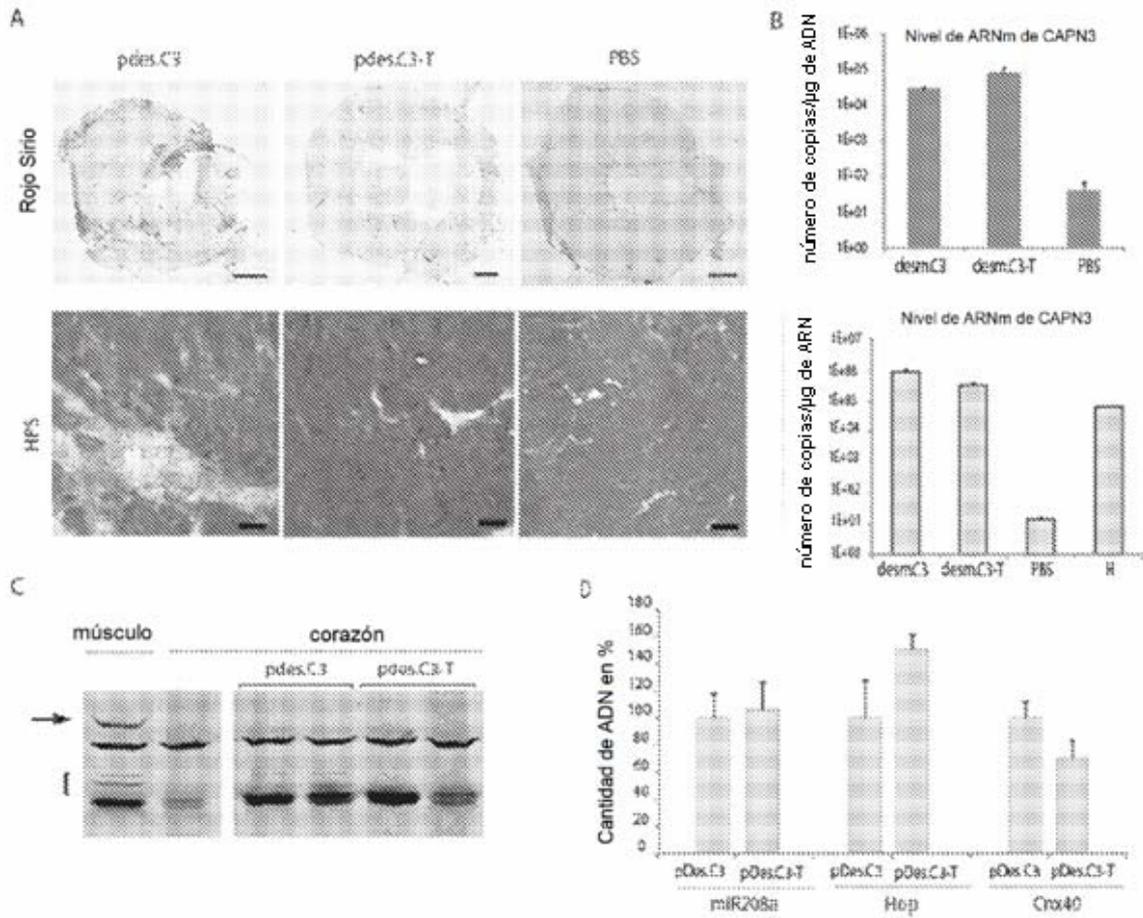


Figura 6

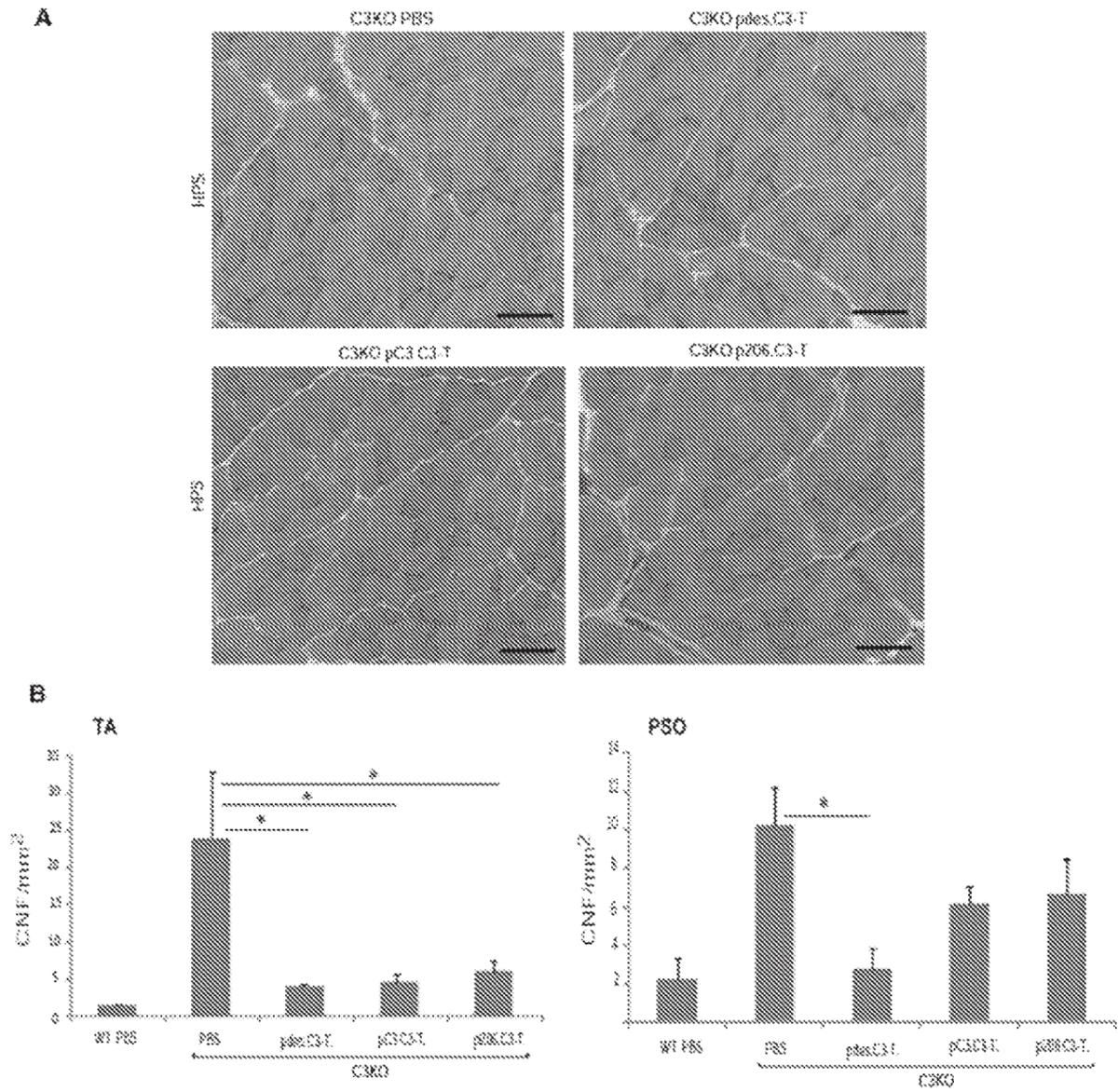


Figura 7