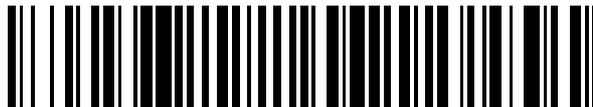


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 496**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C12N 15/864** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C12N 7/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2012 PCT/US2012/034408**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12145597**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 12774899 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2699673**

54 Título: **Productos de virus recombinante y procedimientos para la inhibición de la expresión de la miotilina**

30 Prioridad:

**21.04.2011 US 201161478012 P**

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

**01.03.2019**

73 Titular/es:

**NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL, INC.  
(100.0%)  
700 Children's Drive Room W172  
Columbus, OH 43205, US**

72 Inventor/es:

**HARPER, SCOTT QUENTON y  
LIU, JIAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Nuria**

**Observaciones:**

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

**ES 2 702 496 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**

Productos de virus recombinante y procedimientos para la inhibición de la expresión de la miotilina

- 5 Esta solicitud es una continuación en parte de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos n.º 61/478.012 presentada el 21 de abril de 2011.

Campo de la invención

- 10 La presente invención se refiere a procedimientos basados en la interferencia de ARN para inhibir la expresión del gen de la miotilina. Los virus adenoasociados recombinantes de la invención entregan ADN que codifican microARN que eliminan la expresión de la miotilina. Los procedimientos tienen aplicación en el tratamiento de distrofias musculares tales como la distrofia muscular de cinturas tipo 1A.

- 15 Listado de secuencias

Esta solicitud contiene, como parte separada de la divulgación, un Listado de Secuencias en forma legible por ordenador (nombre de archivo: 46208PCT\_SeqListing.txt; 1,721,237 bytes - archivo de texto ASCII).

- 20 Antecedentes

- 25 Las distrofias musculares (DM) son un grupo de enfermedades genéticas. El grupo se caracteriza por debilidad progresiva y degeneración de los músculos esqueléticos que controlan el movimiento. Algunas formas de DM se desarrollan en la infancia o la niñez, mientras que otras pueden no aparecer hasta la mediana edad o más tarde. Los trastornos difieren en términos de la distribución y extensión de la debilidad muscular (algunas formas de DM también afectan al músculo cardíaco), la edad de inicio, la tasa de progresión y el patrón de herencia.

- 30 Un grupo de DM es el grupo de distrofias musculares de cinturas (LGMD, por sus siglas en inglés). Las LGMD son enfermedades raras y se presentan de forma diferente en diferentes personas con respecto a edad de inicio, áreas de debilidad muscular, compromiso cardíaco y respiratorio, tasa de progresión y gravedad. Las LGMD pueden comenzar en la infancia, la adolescencia, la edad adulta joven o incluso más tarde. Ambos géneros se ven afectados por igual. Las LGMD causan debilidad en los hombros y la cintura pélvica, a veces debilitándose también con el tiempo los músculos cercanos en la parte superior de las piernas y los brazos. La debilidad de las piernas a menudo aparece antes que la de los brazos. Los músculos faciales generalmente no se ven afectados. A medida que la enfermedad avanza, las personas pueden tener problemas para caminar y es posible que necesiten usar una silla de ruedas con el tiempo. La participación de los músculos de los hombros y los brazos puede llevar a dificultades para levantar los brazos por encima de la cabeza y para levantar objetos. En algunos tipos de LGMD, el corazón y los músculos respiratorios pueden estar involucrados.

- 40 Hay al menos diecinueve formas de LGMD, y las formas se clasifican por sus defectos genéticos asociados.

Tipo	Patrón de herencia	Gen o Cromosoma
LGMD1A	Autosómico dominante	Gen Miotilina
LGMD1B	Autosómico dominante	Gen Lamina A/C
LGMD1C	Autosómico dominante	Gen Caveolina
LGMD1D	Autosómico dominante	Cromosoma 7
LGMD1E	Autosómico dominante	Gen Desmina
LGMD1F	Autosómico dominante	Cromosoma 7
LGMD1G	Autosómico dominante	Cromosoma 4
LGMD2A	Autosómico recesivo	Gen Calpaína 3
LGMD2B	Autosómico recesivo	Gen Disferlina
LGMD2C	Autosómico recesivo	Gen gamma-sarcoglicano
LGMD2D	Autosómico recesivo	Gen alfa-sarcoglicano
LGMD2E	Autosómico recesivo	Gen beta-sarcoglicano
LGMD2F	Autosómico recesivo	Gen delta-sarcoglicano
LGMD2G	Autosómico recesivo	Gen Teletonina
LGMD2H	Autosómico recesivo	TRIM32
LGMD2I	Autosómico recesivo	Gen FKRP
LGMD2J	Autosómico recesivo	Gen Titina
LGMD2K	Autosómico recesivo	Gen POMT1
LGMD2L	Autosómico recesivo	Gen Fukutina

Las pruebas especializadas para LGMD ahora están disponibles a través de un esquema nacional de diagnóstico, el National Commissioning Group (NCG).

La LGMD1A es causada por mutaciones de sentido erróneo de ganancia de función en el gen de la miotilina (MYOT) [Hauser y col., *Am. J. Hum. Genet.*, 71: 1428-1432 (2002); Hauser y col., *Hum. Mol. Genet.*, 9: 2141-2147 (2000); Shalaby y col., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 68: 701-707 (2009)]. Los pacientes con LGMD1A desarrollan debilidad proximal de las pieARNs y los brazos en la edad adulta temprana (25 años es la edad media de inicio), que progresa hacia la musculatura distal de las extremidades. A nivel histológico, los pacientes muestran degeneración y variabilidad de tamaño de miofibras, ruptura de fibras, mionúcleos localizados centralmente, vesículas autofágicas y reemplazo de miofibras por tejido graso y fibrótico, que son características comunes de la distrofia muscular. Los pacientes con LGMD1A también desarrollan agregados de proteínas miofibrilares intramusculares, vacuolas con borde y desorganización severa del disco Z (llamada transmisión del disco Z), que interrumpe completamente la estructura sarcomérica. Se ha desarrollado un modelo de ratón transgénico, el modelo de ratón T57I, que utiliza un alelo MYOT humano mutante [Garvey y col., *Hum. Mol. Genet.* 15: 2348-2362 (2006)]. Es importante destacar que los ratones T57I recapitulan las anomalías histológicas y funcionales progresivas asociadas con LGMD1A, incluyendo reducción del tamaño muscular, debilidad muscular, agregados miofibrilares intramusculares, transmisión del disco Z y mionúcleos localizados centralmente.

El gen de la miotilina codifica una proteína de 57 kDa expresada principalmente en el músculo esquelético y cardíaco. La miotilina parece funcionar como un componente estructural del disco Z y, por lo tanto, puede contribuir al ensamblaje del sarcómero, a la estabilización del filamento de actina y a la transmisión de fuerza en el músculo estriado. Sin embargo, la miotilina no es necesaria para el desarrollo o la función muscular normal, ya que los ratones con miotilina nula son abiertos e histológicamente normales. Específicamente, los músculos de los ratones que carecen de miotilina son indistinguibles del tipo salvaje en cuanto a masa muscular, tamaño de las miofibras, fuerza contráctil (fuerza específica) e integridad sarcolémica. Además, los ratones nulos para MYOT se desarrollan con normalidad, viven una vida normal y no muestran evidencia histológica de distrofia muscular o malformaciones del disco Z. Los transcritos de miotilina de ratón y humana se expresan en los mismos tejidos, tienen las mismas estructuras genómicas y las secuencias de proteínas están altamente conservadas (90 % de identidad; 94 % de similitud), lo que indica un funcional conservado.

La interferencia de ARN (ARNi) es un mecanismo de regulación génica en células eucariotas que se ha considerado para el tratamiento de diversas enfermedades. ARNi se refiere al control postranscripcional de la expresión génica mediada por microARN (miARN). Los miARN son pequeños (21-25 nucleótidos), ARN no codificantes que comparten homología de secuencia y pares de bases con ARN mensajeros afines (mARN). La interacción entre los miARN y los mARN dirige la maquinaria celular de silenciamiento génico para evitar la traducción de los mARN. La ruta de ARNi se resume en Duan (Ed.), Sección 7.3 del Capítulo 7 en *Muscle Gene Therapy*, Springer Science+Business Media, LLC (2010). La sección 7.4 menciona la terapia de ARNi MYOT para LGMD1A en ratones para demostrar la prueba de principio para la terapia de ARNi en trastornos musculares dominantes.

Como se ha desarrollado una comprensión de las rutas de ARNi natural, los investigadores han diseñado miARN artificiales para su uso en la regulación de la expresión de genes diana para el tratamiento de la enfermedad. Como se describe en la Sección 7.4 de Duan, supra, los miARN artificiales pueden transcribirse a partir de casetes de expresión de ADN. La secuencia de miARN específica para un gen diana se transcribe junto con las secuencias requeridas para dirigir el procesamiento del miARN en una célula. Se han utilizado vectores virales como el virus adenoasociado para administrar miARN al músculo [Fechner y col., *J. Mol. Med.*, 86: 987-997 (2008)].

El virus adenoasociado (AAV) es un parvovirus deficiente en la replicación, cuyo genoma de ADN monocatenario tiene aproximadamente 4,7 kb de longitud, incluyendo repeticiones terminales invertidas (RTI) de 145 nucleótidos. Existen múltiples serotipos de AAV. Las secuencias de nucleótidos de los genomas de los serotipos de AAV son conocidas. Por ejemplo, el genoma completo de AAV-1 se proporciona en el número de acceso de GenBank NC\_002077; el genoma completo de AAV-2 se proporciona en el número de acceso de GenBank NC\_001401 y Srivastava y col., *J. Virol.*, 45: 555-564 (1983); el genoma completo de AAV-3 se proporciona en el número de acceso de GenBank NC\_1829; el genoma completo de AAV-4 se proporciona en el número de acceso de GenBank NC\_001829; el genoma de AAV-5 se proporciona en el número de acceso de GenBank AF085716; el genoma completo de AAV-6 se proporciona en el número de acceso de GenBank NC\_001862; al menos partes de los genomas AAV-7 y AAV-8 se proporcionan en los números de acceso de GenBank AX753246 y AX753249, respectivamente; el genoma de AAV -9 se proporciona en Gao y col., *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); el genoma de AAV-10 se proporciona en *Mol. Ther.*, 13 (1): 67-76 (2006); y el genoma de AAV-11 se proporciona en *Virology*, 330 (2): 375-383 (2004). Las secuencias que actúan en cis que dirigen la replicación (rep) del ADN viral, la encapsidación/empaquetamiento y la integración del cromosoma de la célula huésped están contenidas dentro de las RTI de AAV. Tres promotores de AAV (denominados p5, p19 y p40 por sus ubicaciones relativas en el mapa) dirigen la expresión de los dos marcos de lectura abiertos internos de AAV que codifican los genes rep y cap. Los dos promotores rep (p5 y p19), junto con el empalme diferencial del intrón AAV único (en los nucleótidos 2107 y 2227), dan como resultado la producción de cuatro proteínas rep (rep 78, rep 68, rep 52 y rep 40) del gen rep. Las proteínas rep poseen múltiples propiedades enzimáticas que son las responsables finales de replicar el genoma viral. El gen cap se expresa desde el promotor p40 y codifica las tres proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. Los empalmes alternativos y los sitios de inicio de traducción no consensuados son responsables de la producción de las tres proteínas de la cápside relacionadas. Un único sitio de poliadenilación por consenso se encuentra en la posición 95 del mapa del genoma de AAV. El ciclo de vida y la genética de AAV se revisan en Muzyczka, *Current Topics in*

Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992).

El AAV posee características únicas que lo hacen atractivo como un vector para entregar ADN extraño a las células, por ejemplo, en terapia génica. La infección por AAV de las células en cultivo no es citopática, y la infección natural de los humanos y otros animales es silenciosa y asintomática. Además, el AAV infecta muchas células de mamíferos permitiendo la posibilidad de atacar muchos tejidos diferentes *in vivo*. Además, el AAV transduce células que se dividen lentamente y células que no se dividen, y puede persistir esencialmente durante toda la vida de esas células como un episoma nuclear transcripcionalmente activo (elemento extracromosómico). El genoma provial de AAV es infeccioso como ADN clonado en plásmidos, lo que hace posible la construcción de genomas recombinantes. Además, debido a que las señales que dirigen la replicación de AAV, la encapsidación y la integración del genoma están contenidas dentro de las RTI del genoma de AAV, algunas o todas las internas de aproximadamente 4,3 kb del genoma (codificación de replicación y proteínas estructurales de la cápside, rep-cap) pueden reemplazarse por ADN extraño. Las proteínas rep y cap pueden proporcionarse *in trans*. Otra característica importante de AAV es que es un virus extremadamente estable y abundante. Resiste fácilmente las condiciones utilizadas para desactivar el adenovirus (de 56° a 65 °C durante varias horas), lo que hace que la preservación en frío del AAV sea menos crítica. El AAV puede incluso estar liofilizado. Finalmente, las células infectadas con AAV no son resistentes a la sobreinfección. Wallace y col., 2010, NEUROMUSCULAR DISORDERS, 22 (9-10): 99-115, o Garvey, 2007, Disertación, "Patho-genetic characterization of the muscular dystrophy gene myotilin", Programa Universitario en Genética y Genómica, Escuela de Graduados de la Universidad de Duke, divulgan los enfoques dirigidos al ARN como terapias prometedoras contra la distrofia muscular de cinturas tipo 1A y su administración con AAV (LGMD1A; Garvey: página 93, página 110, ítem 4.3.3; página 137, último párrafo; Wallace y col., 2010: 7.3-7.5).

Sigue habiendo una necesidad en la técnica de un tratamiento para LGMD1A.

## 25 Sumario

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un virus adenoasociado recombinante que comprende el ADN que codifica miARN de MYOT establecido en SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, en el que el virus adenoasociado recombinante carece de genes rep y cap. En un segundo aspecto de la invención también se proporcionan composiciones que comprenden el virus adenoasociado recombinante de la invención. También se proporciona el uso terapéutico del virus adenoasociado recombinante de la invención, que incluye el uso terapéutico del virus adenoasociado recombinante de la invención para tratar LGMD1A. La presente descripción también proporciona procedimientos y productos para prevenir o inhibir la expresión del gen MYOT. Los procedimientos de la divulgación utilizan ARNi para prevenir o inhibir la expresión del gen MYOT. Los procedimientos implican la entrega de ARN inhibidores específicos para el gen MYOT a las células musculares. Los ARN inhibidores de MYOT contemplados por la divulgación incluyen, pero no se limitan a, ARN antisentido, ARN inhibidores pequeños (ARNsi), ARN de horquilla corta (ARNsh) o microARN artificiales (miARN MYOT) que inhiben la expresión de MYOT. El uso de los procedimientos y productos está indicado, por ejemplo, en la prevención o el tratamiento de la LGMD1A. Algunas realizaciones de la invención explotan las propiedades únicas de AAV para administrar ADN que codifica los ARN inhibidores de MYOT a las células musculares. Otras realizaciones de la divulgación utilizan otros vectores (por ejemplo, otros vectores virales tales como adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus asociado a equinos, alfavirus, virus de la viruela, virus del herpes, virus de la poliomielitis, virus de sindbis y virus de la vacuna) para la entrega de polinucleótidos que codifican ARN inhibidores de MYOT.

En un aspecto, la invención proporciona miARN de MYOT como se expone en las reivindicaciones. En otro aspecto, la invención proporciona rAAV que codifica los miARNs de MYOT en los que los rAAV carecen de genes rep y cap como se expone en las reivindicaciones. En algunas realizaciones descritas, el miARN de MYOT comprende una cadena de guía antisentido de miARN seleccionada de las establecidas en SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 11266. Estas secuencias comprenden secuencias de cadena de "guía" antisentido de la invención de diferentes tamaños. La cadena de guía antisentido es la hebra del dúplex de miARN maduro que se convierte en el componente de ARN del complejo silenciador inducido por ARN responsable, en última instancia, del silenciamiento génico específico de la secuencia. Véase la Sección 7.3 de Duan, supra. Por ejemplo, la primera cadena guía antisentido en SEQ ID NO: 7 corresponde a (es el complemento inverso de) el extremo 3' de la secuencia de miotilina expuesta en la Figura 1. La segunda cadena de guía antisentido (SEQ ID NO: 8) está compensada con un nucleótido de la primera y así sucesivamente. En algunas realizaciones, el contenido de GC de la cadena de guía antisentido es del 60 % o menos y/o el extremo 5' de la cadena de guía antisentido es más rico en AU mientras que el extremo 3' es más rico en GC. Los miARN de MYOT de la invención están codificados por los ADN establecidos en SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende el rAAV que codifica el miARN de MYOT como se expone en las reivindicaciones.

En otro aspecto más, la descripción proporciona un procedimiento para prevenir o inhibir la expresión del gen MYOT en una célula que comprende poner en contacto la célula con un rAAV que codifica un miARN de MYOT, en el que el miARN está codificado por el DNA establecido en SEQ ID. NO: 1, 2, 3 o 4 y en el que el rAAV carece de los genes rep y cap. La expresión de MYOT se inhibe en al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99 por ciento.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona un procedimiento para entregar ADN que codifica el miARN de MYOT establecido en SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 a un animal que lo necesite, que comprende administrar respectivamente al animal un rAAV que codifica el ARN de MYOTmi, en el que el rAAV carece de genes rep y cap.

5 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir o tratar una distrofia muscular (que incluye, pero no se limita a, LGMD1A) que comprende administrar un rAAV que codifica un miARN de MYOT, en el que el miARN está codificado por el ADN establecido en SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 y en el que el rAAV carece de genes rep y cap. El término "tratar" puede incluir mejorar uno o más síntomas de la distrofia muscular (tal como LGMD1A). Los criterios de valoración moleculares, bioquímicos, histológicos y funcionales demuestran la eficacia  
10 terapéutica de los miARN de MYOT. Los criterios de valoración contemplados por la invención incluyen uno o más de: reducción o eliminación de la proteína MYOT mutante en los músculos afectados, eliminación del gen MYOT, reducción o eliminación de (por ejemplo, asociados a LGMD1A) agregados de proteínas patógenas en el músculo, aumento de los diámetros de miofibras y mejora de la fuerza muscular.

15 Descripción detallada

Los genomas de AAV recombinantes de la invención comprenden uno o más RTI de AAV que flanquean un polinucleótido que codifica, por ejemplo, uno o más miARN de MYOT. El polinucleótido está unido operativamente al ADN de control transcripcional, específicamente el ADN promotor que es funcional en la diana. Los proveedores  
20 comerciales como Ambion Inc. (Austin, TX), Dharmacon Inc. (Lafayette, CO), InvivoGen (San Diego, CA) y Molecular Research Laboratories, LLC (Herndon, VA) generan moléculas de ARN inhibidores personalizadas. Además, hay kits comerciales disponibles para producir moléculas de ARNsi personalizadas, como el kit de construcción de ARNsi SILENCER™ (Ambion Inc., Austin, TX) o el psiRNA System (InvivoGen, San Diego, CA). Las realizaciones incluyen un genoma de rAAV que comprende: el ADN establecido en SEQ ID NO: 1 que codifica el miARN de MYOT  
25 (denominado "miMyoT-1291"), el ADN establecido en SEQ ID NO: 2 que codifica el miARN de MYOT (denominado "miMyoT-1321"), el ADN establecido en SEQ ID NO: 3 que codifica el miARN de MYOT (denominado "miMyoT-1366") o el ADN establecido en SEQ ID NO: 4 que codifica el miARN de MYOT (denominado "miMyoT-1490").

Los genomas de rAAV de la invención carecen de ADN de rep y cap de AAV. El ADN de AAV en los genomas de  
30 rAAV puede ser de cualquier serotipo de AAV para el que se pueda derivar un virus recombinante, incluidos, entre otros, los serotipos de AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV -6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 y AAV-11. Como se señaló en la anterior sección de Antecedentes, las secuencias de nucleótidos de los genomas de varios serotipos de AAV son conocidas en la técnica.

Los plásmidos de ADN de la invención comprenden los genomas de rAAV de la invención. Los plásmidos de ADN se transfieren a células permisibles para la infección con un virus auxiliar de AAV (por ejemplo, adenovirus, adenovirus con E1 eliminado o herpesvirus) para el ensamblaje del genoma de rAAV en partículas virales infecciosas. Las técnicas para producir partículas de rAAV, en las cuales se proporcionan a una célula un genoma de AAV para  
35 empaquetado, genes de rep y cap, y funciones de virus auxiliares son estándar en la técnica. La producción de rAAV requiere que los siguientes componentes estén presentes dentro de una sola célula (denominada célula de empaquetamiento en el presente documento): un genoma de rAAV, los genes rep y cap de AAV separados de (es decir, no en) el genoma de rAAV, y las funciones del virus auxiliar. Los genes rep y cap de AAV pueden ser de cualquier serotipo de AAV para el que se pueda derivar un virus recombinante y pueden ser de un serotipo de AAV diferente al de las RTI del genoma de rAAV, incluyendo, pero sin limitarse a, los serotipos de AAV AAV-1, AAV-2,  
40 AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 y AAV-11. La producción de rAAV pseudotipado se describe, por ejemplo, en el documento WO 01/83692, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Un procedimiento para generar una célula de empaquetamiento es crear una línea celular que exprese de manera estable todos los componentes necesarios para la producción de partículas de AAV. Por ejemplo, un plásmido (o plásmidos múltiples) que comprende un genoma de rAAV que carece de los genes rep y cap de AAV, los genes rep y cap de AAV separados del genoma de rAAV, y un marcador seleccionable, como un gen de resistencia a la neomicina, se integran en el genoma de una célula. Los genomas de AAV se han introducido en plásmidos bacterianos mediante procedimientos tales como la prolongación de GC (Samulski y col., 1982, Proc. Natl. Acad. S6.  
55 USA, 79: 2077-2081), adición de ligadores sintéticos que contienen sitios de escisión de endonucleasa de restricción (Laughlin y col., 1983, Gene, 23: 65-73) o mediante ligamiento de extremo romo directo (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259: 4661-4666). La línea celular de empaquetamiento se infecta con un virus auxiliar, como el adenovirus. Las ventajas de este procedimiento son que las celdas son seleccionables y adecuadas para la producción a gran escala de rAAV. Otros ejemplos de procedimientos adecuados emplean adenovirus o baculovirus en lugar de plásmidos para introducir genomas de rAAV y/o genes rep y cap en células de empaquetamiento.  
60

Los principios generales de la producción de rAAV se revisan, por ejemplo, en Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; y Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). Se describen varios enfoques en Ratschin y col., Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin y col., Mol. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin y col., J. Virol., 62:1963 (1988); y Lebkowski y col., 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski y col. (1989, J. Virol., 63:3822-3828); la patente de  
65

Estados Unidos n.º 5.173.414; el documento WO 95/13365 y la patente de Estados Unidos n.º 5.658.776 correspondiente; los documentos WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96 / 20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin y col. (1995) Vaccine 13: 1244-1250; Paul y col. (1993) Human Gene Therapy 4:609-615; Clark y col. (1996) Gene Therapy 3:1124-1132; la patente de Estados Unidos n.º 5.786.211; la patente de Estados Unidos n.º 5.871.982; y la patente de Estados Unidos n.º 6.258.595. Los anteriores documentos proporcionan enseñanzas relacionadas con la producción de rAAV.

La invención proporciona, por lo tanto, células de empaquetamiento que producen rAAV infecciosos. En una realización, las células de empaquetamiento pueden ser células cancerosas transformadas de manera estable, tales como células HeLa, células 293 y células PerC.6 (una línea 293 afín). En otra realización, las células de empaquetamiento son células que no son células cancerosas transformadas, como las células 293 de paso bajo (células renales fetales humanas transformadas con E1 de adenovirus), células MRC-5 (fibroblastos fetales humanos), células WI-38 (fibroblastos fetales humanos), células Vero (células renales de mono) y células FRhL-2 (células pulmonares fetales rhesus).

El rAAV recombinante (es decir, partículas de rAAV encapsidadas infecciosas) de la invención comprende un genoma de rAAV. Las realizaciones incluyen, pero no se limitan a, el rAAV que incluye un genoma que codifica el miARN de MYOT establecido en SEQ ID NO: 1 (denominado "AAV-U6-miMyoT-1291"), el rAAV que incluye un genoma que codifica el de miARN de MYOT establecido en SEQ ID NO: 2 (denominado "AAV-U6-miMyoT-1321"), el rAAV que incluye un genoma que codifica el miARN de MYOT establecido en SEQ ID NO: 3 (denominado "AAV-U6-miMyoT-1366") y el rAAV que incluye un genoma que codifica el miARN de MYOT establecido en SEQ ID NO: 4 (denominado "AAV-U6-miMyoT-1490"). Los genomas de los rAAV carecen de ADN de rep y cap de AAV, es decir, no hay ADN de rep y cap de AAV entre las RTI de los genomas.

El rAAV se puede purificar mediante procedimientos estándar en la técnica, tales como cromatografía en columna o gradientes de cloruro de cesio. Los procedimientos para purificar vectores rAAV a partir de virus auxiliares son conocidos en la técnica e incluyen los procedimientos descritos, por ejemplo, en Clark y col., Hum. Gene Ther., 10(6):1031-1039 (1999); Schenpp y Clark, Methods Mol. Med., 69 427-443 (2002); la patente de Estados Unidos n.º 6.566.118 y el documento WO 98/09657.

En otra realización, la invención contempla composiciones que comprenden rAAV de la presente invención. Las composiciones de la invención comprenden rAAV en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también pueden comprender otros ingredientes tales como diluyentes y adyuvantes. Los portadores, diluyentes y adyuvantes aceptables no son tóxicos para los receptores y son preferiblemente inertes en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas tales como la albúmina sérica, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol (PEG).

Los títulos de rAAV que se administrarán en los procedimientos de la invención variarán dependiendo, por ejemplo, del rAAV particular, el modo de administración, el objetivo del tratamiento, el individuo y los tipos de células a los que se dirige y podrán determinarse mediante procedimientos estándar en la técnica. Los títulos de rAAV pueden variar desde aproximadamente  $1 \times 10^6$ , aproximadamente  $1 \times 10^7$ , aproximadamente  $1 \times 10^8$ , aproximadamente  $1 \times 10^9$ , aproximadamente  $1 \times 10^{10}$ , aproximadamente  $1 \times 10^{11}$ , aproximadamente  $1 \times 10^{12}$ , aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  o más partículas resistentes a DNasa (DRP) por ml. Las dosis también pueden expresarse en unidades de genomas virales (vg).

La invención contempla procedimientos de transducción de una célula diana con rAAV, *in vivo* o *in vitro*. Los procedimientos *in vivo* comprenden la etapa de administrar una dosis efectiva, o dosis múltiples efectivas, de una composición que comprende un rAAV de la invención a un animal (incluyendo un ser humano) que lo necesite. Si la dosis se administra antes del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es profiláctica. Si la dosis se administra después del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es terapéutica. En realizaciones de la invención, una dosis efectiva es una dosis que alivia (elimina o reduce) al menos un síntoma asociado con el estado del trastorno/enfermedad que se está tratando, que retarda o evita la progresión a un estado de trastorno/enfermedad, que retarda o evita la progresión de un estado de trastorno/enfermedad, que disminuye la extensión de la enfermedad, que resulta en la remisión (parcial o total) de la enfermedad y/o que prolonga la supervivencia. Un ejemplo de una enfermedad contemplada para la prevención o el tratamiento con los procedimientos de la invención es LGMD1A.

La invención contempla también terapias de combinación. Tal y como se usa en el presente documento, la combinación incluye tanto el tratamiento simultáneo como el tratamiento secuencial. Se contemplan específicamente las combinaciones de los procedimientos de la invención con tratamientos médicos estándar (por ejemplo,

corticosteroides), así como las combinaciones con terapias nuevas.

La administración de una dosis eficaz de las composiciones puede ser por vías estándar en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, intramuscular, parenteral, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, intracraneal, intraósea, intraocular, rectal o vaginal. La vía o vías de administración y el serotipo o los serotipos de los componentes de rAAV del rAAV (en particular, los RTI de AAV y la proteína de la cápside) de la invención pueden ser seleccionados y/o combinados por los expertos en la materia, teniendo en cuenta la infección y/o el estado de la enfermedad que se está tratando y las células/tejidos diana que vayan a expresar los miARN de MYOT.

En particular, la administración real del rAAV de la presente invención puede llevarse a cabo usando cualquier procedimiento físico que transporte el vector recombinante de rAAV al tejido diana de un animal. La administración de acuerdo con la invención incluye, pero no se limita a, inyección en el músculo, el torrente sanguíneo y/o directamente en el hígado. Se ha demostrado que la simple resuspensión de un rAAV en solución salina tamponada con fosfato es suficiente para proporcionar un vehículo útil para la expresión del tejido muscular, y no se conocen restricciones sobre los portadores u otros componentes que pueden administrarse conjuntamente con el rAAV (aunque las composiciones que degradan el ADN deben evitarse de la manera normal con rAAV). Las proteínas de la cápside de un rAAV pueden modificarse de modo que el rAAV se dirija a un tejido diana particular de interés, tal como el músculo. Véase, por ejemplo, el documento WO 02/053703. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse como formulaciones inyectables o como formulaciones tópicas para ser administradas a los músculos por transporte transdérmico. Numerosas formulaciones tanto para inyección intramuscular como para transporte transdérmico se han desarrollado previamente y se pueden usar en la práctica de la invención. El rAAV se puede usar con cualquier portador farmacéuticamente aceptable para facilitar la administración y la manipulación.

Para los fines de la inyección intramuscular, pueden emplearse soluciones en un adyuvante tal como aceite de sésamo o cacahuete o en propilenglicol acuoso, así como soluciones acuosas estériles. Tales soluciones acuosas pueden tamponarse si se desea y el diluyente líquido primero se vuelve isotónico con solución salina o glucosa. Las soluciones de rAAV como un ácido libre (el ADN contiene grupos fosfato ácidos) o una sal farmacológicamente aceptable se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo como la hidroxipropilcelulosa. También se puede preparar una dispersión de rAAV en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar la proliferación de microorganismos. En este sentido, los medios acuosos estériles empleados se pueden obtener fácilmente mediante técnicas estándar bien conocidas por los expertos en la materia.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra las acciones contaminantes de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando rAAV en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtro. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el ingrediente activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son el secado al vacío y la técnica de liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de la solución estéril filtrada previamente del mismo.

La transducción con rAAV también se puede llevar a cabo *in vitro*. En una realización, las células musculares diana deseadas se eliminan del sujeto, se transducen con rAAV y se reintroducen en el sujeto. Alternativamente, se pueden usar células musculares singénicas o xenogénicas cuando esas células no generen una respuesta inmune inapropiada en el sujeto.

Los procedimientos adecuados para la transducción y reintroducción de células transducidas en un sujeto son conocidos en la técnica. En una realización, las células pueden ser transducidas *in vitro* combinando rAAV con células musculares, por ejemplo, en medios apropiados, y seleccionando aquellas células que albergan el ADN de interés usando técnicas convencionales tales como hibridaciones Southern y/o PCR, o usando marcadores seleccionables. Las células transducidas pueden luego formularse en composiciones farmacéuticas y la composición puede introducirse en el sujeto mediante diversas técnicas, tales como la inyección intramuscular, intravenosa,

subcutánea e intraperitoneal, o mediante inyección en el músculo liso y cardíaco, utilizando, por ejemplo, un catéter.

La transducción de células con el rAAV de la invención da como resultado la expresión sostenida de los miARN de MYOT. La presente invención proporciona así procedimientos de administración/entrega de rAAV que expresan miARN de MYOT a un animal, preferiblemente un ser humano. Estos procedimientos incluyen la transducción de tejidos (incluyendo, pero sin limitarse a, tejidos tales como músculos, órganos como el hígado y el cerebro y glándulas como las glándulas salivales) con uno o más rAAV de la presente invención. La transducción se puede llevar a cabo con casetes de genes que comprenden elementos de control específicos de tejido. Por ejemplo, una realización de la invención proporciona procedimientos para transducir células musculares y tejidos musculares dirigidos por elementos de control específicos de los músculos, incluyendo, pero sin limitarse a, los derivados de las familias de genes de actina y miosina, tales como las de la familia de genes myoD [Véase Weintraub y col., Science, 251: 761-766 (1991)], el factor de unión al potenciador específico de los miocitos MEF-2 [Cserjesi y Olson, Mol Cell Biol 11: 4854-4862 (1991)], elementos de control derivados del gen de la actina esquelética humana [Muscat y col., Mol Cell Biol, 7: 4089-4099 (1987)], el gen de la actina cardíaca, elementos de la secuencia de la creatina quinasa muscular [Véase Johnson y col., Mol Cell Biol, 9:3393-3399 (1989)] y el elemento potenciador de la creatina quinasa murina (mCK), elementos de control derivados del gen de la troponina C de contracción rápida esquelética, el gen de la troponina C cardíaca de contracción lenta y el gen de la troponina I de contracción lenta: factores nucleares inducibles por hipoxia [Semenza y col., Proc Natl Acad Sci USA, 88: 5680-5684 (1991)], elementos inducibles por esteroides y promotores, incluyendo el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) [Véase Mader y White, Proc. Natl Acad Sci. USA, 90: 5603-5607 (1993)] y otros elementos de control.

El tejido muscular es un objetivo atractivo para la administración de ADN *in vivo*, ya que no es un órgano vital y es de fácil acceso. La invención contempla la expresión sostenida de miARNs a partir de miofibras transducidas.

Por "célula muscular" o "tejido muscular" se entiende una célula o grupo de células derivadas de músculo de cualquier tipo (por ejemplo, músculo esquelético y músculo liso, por ejemplo, del tracto digestivo, vejiga urinaria, vasos sanguíneos o tejido cardíaco). Tales células musculares pueden ser diferenciadas o no diferenciadas, como los mioblastos, miocitos, miotubos, cardiomiocitos y cardiomioblastos.

El término "transducción" se usa para referirse a la administración/entrega de miARN de MYOT a una célula receptora, ya sea *in vivo* o *in vitro*, mediante un rAAV de la invención deficiente en la replicación que da como resultado la expresión de un miARN de MYOT por parte de la célula receptora.

Por lo tanto, la invención proporciona procedimientos la administración de una dosis efectiva (o dosis, administradas esencialmente de manera simultánea o dosis administradas a intervalos) de rAAV que codifican los miARN de MYOT de SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 a un paciente que lo necesite.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los sitios diana en la secuencia de miotilina (SEQ ID NO: 11266) para los miARN ejemplificados.

La Figura 2 muestra las secuencias de dos miARN dirigidos a MYOT. En cada panel, las secuencias principales indican las plantillas de ADN a partir de las cuales se transcribe cada miARN respectivo. En el panel superior, la plantilla de ADN miMYOT.1321 es SEQ ID NO: 2. En el panel inferior, la plantilla de ADN miMYOT.1366 es SEQ ID NO: 3. Las transcripciones de miARN plegadas se muestran como estructuras de horquilla. El miARN plegado miMYOT.1321 es SEQ ID NO: 11268. El miARN plegado miMYOT.1366 es SEQ ID NO: 11271. El miMYO.1321 maduro (SEQ ID NO: 11270 que se empareja con SEQ ID NO: 11269 en la figura) y las secuencias miDUX4.1366 (SEQ ID NO: 11273 que se emparejan con SEQ ID NO: 11272 en la figura) surgen después del procesamiento en células diana por parte de la maquinaria de procesamiento de miARN (incluidas Drosha, DGCR8, Dicer y Exportin-5). Las secuencias sombreadas en gris indican los sitios utilizados para clonar cada miARN en el vector U6T6. Los nucleótidos correspondientes a la cadena de guía antisentido de miARN maduro que finalmente ayuda a catalizar la escisión del ARNm diana de MYOT están subrayados en las porciones de la horquilla de miARN de este diagrama. Las puntas de flecha gris y negra indican los sitios de escisión catalizados por Drosha y Dicer, respectivamente. Los números 13, 35, 53 y 75 se proporcionan para orientación. Las secuencias entre (e incluyendo) las posiciones 35-53 se derivan de la secuencia mir-30a humana natural, excepto la A en la posición 39, que es una G en la secuencia mir-30a normal. Esto se cambió a una A para facilitar el plegado del bucle de miARN, basado en modelos de plegamiento de ARN *in silico*. La base del vástago (5' de la posición 13 y 3' de la posición 75) también se deriva de la estructura y secuencia de mir-30a con algunas modificaciones dependiendo de la secuencia primaria de la cadena de guía. Específicamente, el nucleótido en la posición 13 puede variar para ayudar a facilitar un desajuste requerido entre los nucleótidos en la posición 13 y 75. Esta estructura abombada se hipotetiza para facilitar la correcta escisión de Drosha.

La Figura 3 muestra el efecto de los miARNs dirigidos a MYOT en ratones LGMD1A que expresan miotilina mutante (MYOT). La Figura 3A es una transferencia Western que muestra la eliminación de la expresión de miotilina mutante en extractos musculares de ratones de tres meses de edad con LGMD1A, en la que Izquierda (L) = lado de tratamiento con miMYOT y Derecha (R) = lado tratado con control de miGFP. La Figura 3B muestra los resultados de la PCR en tiempo real que confirman los datos de Western.

**Ejemplos**

Los aspectos y realizaciones de la invención se ilustran mediante los siguientes ejemplos. El ejemplo 1 describe miARN específicos para el gen MYOT. El ejemplo 2 describe el efecto de los miARN en la expresión de MYOT medido por PCR en tiempo real. El ejemplo 3 describe rAAV que codifica los miARN. El ejemplo 4 describe el efecto del U6T6 que expresa los miARN en la expresión de MYOT según medido por transferencia Western. El ejemplo 5 describe la entrega de miARN de MYOT a ratones recién nacidos. El ejemplo 6 describe la administración de miARN de MYOT a ratones adultos.

10 Ejemplo 1

MicroARN específicos para el gen MYOT

15 Seis ADN que codifican miARN específicos para el gen MYOT se generaron mediante PCR. Los cebadores de PCR utilizados tenían las siguientes secuencias.

Cebador 775 (miMyoT-592-Forward) (SEQ ID NO: 11274):  
AAAAC TCGAGT GAGCGACCTGATTACAATAGCAGTAAACTGTAAAGCCACAGATGGG

20 Cebador 776 (miMyoT-592-Reverse) (SEQ ID NO: 11275):  
TTTTACTAGTAGGCAGCCTGATTACAATAGCAGTAAACCCATCTGTGGCTTTACAG

Cebador 777 (miMyoT-1291-Forward) (SEQ ID NO: 11276):  
AAAAC TCGAGT GAGCGACTGGATGTCCTTGCAAAGAAGTGTAAAGCCACAGATGGG

25 Cebador 778 (miMyoT-1291-Reverse) (SEQ ID NO: 11277):  
TTTTACTAGTAGGCAGCTGGATGTCCTTGCAAAGAACCCATCTGTGGCTTTACAG

Cebador 779 (miMyoT-1321-Forward) (SEQ ID NO: 11278):  
30 AAAAC TCGAGT GAGCGCGCACCAATGTTTATCTACAAACTGTAAAGCCACAGATGGG

Cebador 780 (miMyoT-1321-Reverse) (SEQ ID NO: 11279):  
TTTTACTAGTAGGCAAGCACCAATGTTTATCTACAAACCCATCTGTGGCTTTACAG

35 Cebador 781 (miMyoT-1366-Forward) (SEQ ID NO: 11280):  
AAAAC TCGAGT GAGCGAGGAGATTCAGTGAAACTAGAACTGTAAAGCCACAGATGGG

Cebador 782 (miMyoT-1366-Reverse) (SEQ ID NO: 11281):  
40 TTTTACTAGTAGGCAGGGAGATTCAGTGAAACTAGAAACCCATCTGTGGCTTTACAG

Cebador 783 (miMyoT-1490-Forward) (SEQ ID NO: 11282):  
AAAAC TCGAGT GAGCGCGAAGAGTTACTTTACTGATAACTGTAAAGCCACAGATGGG

45 Cebador 784 (miMyoT-1490-Reverse) (SEQ ID NO: 11283):  
TTTTACTAGTAGGCAGGAAGAGTTACTTTACTGATAACCCATCTGTGGCTTTACAG

Cebador 785 (miMyoT-1603-Forward) (SEQ ID NO: 11284):  
AAAAC TCGAGT GAGCGGACGTCCAAACCAAACCTTCTGTAAAGCCACAGATGGG

50 Cebador 786 (miMyoT-1603-Reverse) (SEQ ID NO: 11285):  
TTTTACTAGTAGGCAGGCACGTCCAAACCAAACCTTCCCATCTGTGGCTTTACAG

El ADN que codifica un miARN designado miMyoT-592 se generó usando los cebadores 775 y 776. El ADN que codifica el miARN designado miMyoT-1291 se generó usando los cebadores 777 y 778. El ADN que codifica el miARN designado miMyoT-1321 se generó usando los cebadores 779 y 780. El ADN que codifica el miARN designado miMyoT-1366 se generó utilizando los cebadores 781 y 782. El ADN que codifica el miARN designado miMyoT-1490 se generó utilizando los cebadores 783 y 784. El ADN que codifica el miARN designado miMyoT-1603 se generó utilizando los cebadores 785 y 786. A continuación, se indican los ADN, en los que el número en los nombres indica el nucleótido diana 5' en la secuencia de miotilina (SEQ ID NO: 11267). Véase la Figura 1, en la que las secuencias diana para los miARNs en la secuencia de miotilina están subrayadas.

## ES 2 702 496 T3

### miMyoT-592

CTCGAGTGAGCGACCTGATTACAATAGCAGTAAACTGTAAAGCCACAGATGGGTTTACTGCT  
ATTGTAATCAGGCTGCCTACTAGA (SEQ ID NO: 5)

### miMyoT-1291

CTCGAGTGAGCGACTGGATGTCCTTGCAAAAGAAGTGTAAAGCCACAGATGGGTTATTTTGC  
AAGGACATCCAGCTGCCTACTAGA (SEQ ID NO: 1)

### miMyoT-1321

CTCGAGTGAGCGCGCACCAATGTTTATCTACAAACTGTAAAGCCACAGATGGGTTTGTAGAT  
AAACATTGGTGCTTGCCTACTAGA (SEQ ID NO: 2)

### miMyoT-1366

CTCGAGTGAGCGAGGAGATTTCAGTGAAACTAGAACTGTAAAGCCACAGATGGGTTCTAGTTT  
CACTGAATCTCCCTGCCTACTAGA (SEQ ID NO: 3)

### miMyoT-1490

CTCGAGTGAGCGCGAAGAGTTACTTTACTGATAACTGTAAAGCCACAGATGGGTTATCAGTA  
AAGTAACTCTTCCCTGCCTACTAGA (SEQ ID NO: 4)

### miMyoT-1603

CTCGAGTGAGCGAGCACGTCCAAACCAAACCTCTTCTGTAAAGCCACAGATGGGAAGAGTTTG  
GTTTACGTGCCTGCCTACTAGA (SEQ ID NO: 6)

La Figura 2 muestra las plantillas de ADN miMyoT.1321 y miMyoT.1366 y sus correspondientes miARN plegados y maduros.

Se añadió un µg de cada cebador a una reacción de extensión del cebador de 1 ciclo: 95 °C durante 5 minutos; 94 °C durante 2 minutos; 52 °C durante 1 minuto; 72 °C durante 15 minutos; y luego se mantuvo a 4 °C. Los productos de PCR se limpiaron con el kit de purificación de PCR Qiagen QIAquick antes de ser digeridos durante la noche con las enzimas de restricción XhoI y SpeI. El producto de la digestión se aplicó luego en un gel TBE al 1,5 % y la banda se cortó y purificó utilizando el kit de extracción de gel Qiagen QIAquick.

Los productos de PCR se ligaron a un vector U6T6 (a través de XhoI y XbaI) durante la noche. Este vector contiene un promotor U6 de ratón y una señal de terminación de ARN polimerasa III (6 nucleótidos de timidina). Los miARN se clonan en los sitios de restricción XhoI + XbaI ubicados entre el extremo 3' del promotor U6 y la señal de terminación (SpeI en el extremo 3' de la plantilla de ADN para cada miARN tiene extremos cohesivos complementarios con el sitio XbaI). El producto de ligamiento se transformó en células *E-coli* químicamente competentes con un choque térmico de 42 °C y se incubó a 37 °C agitando durante 1 hora antes de ser colocado en placas de selección con kanamicina. Las colonias se dejaron crecer durante la noche a 37°. Al día siguiente se miniprepararon y se secuenciaron para mayor precisión.

### Ejemplo 2

Reacción de PCR en tiempo real para el efecto de la expresión de los miARN de MYOT

Se ensayó la expresión de la secuencia diana de MYOT en presencia de los miARN de MYOT. Se realizó una transfección con lipofectamina 2000 en células C2C12 en una placa de ensayo de pared blanca de 12 pocillos. Se transfectaron 52.000 células con 100 ng de AAV-CMV-mutMyoT y 1500 ng de uno de los vectores U6T6 descritos en el Ejemplo 1 que contiene ADN que codifica miARN. El ensayo se realizó 48 horas después.

El medio se eliminó de las células y se añadió 1 µl de Trizol por pocillo. Luego las células se resuspendieron y los lisados se transfirieron a tubos de EP de 1,5 ml. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se añadieron 200 µl de cloroformo. Los tubos se agitaron vigorosamente durante 15 segundos, se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos y se centrifugaron a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Luego, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 0,5 ml de alcohol isopropílico. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos a 4 °C. La paleta de ARN se lavó una vez con 1 ml de etanol al 75 % y se secó al aire. Se añadieron 20 µl de agua libre de RNasa para disolver el sedimento y se midió la concentración/purificación por Nano-drop. Se añadieron 1,5 µg de ARN total a la reacción de generación de DNc: 5 °C durante 10 minutos; 37 °C durante 120 minutos; 85 °C durante 5 segundos y luego se mantuvo a 4 °C. Los productos de DNc se diluyeron a 1:10 y se añadieron 4,5 µl a la reacción de PCR en tiempo real. Se usó miotilina humana para verificar la expresión de MYOT y la expresión relativa se normalizó a la expresión de GAPDH del ratón.

U6T6-miMyoT-592 (SEQ ID NO: 5) mostró una expresión más alta de MYOT que el control U6T6-miGFP. U6T6-miMyoT-1291 (SEQ ID NO: 1) redujo la expresión de MYOT al 60 %, U6T6-miMyoT-1321 (SEQ ID NO: 2) redujo la expresión de MYOT al 19 %, U6T6-miMyoT-1366 (SEQ ID NO: 3) redujo la expresión de MYOT al 41,7 %, U6T6-miMyoT-1490 (SEQ ID NO: 4) redujo la expresión de MYOT al 55,3 %, U6T6-miMyoT-1603 (SEQ ID NO: 6) redujo la expresión de MYOT al 34,9 %, en comparación con el control U6T6-miGFP.

### Ejemplo 3

#### Producción de rAAV que codifica MicroARN de MYOT

Los ADN de U6-miMYOT se cortaron a partir de construcciones de U6T6-miMYOT en sitios EcoRI y luego se clonaron respectivamente en AAV6-hrGFP para generar vectores de rAAV-U6-miMyoT. Estos vectores rAAV expresan miARN y hrGFP

### Ejemplo 4

#### Ensayo de transferencia Western para el efecto de la expresión de los miARN de MYOT a partir de vectores U6T6 y rAAV

El efecto de la expresión de los miARN de MYOT a partir de los vectores U6T6 descritos en el Ejemplo 1 y el rAAV descrito en el Ejemplo 4 se ensayó mediante transferencia Western.

Un día antes de la transfección, se colocaron en placa 293 células en una placa de 24 pocillos a  $1,5 \times 10^5$  células/pocillo. Las células fueron luego transfectadas con U6T6-miMyoT (592, 1291, 1321, 1366, 1490 o 1603) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cat. No. 11668-019).

Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se recogieron y se lavaron con PBS frío una vez. Luego se añadieron setenta µl de tampón de lisis (137 mM NaCl, 10 mM Tris pH=7,4, 1 % NP40). Las células se resuspendieron completamente y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 13.000 rpm a 4 °C y se recogió el sobrenadante. El lisado celular se diluyó 5 veces para el ensayo de concentración de proteínas de Lowry (Reactivo A, B, S de la Bio-Rad Dc Protein Assay; Cat. No. 500-0113, 500-0114, 500-115). Se tomaron veinte µg de cada muestra y se añadieron 2x tampón de muestra (Tris 100 mM pH=6,8, DTT 100 mM, glicerol al 10 %, SDS al 2 %, azul de bromofenol al 0,006 %). Las muestras se hirvieron durante 10 minutos y luego se pusieron en hielo.

Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10 % (basado en una proporción de acrilamida: bisacrilamida de 37,5:1, Bio-Rad, Cat. No.161-0158), 15 µg en un gel para cada muestra. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF a 15 V durante 1 h usando transferencia semiseca (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, Cat. No. 170-3940). Las transferencias se colocaron en un tampón de bloqueo (5 % de leche en polvo sin grasa, 30 mM Tris pH=7,5, 150 mM NaCl, Tween-20 al 0,05 %) y se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El tampón de bloqueo se decantó y se añadió una solución de anticuerpo primario anti-miotilina (policlonal de conejo generado por Bethyl Laboratories utilizando un péptido correspondiente a los residuos de miotilina 473-488) y se incubó con agitación durante la noche a 4 °C. Las membranas se lavaron luego durante 30 minutos, cambiando el tampón de lavado (NaCl 150 mM, Tris 30 mM pH=7,5, Tween-20 al 0,05 %) cada 10 minutos. Se añadió anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Cat. No. 115-035-146, 1:100.000) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Las membranas se lavaron luego durante 30 minutos, cambiando el tampón de lavado cada 10 minutos. Las transferencias se colocaron en solución de trabajo quimioluminiscente (sustrato de HRP quimioluminiscente Immobilon Western, Millipore, Cat. No. WBKLS0500), se incubaron con agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se expusieron a una película de rayos X.

Las membranas se lavaron durante 20 minutos, cambiando el tampón de lavado cada 10 minutos. Luego, se añadió tampón de eliminación (SDS al 2 %, Tris 62,5 mM, pH=6,7, b-ME 100 mM) a las transferencias y se incubó a 50 °C

durante 30 min. Las membranas se lavaron de nuevo durante 30 minutos, cambiando el tampón de lavado cada 10 minutos. Luego, las membranas se bloquearon de nuevo y se volvieron a sondear con solución de anticuerpo primario anti-GAPDH (Chemicon, Cat. No. MAB374, 1: 200) y anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoReserch, Cat. No. 115- 035-146, 1:100.000) se usó como anticuerpo secundario.

5 Se escaneó la película y se calculó la relación de densidad de MYOT a GAPDH. En comparación con el control U6T6-miGFP, la expresión de MYOT fue mayor (1,08) en las muestras de U6T6-miMyoT-592 (SEQ ID NO: 5) y la expresión de MYOT se redujo al 78,9 % con U6T6-miMyoT-1291 (SEQ ID NO: 1), al 50,2 % con U6T6-miMyoT-1321 (SEQ ID NO: 2), al 60,2 % con U6T6-miMyoT-1366 (SEQ ID NO:3), al 76,2 % con U6T6-miMyoT-1490 (SEQ ID NO: 4),al 87 % con U6T6-miMyoT-1603 (SEQ ID NO: 6).

U6T6-miMYOT-1321 eliminó la expresión de miotilina de manera más efectiva tanto en la PCR en tiempo real como en los experimentos de transferencia Western. El efecto knockdown con AAV-miMyoT-1321 también fue confirmado por el experimento de transferencia Western.

15 Ejemplo 5

Entrega a ratones recién nacidos

20 El genotipo de PCR de crías recién nacidas se determinó para identificar ratones hembra WT o T57I MYOT (utilizando cebadores de MYOT humano y cebadores de cromosoma Y). Inyecciones intramusculares bilaterales de  $5 \times 10^{10}$  AAV6.miMYOT-1321 o partículas de AAV6.miGFP de control por pata en ratones de 1-2 días fueron suficientes para saturar la musculatura de la extremidad inferior.

25 La corrección fenotípica se determinó inicialmente mediante análisis histológicos. Específicamente, 3 meses después de la entrega viral, los músculos fueron cosechados y crioseccionados. Criosecciones en serie de diez micrones se cortaron y se tiñeron con anticuerpos para detectar agregados de proteínas miotilinas positivas en las miofibras T57I. Los músculos AAV6.miMYOT-1321 tuvieron una cantidad significativamente reducida de agregados por sección en comparación con AAV6.miGFP o controles sin tratar. Además, cuando los músculos tratados con AAV6.miMYOT-132 mostraron agregados ocasionales, fueron significativamente más pequeños que los observados en animales tratados con control o no tratados con T57I. El tratamiento con AAV6.miMYOT-132 también mejoró los déficits de tamaño muscular en comparación con el tratamiento de control.

35 La eliminación de MYOT se confirmó mediante transferencia Western y PCR en tiempo real tal como se muestra en la Figura 3. El AAV entregó miMYOT-1321 que redujo significativamente la proteína MYOT mutante (Figura 3A) y el ARNm (Figura 3B) en los músculos.

40 Estos resultados respaldan la eficacia terapéutica. Los experimentos continuos incluyen la determinación de los efectos funcionales de la eliminación de MYOT en músculos enteros mediante la medición de la fuerza específica de EDL.

Ejemplo 6

Entrega a ratones adultos

45 Se determina el genotipo de PCR de los destetados y se eligen para el tratamiento ratones de 12 semanas de edad que tienen una patología asociada con LGMDIA preexistente significativa. Los vectores de  $5 \times 10^{11}$  AAV6 se entregan a la musculatura de las extremidades inferiores mediante perfusión aislada de la pierna. La corrección fenotípica (incluida la fuerza de agarre de las extremidades posteriores, los parámetros musculares gruesos y la fuerza específica de la EDL se miden utilizando varios procedimientos durante los meses siguientes.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un virus adenoasociado recombinante que comprende el ADN que codifica miARN de MYOT establecido en SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, en el que el virus recombinante adenoasociado carece de genes rep y cap.
- 10 2. El virus adenoasociado recombinante de la reivindicación 1, en el que la expresión del ADN que codifica miARN está bajo el control de un promotor CMV, un promotor de la creatina quinasa muscular (MCK), un potenciador de la cadena pesada de alfa-miosina/promotor potenciador de MCK (MHCK7) o un promotor de desmina.
- 15 3. El virus adenoasociado recombinante de la reivindicación 1 o 2 para su uso en un procedimiento para inhibir la expresión del gen MYOT en una célula, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la célula con el virus adenoasociado recombinante.
- 20 4. Una composición que comprende el virus recombinante adenoasociado de la reivindicación 1 o 2.
- 25 5. La composición de la reivindicación 4 para su uso en un procedimiento para inhibir la expresión del gen MYOT en una célula, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la célula con la composición.
- 30 6. El virus adenoasociado recombinante de la reivindicación 1 o 2 para su uso en terapia.
- 35 7. Un virus adenoasociado recombinante que comprende el ADN que codifica miARN de MYOT establecido en SEQ ID NO: 1, en el que el virus adenoasociado recombinante carece de genes rep y cap para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas tipo 1A.
- 40 8. Un virus adenoasociado recombinante que comprende el ADN que codifica miARN de MYOT establecido en SEQ ID NO: 2, en el que el virus adenoasociado recombinante carece de genes rep y cap para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas tipo 1A.
9. Un virus adenoasociado recombinante que comprende el ADN que codifica miARN de MYOT establecido en SEQ ID NO: 3, en el que el virus adenoasociado recombinante carece de genes rep y cap para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas tipo 1A.
10. Un virus adenoasociado recombinante que comprende el ADN que codifica miARN de MYOT establecido en SEQ ID NO: 4, en el que el virus adenoasociado recombinante carece de genes rep y cap para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas tipo 1A.
11. El virus adenoasociado recombinante para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la expresión del ADN que codifica miARN está bajo el control de un promotor de CMV, un promotor de la creatina quinasa muscular (MCK), un potenciador de la cadena pesada de alfa-miosina/promotor potenciador de MCK (MHCK7) o un promotor de desmina.

Figura 1

Secuencia de miotilina C450T humana (los sitios diana están subrayados y resaltados)

GGGAAGGAGATGCCTCTTCCTTCCCTTCAATAGTGGGTAAACCCAGCTGGCA  
 CCCTCTGGAACACTACGGGAACAATATTCCTTCAAGAGAAGGTCCTCTACCAAAG  
 CCAGGAGCACAGTATTCTCAGGATCTCAACAAGGAAGAGCAGACCAAGGTTGC  
 TTCTGATTCCCTTACAACCTTCCGTAATTCAGGCTTGTGGCCCCAAATTCAGG  
 GCCCCACCCTTCCAGGAACAAATCATTATAGTAATAATTTGCCTTCATCTTCC  
 ATATACCAACTAAGCATGTTTAACTACGAACGTCCAAAACACTTCATCCAGTC  
 CAAAACCCATGTGGCTCCAGATTGCAGCCTCCTGGACCAGAAACCTCCAGCT  
 TCTCTAGCCAGACCAAACAGTCTTCCATTATCATCCAGCCCCGCCAGTGTACA  
 GAGCAAAGATTTTCTGCCTCCTCAATACTGAGCTCTCACATCACCATGTCCCTC  
 CTCTGCTTTCCCTGCTTCTCCCAAGCAGCATGCTGGCTCCAACCCAGGCCAAA  
 GGGTTACAACCACCTATAACCAGTCCCAGCCAGCTTCCCTCAGCTCCATATTA  
 CCATCACA592GCCTGATTACAATAGCAGTAAAATCCCTTCCGCTATGGATTCC  
 CAACTATCAACAGTCCCTCAGCTGGCCAACCTATAAATGCAAAGCCATCCCAA  
 CTGCAAATGCTAAGCCCATACCAAGAACCTCCTGATCATGAAATACAAGGATCA  
 AAAGAAGCTTTGATTCAAGATTTGGAAAGAAAGCTGAAATGCAAGGACACCCT  
 TCTTCATAATGGAAATCAACGTCTAACATATGAAGAGAAGATGGCTCGCAGAT  
 TGCTAGGACCACAGAAATGCAGCTGCTGTGTTTCAAGCTCAGGATGACAGTGGT  
 GCACAAGACTCGCAGCAACACAACCTCAGAACATGCGCGACTGCAAGTTCCCTAC  
 ATCACAAGTAAGAAAGTAGATCAACCTCAAGGGGAGATGTGAATGATCAGGATG  
 CAATCCAGGAGAAAATTTTACCACCACGTTTCATTCAAGTGCCAGAGAACATG  
 TCGATTGATGAAGGAAGATTCTGCAGAATGGACTTCAAAGTGAGTGGACTGCC  
 AGCTCCTGATGTGTCATGGTATCTAAATGGAAGAACAGTTCATCAGATGATT  
 TGCACAAAATGATAGTGTCTGAGAAGGGTCTTCATTCACTCATCTTTGAAGTA  
 GTCAGAGCTTCAGATGCAGGGGCTTATGCATGTGTTGCCAAGAATAGAGCAGG  
 AGAAGCCACCTTCACTGTGCA1291GCTGGATGTCCCTTGCAAAGAACAATAAA  
 AG1321AGCACCAATGTTTATCTACAAACCACAGAGCAAAAAAGTTTTAGA13  
 66GGGAGATTTCAGTGAACTAGAATGCCAGATCTCGGCTATACCTCCACCAA  
 GCTTTTCTGGAAAAGAAATAATGAAATGGTACAATTCAACACTGACCGAATAA  
 GCTTATATCAAGATAACACT1490GGAAGAGTTACTTTACTGATAAAAGATGT  
 AAACAAGAAAGATGCTGGGTGGTATACTGTGTGTCAGCAGTTAATGAAGCTGGAG  
 TGACTACATGTAACACAAGATTAGACGTTAC1603GGCACGTCCAAACCAAAC  
 TCTTCCAGCTCCTAAGCAGTTACGGGTTCCAGCAACATTCAGCAAATATTTAG  
 CACTTAATGGGAAAGGTTTGAATGTAAAACAAGCTTTTAACCCAGAAGGAGAA  
 TTTACAGCTTTGGCAGCTCAATCTGGACTCTATGAAAGTGAAGAACTTTAATA  
 ACTTTACCAACATTTGAAAACAGCCAACCTACACCATTAGTAATATATTTGATT  
 ACATTTTTTTGAAATTAATCCATAGCTGTATTAACAGATTATGGTTTTAATTA  
 GGTAATATAGTTAATATATATTTATAATATTATTTATCCTTTGACTCTTGCAC  
 ATTCTATGTACCCCTCCGATTTGTGAAGCCTACAGGAAATCTGGGTATATGGA  
 TTTGTAAGTGCAGAAGACTATCTTAAAATACAGGATTTTAACATTTAAGTCAT  
 GCACATTTAACAATTACAGGTTATAAATTAGTATCAACTTTTTAAACACATCT  
 AATGCTTGTAAATAACGTTTACTGGTACTGCTTTCTAAATACTGTTTTACCCGT  
 TTTCTCTTGTAGGAATACTAACATGGTATAGATTATCTGAGTGTTCACAGTT  
 GTATGTCAAAGAAAATAAAATTCAAATATTTAAAACGGA



Figura 3

