

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 208**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2015 PCT/EP2015/050372**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15104403**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2015 E 15701686 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3092493**

54 Título: **Métodos para el diagnóstico o el seguimiento de distrofias musculares**

30 Prioridad:

09.01.2014 EP 14305029

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

21.11.2019

73 Titular/es:

**GENETHON (100.0%)
1 bis rue de l'Internationale
91000 Evry, FR**

72 Inventor/es:

**ROUILLON, JÉRÉMY;
SVINARTCHOUK, FEDOR;
POUPIOT, JÉRÔME y
RICHARD, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 732 208 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

Métodos para el diagnóstico o el seguimiento de distrofias musculares

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un método para el pronóstico, diagnóstico, estimación del riesgo y control de la evolución de una distrofia muscular. También se refiere a un método para evaluar la eficacia de un tratamiento de una distrofia muscular en un sujeto en necesidad del mismo.

Antecedentes de la invención

10 Las distrofias musculares son enfermedades neuromusculares devastadoras. Además de no haber cura para tales enfermedades, no hay métodos no invasivos para el diagnóstico, pronóstico, seguimiento o evaluación de la eficacia de los tratamientos para dichas afecciones. Actualmente se utilizan biopsias con aguja fina y niveles de creatina quinasa sérica. Sin embargo, las biopsias musculares reportan el estado del músculo solo en el sitio de la biopsia, y son dolorosas, invasivas y no prácticas de realizar de una forma regular. Los niveles séricos de creatina quinasa pueden variar de un día a otro en un mismo paciente, haciéndolos indicadores poco fiables de cambios musculares bajo una terapia. En particular, la creatina quinasa sérica se correlacionaría con la degradación del tejido muscular bajo los esfuerzos físicos en vez de hacerlo con el estado patológico del paciente. Por ejemplo, se ha demostrado que el nivel de este marcador disminuye tan pronto como el paciente está en una silla de ruedas.

15 Por consiguiente, se necesita un biomarcador fácil de controlar que refleje la progresión de la enfermedad en un fluido biológico fácilmente accesible.

Sumario de la invención

20 El diagnóstico de distrofia muscular ha implicado el uso de niveles de creatina quinasa en suero que aumentan significativamente por miopatía o necrosis. Dado que los niveles de creatina quinasa sérica cambian fácilmente con el movimiento o el reposo, se ha señalado que tales niveles son insuficientes para el diagnóstico o la comprensión de la progresión de la enfermedad. Los autores de la presente invención han demostrado que la presencia de una miomesina o de un fragmento de la misma, en particular de miomesina 3 o de un fragmento de la misma, en un fluido biológico de un sujeto, está asociada a una distrofia muscular. La presencia de una miomesina o de un fragmento de la misma, en particular la de miomesina 3 o de un fragmento de la misma, en un fluido biológico de un paciente con una distrofia muscular nunca ha sido publicada en la técnica anterior. Además, los resultados presentados en el presente documento muestran que, al contrario que los niveles de creatina quinasa en suero, la miomesina sérica 3 refleja el estado patológico en vez de la estimulación muscular funcional. En comparación con la creatina quinasa, la miomesina 3 o un fragmento de la misma muestra una menor variabilidad inter-individual y se correlaciona mejor con la restauración del complejo proteico y fuerza muscular asociadas a la distrofina después del tratamiento farmacológico o de terapia génica de las distrofias musculares.

35 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo biomarcador asociado con el desarrollo de una distrofia muscular, o con el riesgo de tener o desarrollar una distrofia muscular. En este documento se describe el uso de una miomesina, en particular una miomesina sérica, más en particular miomesina sérica 3, o de un fragmento de la misma, como biomarcador de distrofias musculares. La invención se refiere más en particular a un método para el diagnóstico, el pronóstico, el seguimiento de la evolución o la determinación del riesgo de tener o desarrollar una distrofia muscular, que comprende detectar la presencia o la ausencia de una miomesina, en particular miomesina 3, o de un fragmento de la misma en un fluido biológico de un sujeto, siendo la presencia de una miomesina, en particular 40 de miomesina 3, o de un fragmento de la misma, indicativa de una distrofia muscular o de un riesgo de tener o de desarrollar una distrofia muscular.

Con el progreso reciente de la farmacoterapia o de la terapia génica para las distrofias musculares, hay una necesidad creciente de biomarcadores mínimamente invasivos que puedan usarse para evaluar y vigilar la eficacia de la terapia. De hecho, para evaluar la eficacia de un tratamiento durante los estudios en animales, los investigadores tienen acceso ilimitado a diferentes tipos de biopsias o necropsias. En cambio, los ensayos en seres humanos imponen restricciones éticas que requieren métodos mínimamente invasivos para evaluar y vigilar la eficacia de la terapia. Por tanto, existe una gran necesidad de proporcionar métodos fiables y mínimamente invasivos para evaluar y vigilar la eficacia de las terapias de la distrofia muscular. Los presentes inventores muestran en este documento que el nivel de miomesina 3, o el nivel de un fragmento de la misma, se restablece en un fluido biológico de (1) ratones mdx (modelo animal de distrofia muscular de Duchenne) después de la restauración de la expresión de distrofina utilizando el salto de exón, u omisión de exón, mediado por oligonucleótidos y (2) ratones KO-SGCA en los que la expresión de α -sarcoglicano se restauró de manera estable mediante la inyección sistémica de un vector viral. Por tanto, otro objeto de la invención se refiere a un método para evaluar la eficacia de un tratamiento de una distrofia muscular, que comprende evaluar la presencia o ausencia de una miomesina, en particular de miomesina 3, o de un fragmento de una miomesina tal como 55 un fragmento de miomesina 3, o evaluar el nivel de una miomesina, en particular de miomesina 3, o de un fragmento de la misma (por ejemplo, un fragmento de miomesina 3) en un fluido biológico. En particular, el método puede

comprender comparar el nivel de la miomesina (por ejemplo, miomesina 3) o del fragmento de la misma (por ejemplo, un fragmento de la miomesina 3) con su nivel en un fluido biológico previamente recolectado del mismo sujeto. El tratamiento evaluado puede incluir, por ejemplo, un tratamiento con un agente terapéutico tal como moléculas farmacológicas, oligonucleótidos y sus derivados, tales como oligonucleótidos antisentido y sus derivados (por ejemplo, oligonucleótidos que median la omisión o salto de exón de un pre-mARN de interés) o vectores para terapia génica, o con una técnica terapéutica para la distrofia muscular.

El método de diagnóstico para la distrofia muscular de acuerdo con la presente invención permite el diagnóstico precoz y la predicción de la distrofia muscular, y por tanto es útil para el tratamiento temprano de la distrofia muscular. Además, el nuevo marcador de acuerdo con la presente invención está asociado con distrofias musculares, y puede usarse para elucidar los mecanismos de desarrollo de las distrofias musculares y el desarrollo de técnicas terapéuticas o agentes para las mismas, además del diagnóstico y la predicción de la distrofia muscular.

La invención se refiere además a un *kit* útil para implementar los métodos descritos en este documento.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un nuevo marcador para el diagnóstico de distrofias musculares como se define en las reivindicaciones anexas. El nivel del marcador en fluidos biológicos según la presente invención, en particular en suero y plasma, es bajo en un estado normal y alto en el caso de distrofias musculares. En consecuencia, el marcador es útil para el diagnóstico destinado a determinar si un paciente tiene o no distrofia muscular, la predicción del desarrollo de distrofia muscular, la detección de un agente terapéutico o la técnica para el tratamiento de la distrofia muscular, evaluación de la eficacia de un agente terapéutico o técnica para el tratamiento de la distrofia muscular, y otros fines.

De acuerdo con la presente invención, la proteína miomesina sérica, y en particular la miomesina 3, está asociada a distrofias musculares, estando en niveles muy bajos o ausentes en sujetos sanos, pero muy presente en suero de pacientes en caso de distrofias musculares.

La familia de proteínas miomesina comprende proteínas estructurales estrechamente relacionadas detectadas en la banda M del sarcómero en los músculos estriados: miomesina-1 (en *homo sapiens*, UniprotKB / Swiss-Prot número de acceso P52179 - SEQ ID NO: 23), miomesina -2 (en *homo sapiens*, UniprotKB / número de acceso de Swiss-Prot P54296 - SEQ ID NO: 24) y miomesina-3 (en *homo sapiens*, UniprotKB / Swiss-Prot número de acceso Q5VTT5 - SEQ ID NO: 1). Estas proteínas están implicadas en la estabilidad y resistencia del sarcómero durante un estiramiento intenso o sostenido (Schoenauer et al, 2008).

En una realización particular de la presente invención, la detección de una proteína miomesina o de un fragmento de la misma incluye la detección de miomesina-1, miomesina-2 o miomesina-3, o de un fragmento de miomesina-1, miomesina-2 o miomesina -3.

No ha habido ninguna publicación con respecto a ninguna correlación entre estas proteínas que están presentes en los fluidos biológicos y las distrofias musculares.

En una realización preferida, los métodos de la presente invención comprenden la detección de miomesina-3 o de un fragmento de la misma. La secuencia de miomesina 3 es conocida y se muestra en la SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden detectar o cuantificar un fragmento de miomesina 3. En una realización particular, el fragmento detectado es un fragmento C-terminal de miomesina 3, en particular un fragmento de aproximadamente 110 o 140 kDa. En algunas realizaciones, el fragmento detectado está comprendido entre los aminoácidos 350 y 1350 de la SEC ID NO: 1 o cualquier variante natural de miomesina 3, por ejemplo de fragmentos correspondientes en una secuencia que presenta al menos el 90%, preferiblemente el 95%, más preferiblemente 99% de identidad con la SEC ID N°: 1. En particular, el fragmento detectado está comprendido entre los aminoácidos 355 y 1322 de la SEC ID NO: 1 o cualquier variante natural de miomesina 3, por ejemplo, de los fragmentos correspondientes en una secuencia que presente al menos el 90%, preferiblemente el 95%, más preferiblemente el 99 % de identidad con la SEC ID NO: 1. En otra realización particular, la invención implementa la detección de un fragmento de miomesina 3 que comprende los aminoácidos 355-363 (SEC ID NO: 2), 364-380 (SEC ID NO: 3), 461-474 (SEC ID NO: 4), 539-556 (SEC ID NO: 5), 560-567 (SEC ID NO: 6), 577-596 (SEC ID NO: 7), 640-657 (SEC ID NO: 8), 695-713 (SEC ID NO: 9), 761-773 (SEC ID NO: 10), 776-795 (SEC ID NO: 11), 1008-1019 (SEC ID NO: 12), 1076-1086 (SEC ID NO: 13), 1130-1141 (SEC ID NO: 14), 1219-1228 (SEC ID NO: 15) y/o 1303-1322 (SEC ID NO: 16) de miomesina 3 como se representa en la SEQ ID NO: 1, o de cualquier variante natural de miomesina 3, por ejemplo, de fragmentos correspondientes en una secuencia que presente al menos el 90%, preferiblemente el 95%, más preferiblemente el 99% de identidad con ID SEC N°: 1. De acuerdo con otra realización, el fragmento de miomesina 3 detectado de acuerdo con la invención se selecciona como un fragmento de la proteína completa que migra en gel de SDS-PAGE en las posiciones que corresponden aproximadamente a 110 o 140 kD.

Los términos "fluido biológico" incluyen en particular sangre, suero, plasma, saliva y orina. Según una realización particular de la invención, la muestra de fluido biológico es una muestra de suero o plasma.

En una realización particular, una "distrofia muscular" o "distrofias musculares" significa distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (BMD) y distrofias musculares de cintura (LGMD), tal como la alfa-sarcoglicanopatía (LGMD2D), gamma-sarcoglicanopatía (LGMD2C), calpainopatía (LGMD2A), disferlinopatía o distrofia muscular de Miyoshi.

5 De acuerdo con la presente invención, una "muestra de referencia" puede corresponder a una muestra de fluido biológico obtenida de uno o más sujetos, preferiblemente dos o más, que no tienen una distrofia muscular. La "muestra de referencia" también puede corresponder a una muestra obtenida de uno o más pacientes que tienen una distrofia muscular. En el contexto de un método para el pronóstico de un paciente, para vigilar la evolución de la enfermedad en un paciente o para evaluar la eficacia de un tratamiento de una distrofia muscular en un paciente, la muestra de
10 referencia puede ser en particular una muestra recolectada con anterioridad de dicho paciente, en particular antes de que comience el seguimiento o la evaluación.

El objeto de la presente invención es un mamífero humano o no humano. Los mamíferos no humanos incluyen, en particular, un ratón, un primate o un sujeto canino. En una realización preferida, el sujeto es un sujeto humano. El sujeto puede presentar una predisposición a una distrofia muscular identificada gracias al análisis del genoma, o sospechada por antecedentes familiares. El sujeto también puede sufrir de una distrofia muscular ya establecida. El método de diagnóstico de la presente invención también puede aplicarse a un sujeto sin síntomas o predisposición conocidos. En algunas realizaciones, el método se aplica para el cribado masivo de niños pequeños o de recién nacidos. La presente invención también puede implementarse para la detección de miomesina 3 en hembras heterocigotas, para predecir el riesgo de dar a luz a un niño con distrofia muscular. La invención también se puede
15 usar para controlar modelos animales, en particular modelos caninos como el perro de distrofia muscular Golden Retriever (GRMD), o modelos de ratón como el ratón mdx durante la evaluación preclínica de los tratamientos.

Los inventores también han demostrado que una miomesina, en particular miomesina 3, o un fragmento de la misma, como un fragmento de miomesina 3, es útil para la detección de una distrofia muscular o para la determinación del riesgo de tener una distrofia muscular en sujetos jóvenes. Por consiguiente, en una realización en particular, el sujeto es un adulto, un adolescente o un niño, en particular un niño de 10 años de edad, o menos de 10 años, en particular menores de 5 años, en particular menores de 4 años, más en particular un niño de 3 años o menor de 3 años. En una realización, el sujeto es un sujeto humano de 3 a 10 años. En una realización, el sujeto es un recién nacido. En consecuencia, la detección de una distrofia muscular o del riesgo de tener o desarrollar una distrofia muscular se puede hacer en una etapa temprana e incluso antes de que se observen los síntomas de las enfermedades. Este marcador es también útil en sujetos jóvenes para predecir el desarrollo de distrofia muscular, cribado de un agente terapéutico o técnica para la distrofia muscular, evaluación de la eficacia de un agente terapéutico o técnica para la distrofia muscular, y otros fines.
25

En una realización particular, el método de la invención es para el diagnóstico de una distrofia muscular, o para determinar el riesgo de tener o desarrollar una distrofia muscular, que comprende detectar la presencia o la ausencia de una miomesina, en particular miomesina 3 o de un fragmento de la misma en una muestra de líquido biológico de un sujeto, siendo la presencia de una miomesina (en particular miomesina 3), o de un fragmento de la misma, indicativa de una distrofia muscular o del riesgo de tener o desarrollar una distrofia muscular.
30

La meta de la invención es, en particular, detectar la presencia o ausencia de miomesina 3 o de un fragmento de miomesina 3 en una muestra de suero de un sujeto.

40 La presencia o la ausencia de una miomesina (en particular miomesina 3) o de un fragmento de la misma puede detectarse mediante una serie de técnicas conocidas en este campo para la detección de proteínas tales como:

- ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA),
- ensayo de (inmuno) flujo lateral,
- transferencia western, y
- 45 - espectrometría de masas.

Por ejemplo, la expresión de una proteína marcadora en una muestra puede determinarse mediante inmunoensayos (técnicas de ensayo inmunológico). Específicamente, la expresión de una proteína marcadora en la muestra puede determinarse basándose en la reacción entre dicha proteína y un anticuerpo que se une específicamente a la misma. Los inmunoensayos se pueden llevar a cabo en fase líquida o en fase sólida, siempre y cuando la técnica utilizada sea convencional en este campo. Para facilitar la detección, puede ser preferible el uso de una fase sólida. Además, las técnicas de inmunoensayo no están limitadas, y el inmunoensayo se puede realizar mediante un ensayo de tipo sandwich, un ensayo competitivo, transferencia western, o ELISA, así como un ensayo directo en fase sólida. Cualquier anticuerpo que sea capaz de unirse específicamente a una miomesina, en particular miomesina 3, o a un fragmento de la misma, y más particularmente a un fragmento C-terminal de miomesina 3, puede usarse en inmunoensayos de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, el fragmento detectado está comprendido entre los aminoácidos 350 y 1350 de la SEC ID NO: 1 tal como se proporcionó anteriormente (siendo el fragmento en particular una secuencia que comprende o consiste en una o más de la SEC ID NO: 2 a la SEC ID NO: 16) o de cualquier variante natural de miomesina 3. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal.
50

Alternativamente, puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o Fv capaz de unirse a un epítipo de una proteína marcadora. Cuando se usan un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario, ambos pueden ser anticuerpos monoclonales. Alternativamente, el anticuerpo primario o el secundario pueden ser un anticuerpo policlonal. Se puede preparar un anticuerpo por un método conocido en la técnica, o se puede usar un anticuerpo disponible comercialmente, como el anticuerpo anti-miomesina 3 de Proteintech, que es un anticuerpo policlonal de conejo contra los 325 aminoácidos C-terminales de la miomesina 3 o puede usarse un anticuerpo disponible comercialmente, tal como anti-miomesina 2 de Santa Cruz (anticuerpo miomesina-2 (H-65): sc-50435) contra el mapeo de aminoácidos 913-977 dentro de una región interna de miomesina-2 de origen humano.

Alternativamente, la expresión de una proteína marcadora puede ser determinada por espectrometría de masas (MS) y comprende la identificación de proteínas midiendo la proporción entre masa y carga (m/z) de los péptidos obtenidos a partir de su digestión enzimática (MS) o de sus fragmentos (MS/MS). Las m/z de los péptidos así generados se comparan después con los valores m/z calculados de secuencias de proteínas presentes en las bases de datos que permiten la identificación de proteínas. De acuerdo con una realización particular, el enfoque de monitorización de la reacción múltiple (MRM) se puede usar en la presente invención para permitir la detección cuantitativa y/o cualitativa de los péptidos en fluidos biológicos.

Según otro aspecto, la invención se refiere a un método para controlar una progresión de distrofia muscular. En este caso, el método puede comprender la etapa de cuantificar el nivel de una miomesina, en particular miomesina 3, o de sus fragmentos a un tiempo T1 en el sujeto, siendo un nivel más alto a un tiempo T2 después de T1 indicativo de una progresión de la enfermedad y siendo una expresión a T2 inferior o igual indicativa de una remisión o estabilización. La evolución del nivel de miomesina o de un fragmento de la misma, en particular el nivel de miomesina 3 o de fragmentos de miomesina 3, se puede también comparar con una muestra de referencia de un paciente de una edad equivalente que tenga una distrofia muscular.

Según otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar la eficacia de un tratamiento de la distrofia muscular. En este caso, el método puede comprender la etapa de cuantificar el nivel de la proteína miomesina (por ejemplo, miomesina 3) o de un fragmento de la misma a un tiempo T1 en el sujeto, siendo indicativo de un tratamiento eficiente un nivel inferior en un tiempo T2 después de T1, mientras que una expresión mayor o igual en T2 es indicativa de un tratamiento ineficiente o de un tratamiento menos eficiente. La evolución del nivel de miomesina (por ejemplo, miomesina 3) o fragmento de miomesina (por ejemplo, fragmento de miomesina 3) también se puede comparar con una muestra de referencia de un paciente de una edad equivalente que tenga una distrofia muscular. Un nivel más bajo en el sujeto que en la muestra de referencia es indicativo de un tratamiento eficiente de la distrofia muscular.

Por "nivel de expresión más alto" o "nivel de expresión más bajo" se entiende un nivel de expresión cuya variación es significativa, de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Ambos métodos para vigilar una progresión de la distrofia muscular y para determinar la eficacia de un tratamiento de distrofia muscular pueden implicar el uso de un método cuantitativo para determinar el nivel de una proteína miomesina (por ejemplo, miomesina 3) o de un fragmento de la misma, como ELISA o Espectrometría de masas MRM. Además, ambos métodos incluyen la recolección de muestras en diferentes momentos (por ejemplo, las recolecciones se realizan en diversos días/semanas/meses). Además, en el método para determinar la eficacia de un tratamiento, tanto la primera como la segunda muestras se pueden recolectar después de que el paciente haya recibido el tratamiento (por ejemplo, la primera muestra se recoge después del tratamiento, el mismo día del tratamiento) o diversos días/semanas/meses después del tratamiento, y la segunda muestra se recolecta varios días/semanas/meses después de la recolección de la primera muestra).

La expresión diferencial de diferentes miomesinas en las fibras musculares (MYOM3 se encontró principalmente en las fibras de velocidad intermedia (tipo IIa) del músculo esquelético, mientras que las fibras rápidas expresan más MYOM2 y MYOM1 se expresa en todas las fibras musculares (Schoenauer et al, 2008)) implica una posibilidad de seguir los resultados del tratamiento terapéutico para cada tipo de fibras musculares. Por consiguiente, se proporciona aquí un método para el seguimiento del resultado de un tratamiento terapéutico de una distrofia muscular, que comprende detectar la ausencia o la presencia, y/o el nivel de al menos una proteína miomesina seleccionada entre miomesina 1, miomesina 2 y miomesina 3, en un fluido biológico de un sujeto, en particular la detección de la ausencia o la presencia de las tres proteínas, para determinar así el impacto del tratamiento en cada tipo de fibras musculares.

Además, el diagnóstico, el pronóstico, la vigilancia, la determinación del riesgo de tener o desarrollar la enfermedad o la determinación de la eficacia del tratamiento se pueden confirmar en una etapa adicional mediante métodos conocidos en la técnica para la evaluación de distrofias musculares, tales como determinando los niveles de creatina quinasa en suero, buscando marcadores específicos en biopsias musculares, etc.

También se describe un *kit* para el diagnóstico, el pronóstico, la vigilancia o la determinación del riesgo de tener o desarrollar una distrofia muscular o la determinación de la eficacia de un tratamiento de una distrofia muscular, que comprende medios para detectar o dosificar una proteína miomesina, en particular miomesina 3, o un fragmento de la misma en una muestra de fluido biológico de un sujeto. En una realización particular, el *kit* comprende medios para implementar un análisis ELISA o de transferencia western. Por ejemplo, el *kit* comprende un medio específico para

detectar una proteína miomesina, como miomesina 3, o un fragmento de la misma, tal como un anticuerpo como el descrito anteriormente. El *kit* también puede comprender instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona también métodos para el diagnóstico o pronóstico de una distrofia muscular, para vigilar tal distrofia muscular, para determinar el riesgo de tener o de desarrollar una distrofia muscular, o para determinar la eficacia de un tratamiento contra una distrofia muscular, que comprende detectar en un fluido biológico de un sujeto la ausencia o la presencia de al menos una proteína seleccionada entre las expuestas en las tablas 2 y 3 de los ejemplos que se presentan a continuación.

La presente invención se describirá ahora con referencia a las siguientes figuras y ejemplos.

Leyendas de las figuras.

10 Figura 1: Análisis de Miomesina 3 en sueros de sujetos sanos y pacientes con DMD mediante transferencia western. Los anticuerpos contra la parte C-ter de miomesina-3 revelaron la presencia de fragmentos de 140 kDa y 110 kDa exclusivamente en muestras de suero de pacientes con DMD que se correlacionan con el análisis de espectrometría de masas LC/MS/MS.

15 Figura 2: Análisis de Miomesina 3 en sueros de perros y ratones mediante transferencia western. El análisis de transferencia western de sueros de modelos animales de DMD (perro GRMD y ratón mdx) reveló la presencia de la miomesina-3 exclusivamente en sueros de los animales afectados.

20 Figura 3: Análisis de Miomesina 3 y CK en sueros de ratones de un día de edad sanos y mdx mediante transferencia western. Se usó suero de 5 ratones sanos y 5 mdx en este experimento. Los fragmentos de miomesina-3 son detectables en el nivel bajo en los cinco mdx ensayados. Es importante destacar que no existe una correlación entre el nivel de CK y el nivel de Miomesina 3 en los animales estudiados: se detectó CK en todas las muestras, mientras que la de Miomesina 3 solamente se detectó en ratones mdx. Además, algunos ratones sanos demostraron un nivel de CK más alto en comparación con los ratones mdx de "CK de bajo nivel" (ver ratones sanos 3 y 5 y ratones mdx 2 y 5).

25 Figura 4: Análisis de Miomesina 3 y CK en sueros de ratones mdx y sanos a diferentes edades mediante transferencia western. El análisis de MYOM3 y la creatina quinasa se realizó mediante western blot en sueros de 10 testigos sanos y 10 ratones mdx. Se tomaron muestras cada semana a partir de 1 semana de edad. Las cruces grises indican que no había suero disponible para estos ratones.

30 Figura 5: Nivel constante de Miomesina 3 y nivel variable de CK en sueros de ratones mdx y sanos después del ejercicio físico. El análisis de MYOM3 y creatina quinasa se llevó a cabo mediante transferencia western en sueros de dos grupos de ratones (testigos sanos y mdx). Seis ratones de 3 meses de edad fueron sometidos a un ejercicio físico intenso en una cinta sin fin. Las muestras de suero se recogieron 7 días antes del ejercicio y 3 h, 24 h y 48 h después del ejercicio.

35 Figura 6: Fragmentos de MYOM3 en sueros de pacientes con LGMD2D. Panel superior: análisis de transferencia western de MYOM3 en sueros de pacientes con LGMD2 (1-3) y controles (4-5). Panel inferior: ensayos de CK en los mismos sueros. La actividad se midió en unidades del sistema internacional por litro (U/L).

40 Figura 7: Nivel constante de fragmentos de MYOM3 en suero de ratones KO-Sgca después del ejercicio físico. Análisis de transferencia western de sueros MYOM3in de un grupo de ratones KO-Sgca en el momento de la prueba Escape ("Escape") (D0: 6 días antes del ejercicio, D6: 20 min después del ejercicio y D7: 24 horas después del ejercicio). "Descanso": los mismos tiempos para el grupo testigo de ratones no sometidos a ejercicio físico (n = 3). El nivel del MYOM3 se mantiene estable en todo momento.

45 Figura 8: La terapia génica de ratones KO-Sgca reduce el nivel de fragmentos de MYOM3 en el suero. Los ratones se inyectaron sistémicamente con PBS o bien con 1e11 vg o 5e11 vg de rAAV que codifica el alfa-sarcoglicano humano wt (n = 6 para cada grupo), los días 14 y 56 después de las inyecciones se tomó suero para el análisis de CK y MYOM3. Antes del punto final del experimento (56 días después de la inyección, a la edad de 90 días), se estimó la fuerza muscular mediante la prueba de escape. En el punto final, se sacrificaron los ratones y las secciones transversales del músculo gastrocnemio anterior se caracterizaron por tinción con HPS y la presencia de SGCA se analizó con anticuerpos contra SGCA. **A:** Panel superior: análisis de transferencia western de MYOM3 y CK 14 días después del tratamiento con rAAV. Se presentan dos análisis representativos para cada grupo. "Panel inferior": Representación gráfica de los niveles de MYOM3 y CK en cada grupo 14 días después del tratamiento con rAAV. Cada punto en la gráfica corresponde a un animal. **B:** Panel superior: análisis de transferencia western de MYOM3 y CK 56 días después del tratamiento con rAAV. Se presentan dos análisis representativos para cada grupo. Panel inferior: Representación gráfica del nivel de MYOM3 y CK en cada grupo 56 días después del tratamiento con rAAV. Cada punto en la gráfica corresponde a un animal. **C:** caracterización histoquímica de los músculos gastrocnemios anteriores de ratones tratados y de testigos 90 días después de la inyección de rAAV. **D:** correlación entre el nivel sérico de los fragmentos de MYOM3 y la fuerza muscular después del tratamiento con terapia génica. Las gráficas

muestran las relaciones entre MYOM3 y la fuerza muscular y entre CK y la fuerza muscular. El nivel de los fragmentos de MYOM3 está en buena correlación con la restauración de la morfología muscular y la fuerza física.

5 Figura 9: Fragmentos de MYOM3 en suero de otras enfermedades musculares. El análisis de MYOM3 se realizó mediante transferencia western en sueros de modelos de ratones para diferentes distrofias (KO-*Sgca*, MDX, KO-*Dysf*, KO-*Capn3* y KO-*Sgcg*) y testigos (C57B16) a la edad de 4 semanas y 6 meses. El alto nivel de fragmentos de MYOM3 se encontró en ambas edades en ratones MDX, KO-*Sgca* y KO-*Sgcg*, mientras que en KO-*Dysf* estos fragmentos eran apenas detectables a la edad de 1 mes y alcanzaron su máximo a la edad de 6 meses. Solo se detectó un débil marcaje del fragmento MYOM3 en ratones KO-*Capn3*.

10 Figura 10: Lista de péptidos de Miomesina-3 identificados por espectrometría de masas en sueros de 4 pacientes con DMD. Solamente se muestran los péptidos con una puntuación iónica superior a 30 al menos en un paciente con DMD.

Figura 11. Análisis de transferencia western de MYOM3 en sueros de subgrupos de pacientes con DMD jóvenes (G1) y mayores (G3), así como en sujetos sanos jóvenes (G3) y mayores (G4). A: exposición normal; B: aumento de la exposición. Para una explicación de los grupos y subgrupos, véase la Tabla 1. Se cargaron en cada pocillo cincuenta microgramos de proteínas séricas.

15 Figura 12. Niveles de expresión de los fragmentos de suero MYOM3 (A) y CK (B) en los sueros de toda la cohorte de US, incluyendo 39 pacientes con DMD jóvenes y 17 mayores, así como 29 controles sanos jóvenes y 18 mayores. Para medir los niveles de los fragmentos MYOM3, se analizaron 50 µg de proteínas séricas mediante transferencia western, luego se cuantificaron las intensidades de la banda y se expresaron en unidades arbitrarias (a. u.: arbitrary units). La actividad de la enzima CK en suero se expresa en unidades internacionales por litro (IU/L). (C) Análisis de regresión lineal entre los niveles séricos de los fragmentos MYOM3 y CK para pacientes jóvenes. (D) Análisis de regresión lineal entre los niveles séricos de los fragmentos MYOM3 y CK para pacientes mayores con DMD.

20

Figura 13. Los fragmentos de MYOM3 están específicamente presentes en sueros de modelos animales de DMD. **A:** análisis de transferencia western de suero de perros GRMD y sanos. GRMD nº 1-4: dos meses de edad; nº 5-6: 18 meses de edad. Sanos nº 1-4: dos meses de edad; nº 5-6: perros de 18 meses. DMD: suero control de paciente con DMD. **B:** análisis de transferencia western de suero de ratones *mdx* y WT de 6 meses de edad. WT: cepa C57/BL10.

25

Figura 14. A: Análisis de transferencia western de los fragmentos MYOM3 en suero de 3 pacientes con LGMD2D (el nº 1 es de 35 años de edad, el nº 2 es de 23 y el nº 3 es de 24 años). Se utilizó suero de 2 pacientes con DMD (grupo G1) y 3 individuos sanos (grupo G4) como controles. B: análisis de transferencia western de los fragmentos de MYOM3 en suero de modelos de ratón de diferentes distrofias musculares a las edades de 1 y 6 meses. WT: ratón C57BL/6J; *mdx* (modelo para DMD); KO-*Sgcg*: modelo para LGMD2C; KO-*Sgca*: modelo para LGMD2D; KO-*Dysf*: modelo para LGMD2B; KO-*Capn3*: modelo para LGMD2A.

30

Figura 15. Niveles de los fragmentos MYOM3 (A, B) y CK-M (C, D) en suero de ratones sanos (B, D) y ratones *mdx* (A, C) a diferentes edades según se estima por análisis de transferencia western. La intensidad de las bandas (en unidades arbitrarias, a. u.) en diferentes geles se normalizó mediante las respectivas bandas del control positivo (50 µg de proteínas séricas del mismo ratón *mdx* presente en cada gel). Se utilizaron cincuenta microgramos de proteínas séricas para el análisis. La edad 0 corresponde a ratones recién nacidos. La estimación del nivel de CK-M por análisis de transferencia western se correlacionó bien con la actividad de CK (Figura 20).

35

Figura 16. Niveles de los fragmentos MYOM3 (A, B) y CK-M (C, D) en suero de ratones sanos (B, D) y *mdx* (A, C) en diferentes momentos después del ejercicio físico estimados por análisis de transferencia western. La intensidad de la banda en diferentes geles se normalizó mediante las bandas respectivas del control positivo (50 µg de proteínas séricas del mismo ratón *mdx* presente en cada gel). Se utilizaron para el análisis cincuenta microgramos de suero de ratón.

40

Figura 17. Efecto de la terapia de salto de exón mediado por oligonucleótidos antisentido en ratones *mdx* sobre los niveles séricos de los fragmentos MYOM3 y CK-M. Cuatro ratones *mdx* de 12 semanas de edad recibieron en la vena de la cola una sola inyección de 12,5 mg/kg de Pip6a-PMO. Las muestras de sangre de los ratones *mdx* inyectados se recogieron a las 14, 16 y 20 semanas de edad (2, 4 y 8 semanas después de la inyección) y de los ratones de control a las 14 y 20 semanas de edad. Los niveles de los fragmentos MYOM3 y CK-M se estimaron mediante análisis de transferencia western.

45

Figura 18. Comparación de diferentes ensayos para el seguimiento del tratamiento de terapia génica en ratones KO-*Sgca*. **A:** Análisis histológicos (panel superior: tinte Hematoxilina Floxina Azafrán; panel inferior: inmunodetección de α-sarcoglicano) de los músculos gastrocnemios después del tratamiento con dosis crecientes de rAAV que codifica huSgca (1e11, 5e11 y 1e12 vg). **B:** Análisis cuantitativo de fibras positivas de α-sarcoglicano después de los tratamientos. **C:** Restauración de la fuerza muscular (prueba de escape) 83 días después del tratamiento. **D:** Suero CK y **E:** niveles de fragmentos MYOM3 en distintos momentos después del tratamiento (media ± SEM). **F:** Valores de P sin procesar (prueba de la t de Student) para la comparación de los niveles de MYOM3 y CK entre diferentes grupos de ratones en distintos momentos. Los valores por debajo del umbral 0,01 están en rosa y por debajo de 0,05 están

50

55

en amarillo. KO_PBS, KO_1e11, KO_5e11, KO_1e12: ratones KO-Sgca inyectados con PBS o la dosis respectiva del vector. Ratones de control WT_PBS: C57BL/6J inyectados con PBS. Los niveles de los fragmentos MYOM3 y CK-M se estimaron cada dos semanas por análisis de transferencia western.

5 Figura 19: Correlación entre los niveles de los fragmentos de MYOM3 (A) o CK-M (B) en suero con fuerza muscular evaluada por la prueba de escape. KO_PBS, KO_1e11, KO_5e11, KO_1e12: ratones KO-Sgca inyectados con PBS o la dosis respectiva del vector. WT_PBS: ratones C57BL/6J de control inyectados con PBS. Los niveles de los fragmentos MYOM3 y CK-M se estimaron mediante análisis de transferencia western 78 días después de la inyección. Dpi: días después de la inyección.

10 Figura 20: Correlación entre la CK-M medida por transferencia western (a. u.) y su actividad enzimática (IU/L). El nivel de CK se midió mediante dos métodos en suero de ratones *mdx* antes y en diferentes momentos después de los ejercicios físicos. Se utilizaron tres ratones y cuatro valores del tiempo para construir el gráfico.

15 Figura 21: Efecto del ejercicio físico sobre el nivel de los fragmentos MYOM2 en suero de ratones *mdx*. Las muestras de suero se tomaron 7 días antes y 3, 24 y 48 horas después del ejercicio. Panel superior: análisis de transferencia western con anticuerpos anti-Myom2; panel inferior: cuantificación de la expresión de myom2. MYOM2: posición de los fragmentos myom2. Se utilizó un microlitro de suero para el análisis.

Ejemplos

Ejemplo 1.

Materiales y métodos.

Agotamiento del suero.

20 Usando las instrucciones del fabricante, se agotaron 10 microlitros de suero (6 donantes sanos y 4 pacientes con DMD) con una columna de agotamiento por afinidad que elimina selectivamente 12 de las proteínas más abundantes (kit "Proteome purify 12" de R&D System). Después se precipitaron 300 μ l de solución agotada, con 4 volúmenes de acetona al 100% durante la noche a 4 °C, seguido de centrifugación a 14000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 50 μ l de tampón que contenía urea 6M/tiourea 2M y la concentración de proteína se determinó mediante el ensayo de Bradford.

25

Análisis de espectrometría de masas (LC-MS / MS).

30 Se ajustó un volumen de suero que contenía diez microgramos de proteínas a 120 μ l de la mezcla de reacción que contenía urea 4 M, tiourea 1,5 M y tris-HCl 50 mM, pH 8,3. Las proteínas se redujeron con ditiotreitól 10 mM durante 30 min y luego se alquilaron con yodoacetamida 55 mM durante 20 min. Las proteínas alquiladas se digirieron primero con 500 ng de endopeptidasa lys-C (Wako) durante 3 horas a temperatura ambiente (RT). Luego, la mezcla se diluyó con 3 volúmenes de agua MilliQ y se trató con 500 ng de tripsina (Sequenece Grade Trypsin, Promega) durante 16 horas a temperatura ambiente. La actividad enzimática se detuvo mediante la adición de ácido fórmico hasta una concentración final del 3%. Las muestras se almacenaron a -20 ° C hasta su uso.

35 La mezcla de péptidos se desaló utilizando una punta de pipeta ZipTip μ -C18 Pipette Tip (Millipore) y se separó con un sistema Easy nano-LC Proxeon (Thermo Fisher Scientific) equipado con una columna de fase inversa C18 (Easy-Column Proxeon C18, L 10 cm, ID 75 μ m, 120 Å) con los siguientes parámetros: flujo 300 nl/min, aumento del gradiente a partir de 95% de disolvente A (0,1% de ácido fórmico) a 25% de B (100% de acetonitrilo, 0,1% de ácido fórmico) en 20 minutos, luego al 45% de B en 40 min y finalmente al 80% de B en 10 min. Los eluatos fueron monitorizados por un espectrómetro de masas LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) en modo de barrido iónico completo a una resolución de 30.000 y un rango de masa de 400-1.800 m/z. El espectrómetro de masas se hizo funcionar de forma dependiente de los datos, seleccionando los 20 iones precursores más intensos con una exclusión dinámica de 15 segundos (ancho de aislamiento de 1 Da y activación de 0,250 durante 10 ms) para la fragmentación secuencial por disociación inducida por colisión (energía de colisión del 40%).

45 Los datos se procesaron con el software Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher scientific) acoplado a un servidor de búsqueda Mascot interno (Matrix Science, versión 2.3.2) utilizando la base de datos SwissProt y los siguientes parámetros: especie humana/ratón/perro, tolerancia de masa de 10 ppm para iones precursores o 0,6 Da para fragmentos, y dos sitios de escisión perdidos. Las modificaciones químicas parciales, como la oxidación de metionina y la carbamidometilación de la cisteína, se tuvieron en cuenta para las consultas. La tasa de descubrimiento falso se estimó utilizando un planteamiento de búsqueda de base de datos invertida.

50 Construcción y producción de vectores.

Se obtuvo un plásmido que lleva la secuencia de codificación de α -sarcoglicano humano del Dr. Jeng-Shin Lee (HGT1, Harvard). Fue utilizado para construir los plásmidos pAAV.Des. SGCA 142T que consisten en un vector derivado de

pSMD2 basado en AAV (Snyder, 1997) en donde el α -sarcoglicano humano se pone bajo el control de un promotor de desmina humano y 4 repeticiones de las secuencias diana miR-142-3p descritas en Brown et al, 2006. Los plásmidos se prepararon utilizando el kit Nucleobond PC2000EF de Macherey-Nagel (Alemania). La integridad de los constructos fue confirmada por secuenciación. Las preparaciones virales de AAV2/8 libres de adenovirus se generaron empaquetando genomas recombinantes de AAV2-ITR en cápsidas de AAV8 utilizando un protocolo de transfección de tres plásmidos (Bartoli, 2006). Después de la extracción de ADN mediante tratamientos sucesivos con ADNasa I y proteinasa K, los genomas virales se cuantificaron mediante un ensayo de PCR en tiempo real TaqMan utilizando cebadores y sondas correspondientes a la región ITR y al gen de la albúmina (Alb) para la normalización de los datos en todas las muestras. Los pares de cebadores y las sondas TaqMan MGB utilizados para la amplificación de ITR fueron: 1AAV65/Fwd: $5'$ -CTCCATCACTAGGGGTTCTTGTGTA $_3$ (SEC ID NO: 17), 64AAV65/rev: $5'$ -TGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGC $_3$ (SEQ ID NO 18) y AAV65MGB/taq: $5'$ -GTTAATGATTAACCC $_3$ (SEC ID NO: 19). Los pares de cebadores y las sondas MGB TaqMan utilizadas para la amplificación de Alb fueron: ALB.Fwd: $5'$ -GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT $_3$ (SEQ ID NO 20), ALB.Rev: $5'$ -ACTCATGGGCTCTGCTGGTTC $_3$ (SEC ID NO: 21) y AlbVic/taq: $5'$ -CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC $_3$ (SEC ID NO: 22).

15 Modelos animales, muestreo de sangre y administración de vectores.

Las cepas de ratones incluidas en este estudio se muestran en la Tabla 1. Todos los procedimientos en animales se realizaron de acuerdo con la directiva del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC) del Consejo de las Comunidades Europeas y fueron aprobados por el comité de ética de Genethon con el número CE12-034. Los ratones C57BL/6 se adquirieron en Charles River Laboratories (Les Oncins, Francia). Se obtuvieron ratones Sgca_nulos (KO-Sgca) y se criaron en las instalaciones para animales de Genethon. Los ratones se manipularon de acuerdo con los requisitos de bioseguridad A1 de acuerdo con las directrices europeas para el uso de animales de experimentación. Todos los experimentos se realizaron en consecuencia para minimizar el sufrimiento de los animales. Antes de la extracción de sangre, los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina/xilazina. Los ratones anestesiados se sacrificaron por alargamiento cervical al final de los experimentos.

25 Todos los protocolos experimentales de transferencia de genes se realizaron en ratones macho de 4 semanas de edad. Las administraciones sistémicas se realizaron mediante inyecciones en la vena de la cola de 500 μ l de solución que contenía diferentes cantidades de rAAV (genoma viral (vg) $1e11$ o $5e11$ /ratón) o solución salina tamponada con fosfato (PBS; Gibco, Life Technologies). Se tomaron muestras para el análisis en los días 14 y 56 después de la inyección. La sangre se recogió mediante punción retro-orbital de animales anestesiados.

30 Tabla 1: Características principales de las cepas de ratones de modelos de distrofia muscular.

Nombre	Nombre oficial	Mutación	Referencia	Localización
KO-Capn3	B6-Capn3 ^{tm2.1Gnt}	delección parcial fuera de marco de KO – CAPN3	Laure, et al. ; FEBS J.2009	GNT
KO-Dysf	B6.A-Dysf ^{prmd/J}	transposón de inserción	Lostal et al.; Hum. Mol. Genet. 2010	GNT
KI-FKRP	B6;129-FKRP ^{tm1Gnt}	KI – FKRP L276I		Cerfe
KO-Sgca	B6-Sgca ^{tm1Kcam}	delección parcial fuera de marco KO – SGCA	Duclos et al.; J. Cell Biol. 1998	GNT
KO-Sgcg	B6-Sgca ^{tm1Kcam}	delección parcial fuera de marco KO – SGCG	Hack AA, et al.; J. Cell Biol. 1998	GNT
MDX	B6Ros.Cg-Dmd ^{mdx-4Cv/J}	transición C a T en posición 7916 (exón DYS 53)	Chapman VM, et al.; PNAS. 1989	Charles River Labs.
WT	C57B1/6			Charles River Labs.

Ejercicio físico.

35 Dos grupos (controles sanos y mdx) de seis ratones de 3 meses de edad se pusieron en una cinta sin fin para correr con una inclinación hacia abajo de 15° a la velocidad de 8 m/min durante 5 min, seguido de 12 m/min durante 25 min. Las muestras de suero se recogieron 7 días antes del ejercicio y 3 h, 24 h y 48 h después del ejercicio, y se almacenaron a -80 °C.

Envejecimiento.

40 Se recogieron muestras de suero de 10 controles sanos y 10 ratones mdx de 1 semana a 4 semanas de edad cada semana, y se almacenaron a -80 °C. Se recogieron muestras de suero de ratones de 1 día de edad (5 controles sanos o 5 mdx) después de la eutanasia.

Prueba de escape.

La fuerza muscular del ratón se evaluó mediante la "prueba de escape" (Carlson, 1990). Los ratones se pusieron en una plataforma frente a la entrada de un tubo de 30 cm de longitud. Se envolvió un manguito alrededor de la cola y se conectó a un transductor de fuerza fijo. En respuesta a un suave pellizco de la cola, los ratones intentaron escapar dentro del tubo. Esto se evitó al unir la cola al transductor de fuerza y se registró un pico de fuerza corto. Se reportan el pico máximo y el promedio de los cinco picos más altos normalizados al peso corporal del animal. Los sueros se obtuvieron de muestras de sangre mediante punción retroorbital de animales anestesiados. Todos los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de colorante azul de Evans (EBD) (1 mg/g de peso corporal) 5 horas después de la prueba. Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la inyección de EBD y los músculos TA se retiraron y se congelaron rápidamente en isopentano enfriado con nitrógeno líquido.

Medida de la actividad de la creatina quinasa sérica.

La actividad de la creatina quinasa (CK) en suero se midió utilizando los portaobjetos VITROS CK (Ortho-Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson).

Análisis de transferencia western.

Las muestras de proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE (gradiente de 4 a 12%, NuPAGE Novex Bis-Tris Gel 1,0 mm, Life Technologies), y se transfirieron a una membrana de transferencia Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore). Se cargaron cincuenta microgramos de proteína de suero humano, de perro o de ratón, por línea. Un anticuerpo policlonal de conejo (pAb) contra Miomesina-3 (1:1000; 17692-1-AP: Proteintech) y un anticuerpo policlonal de cabra contra humano CK-M (N-13, 1/500, Santa Cruz) se utilizaron como anticuerpos primarios, seguido de anticuerpos conjugados IRDye-800CW (1:10.000) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (LI-COR Biosciences). La fluorescencia infrarroja de los anticuerpos secundarios se leyó en un sistema de imágenes Odyssey (LI-COR Biosciences). Los patrones de proteínas Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad) se utilizaron como marcadores de peso molecular. Las intensidades de banda se midieron con el software de aplicación Odyssey (LI-COR Biosciences, versión 2.1).

Histología e inmunotinción.

Se prepararon criosecciones (8 μ m de espesor) a partir de músculos congelados. Las secciones transversales se procesaron para la tinción con hematoxilina-floxina-azafrán (HPS) e inmunotinción con α -sarcoglicano.

Para la inmunodetección colorimétrica de α -sarcoglicano, se rehidrataron con PBS durante 5 min criosecciones transversales no fijadas y después se incubaron con H₂O₂ durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA) para inhibir las peroxidasas endógenas. Después de lavar con PBS, las secciones se bloquearon con PBS/suero de cabra al 10% durante 30 min y después se incubaron con una dilución 1/1000 de un anticuerpo primario policlonal de conejo dirigido contra los aminoácidos 366 a 379 de la secuencia de α -sarcoglicano humano (AC-ahSarco57) de 1 a 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) diluida 1/200 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron 3 veces con PBS y luego se incubaron con diaminobencidina diluida (DAB; DAKO) durante 2 - 5 min. Luego, las secciones se trataron sucesivamente con etanol (5 min), dos veces en xileno (5 min), se montaron con Eukkit (Labonord, Francia) y se visualizaron en un microscopio Nikon.

Resultados.

Distrofina.

Identificación de fragmentos de miomesina 3 en sueros de pacientes con DMD mediante espectrometría de masas.

El análisis de espectrometría de masas (LC-MS/MS) de 4 pacientes con DMD y 6 controles sanos reveló la presencia de miomesina 3 exclusivamente en las muestras de DMD. Se detectaron péptidos que coinciden con la miomesina-3 en 3 de 4 pacientes con DMD (Figura 10). Aparte de los 300 primeros aminoácidos, los péptidos se distribuyeron a lo largo de la proteína miomesina-3 (Figura 10).

La miomesina 3 es una proteína estructural de 162 kDa localizada en la línea M del sarcómero en los músculos esqueléticos estriados. Pertenece a la familia de la miomesina, que comprende además miomesina 1 y miomesina 2 (proteína M). Estas proteínas están compuestas principalmente por dominios similares a inmunoglobulina y fibronectina (un dominio N-terminal único, dos dominios Ig (Ig2-3), 5 dominios Fn (Fn4-8) y 5 dominios Ig C-terminales (Ig9-13). Se ha demostrado que se unen a la miosina por su terminal N y a la titina por su parte central y que se dimerizan por su terminal C. También se ha publicado una unión de la proteína M y la miomesina con la creatina quinasa. La miomesina 3 se encuentra en el músculo esquelético y parece expresarse específicamente en las fibras del tipo intermedio y, en menor medida, en las fibras lentas. Estas proteínas están implicadas en la estructura del

sarcómero permitiendo el anclaje de la miosina y la titina a la línea M. También permiten que los sarcómeros resistan las tensiones mecánicas gracias a sus propiedades elásticas.

Presencia de fragmentos de miomesina 3 en el suero de pacientes con distrofia muscular de Duchenne.

5 El análisis de transferencia western con anticuerpos contra la parte C-terminal de miomesina 3 mostró la presencia de dos fragmentos de 110 kDa y 140 kDa en los sueros de pacientes con distrofia de Duchenne (Fig. 1). Estos fragmentos fueron indetectables en todos los sujetos sanos. Hasta ahora han sido analizados cinco pacientes con distrofia muscular de Duchenne.

Presencia de fragmentos MYOM3 en sueros de perros GRMD.

10 El análisis de transferencia western de sueros del modelo canino de DMD (perro GRMD) reveló la presencia de dos bandas que migran en las mismas posiciones que los fragmentos C-ter de MYOM3 humano (Fig. 2). Ha sido evaluado un total de 40 perros GRMD y 30 controles sanos de una edad de 40 días a 1 año y medio. Estos fragmentos estaban presentes exclusivamente en sueros de todos los animales afectados.

Presencia de fragmentos MYOM3 en sueros de ratones mdx.

15 La presencia de los fragmentos MYOM3 se analizó en ratones de una edad de 1 semana a 1 año mediante análisis de transferencia western. Los fragmentos se detectaron en todos los ratones mdx a todas las edades ensayadas (de 1 día a 6 meses: Figs. 3, 4 y 10) y estaban ausentes en los controles sanos (aproximadamente se analizaron un total de 100 mdx y 100 ratones testigo). Es interesante indicar que el nivel de MYOM3 en los sueros aumentó progresivamente con el envejecimiento del ratón y no se correlacionó con el momento de la fase aguda de la necrosis muscular, que ocurre generalmente entre las tres y las cuatro semanas de edad, seguida de una aparente estabilización del fenotipo del ratón. La cinética del nivel de creatina quinasa es bastante diferente de la de MYOM3: en primer lugar, hay variaciones sustanciales entre individuos en el nivel de CK; en segundo lugar, el nivel elevado de CK ya se vio en el nacimiento (1 día de edad), pero a una semana de edad no se detectó CK, aumentando nuevamente a las 2 semanas y aumentando más a las 4 semanas (Fig. 3, 4). Es importante destacar que el nivel de CK al nacer puede ser mayor en los controles sanos en comparación con los ratones mdx (Fig. 2).

25 La similitud en los tamaños de los fragmentos de MYOM3 entre especies diferentes podría implicar mecanismos similares de procesamiento de miomesina-3 en esta distrofia.

Nivel estacionario de los fragmentos MYOM3 en el suero de ratones mdx sometidos a ejercicio físico.

30 Para seguir los impactos del ejercicio físico sobre los niveles de miomesina-3 y creatina quinasa en los sueros, los ratones sanos y los ratones mdx se sometieron a una carrera cuesta abajo durante 30 min. Los 6 ratones sanos pudieron correr durante 30 minutos sin dar signos de desgaste. Por el contrario, solo 1 ratón mdx pudo completar el ejercicio (mdx n° 1) mientras que los otros se detuvieron al cabo de 10 min (2 ratones) o 15 min (3 ratones). Los fragmentos de MYOM3 estuvieron presentes en todos los momentos en el suero de ratones mdx con solo un ligero aumento de intensidad a las 24 h y las 48 h, mientras que el nivel de CK varió sustancialmente siendo al menos cuatro veces más alto 3 horas después del ejercicio en comparación con el nivel antes del ejercicio (Fig. 5). Es importante destacar que los fragmentos de MYOM3 no se detectaron en el suero de los controles sanos, mientras que la creatina quinasa se detectó en diferentes niveles en el suero de todos los ratones sanos sin una correlación notable con el ejercicio físico. En conclusión, el análisis del impacto del ejercicio (carrera en cinta sin fin) sobre la presencia de fragmentos de miomesina-3 en el suero de ratones mdx no mostró ningún aumento en estos fragmentos después del ejercicio, a diferencia del aumento en la creatina quinasa.

40 α -Sarcoglicano.

Los fragmentos de miomesina 3 están presentes en los sueros de pacientes con LGMD2D.

45 Con el fin de saber si la presencia de MYOM3 en el suero es una característica específica de los pacientes con DMD o si esta proteína se puede detectar también en el suero de pacientes con otras enfermedades musculares distróficas, se analizó el suero de 3 pacientes con LGMD2D disponibles. El análisis de transferencia western demostró que estaban presentes los fragmentos de MYOM3 del mismo tamaño que en los pacientes con DMD en los sueros de los otros tres pacientes (Fig. 6), mientras que no se vieron fragmentos en los controles sanos.

Presencia estable de fragmentos en el suero de ratones KO-Sgca sometidos a ejercicio físico (modelo α -sarcoglicanopatía).

50 La presencia de estos fragmentos se analizó mediante transferencia western en reposo y en diferentes momentos después del esfuerzo muscular (prueba de escape) (Fig. 7). El nivel de los fragmentos de MYOM3 después del ejercicio se mantuvo igual que en el reposo.

El nivel de los fragmentos de miomesina-3 en los sueros se correlaciona con la eficiencia de la transferencia de genes y la fuerza muscular del ratón.

Luego se analizó el nivel de los fragmentos de miomesina-3 en los sueros después de la terapia génica de los ratones KO-*Sgca*. Con este fin, los ratones KO-*Sgca* recibieron una inyección intravenosa con dos dosis diferentes (genomas virales $1e11$ y $5e11$ (vg)) de AAV8 que codifican α -sarcoglicano humano (SGCA) bajo el control del promotor de desmina. La eficacia de la terapia se evaluó mediante la inmunotinción de *Sgca* y por tinción con hematoxilina-floxina-azafrán (HPS) en secciones musculares 56 días después de las inyecciones de rAAV8 (Fig. 8). A la dosis baja del vector, aproximadamente el 10% de las fibras expresaron SGCA, mientras que en la dosis más alta, el 90% de las fibras fueron SGCA-positivas. La tinción con HPS confirmó la mejora de la morfología muscular con el aumento de las dosis del vector. Es importante que el nivel de fragmentos de MYOM3 en los sueros de ratones KO *Sgca* disminuyó con el aumento de la eficiencia de la transferencia de genes. Este efecto era ya visible 14 días después de la inyección de AAV y persistió después de 56 días después de la inyección. El análisis de la correlación entre la fuerza muscular del ratón medida por la Prueba del Escape y el nivel de los fragmentos de MYOM3 en suero demostró una estrecha correlación entre estos valores ($r^2 = 0,7616$). No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la fuerza muscular después de la terapia génica y el nivel de CK en el suero ($r^2 = 0,2619$) (Fig. 8).

Otras enfermedades.

Presencia de fragmentos de miomesina 3 en suero de modelos de ratón de otras distrofias.

El análisis de MYOM3 se realizó mediante transferencia western en sueros de modelos de ratones para diferentes distrofias (KO-*Sgca*, MDX, KO-*Dysf*, KO-*Capn3* y KO-*Sgcg*) y controles (C57B16) (véase la Tabla 1 para la descripción de los modelos) a la edad de 4 semanas y 6 meses. El nivel alto de fragmentos de MYOM3 se encontró en ambas edades en ratones MDX, KO-*Sgca* y KO-*Sgcg*, mientras que en KO-*Dysf* estos fragmentos eran apenas detectables a la edad de 1 mes y alcanzaron su máximo a la edad de 6 meses. Solo se detectó un ligero marcaje del fragmento MYOM3 en ratones KO-*Capn3* (Fig. 9). Es interesante indicar que entre los modelos murinos de distrofias musculares estudiados, KO-*Capn3* demostró el fenotipo más débil, lo que sugiere que el nivel en suero de miomesina 3 podría correlacionarse con la gravedad de la enfermedad. Con el fin de reforzar esta hipótesis, se evaluó el nivel de los fragmentos de miomesina-3 en ratones KI-*FKRP*, un modelo de ratón para LGMD-2I. Al contrario que la enfermedad en humanos, la mutación del gen de la proteína relacionada con la Fukutina en ratones conduce a un fenotipo muy leve sin fragmentos de miomesina 3 en el suero, confirmando así la correlación entre la gravedad de la distrofia y el nivel de fragmentos de miomesina-3 en el suero.

Ejemplo 2.

En el presente ejemplo, los autores de la presente invención han completado su estudio y muestran en particular que las proteínas de miomesina son herramientas relevantes para determinar si un paciente tiene o no distrofia muscular, la predicción del desarrollo de la distrofia muscular, el cribado de un agente terapéutico, o una técnica para detectar distrofia muscular, o para la evaluación de la eficacia de un agente terapéutico o una técnica para la distrofia muscular.

Materiales y métodos.

Colección de muestras humanas.

Los estudios en seres humanos se realizaron de acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects" (Principios éticos para la investigación médica con seres humanos). Se recogieron muestras de suero de una cohorte de 39 pacientes jóvenes con DMD (de 3 a 10 años) y 17 mayores (de 12 a 20 años), así como de 29 pacientes jóvenes (3 a 10 años de edad) y 18 individuos sanos mayores (de 12 a 20 años de edad), en el Cincinnati Children's Hospital Medical Center (cohorte de US) como parte del proyecto ADNA (Avancées Diagnostiques pour de Nouvelles Approches thérapeutiques) (http://www.institut-merieux.com/projetssante_adna.php). El protocolo de estudio y el consentimiento informado fueron aprobados por el Institutional Review Board (IRB) (Junta de Revisión Institucional) en el Centro Médico del Hospital Infantil de Cincinnati. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos antes del estudio. La realización del estudio se ajusta a todas las reglamentaciones de investigación de sujetos humanos aplicables. Las muestras de suero de 3 pacientes con LGMD2D se recolectaron en el Centro de Investigación Neuromuscular (Hospital Universitario de Tampere, Finlandia) durante la consulta estándar del centro de día. Después de la recolección, las muestras se centrifugaron dos veces inmediatamente ($10.000 \times g$, 10 min) y el suero se guardó a -80°C .

Cuantificación de proteínas y medidas de la actividad de la creatina quinasa.

La concentración de proteína se determinó usando el Reactivo de Colorante del Ensayo de Proteínas Bio-Rad (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con albúmina de suero bovino como patrón. Las medidas de la actividad total de la creatina quinasa (CK) se realizaron utilizando el sistema Vitros DT60 II Chemistry System, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Ortho-Clinical Diagnostics).

Agotamiento del suero.

El agotamiento de las 12 proteínas del suero más abundantes (alfa 1 glucoproteína ácida, alfa 1-antitripsina, alfa 2 macroglobulina, albúmina, apolipoproteína A-I, apolipoproteína A-II, fibrinógeno, haptoglobina, IgA, IgG, IgM y transferrina) fue realizado con el *kit* Proteome Purify 12 Human Serum Protein Immunodepletion (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Brevemente, se mezcló 1 ml de resina de inmunodepleción con 10 µl de suero reunido diluido con PBS hasta un volumen final de 500 µl, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). El suero agotado se recogió después de la centrifugación (1000 x g, 2 min) en unidades de filtro Spin-X y las proteínas se concentraron 5 veces utilizando unidades centrifugas de filtración Amicon Ultra-2 (valor de corte 3000 kDa; Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

10 Espectrometría de masas.

Para el análisis de espectrometría de masas 10 µg de proteínas séricas agotadas fueron solubilizadas en un total de 123 µl de la mezcla de reacción que contenía urea 4 M, tiourea 1,5 M y tris-HCl 50 mM, pH 8,3. Las proteínas se redujeron con 10 mM ditioneitol durante 30 min y luego se alquilaron con yodoacetamida 55 mM durante 20 min. Las proteínas alquiladas se digirieron primero con 500 ng de endopeptidasa lys-C (Wako) durante 3 horas a temperatura ambiente. Después se ajustó la mezcla a 235 µl con agua MilliQ y se trató con 500 ng de tripsina (Sequence Grade Trypsin, Promega) durante 16 horas a temperatura ambiente. La actividad enzimática se detuvo añadiendo ácido fórmico a una concentración final del 3% y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La mezcla de péptidos se desaló utilizando la punta de pipeta ZipTip_{µ-C18} (Millipore) y se separó con un sistema Easy nano-LC Proxeon (Thermo Fisher Scientific) equipado con una columna C18 de fase inversa (Easy-Column Proxeon C18, L 10 cm, ID 75 µm). Los eluatos se controlaron con un espectrómetro de masas LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) y los datos de MS tándem (MS/MS) se procesaron con el software Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher scientific) acoplado a un servidor de búsqueda Mascot interno (Matrix Science, versión 2.3.2 213) utilizando la base de datos SwissProt como se describió anteriormente (Rouillon et al., 2014). La abundancia relativa de cada proteína identificada en el suero de pacientes con DMD o pacientes sanos se estimó mediante una cuantificación sin etiqueta utilizando el software Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics, versión 4.0).

Transferencia western.

Las muestras de proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE (gradiente de 4 a 12%, NuPAGE Novex Bis-Tris Gel 1,0 mm., Life Technologies) y se transfirió a la membrana Protran Premium (nitrocelulosa, GE Healthcare). Se cargaron cincuenta microgramos (1 µl de suero) de proteína de suero humano, de ratón o de perro, por carril. Anticuerpos contra MYOM3 (1:1000, Proteintech: 17692-1-AP) y la CK-M (1:500, Santa Cruz: sc-15161) se utilizaron como anticuerpos primarios seguidos de incubación con los correspondientes anticuerpos conjugados con IR Dyc-800CW (1:10.000, LI-COR Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia infrarroja de los anticuerpos secundarios se leyó en un sistema de imágenes Odyssey (LI-COR Biosciences). Las intensidades de banda se midieron con el software de la aplicación Odyssey (LI-COR Biosciences, Image Studio Lite Version 4.0).

35 Experimentos con animales.

Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices europeas para la protección de animales vertebrados utilizados con fines experimentales (Directiva 2010/63/EU del 22 de septiembre de 2010) y para los ratones tratados con el oligonucleótido Pip6a-PMO, de acuerdo con los procedimientos autorizados por la oficina central del UK. Se recolectaron muestras de sangre de perros machos (proporcionados por el CEDS en Mezilles y Oniris en Nantes, Francia) de la vena safena lateral y de ratones por sangrado retroorbital o de la vena yugular. Se utilizaron las siguientes cepas de ratón: cepas de control C57BL/6 y C57/BL10, así como *mdx* (modelo para DMD; Chapman, 1989), y 4 cepas knockout (KO) denominadas KO-Capn3 (modelo para LGMD2A; Laure, et al. al., 2009), KO-Dysf (modelo para LGMD2B; Lostal, et al, 2010), KO-Sgcg (modelo para LGMD2C; Hack, et al., 1998) y KO-Sgca (modelo para LGMD2D; Duclos, et al., 1998). Las muestras de sangre se centrifugaron dos veces (10.000 x g, 10 min, 4 °C) y las muestras de suero obtenidas se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Ejercicio físico de los ratones.

Los ratones se pusieron en una cinta sin fin (Treadmill Exer 6M, Columbus Instruments) para correr con una inclinación cuesta abajo de 15° a velocidades de 8 m/min durante 5 min, seguido de 12 mm durante 25 min. Las muestras de suero se recogieron mediante sangrado retro-orbital y se guardaron a -80 °C.

50 Envejecimiento en ratones.

Se recogieron muestras de sangre de ratones con una edad de 1 día a 52 semanas (5 controles sanos o 5 *mdx* por edad) y se almacenaron a -80 °C. Los ratones recién nacidos, así como los de 12, 24, 36 y 52 semanas de edad, fueron sacrificados después de la toma de muestras. Las muestras para los tiempos 1, 2, 3 y 4 semanas se recolectaron del mismo grupo de ratones.

Terapia de salto de exón mediado por oligonucleótidos antisentido de ratones *mdx*.

Se trataron ratones *mdx* de doce semanas de edad con una única inyección en la vena de la cola de 12,5 mg/kg de un péptido penetrante a las células rico en arginina, conjugado con un fosforodiamidato morfolino oligonucleótido, Pip6a-PMO (péptido RXRRBRRXRYQFLIRXRBRXRRB acoplado a través de un enlace amida en el 3' del oligonucleótido 5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3'), sintetizado y preparado en una solución salina estéril como se describió anteriormente (Betts et al., 2012; Roberts et al., 2012). Las muestras de sangre se recolectaron antes y 2, 4 y 8 semanas después de la inyección y los niveles en suero de los fragmentos MYOM3 y CK-M se controlaron mediante análisis de transferencia western.

Tratamiento por terapia génica de ratones KO-Sgca.

Se utilizó el vector del virus 8 adenoasociado recombinante (rAAV2/8) para restaurar la expresión de α -sarcoglicano en ratones KO-Sgca. La producción de rAAV se realizó por infección dual de células Sf9 con baculovirus que albergan cDNA para Sgca bajo el promotor de desmina y regulado por los genes miR-142-3p (Boisgerault et al, 2013) y AAV *rep2/cap8* (rAAV2/8). La purificación se realizó en medio de sefrosa AVB de inmunoafinidad (GE Healthcare) (de acuerdo con Smith et al, 2009). Cuatro grupos de ratones KO-Sgca de 5 semanas de edad (5 ratones por grupo, excepto 4 ratones para la dosis más alta del vector) se inyectaron con PBS o bien con dosis crecientes de genoma viral (vg) rAAV (1e11, 5e11 y 1e12). Se recolectaron muestras de sangre cada dos semanas durante 3 meses y los niveles de los fragmentos MYOM3 y CK se controlaron mediante análisis de transferencia western y medidas de la actividad de CK, respectivamente. La fuerza muscular se midió mediante la prueba de escape 1 semana antes del sacrificio. La restauración del complejo de sarcoglicano y la morfología muscular se evaluaron mediante inmunotinción y análisis histológicos.

Evaluación de la fuerza muscular en ratones.

La fuerza muscular del ratón se evaluó por el método de tensión corporal total o la prueba de escape (Carlson & Makiejus, 1990) con algunas modificaciones. Los ratones unidos a la cola con un hilo conectado a un transductor de tensión se pusieron en una plataforma orientada hacia la entrada a través de un tubo de 30 cm de longitud. En respuesta al pellizco de la cola, los ratones intentaron escapar dentro del tubo, elevando así un pico de fuerza corto (Forward Pulling Tensión, tensión de tracción hacia adelante, FPT), que se registra. Se registraron cinco FPT para cada ratón. Se midió el peso corporal de cada ratón y se obtuvo el WBT dividiendo el promedio de las 5 FPT con el peso corporal.

Análisis estadístico.

Se realizaron análisis estadísticos utilizando GraphPad Prism versión 6.04. Los datos se expresan como media \pm SD si no se especifica otra cosa. Para las comparaciones entre las medias, se evaluó la homogeneidad de las variaciones mediante la prueba de Fisher-Snedecor y se aplicó la prueba t de Student (dos colas). Se utilizó la correlación de Pearson para los estudios de correlación y los datos se analizaron con un intervalo de confianza del 95%, considerándose significativa una $p < 0,05$.

Histología e inmunotinción de Sgca.

Se prepararon criosecciones (8 mm de grosor) a partir de músculos del gastrocnemio derecho e izquierdo congelados. Las secciones transversales se procesaron para la tinción histológica hematoxilina-floxina-azafrán (HPS). La inmunodetección colorimétrica de Sgca se realizó como se describió anteriormente (Fougerousse et al, 2007).

Después de la digitalización de las biopsias inmunoteñidas (Axioscan, ZEISS), se cuantificaron la superficie total de las biopsias y la superficie teñida de α -sarcoglicano utilizando el software ImageJ (versión 1.47g 64 bits, Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE. UU., <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014) y un script personalizado (disponible bajo pedido). El porcentaje de fibras positivas de Sgca para una biopsia dada se calculó utilizando la siguiente ecuación: (número de píxeles positivos de Sgca en el área de biopsia/ superficie de la biopsia en μm^2) dividido por la misma relación obtenida para el control sano (número de píxeles positivos de Sgca en el área de la biopsia/superficie en μm^2 de la biopsia del ratón de control C57BL/6J) y multiplicado por 100.

Resultados.

Detección de proteínas séricas expresadas diferencialmente en pacientes con DMD mediante espectrometría de masas.

Muestras de suero de 39 pacientes y 38 sujetos de controles recopilados en EE. UU. como parte del proyecto ADNA (http://www.institut-merieux.com/projetssante_adna.php) (la cohorte de EE. UU. total comprendía 103 pacientes y sujetos de control) fueron analizadas usando un enfoque de espectrometría de masas. Para reducir el número de análisis de LC-MS/MS, las muestras se organizaron en 4 grupos (G1: DMD jóvenes de 3 a 10 años de edad; G2: DMD mayores, de 12 a 20 años; G3: controles jóvenes de 3 a 10 años; y G4: controles mayores, de 12 a 20 años de edad)

subdivididos en un total de 12 grupos según la edad del paciente (Tabla 2). Cada grupo incluyó sueros de al menos 4 individuos, donde el suero de cada individuo estaba igualmente representado. Con el fin de garantizar una cobertura profunda del proteoma, las agrupaciones se inmunodepletaron para las 12 proteínas séricas principales.

5 Tabla 2: Lista de proteínas expresadas diferencialmente entre los grupos G1 y G3 (DMD joven y controles sanos de la misma edad) clasificada por la disminución en la relación DMD/sano (cambio en nº de veces). Las 10 proteínas principales con el valor p más bajo están en negrita. Todas las proteínas mostradas pasaron umbrales de números de péptidos ≥ 2 , una puntuación ≥ 50 , un cambio de veces ≥ 2 y un valor de $p \leq 0,05$. Péptidos: número de péptidos identificados para una proteína dada. Puntuación: Puntuación de la proteína mascota.

No. Acceso	Descripción	Localización	Péptidos	Puntuación	ANOVA (valor p)	Cambio en veces
MYG_HUMAN	Mioglobina	Citoplasma	4	195	2,7e-03	234,8
MYOM2_HUMAN	MYOM2	Miofibrilla	10	390	9,8e-05	100,1
MYOM3_HUMAN	MYOM3	Miofibrilla	11	491	1,5e-05	49,7
TPIS_HUMAN	triosafosfato isomerasa	Citoplasma	3	128	2,3e-03	48,4
AATC_HUMAN	Aspartato aminotransferasa	Citoplasma	3	75	4,7e-04	45,7
KCRM_HUMAN	CK-M	Citoplasma	15	849	2,9e-05	39,8
MYH7_HUMAN	Myosin-7	Miofibrilla	11	520	2,2e-05	38,3
ENOB_HUMAN	β-enolasa	Citoplasma	4	178	7,4e-05	34,8
G6PI_HUMAN	Glucosa-6-fosfato Isomerasa	Citoplasma/ secretada	4	130	1,6e-03	29,5
CAH3_HUMAN	Anhidrasa carbónica 3	Citoplasma	5	182	8,6e-05	23,9
FLNC_HUMAN	Filamina-C	Miofibrilla	4	145	4,3e-04	19,4
ALAT1_HUMAN	alanina amino transferasa1	Citoplasma	4	127	3,0e-05	15,6
ALDOA_HUMAN	Fructosa bisfosfato aldolasa A	Citoplasma	15	729	9,3e-05	14,2
KPYM_HUMAN	Piruvato quinasa PKM	Citoplasma	16	845	1,1e-05	12,8
TITIN_HUMAN	Titina	Miofibrilla	14	495	1,9e-03	10,8
VINC_HUMAN	Vinculina	Citoplasma/ membrana	2	74	7,2e-05	10,3
PYGM_HUMAN	glucógeno fosforilasa, forma del músculo	Citoplasma	8	257	6,1e-04	9,9
LDHA_HUMAN	cadena A L-lactato deshidrogenasa	Citoplasma	8	378	9,1e-04	9,5
HPT_HUMAN	Haptoglobina	Secretado	29	1867	1,5e-04	7,6
HBD_HUMAN	subunidad δ de hemoglobina	Citoplasma	3	100	5,1e-03	6,2
LDHB_HUMAN	L-lactato deshidrogenasa B	Citoplasma	10	598	2,4e-05	5,4
HBB_HUMAN	Hemoglobina subunidad β	Citoplasma	7	552	8,0e-03	3,6
HBA_HUMAN	hemoglobina subunidad α	Citoplasma	7	407	5,3e-03	3,4
TPM2_HUMAN	Cadena β de tropomiosina	Miofibrilla	5	170	2,0e-02	2,6
VASN_HUMAN	Vasorin	Membrana	4	135	4,0e-02	0,5
ALS_HUMAN	Complejo de factor de crecimiento similar a la insulina/proteína de unión	Secretado	22	1096	1,0e-02	0,5
PHLD_HUMAN	fosfolipasa D específica de fosfatidilinositol glicano	Secretado	9	533	4,7e-03	0,5

CHL1_HUMAN	Proteína similar a molécula L1 de adhesión a células neurales	Membrana/secretado	2	66	3,0e-02	0,5
COL11_HUMAN	Colectina-11	Secretado	2	72	2,6e-03	0,4
CADH5_HUMAN	Cadherina-5	Membrana	6	220	2,0e-03	0,4
CD109_HUMAN	antígeno CD109	Membrana	2	59	3,0e-02	0,4
LBP_HUMAN	proteína de unión a lipopolisacárido	Secretado	7	386	5,0e-03	0,4
CRAC1_HUMAN	Proteína ácida del cartílago 1	Secretado	6	223	2,0e-02	0,4
C4BPB_HUMAN	proteína de unión a C4b	Secretado	4	207	2,0e-02	0,4
CNDP1_HUMAN	β -Ala-His dipeptidasa	Secretado	8	294	4,2e-03	0,3
DPP4_HUMAN	Dipeptidil peptidasa 4	Membrana/secretado	5	162	5,5e-03	0,3
CETP_HUMAN	proteína de transferencia de éster de colesterol	Secretado	7	296	8,2e-04	0,2

El análisis por espectrometría de masas de muestras de suero de los 12 subgrupos permitió la identificación de un total de 3329 péptidos únicos que coinciden con 378 proteínas (con una tasa de descubrimiento falso menor que 0,01). Entre ellos, el 69% de las llamadas de identificación de proteínas (260 proteínas) se basaron en espectros de 2 o más péptidos. Para revelar las proteínas presentes diferencialmente en sueros de DMD e individuos sanos, los datos se analizaron mediante un enfoque de cuantificación sin etiqueta utilizando los siguientes parámetros: número de péptidos ≥ 2 ; Puntuación de proteína ≥ 50 y cambio en veces ≥ 2 . El análisis de los grupos G1 frente a G3 reveló 24 proteínas más abundantes en DMD y 13 en sujetos sanos (Tabla 3). Las 10 proteínas principales con el valor de p más bajo se sobreexpresaron en pacientes con DMD y se implicaron en el metabolismo de la energía muscular (piruvato quinasa PKM, cadena L-lactato deshidrogenasa B, CK-M, alanina aminotransferasa 1, β -enolasa, anhidrasa carbónica 3, fructosa-bisfosfato aldolasa A), en la organización del sarcómero (miomesina-3, miosina-7) o en la organización del costámero (vinculina).

Tabla 3: Lista de proteínas expresadas diferencialmente en muestras de suero entre los grupos G2 y G4 (DMD más antiguos y controles sanos de la misma edad) clasificada por la disminución de la relación DMD/sano (cambio doble). Todas las proteínas mostradas pasaron umbrales de números de péptidos ≥ 2 , una puntuación ≥ 50 , un cambio de veces ≥ 2 y un valor de $p \leq 0,05$. Péptidos: número de péptidos identificados para una proteína dada. Puntuación: Puntuación de la proteína mascota.

No. Acceso	Descripción	Localización	Péptidos	Puntuación	ANOVA (valor de p)	Cambio en veces
KCRM_HUMAN	CK-M	Citoplasma	3	96	1,0e-02	19,5
ADIPO_HUMAN	Adiponectina	Secretado	3	213	3,0e-02	4,4
ALDOA_HUMAN	Fructosa-bisfosfato aldolasa A	Citoplasma	2	84	3,0e-02	3,3
HBB_HUMAN	subunidad β de hemoglobina	Citoplasma	9	632	8,4e-03	2,4
LDHB_HUMAN	cadena L-lactato deshidrogenasa B	Citoplasma	6	223	4,0e-02	2,2
GELS_HUMAN	Gelsolina	Citoplasma	32	2287	1,0e-02	0,5
LCAT_HUMAN	Fosfatidilcolina esteroil aciltransferasa	Secretado	6	295	1,0e-02	0,4
CAD13_HUMAN	Cadherina-13	Membrana	2	86	5,8e-03	0,4
CRAC1_HUMAN	Proteína 1 ácida del cartílago	Secretado	3	105	1,0e-02	0,2

La comparación de pacientes mayores de DMD con controles de su misma edad (G2 frente a G4) usando los mismos parámetros dio como resultado solo 9 proteínas expresadas diferencialmente: 5 proteínas más abundantes en DMD (CK-M, adiponectina, fructosa-bisfosfato aldolasa A, cadena L-lactato deshidrogenasa B, y hemoglobina β) y 4 en

sujetos sanos (gelsolina, fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa, cadherina-13, proteína ácida del cartilago 1) (Tabla 3). Solo 4 de estas proteínas (CK-M, fructosa-bisfosfato aldolasa A, cadena B de L-lactato deshidrogenasa y hemoglobina β) fueron diferencialmente abundantes en los dos grupos de edad de DMD de acuerdo con el análisis de espectrometría de masas. Es importante destacar que las relaciones de expresión para estas cuatro proteínas en la DMD en comparación con los controles sanos fueron sustancialmente más bajas en pacientes con DMD mayores en comparación con el grupo de DMD jóvenes (19,5; 3,3; 2,2 y 2,4 veces en DMD mayores frente a 39,8; 14,2; 5,4 y 3,6 veces en jóvenes, respectivamente). La disminución en el número de proteínas expresadas diferencialmente y en la magnitud de sus cambios en veces es debida muy probablemente a la disminución drástica de la masa muscular en pacientes con DMD mayores (12 - 20 años de edad), y la relativa inmovilidad de estos pacientes. Curiosamente, el análisis sin etiqueta de pacientes jóvenes y mayores con DMD (G1 frente a G2) reveló 8 proteínas secretadas que aumentaron en abundancia con la edad del paciente (β -hidroxilasa de dopamina: 3 veces, adiponectina: 3 veces, componente P amiloide sérico: 3 veces, subunidad lábil ácida del complejo factor de crecimiento similar a la insulina – proteína de unión: 3 veces, β -Ala-His dipeptidasa: 5 veces, factor de crecimiento I similar a la insulina: 5 veces).

Los niveles de MYOM3 demuestran menos variaciones inter-individuales en comparación con la CK en pacientes con DMD.

Los niveles elevados de proteínas miofibrilares citosólicas tal como la CK en la sangre se usan ahora ampliamente como la primera etapa del diagnóstico de DMD (Gasper y Gilchrist, 2005; Moat et al. 2013). Por tanto, una demanda atrayente fue comparar los niveles de CK en el suero con una de las proteínas estructurales miofibrilares encontradas en el presente estudio. Basándose en el elevado cambio en veces (50) y el bajo valor p ($1,5e-5$) entre la DMD y los controles sanos (Tabla 2), se eligió la proteína MYOM3 (UniProtKB n° Q5VTT5) para un análisis adicional. MYOM3, una proteína de 1437 aminoácidos (162,2 kDa), es un miembro de una familia de proteínas estructurales muy relacionadas detectadas en la banda M del sarcómero en músculos esqueléticos estriados: MYOM1, MYOM2 (o proteína M) y MYOM3. Estas proteínas están involucradas en la estabilidad y resistencia del sarcómero durante el estiramiento intenso o sostenido (Schoenauer et al., 2008). El análisis detallado de los datos de MS/MS mostró que los 25 péptidos identificados se distribuyeron por igual a lo largo de la secuencia de MYOM3, indicando que toda la proteína (o fragmentos que cubren la longitud total de la proteína) estaba presente en el suero.

Como se mencionó en el ejemplo 1, el análisis de transferencia western del suero de pacientes con DMD con un anticuerpo anti-MYOM3 dirigido a los últimos 325 aminoácidos en el extremo C reveló la presencia de dos bandas de 100 y 140 kDa respectivamente (Fig. 11). Dado que el MYOM3 intacto tiene un tamaño predicho de 162 kDa, esto sugiere que estas dos bandas corresponden a los fragmentos C-terminales de la proteína. Es importante destacar que los fragmentos del mismo tamaño fueron apenas detectables en sueros de sujetos sanos, validando así los datos de espectrometría de masas.

A continuación, los autores de la presente invención compararon los niveles de los fragmentos MYOM3 y CK en los 103 sujetos de la cohorte de US. Los niveles de expresión en el suero de ambos fragmentos de MYOM3 se determinaron mediante análisis de transferencia western y la CK se evaluó midiendo su actividad enzimática (Fig. 12). De acuerdo con los datos de espectrometría de masas, los resultados indicaron que los niveles de expresión de ambos fragmentos, CK y MYOM3, eran mucho más altos en pacientes con DMD jóvenes en comparación con los controles sanos correspondientes (relación DMD/Control: CK = 193 y MYOM3 = 185) (Fig. 12A y 12B). En pacientes con DMD mayores, los niveles de expresión de los fragmentos CK y MYOM3 fueron respectivamente 14 y 5 veces más bajos que en pacientes con DMD jóvenes.

Es importante destacar que, incluso si ambas proteínas pudiesen discriminar a los pacientes con DMD y los controles sanos, hubo menos variaciones interindividuales en los niveles de los fragmentos de MYOM3 en comparación con la CK. Mientras que los niveles de CK en los pacientes jóvenes variaron de 9000 IU/L a 60000 IU/L (media 27130 IU/L \pm 13130), los valores para los fragmentos MYOM3 se mantuvieron entre 11 a. u. y 24 a. u. (media 19 a. u. \pm 3). La baja correlación observada entre los niveles de CK en suero y los fragmentos de MYOM3 en el grupo de pacientes jóvenes ($R^2 = 0,28$) indica que diferentes mecanismos fisiológicos pueden explicar la secreción/ estabilidad de estas proteínas a esta edad. (Fig. 12C). Por el contrario, estos dos biomarcadores estaban bien correlacionados en pacientes mayores (Fig. 12D).

Los fragmentos de MYOM3 están presentes específicamente en sueros de modelos animales de DMD.

Los niveles de fragmentos de MYOM3 se cuantificaron en dos modelos animales de DMD: distrofia muscular Golden Retriever (GRMD) que tiene un fenotipo grave similar a los pacientes con DMD (Kornegay et al. 2012) y ratones *mdx* deficientes de distrofina. El análisis de transferencia western de sueros GRMD y *mdx* reveló la presencia de 2 bandas que migran a las mismas posiciones que los fragmentos de MYOM3 humanos. Es importante destacar que la abundancia de estos fragmentos fue 100 veces mayor que en los perros de control sanos (Fig. 13 A, B). Mientras que el nivel de los fragmentos MYOM3 en muestras de DMD humana disminuyó con la edad, la expresión de estos fragmentos fue muy similar en el suero de GRMD de 2 y 18 meses de edad (los perros GRMD generalmente no sobreviven más allá de esta edad sin una atención especial). La expresión independiente de la edad de los fragmentos

MYOM3 podría ser una ventaja para la utilización de este marcador biológico en estudios de terapia génica realizados en perros.

Los fragmentos de MYOM3 se expresan específicamente en sueros de pacientes con LGMD2D y modelos de ratón de LGMDs.

5 La presencia de los fragmentos MYOM3 fue también analizada en muestras de suero de 3 pacientes con α -sarcoglicanopatía (LGMD2D). Se detectaron fragmentos de la misma longitud (100 y 140 kDa) a niveles elevados en todos estos pacientes. En general, el nivel de estos fragmentos en pacientes con LGMD2D fue más bajo en comparación con su intensidad en pacientes jóvenes con DMD (Fig. 14A). En este estudio, se incluyeron los siguientes modelos de ratón de distrofias musculares de la cintura escapular: KO-Calpain3 (modelos para LGMD2A) (Richard et al, 2000), KO-Dysferlin (modelos para LGMD2B) (Lostal et al, 2010), KO-Sgcg (modelos para LGMD2C) (Hack et al, 1998), y KO-Sgca (modelos para LGMD2D) (Duclos et al, 1998). Estos modelos de ratón son cepas congénicas en la base genética del ratón C57BL/6J, que se incluyó en el estudio como su control de tipo silvestre (WT). Tomando en consideración el deterioro muscular y el tiempo de aparición de la enfermedad, estos modelos de ratón se pueden clasificar en términos de orden decreciente de gravedad: KO-Sgca, KO-Sgcg, KO-dysf y KO-Capn3. El suero de estos modelos de ratón se recolectó a los 1 y 6 meses de edad, correspondientes a las etapas tempranas y avanzadas de las distrofias, y los niveles de los fragmentos MYOM3 se compararon mediante transferencia western. Los niveles más altos de fragmentos de MYOM3 en suero se observaron en los tres modelos de ratón con perturbaciones en el DAPC (Fig. 14B). En los ratones KO-Dysf, estos fragmentos eran raramente detectables a la edad de 1 mes y luego aumentaron a los 6 meses, lo que refleja el agravamiento de la enfermedad a esta edad. Los fragmentos de MYOM3 fueron apenas detectables en ratones KO-Capn3 a cualquier edad.

En ratones *mdx*, los fragmentos de MYOM3 se expresan temprano, muestran menos variabilidad inter-individual y son menos sensibles al ejercicio físico en comparación con la CK.

25 Con el fin de identificar el momento más temprano en el que son detectables los fragmentos de MYOM3 en suero, los autores de la presente invención investigaron sueros de ratones *mdx* de diferentes edades (desde el nacimiento hasta 1 año de edad). Los fragmentos MYOM3 se detectaron en ratones *mdx* al nacer, con una pequeña disminución en sus niveles a la edad de una semana, y seguidos por un aumento de la abundancia a las 3 semanas (Fig. 15A). Es importante destacar que los niveles de estos fragmentos en los ratones de control de la misma edad fueron menores en todas las edades analizadas (Fig. 15B). La cinética de la abundancia del fragmento MYOM3 en el suero de ratones *mdx* se correlaciona con el momento de una fase aguda de la necrosis muscular que tiene lugar generalmente entre las 3 y las 4 semanas de edad, seguida de una aparente estabilización del fenotipo muscular (Cullen y Jaros, 1988). La cinética de los niveles séricos de CK en ratones *mdx* fue distinta de la de los fragmentos MYOM3 durante las primeras semanas de edad. De forma consistente con estudios previos (McArdle et al., 1994; Wooddell et al., 2010) la CK en el suero se elevó en ratones recién nacidos, pero luego se hizo indetectable durante la 1ª y la 2ª semana de edad (excepto para 1 mes), subiendo de nuevo a las 3 y las 12 semanas, seguido por una estabilización (Fig. 15C). En ratones sanos la CK del suero fue también ligeramente elevada en los recién nacidos y en los animales de 12 y 24 semanas de edad (Fig. 15D). Es importante destacar que se observó una menor variación en los niveles de fragmentos de MYOM3 en ratones de la misma edad en comparación con la CK (máximo cambio en 2 veces para MYOM3 frente a 110 para CK). La diferencia en los patrones de expresión dependientes de la edad entre la CK sérica y los fragmentos de MYOM3 en ratones *mdx* están probablemente relacionados con diferentes mecanismos de bioprocésamiento de estas proteínas, especialmente durante las primeras fases de la enfermedad.

45 Para evaluar el impacto del ejercicio físico sobre el suero, los niveles de los fragmentos MYOM3 y CK, los ratones WT y *mdx* se sometieron a una carrera cuesta abajo durante 30 minutos. Este régimen de ejercicio se usa con frecuencia para aumentar la lesión muscular y empeorar el fenotipo *mdx* (Brussee et al, 1997; Vilquin et al, 1998). Los sueros se recolectaron 7 días antes y 3, 24 y 48 horas después del ejercicio. Es importante destacar que, mientras que en los ratones *mdx* la concentración de CK alcanzó su máximo a las 3 horas después del ejercicio (un aumento de hasta 10 veces) seguido de una disminución sustancial (Fig. 16C), el ejercicio físico tuvo un impacto relativamente pequeño sobre los niveles séricos de los fragmentos de MYOM3 (menos que un incremento de 2 veces 48 horas después del ejercicio) (Fig. 16A). Es interesante que en los ratones sanos hubo un ligero aumento en los niveles de los fragmentos MYOM3 24 y 48 h después del ejercicio, aun cuando el nivel máximo de los fragmentos en ratones sanos fue 50 veces menor que en ratones *mdx* (Fig. 16B). Los niveles de suero CK fueron variables en ratones sanos sin una correlación notable con el ejercicio físico (Fig. 16D). Dado que MYOM3 se expresa de una forma predominante en fibras esqueléticas de velocidad lenta e intermedia (tipo I y IIa) (Schoenauer et al., 2008) que se ven menos afectadas en la DMD relativa a las miofibras rápidas (Webster et al, 1988), es posible que la diferencia en la cinética de estos biomarcadores se deba parcialmente a la sensibilidad diferencial de estos tipos de fibras musculares al daño inducido por el ejercicio.

Los fragmentos MYOM3 permiten el seguimiento de la eficacia del tratamiento farmacológico y de la terapia génica.

La presencia de los fragmentos MYOM3 en el suero de pacientes con DMD y LGMD2D y sus respectivos modelos de ratón animó a los autores de la presente invención a evaluar la utilidad de estos biomarcadores para el seguimiento de la respuesta a terapias experimentales en ratones *mdx* y KO-Sgca.

5 La restauración de la expresión de la distrofina en los músculos del ratón *mdx* se logró mediante una administración única de un péptido penetrante en células rico en arginina (CPP) conjugado a un fosforodiamidato morfolino oligonucleótido (PMO) que induce eficazmente el salto de exón 23 y restablece la expresión de la proteína distrofina y la función muscular (Betts et al., 2012; Yin et al., 2011). Con el fin de evaluar el impacto de la restauración de la expresión de distrofina en los niveles séricos de los fragmentos de MYOM3 y CK, se recogieron muestras de sangre de ratones *mdx* tratados, ratones *mdx* no tratados y ratones de control WT a las 2, 4 y 8 semanas después de la inyección. Dos semanas después de la inyección, los niveles de los fragmentos de MYOM3 en ratones *mdx* tratados disminuyeron sustancialmente (sin alcanzar el nivel en los ratones de control) y luego aumentaron gradualmente con el tiempo (Fig. 7A). Estos datos concuerdan con la restauración de la expresión de distrofina observada en 30 a 60% de las fibras musculares 2 semanas después de las inyecciones (Betts et al., 2012; Yin et al., 2011) seguido por una disminución en el porcentaje de fibras positivas en puntos temporales posteriores (Jearawiriyapaisarn et al., 2010). A diferencia de los fragmentos MYOM3, los niveles de CK no reflejaron la restauración de la expresión de distrofina. Así, 2 semanas después de la inyección el nivel de CK en el suero fue menor en los ratones *mdx* tratados en comparación con los ratones testigo WT (Fig. 17B), mientras que la expresión de distrofina no excedió el 60% en ese momento. Además, 8 semanas después del tratamiento, cuando el nivel estimado de fibras positivas a la distrofina fue aproximadamente el 20% (Betts et al., 2012; Yin et al., 2011), los niveles de CK fueron más altos en los ratones *mdx* tratados que en los no tratados. El diferente comportamiento de los fragmentos de MYOM3 y CK después de la restauración parcial de la expresión de distrofina puede reflejar la capacidad de estos biomarcadores para revelar diferencialmente un proceso intracelular, tal como el recambio de micropartículas (Duguez et al., 2013) o el aumento del catabolismo de la proteína Miofibrillaar (McKeran et al., 1977; Mussini et al., 1984).

25 Para restaurar la expresión de α -sarcoglicano en ratones KO-Sgca, los presentes autores utilizaron el vector rAAV2/8 del virus recombinante adenoasociado. Los ratones de control C57BL/6J recibieron una inyección intravenosa de PBS y cuatro grupos de ratones KO-Sgca recibieron inyecciones intravenosas de PBS o de baja (vg 1e11), media (vg 5e11) o alta (vg 1e12) dosis de rAAV2/8 que codifican hSGCA. Los ratones fueron controlados durante tres meses después del tratamiento. Se compararon los siguientes ensayos para definir el más apropiado para el seguimiento del tratamiento: análisis histológico de biopsias musculares (tinción con HPS y restauración del complejo de sarcoglicanos); fuerza física total 3 meses después del tratamiento (1 semana antes del sacrificio del animal); análisis bisemanal de los niveles séricos de fragmentos de CK y MYOM3.

35 El análisis histológico de los músculos gastrocnemios demostró la restauración del complejo en 5-30% (media 15,6 \pm 8,4), 60-100% (media 79,2 \pm 16,7) y 84-100% (media 94,6 \pm 8,8) de las fibras después de los tratamientos con dosis baja, media y alta de rAAV, respectivamente (Fig. 18 A, B). Es importante destacar que, al evaluar el nivel de expresión de α -sarcoglicano (determinado mediante inmunotinción), se pudieron distinguir claramente los ratones KO-Sgca, bajo, medio y WT. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dosis de rAAV medias y altas mediante este método. Es importante señalar que este análisis es muy laborioso, y el tamaño de las biopsias lo hace inadecuado para el seguimiento del efecto terapéutico en animales pequeños.

40 Similar al análisis histológico, el método convencional de tensión corporal total (WBT) es un ensayo de punto final porque los ratones se acostumbran al protocolo (Carlson et al., 2010). El método WBT solo fue capaz de discriminar 2 grupos de animales: (1) ratones KO-Sgca inyectados con PBS o una dosis baja de rAAV y (2) ratones testigo C57BL/6J y ratones KO-Sgca inyectados con dosis medias o altas de rAAV (Fig. 18C).

45 Un umbral de 3000 IU/L de CK separa claramente a los ratones KO-Sgca inyectados con PBS de todos los demás grupos experimentales (Fig. 18D, F). Sin embargo, al aplicar la prueba de Student (umbral del valor $P < 0,01$), las diferencias solamente entre unos cuantos valores del tiempo/dosis de inyección aparecieron como estadísticamente significativas (Fig. 18F). El cambio del umbral del valor $p < 0,05$ permite distinguir más grupos experimentales de ratones (Fig. 18F). Los niveles más bajos de CK en todos los grupos de ratones en el día 90 (una semana después de las medidas de fuerza total) (Fig. 18D) podrían explicarse por el hecho de que un aumento de los niveles de CK después del ejercicio de esfuerzo físico es seguido por una disminución sustancial que persiste durante 2 semanas (Kobayashi et al., 2012).

55 Las variaciones inter-individuales de los niveles del fragmento MYOM3 fueron menores en comparación con la CK sérica en el caso de todos los grupos animales (Fig. 18D, E). De acuerdo con un estudio previo que muestra el desarrollo progresivo de la distrofia muscular en ratones KO-Sgca (Duclos et al., 1998), los niveles de los fragmentos MYOM3 en los ratones de control inyectados con PBS aumentaron gradualmente con la edad (Fig. 18E). Incluso la dosis más baja de rAAV (vg 1e11) estabilizó los niveles del fragmento MYOM3, mientras que las dosis medias y altas redujeron los niveles del fragmento MYOM3 5 veces y 8 veces, respectivamente. Debido a la baja variabilidad inter-individual, la medida de los fragmentos MYOM3 permitió que casi todos los grupos de ratones se distinguieran con cualquiera de los umbrales (valores $P < 0,01$ o $0,05$) en la mayoría de los puntos de tiempo (Fig 18E, F). Además, la

abundancia del fragmento MYOM3 se correlacionó mejor ($R^2 = 0,71$) con la fuerza muscular medida por la prueba de escape en comparación con CK ($R^2 = 0,59$) (Fig. 19).

5 La comparación de los fragmentos de MYOM3 con otros 3 ensayos (biopsia, restauración de la fuerza física y CK) en modelos de 2 distrofias musculares distintas, *mdx* (deficiente de distrofina) y KO-Sgca (deficiente de α -sarcoglicano), demostró la superioridad de los fragmentos de MYOM3 para el seguimiento de los tratamientos de terapia génica en relación con otros ensayos. Las ventajas de los fragmentos MYOM3 en comparación con la CK son su menor variabilidad inter-individual entre los pacientes de la misma edad, una mejor correlación con la reconstitución del complejo proteico asociado a distrofina y la restauración de la fuerza muscular. Las ventajas críticas de los fragmentos MYOM3 en comparación con el análisis histológico de las biopsias estriban en que son menos invasivas y proporcionan información sobre la integridad muscular en todo el cuerpo. MYOM3 fue el biomarcador más eficiente para distinguir los 5 grupos de ratones KO-Sgca tratados con diferentes dosis de vector rAAV. Tomados en conjunto, los presentes datos demuestran que los fragmentos MYOM3 son biomarcadores excelentes para controlar los resultados terapéuticos en pacientes con DMD y otras distrofias musculares.

15 La expresión diferencial de diferentes proteínas miomesina puede controlarse para estudiar el estatus de diferentes tipos de fibras musculares.

20 La expresión diferencial de diferentes miomesinas en las fibras musculares (MYOM3 se encontró principalmente en las fibras de velocidad intermedia (tipo IIa) del músculo esquelético, mientras que las fibras rápidas expresan más MYOM2 y MYOM1 se expresa en todas las fibras musculares (Schoenauer et al, 2008)), implica una posibilidad de seguir los resultados del tratamiento terapéutico para cada tipo de fibras musculares. Los autores de la presente invención han encontrado que, después de los ejercicios físicos, los fragmentos de myom2 y myom3 aparecían en el torrente circulatorio de los ratones *mdx* en diferentes momentos, alcanzando un máximo a 1 y 2 días después del ejercicio, respectivamente (Figura 21 y Figura 16). Esto corresponde al hecho de que los músculos rápidos, ricos en myom2, se ven afectados preferentemente en la distrofia muscular de Duchenne (Webster, 1988).

Referencias.

Bartoli M, Poupiot J, Goyenvalle A, Perez N, Garcia L, Danos O, Richard I. Noninvasive monitoring of therapeutic gene transfer in animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther.* 2006 Jan;13(1):20-8.

Betts C, Saleh AF, Arzumanov AA, Hammond SM, Godfrey C, Coursindel T, Gait MJ, Wood MJ (2012) Pip6-PMO, A New Generation of Peptide-oligonucleotide Conjugates With Improved Cardiac Exon Skipping Activity for DMD Treatment. *Molecular therapy Nucleic acids* 1: e38

Boisgerault F, Gross DA, Ferrand M, Poupiot J, Darocha S, Richard I, Galy A (2013) Prolonged gene expression in muscle is achieved without active immune tolerance using microrRNA 142.3p-regulated rAAV gene transfer. *Human gene therapy* 24: 393-405

25

- Brown BD, Venneri MA, Zingale A, Sergi L, Naldini L. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med*. 2006 May;12(5):585-91. Epub 2006 Apr 23.
- Brussee V, Tardif F, Tremblay JP (1997) Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscular disorders : NMD* **7**: 487-492
- Carlson CG. A noninvasive procedure to detect muscle weakness in the mdx mouse. *Muscle Nerve*. 1990 Jun;13(6):480-4.
- Carlson CG, Rutter J, Bledsoe C, Singh R, Hoff H, Bruemmer K, Sesti J, Gatti F, Berge J, McCarthy L (2010) A simple protocol for assessing inter-trial and inter-examiner reliability for two noninvasive measures of limb muscle strength. *Journal of neuroscience methods* **186**: 226-230
- Chapman VM, Miller DR, Armstrong D, Caskey CT. Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Feb;86(4):1292-6.
- Cullen MJ, Jaros E (1988) Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta neuropathologica* **77**: 69-81
- Duclos F, Straub V, Moore SA, Venzke DP, Hrstka RF, Crosbie RH, Durbeej M, Lebakken CS, Ettinger AJ, van der Meulen J, Holt KH, Lim LE, Sanes JR, Davidson BL, Faulkner JA, Williamson R, Campbell KP. Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol*. 1998 Sep 21;142(6):1461-71.
- Duguez S, Duddy W, Johnston H, Laine J, Le Bihan MC, Brown KJ, Bigot A, Hathout Y, Butler-Browne G, Partridge T (2013) Dystrophin deficiency leads to disturbance of LAMP1-vesicle-associated protein secretion. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **70**: 2159-2174
- Fougerousse F, Bartoli M, Poupot J, Arandel L, Durand M, Guerchet N, Gicquel E, Danos O, Richard I (2007) Phenotypic correction of alpha-sarcoglycan deficiency by intra-arterial injection of a muscle-specific serotype I rAAV vector. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **15**: 53-61
- Gasper MC, Gilchrist JM (2005) Creatine kinase: a review of its use in the diagnosis of muscle disease. *Medicine and health, Rhode Island* **88**: 398, 400-394

- Hack AA, Ly CT, Jiang F, Clendenin CJ, Sigrist KS, Wollmann RL, McNally EM. Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J Cell Biol.* 1998 Sep 7;142(5):1279-87.
- Jearawiriyapaisarn N, Moulton HM, Sazani P, Kole R, Willis MS (2010) Long-term improvement in mdx cardiomyopathy after therapy with peptide-conjugated morpholino oligomers. *Cardiovascular research* **85**: 444-453
- Kobayashi YM, Rader EP, Crawford RW, Campbell KP (2012) Endpoint measures in the mdx mouse relevant for muscular dystrophy pre-clinical studies. *Neuromuscular disorders : NMD* **22**: 34-42
- Kornegay JN, Bogan JR, Bogan DJ, Childers MK, Li J, Nghiem P, Detwiler DA, Larsen CA, Grange RW, Bhavaraju-Sanka RK, Tou S, Keene BP, Howard JF, Jr., Wang J, Fan Z, Schatzberg SJ, Styner MA, Flanigan KM, Xiao X, Hoffman EP (2012) Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **23**: 85-108
- Laure L, Suel L, Roudaut C, Bourg N, Ouali A, Bartoli M, Richard I, Danièle N. Cardiac ankyrin repeat protein is a marker of skeletal muscle pathological remodelling. *FEBS J.* 2009 Feb;276(3):669-84.
- Lostal W, Bartoli M, Bourg N, Roudaut C, Bentaïb A, Miyake K, Guerchet N, Fougerousse F, McNeil P, Richard I. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum Mol Genet.* 2010 May 15;19(10):1897-907.
- McArdle A, Edwards RH, Jackson MJ (1994) Time course of changes in plasma membrane permeability in the dystrophin-deficient mdx mouse. *Muscle & nerve* **17**: 1378-1384
- McKeran RO, Halliday D, Purkiss P (1977) Increased myofibrillar protein catabolism in Duchenne muscular dystrophy measured by 3-methylhistidine excretion in the urine. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **40**: 979-981
- Moat SJ, Bradley DM, Salmon R, Clarke A, Hartley L (2013) Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales (UK). *European journal of human genetics : EJHG* **21**: 1049-1053
- Mussini E, Cornelio F, Colombo L, De Ponte G, Giudici G, Cotellessa L, Marcucci F (1984) Increased myofibrillar protein catabolism in duchenne muscular dystrophy measured by 3-methylhistidine excretion in the urine. *Muscle & nerve* **7**: 388-391
- Richard I, Roudaut C, Marchand S, Baghdiguian S, Herasse M, Stockholm D, Ono Y, Suel L, Bourg N, Sorimachi H, Lefranc G, Fardeau M, Sebille A, Beckmann JS (2000) Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated

IkappaBalpha/nuclear factor kappaB pathway perturbation in mice. *The Journal of cell biology* **151**: 1583-1590

Roberts TC, Blomberg KE, McClorey G, El Andaloussi S, Godfrey C, Betts C, Coursindel T, Gait MJ, Smith CI, Wood MJ (2012) Expression analysis in multiple muscle groups and serum reveals complexity in the microRNA transcriptome of the mdx mouse with implications for therapy. *Molecular therapy Nucleic acids* **1**: e39

Schoenauer R, Lange S, Hirschy A, Ehler E, Perriard JC, Agarkova I (2008) Myomesin 3, a novel structural component of the M-band in striated muscle. *Journal of molecular biology* **376**: 338-351

Smith RH, Levy JR, Kotin RM (2009) A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **17**: 1888-1896

Snyder RO., et al. (1997). Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet.* **16**: 270-276.

Vilquin JT, Brussee V, Asselin I, Kinoshita I, Gingras M, Tremblay JP (1998) Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility in vivo by eccentric running exercise. *Muscle & nerve* **21**: 567-576

Webster C, Silberstein L, Hays AP, Blau HM (1988) Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **52**: 503-513

Wokke BH, Bos C, Reijnierse M, van Rijswijk CS, Eggers H, Webb A, Verschuuren JJ, Kan HE (2013) Comparison of dixon and T1-weighted MR methods to assess the degree of fat infiltration in duchenne muscular dystrophy patients. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* **38**: 619-624

Wooddell CI, Zhang G, Griffin JB, Hegge JO, Huss T, Wolff JA (2010) Use of Evans blue dye to compare limb muscles in exercised young and old mdx mice. *Muscle & nerve* **41**: 487-499

Yin H, Saleh AF, Betts C, Camelliti P, Seow Y, Ashraf S, Arzumanov A, Hammond S, Merritt T, Gait MJ, Wood MJ (2011) Pip5 transduction peptides direct high efficiency oligonucleotide-mediated dystrophin exon skipping in heart and phenotypic correction in mdx mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **19**: 1295-1303

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENETHON

5 <120> Métodos para el diagnóstico o el seguimiento de distrofias musculares

<130> B1751PC00

<160> 24

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1437

15 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Met Thr Leu Pro His Ser Leu Gly Gly Ala Gly Asp Pro Arg Pro Pro
1 5 10 15

Gln Ala Met Glu Val His Arg Leu Glu His Arg Gln Glu Glu Glu Gln
20 25 30

Lys Glu Glu Arg Gln His Ser Leu Arg Met Gly Ser Ser Val Arg Arg
35 40 45

Arg Thr Phe Arg Ser Ser Glu Glu Glu His Glu Phe Ser Ala Ala Asp
50 55 60

Tyr Ala Leu Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Ala Ser Ser Glu Leu Ser
65 70 75 80

Trp Glu Ala Gln Leu Arg Arg Gln Thr Ser Ala Val Glu Leu Glu Glu
85 90 95

Arg Gly Gln Lys Arg Val Gly Phe Gly Asn Asp Trp Glu Arg Thr Glu
100 105 110

Ile Ala Phe Leu Gln Thr His Arg Leu Leu Arg Gln Arg Arg Asp Trp
115 120 125

Lys Thr Leu Arg Arg Arg Thr Glu Glu Lys Val Gln Glu Ala Lys Glu
130 135 140

Leu Arg Glu Leu Cys Tyr Gly Arg Gly Pro Trp Phe Trp Ile Pro Leu
145 150 155 160

Arg Ser His Ala Val Trp Glu His Thr Thr Val Leu Leu Thr Cys Thr
165 170 175

20

ES 2 732 208 T3

Val Gln Ala Ser Pro Pro Pro Gln Val Thr Trp Tyr Lys Asn Asp Thr
 180 185 190

Arg Ile Asp Pro Arg Leu Phe Arg Ala Gly Lys Tyr Arg Ile Thr Asn
 195 200 205

Asn Tyr Gly Leu Leu Ser Leu Glu Ile Arg Arg Cys Ala Ile Glu Asp
 210 215 220

Ser Ala Thr Tyr Thr Val Arg Val Lys Asn Ala His Gly Gln Ala Ser
 225 230 235 240

Ser Phe Ala Lys Val Leu Val Arg Thr Tyr Leu Gly Lys Asp Ala Gly
 245 250 255

Phe Asp Ser Glu Ile Phe Lys Arg Ser Thr Phe Gly Pro Ser Val Glu
 260 265 270

Phe Thr Ser Val Leu Lys Pro Val Phe Ala Arg Glu Lys Glu Pro Phe
 275 280 285

Ser Leu Ser Cys Leu Phe Ser Glu Asp Val Leu Asp Ala Glu Ser Ile
 290 295 300

Gln Trp Phe Arg Asp Gly Ser Leu Leu Arg Ser Ser Arg Arg Arg Lys
 305 310 315 320

Ile Leu Tyr Thr Asp Arg Gln Ala Ser Leu Lys Val Ser Cys Thr Tyr
 325 330 335

Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Met Val Arg Val Pro Ser Pro Phe Gly
 340 345 350

Pro Arg Glu Gln Ser Thr Tyr Val Leu Val Arg Asp Ala Glu Ala Glu
 355 360 365

Asn Pro Gly Ala Pro Gly Ser Pro Leu Asn Val Arg Cys Leu Asp Val
 370 375 380

Asn Arg Asp Cys Leu Ile Leu Thr Trp Ala Pro Pro Ser Asp Thr Arg
 385 390 395 400

Gly Asn Pro Ile Thr Ala Tyr Thr Ile Glu Arg Cys Gln Gly Glu Ser
 405 410 415

Gly Glu Trp Ile Ala Cys His Glu Ala Pro Gly Gly Thr Cys Arg Cys
 420 425 430

ES 2 732 208 T3

Pro Ile Gln Gly Leu Val Glu Gly Gln Ser Tyr Arg Phe Arg Val Arg
 435 440 445

Ala Ile Ser Arg Val Gly Ser Ser Val Pro Ser Lys Ala Ser Glu Leu
 450 455 460

Val Val Met Gly Asp His Asp Ala Ala Arg Arg Lys Thr Glu Ile Pro
 465 470 475 480

Phe Asp Leu Gly Asn Lys Ile Thr Ile Ser Thr Asp Ala Phe Glu Asp
 485 490 495

Thr Val Thr Ile Pro Ser Pro Pro Thr Asn Val His Ala Ser Glu Ile
 500 505 510

Arg Glu Ala Tyr Val Val Leu Ala Trp Glu Glu Pro Ser Pro Arg Asp
 515 520 525

Arg Ala Pro Leu Thr Tyr Ser Leu Glu Lys Ser Val Ile Gly Ser Gly
 530 535 540

Thr Trp Glu Ala Ile Ser Ser Glu Ser Pro Val Arg Ser Pro Arg Phe
 545 550 555 560

Ala Val Leu Asp Leu Glu Lys Lys Lys Ser Tyr Val Phe Arg Val Arg
 565 570 575

Ala Met Asn Gln Tyr Gly Leu Ser Asp Pro Ser Glu Pro Ser Glu Pro
 580 585 590

Ile Ala Leu Arg Gly Pro Pro Ala Thr Leu Pro Pro Pro Ala Gln Val
 595 600 605

Gln Ala Phe Arg Asp Thr Gln Thr Ser Val Ser Leu Thr Trp Asp Pro
 610 615 620

Val Lys Asp Pro Glu Leu Leu Gly Tyr Tyr Ile Tyr Ser Arg Lys Val
 625 630 635 640

Gly Thr Ser Glu Trp Gln Thr Val Asn Asn Lys Pro Ile Gln Gly Thr
 645 650 655

Arg Phe Thr Val Pro Gly Leu Arg Thr Gly Lys Glu Tyr Glu Phe Cys
 660 665 670

Val Arg Ser Val Ser Glu Ala Gly Val Gly Glu Ser Ser Ala Ala Thr
 675 680 685

ES 2 732 208 T3

Glu Pro Ile Arg Val Lys Gln Ala Leu Ala Thr Pro Ser Ala Pro Tyr
 690 695 700

Gly Phe Ala Leu Leu Asn Cys Gly Lys Asn Glu Met Val Ile Gly Trp
 705 710 715 720

Lys Pro Pro Lys Arg Arg Gly Gly Gly Lys Ile Leu Gly Tyr Phe Leu
 725 730 735

Asp Gln His Asp Ser Glu Glu Leu Asp Trp His Ala Val Asn Gln Gln
 740 745 750

Pro Ile Pro Thr Arg Val Cys Lys Val Ser Asp Leu His Glu Gly His
 755 760 765

Phe Tyr Glu Phe Arg Ala Arg Ala Ala Asn Trp Ala Gly Val Gly Glu
 770 775 780

Leu Ser Ala Pro Ser Ser Leu Phe Glu Cys Lys Glu Trp Thr Met Pro
 785 790 795 800

Gln Pro Gly Pro Pro Tyr Asp Val Arg Ala Ser Glu Val Arg Ala Thr
 805 810 815

Ser Leu Val Leu Gln Trp Glu Pro Pro Leu Tyr Met Gly Ala Gly Pro
 820 825 830

Val Thr Gly Tyr His Val Ser Phe Gln Glu Glu Gly Ser Glu Gln Trp
 835 840 845

Lys Pro Val Thr Pro Gly Pro Ile Ser Gly Thr His Leu Arg Val Ser
 850 855 860

Asp Leu Gln Pro Gly Lys Ser Tyr Val Phe Gln Val Gln Ala Met Asn
 865 870 875 880

Ser Ala Gly Leu Gly Gln Pro Ser Met Pro Thr Asp Pro Val Leu Leu
 885 890 895

Glu Asp Lys Pro Gly Ala His Glu Ile Glu Val Gly Val Asp Glu Glu
 900 905 910

Gly Phe Ile Tyr Leu Ala Phe Glu Ala Pro Glu Ala Pro Asp Ser Ser
 915 920 925

Glu Phe Gln Trp Ser Lys Asp Tyr Lys Gly Pro Leu Asp Pro Gln Arg

ES 2 732 208 T3

Leu Cys Ile Glu Glu Leu Ser Lys Lys Asp Lys Gly Ile Tyr Arg
 1175 1180 1185

Ala Met Val Ser Asp Asp Arg Gly Glu Asp Asp Thr Ile Leu Asp
 1190 1195 1200

Leu Thr Gly Asp Ala Leu Asp Ala Ile Phe Thr Glu Leu Gly Arg
 1205 1210 1215

Ile Gly Ala Leu Ser Ala Thr Pro Leu Lys Ile Gln Gly Thr Glu
 1220 1225 1230

Glu Gly Ile Arg Ile Phe Ser Lys Val Lys Tyr Tyr Asn Val Glu
 1235 1240 1245

Tyr Met Lys Thr Thr Trp Phe His Lys Asp Lys Arg Leu Glu Ser
 1250 1255 1260

Gly Asp Arg Ile Arg Thr Gly Thr Thr Leu Asp Glu Ile Trp Leu
 1265 1270 1275

His Ile Leu Asp Pro Lys Asp Ser Asp Lys Gly Lys Tyr Thr Leu
 1280 1285 1290

Glu Ile Ala Ala Gly Lys Glu Val Arg Gln Leu Ser Thr Asp Leu
 1295 1300 1305

Ser Gly Gln Ala Phe Glu Asp Ala Met Ala Glu His Gln Arg Leu
 1310 1315 1320

Lys Thr Leu Ala Ile Ile Glu Lys Asn Arg Ala Lys Val Val Arg
 1325 1330 1335

Gly Leu Pro Asp Val Ala Thr Ile Met Glu Asp Lys Thr Leu Cys
 1340 1345 1350

Leu Thr Cys Ile Val Ser Gly Asp Pro Thr Pro Glu Ile Ser Trp
 1355 1360 1365

Leu Lys Asn Asp Gln Pro Val Thr Phe Leu Asp Arg Tyr Arg Met
 1370 1375 1380

Glu Val Arg Gly Thr Glu Val Thr Ile Thr Ile Glu Lys Val Asn
 1385 1390 1395

Ser Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Gly Val Phe Val Lys Asn Lys Tyr
 1400 1405 1410

Gly Ser Glu Thr Gly Gln Val Thr Ile Ser Val Phe Lys His Gly
 1415 1420 1425

Asp Glu Pro Lys Glu Leu Lys Ser Met
 1430 1435

5 <210> 2

<211> 9

ES 2 732 208 T3

<212> PRT
 <213> homo sapiens

 <400> 2
 Glu Gln Ser Thr Tyr Val Leu Val Arg
 5 1 5

 <210> 3

 <211> 17
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

 <400> 3
 Asp Ala Glu Ala Glu Asn Pro Gly Ala Pro Gly Ser Pro Leu Asn Val
 1 5 10 15

 Arg
 15
 <210> 4

 <211> 14
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 20

 <400> 4
 Ala Ser Glu Leu Val Val Met Gly Asp His Asp Ala Ala Arg
 1 5 10
 25
 <210> 5

 <211> 18
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 30

 <400> 5
 Ser Val Ile Gly Ser Gly Thr Trp Glu Ala Ile Ser Ser Glu Ser Pro
 1 5 10 15

 Val Arg

 <210> 6
 35
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

 <400> 6
 Phe Ala Val Leu Asp Leu Glu Lys
 1 5
 <210> 7

 <211> 20
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

 <400> 7
 Ala Met Asn Gln Tyr Gly Leu Ser Asp Pro Ser Glu Pro Ser Glu Pro
 1 5 10 15

 Ile Ala Leu Arg
 50 20

ES 2 732 208 T3

<210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 5 <213> homo sapiens
 <400> 8
 Val Gly Thr Ser Glu Trp Gln Thr Val Asn Asn Lys Pro Ile Gln Gly
 1 5 10 15
 Thr Arg
 10 <210> 9
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 15 <400> 9
 Gln Ala Leu Ala Thr Pro Ser Ala Pro Tyr Gly Phe Ala Leu Leu Asn
 1 5 10 15
 Cys Gly Lys
 20 <210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 25 <400> 10
 Val Ser Asp Leu His Glu Gly His Phe Tyr Glu Phe Arg
 1 5 10
 <210> 11
 30 <211> 20
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 11
 Ala Ala Asn Trp Ala Gly Val Gly Glu Leu Ser Ala Pro Ser Ser Leu
 1 5 10 15
 Phe Glu Cys Lys
 35 20
 <210> 12
 <211> 12
 40 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 12
 Leu Ile Ser Gly Trp Asn Ile Asp Ile Leu Glu Arg
 1 5 10
 45 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 50 <213> homo sapiens

<400> 13
 Gly Ser Tyr Thr Ala Gln Leu Gln Asp Gly Lys
 1 5 10

5 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10 <400> 14
 Val Thr Glu Asp Cys Gln Val Gln Leu Thr Cys Lys
 1 5 10

15 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

20 <400> 15
 Ile Gly Ala Leu Ser Ala Thr Pro Leu Lys
 1 5 10

25 <210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 16
 Gln Leu Ser Thr Asp Leu Ser Gly Gln Ala Phe Glu Asp Ala Met Ala
 1 5 10 15

30 Glu His Gln Arg
 20

<210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> artificial

<220>
 <223> cebador

40 <400> 17
 ctccatcact aggggtcct tgta 24

<210> 18

45 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 50 <223> cebador

<400> 18
 tggctacgta gataagtagc atggc 25

55 <210> 19
 <211> 15
 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> sonda
 5 <400> 19
 gttaatgatt aaccc 15
 <210> 20
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 20
 20 gctgtcatct cttgtgggct gt 22
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 21
 actcatggga gctgctggtt c 21
 <210> 22
 35 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 40 <223> sonda
 <400> 22
 cctgtcatgc ccacacaaat ctctcc 26
 45 <210> 23
 <211> 1685
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 50 <400> 23

ES 2 732 208 T3

Met Ser Leu Pro Phe Tyr Gln Arg Cys His Gln His Tyr Asp Leu Ser
 1 5 10 15

Tyr Arg Asn Lys Asp Val Arg Ser Thr Val Ser His Tyr Gln Arg Glu
 20 25 30

Lys Lys Arg Ser Ala Val Tyr Thr Gln Gly Ser Thr Ala Tyr Ser Ser
 35 40 45

Arg Ser Ser Ala Ala His Arg Arg Glu Ser Glu Ala Phe Arg Arg Ala
 50 55 60

Ser Ala Ser Ser Ser Gln Gln Gln Ala Ser Gln His Ala Leu Ser Ser
 65 70 75 80

Glu Val Ser Arg Lys Ala Ala Ser Ala Tyr Asp Tyr Gly Ser Ser His
 85 90 95

Gly Leu Thr Asp Ser Ser Leu Leu Leu Asp Asp Tyr Ser Ser Lys Leu
 100 105 110

Ser Pro Lys Pro Lys Arg Ala Lys His Ser Leu Leu Ser Gly Glu Glu
 115 120 125

Lys Glu Asn Leu Pro Ser Asp Tyr Met Val Pro Ile Phe Ser Gly Arg
 130 135 140

ES 2 732 208 T3

Gln Lys His Val Ser Gly Ile Thr Asp Thr Glu Glu Glu Arg Ile Lys
 145 150 155 160
 Glu Ala Ala Ala Tyr Ile Ala Gln Arg Asn Leu Leu Ala Ser Glu Glu
 165 170 175
 Gly Ile Thr Thr Ser Lys Gln Ser Thr Ala Ser Lys Gln Thr Thr Ala
 180 185 190
 Ser Lys Gln Ser Thr Ala Ser Lys Gln Ser Thr Ala Ser Lys Gln Ser
 195 200 205
 Thr Ala Ser Arg Gln Ser Thr Ala Ser Arg Gln Ser Val Val Ser Lys
 210 215 220
 Gln Ala Thr Ser Ala Leu Gln Gln Glu Glu Thr Ser Glu Lys Lys Ser
 225 230 235 240
 Arg Lys Val Val Ile Arg Glu Lys Ala Glu Arg Leu Ser Leu Arg Lys
 245 250 255
 Thr Leu Glu Glu Thr Glu Thr Tyr His Ala Lys Leu Asn Glu Asp His
 260 265 270
 Leu Leu His Ala Pro Glu Phe Ile Ile Lys Pro Arg Ser His Thr Val
 275 280 285
 Trp Glu Lys Glu Asn Val Lys Leu His Cys Ser Ile Ala Gly Trp Pro
 290 295 300
 Glu Pro Arg Val Thr Trp Tyr Lys Asn Gln Val Pro Ile Asn Val His
 305 310 315 320
 Ala Asn Pro Gly Lys Tyr Ile Ile Glu Ser Arg Tyr Gly Met His Thr
 325 330 335
 Leu Glu Ile Asn Gly Cys Asp Phe Glu Asp Thr Ala Gln Tyr Arg Ala
 340 345 350
 Ser Ala Met Asn Val Lys Gly Glu Leu Ser Ala Tyr Ala Ser Val Val
 355 360 365
 Val Lys Arg Tyr Lys Gly Glu Phe Asp Glu Thr Arg Phe His Ala Gly
 370 375 380
 Ala Ser Thr Met Pro Leu Ser Phe Gly Val Thr Pro Tyr Gly Tyr Ala

ES 2 732 208 T3

Pro Thr Asp Leu Ser Val Thr Glu Ala Thr Arg Ser Tyr Val Val Leu
645 650 655

Ser Trp Lys Pro Pro Gly Gln Arg Gly His Glu Gly Ile Met Tyr Phe
660 665 670

Val Glu Lys Cys Glu Ala Gly Thr Glu Asn Trp Gln Arg Val Asn Thr
675 680 685

Glu Leu Pro Val Lys Ser Pro Arg Phe Ala Leu Phe Asp Leu Ala Glu
690 695 700

Gly Lys Ser Tyr Cys Phe Arg Val Arg Cys Ser Asn Ser Ala Gly Val
705 710 715 720

Gly Glu Pro Ser Glu Ala Thr Glu Val Thr Val Val Gly Asp Lys Leu
725 730 735

Asp Ile Pro Lys Ala Pro Gly Lys Ile Ile Pro Ser Arg Asn Thr Asp
740 745 750

Thr Ser Val Val Val Ser Trp Glu Glu Ser Lys Asp Ala Lys Glu Leu
755 760 765

Val Gly Tyr Tyr Ile Glu Ala Ser Val Ala Gly Ser Gly Lys Trp Glu
770 775 780

Pro Cys Asn Asn Asn Pro Val Lys Gly Ser Arg Phe Thr Cys His Gly
785 790 795 800

Leu Val Thr Gly Gln Ser Tyr Ile Phe Arg Val Arg Ala Val Asn Ala
805 810 815

Ala Gly Leu Ser Glu Tyr Ser Gln Asp Ser Glu Ala Ile Glu Val Lys
820 825 830

Ala Ala Ile Gly Gly Gly Val Ser Pro Asp Val Cys Pro Ala Leu Ser
835 840 845

Asp Glu Pro Gly Gly Leu Thr Ala Ser Arg Gly Arg Val His Glu Ala
850 855 860

Ser Pro Pro Thr Phe Gln Lys Asp Ala Leu Leu Gly Ser Lys Pro Asn
865 870 875 880

Lys Pro Ser Leu Pro Ser Ser Ser Gln Asn Leu Gly Gln Thr Glu Val
885 890 895

ES 2 732 208 T3

Ser Lys Val Ser Glu Thr Val Gln Glu Glu Leu Thr Pro Pro Pro Gln
 900 905 910

Lys Ala Ala Pro Gln Gly Lys Ser Lys Ser Asp Pro Leu Lys Lys Lys
 915 920 925

Thr Asp Arg Ala Pro Pro Ser Pro Pro Cys Asp Ile Thr Cys Leu Glu
 930 935 940

Ser Phe Arg Asp Ser Met Val Leu Gly Trp Lys Gln Pro Asp Lys Ile
 945 950 955 960

Gly Gly Ala Glu Ile Thr Gly Tyr Tyr Val Asn Tyr Arg Glu Val Ile
 965 970 975

Asp Gly Val Pro Gly Lys Trp Arg Glu Ala Asn Val Lys Ala Val Ser
 980 985 990

Glu Glu Ala Tyr Lys Ile Ser Asn Leu Lys Glu Asn Met Val Tyr Gln
 995 1000 1005

Phe Gln Val Ala Ala Met Asn Met Ala Gly Leu Gly Ala Pro Ser
 1010 1015 1020

Ala Val Ser Glu Cys Phe Lys Cys Glu Glu Trp Thr Ile Ala Val
 1025 1030 1035

Pro Gly Pro Pro His Ser Leu Lys Cys Ser Glu Val Arg Lys Asp
 1040 1045 1050

Ser Leu Val Leu Gln Trp Lys Pro Pro Val His Ser Gly Arg Thr
 1055 1060 1065

Pro Val Thr Gly Tyr Phe Val Asp Leu Lys Glu Ala Lys Ala Lys
 1070 1075 1080

Glu Asp Gln Trp Arg Gly Leu Asn Glu Ala Ala Ile Lys Asn Val
 1085 1090 1095

Tyr Leu Lys Val Arg Gly Leu Lys Glu Gly Val Ser Tyr Val Phe
 1100 1105 1110

Arg Val Arg Ala Ile Asn Gln Ala Gly Val Gly Lys Pro Ser Asp
 1115 1120 1125

Leu Ala Gly Pro Val Val Ala Glu Thr Arg Pro Gly Thr Lys Glu
 1130 1135 1140

ES 2 732 208 T3

Val Val Val Asn Val Asp Asp Asp Gly Val Ile Ser Leu Asn Phe
1145 1150 1155

Glu Cys Asp Lys Met Thr Pro Lys Ser Glu Phe Ser Trp Ser Lys
1160 1165 1170

Asp Tyr Val Ser Thr Glu Asp Ser Pro Arg Leu Glu Val Glu Ser
1175 1180 1185

Lys Gly Asn Lys Thr Lys Met Thr Phe Lys Asp Leu Gly Met Asp
1190 1195 1200

Asp Leu Gly Ile Tyr Ser Cys Asp Val Thr Asp Thr Asp Gly Ile
1205 1210 1215

Ala Ser Ser Tyr Leu Ile Asp Glu Glu Glu Leu Lys Arg Leu Leu
1220 1225 1230

Ala Leu Ser His Glu His Lys Phe Pro Thr Val Pro Val Lys Ser
1235 1240 1245

Glu Leu Ala Val Glu Ile Leu Glu Lys Gly Gln Val Arg Phe Trp
1250 1255 1260

Met Gln Ala Glu Lys Leu Ser Gly Asn Ala Lys Val Asn Tyr Ile
1265 1270 1275

Phe Asn Glu Lys Glu Ile Phe Glu Gly Pro Lys Tyr Lys Met His
1280 1285 1290

Ile Asp Arg Asn Thr Gly Ile Ile Glu Met Phe Met Glu Lys Leu
1295 1300 1305

Gln Asp Glu Asp Glu Gly Thr Tyr Thr Phe Gln Leu Gln Asp Gly
1310 1315 1320

Lys Ala Thr Asn His Ser Thr Val Val Leu Val Gly Asp Val Phe
1325 1330 1335

Lys Lys Leu Gln Lys Glu Ala Glu Phe Gln Arg Gln Glu Trp Ile
1340 1345 1350

Arg Lys Gln Gly Pro His Phe Val Glu Tyr Leu Ser Trp Glu Val
1355 1360 1365

Thr Gly Glu Cys Asn Val Leu Leu Lys Cys Lys Val Ala Asn Ile

ES 2 732 208 T3

1370		1375		1380
Lys Lys Glu Thr His Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu Arg Glu Ile 1385 1390 1395				
Ser Val Asp Glu Lys His Asp Phe Lys Asp Gly Ile Cys Thr Leu 1400 1405 1410				
Leu Ile Thr Glu Phe Ser Lys Lys Asp Ala Gly Ile Tyr Glu Val 1415 1420 1425				
Ile Leu Lys Asp Asp Arg Gly Lys Asp Lys Ser Arg Leu Lys Leu 1430 1435 1440				
Val Asp Glu Ala Phe Lys Glu Leu Met Met Glu Val Cys Lys Lys 1445 1450 1455				
Ile Ala Leu Ser Ala Thr Asp Leu Lys Ile Gln Ser Thr Ala Glu 1460 1465 1470				
Gly Ile Gln Leu Tyr Ser Phe Val Thr Tyr Tyr Val Glu Asp Leu 1475 1480 1485				
Lys Val Asn Trp Ser His Asn Gly Ser Ala Ile Arg Tyr Ser Asp 1490 1495 1500				
Arg Val Lys Thr Gly Val Thr Gly Glu Gln Ile Trp Leu Gln Ile 1505 1510 1515				
Asn Glu Pro Thr Pro Asn Asp Lys Gly Lys Tyr Val Met Glu Leu 1520 1525 1530				
Phe Asp Gly Lys Thr Gly His Gln Lys Thr Val Asp Leu Ser Gly 1535 1540 1545				
Gln Ala Tyr Asp Glu Ala Tyr Ala Glu Phe Gln Arg Leu Lys Gln 1550 1555 1560				
Ala Ala Ile Ala Glu Lys Asn Arg Ala Arg Val Leu Gly Gly Leu 1565 1570 1575				
Pro Asp Val Val Thr Ile Gln Glu Gly Lys Ala Leu Asn Leu Thr 1580 1585 1590				
Cys Asn Val Trp Gly Asp Pro Pro Pro Glu Val Ser Trp Leu Lys 1595 1600 1605				

ES 2 732 208 T3

Asn Glu Lys Ala Leu Ala Ser Asp Asp His Cys Asn Leu Lys Phe
 1610 1615 1620

Glu Ala Gly Arg Thr Ala Tyr Phe Thr Ile Asn Gly Val Ser Thr
 1625 1630 1635

Ala Asp Ser Gly Lys Tyr Gly Leu Val Val Lys Asn Lys Tyr Gly
 1640 1645 1650

Ser Glu Thr Ser Asp Phe Thr Val Ser Val Phe Ile Pro Glu Glu
 1655 1660 1665

Glu Ala Arg Met Ala Ala Leu Glu Ser Leu Lys Gly Gly Lys Lys
 1670 1675 1680

Ala Lys
 1685

<210> 24

5 <211> 1465

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 24

Met Ser Leu Val Thr Val Pro Phe Tyr Gln Lys Arg His Arg His Phe
 1 5 10 15

Asp Gln Ser Tyr Arg Asn Ile Gln Thr Arg Tyr Leu Leu Asp Glu Tyr
 20 25 30

Ala Ser Lys Lys Arg Ala Ser Thr Gln Ala Ser Ser Gln Lys Ser Leu
 35 40 45

Ser Gln Arg Ser Ser Ser Gln Arg Ala Ser Ser Gln Thr Ser Leu Gly
 50 55 60

Gly Thr Ile Cys Arg Val Cys Ala Lys Arg Val Ser Thr Gln Glu Asp
 65 70 75 80

Glu Glu Gln Glu Asn Arg Ser Arg Tyr Gln Ser Leu Val Ala Ala Tyr
 85 90 95

Gly Glu Ala Lys Arg Gln Arg Phe Leu Ser Glu Leu Ala His Leu Glu
 100 105 110

10 Glu Asp Val His Leu Ala Arg Ser Gln Ala Arg Asp Lys Leu Asp Lys
 115 120 125

ES 2 732 208 T3

Tyr Ala Ile Gln Gln Met Met Glu Asp Lys Leu Ala Trp Glu Arg His
 130 135 140

Thr Phe Glu Glu Arg Ile Ser Arg Ala Pro Glu Ile Leu Val Arg Leu
 145 150 155 160

Arg Ser His Thr Val Trp Glu Arg Met Ser Val Lys Leu Cys Phe Thr
 165 170 175

Val Gln Gly Phe Pro Thr Pro Val Val Gln Trp Tyr Lys Asp Gly Ser
 180 185 190

Leu Ile Cys Gln Ala Ala Glu Pro Gly Lys Tyr Arg Ile Glu Ser Asn
 195 200 205

Tyr Gly Val His Thr Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Phe Asp Asp Thr
 210 215 220

Ala Thr Tyr Ser Ala Val Ala Thr Asn Ala His Gly Gln Val Ser Thr
 225 230 235 240

Asn Ala Ala Val Val Val Arg Arg Phe Arg Gly Asp Glu Glu Pro Phe
 245 250 255

Arg Ser Val Gly Leu Pro Ile Gly Leu Pro Leu Ser Ser Met Ile Pro
 260 265 270

Tyr Thr His Phe Asp Val Gln Phe Leu Glu Lys Phe Gly Val Thr Phe
 275 280 285

Arg Arg Glu Gly Glu Thr Val Thr Leu Lys Cys Thr Met Leu Val Thr
 290 295 300

Pro Asp Leu Lys Arg Val Gln Pro Arg Ala Glu Trp Tyr Arg Asp Asp
 305 310 315 320

Val Leu Leu Lys Glu Ser Lys Trp Thr Lys Met Phe Phe Gly Glu Gly
 325 330 335

Gln Ala Ser Leu Ser Phe Ser His Leu His Lys Asp Asp Glu Gly Leu
 340 345 350

Tyr Thr Leu Arg Ile Val Ser Arg Gly Gly Val Ser Asp His Ser Ala
 355 360 365

Phe Leu Phe Val Arg Asp Ala Asp Pro Leu Val Thr Gly Ala Pro Gly
 370 375 380

ES 2 732 208 T3

Ala Pro Met Asp Leu Gln Cys His Asp Ala Asn Arg Asp Tyr Val Ile
 385 390 395 400

Val Thr Trp Lys Pro Pro Asn Thr Thr Thr Glu Ser Pro Val Met Gly
 405 410 415

Tyr Phe Val Asp Arg Cys Glu Val Gly Thr Asn Asn Trp Val Gln Cys
 420 425 430

Asn Asp Ala Pro Val Lys Ile Cys Lys Tyr Pro Val Thr Gly Leu Phe
 435 440 445

Glu Gly Arg Ser Tyr Ile Phe Arg Val Arg Ala Val Asn Ser Ala Gly
 450 455 460

Ile Ser Arg Pro Ser Arg Val Ser Asp Ala Val Ala Ala Leu Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Asp Leu Arg Arg Leu Gln Ala Val His Leu Glu Gly Glu Lys Glu
 485 490 495

Ile Ala Ile Tyr Gln Asp Asp Leu Glu Gly Asp Ala Gln Val Pro Gly
 500 505 510

Pro Pro Thr Gly Val His Ala Ser Glu Ile Ser Arg Asn Tyr Val Val
 515 520 525

Leu Ser Trp Glu Pro Pro Thr Pro Arg Gly Lys Asp Pro Leu Met Tyr
 530 535 540

Phe Ile Glu Lys Ser Val Val Gly Ser Gly Ser Trp Gln Arg Val Asn
 545 550 555 560

Ala Gln Thr Ala Val Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Val Phe Asp Leu Met
 565 570 575

Glu Gly Lys Ser Tyr Val Phe Arg Val Leu Ser Ala Asn Arg His Gly
 580 585 590

Leu Ser Glu Pro Ser Glu Ile Thr Ser Pro Ile Gln Ala Gln Asp Val
 595 600 605

Thr Val Val Pro Ser Ala Pro Gly Arg Val Leu Ala Ser Arg Asn Thr
 610 615 620

Lys Thr Ser Val Val Val Gln Trp Asp Arg Pro Lys His Glu Glu Asp
 625 630 635 640

ES 2 732 208 T3

Leu Leu Gly Tyr Tyr Val Asp Cys Cys Val Ala Gly Thr Asn Leu Trp
 645 650 655
 Glu Pro Cys Asn His Lys Pro Ile Gly Tyr Asn Arg Phe Val Val His
 660 665 670
 Gly Leu Thr Thr Gly Glu Gln Tyr Ile Phe Arg Val Lys Ala Val Asn
 675 680 685
 Ala Val Gly Met Ser Glu Asn Ser Gln Glu Ser Asp Val Ile Lys Val
 690 695 700
 Gln Ala Ala Leu Thr Val Pro Ser His Pro Tyr Gly Ile Thr Leu Leu
 705 710 715 720
 Asn Cys Asp Gly His Ser Met Thr Leu Gly Trp Lys Val Pro Lys Phe
 725 730 735
 Ser Gly Gly Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Tyr Leu Asp Lys Arg Glu Val
 740 745 750
 His His Lys Asn Trp His Glu Val Asn Ser Ser Pro Ser Lys Pro Thr
 755 760 765
 Ile Leu Thr Val Asp Gly Leu Thr Glu Gly Ser Leu Tyr Glu Phe Lys
 770 775 780
 Ile Ala Ala Val Asn Leu Ala Gly Ile Gly Glu Pro Ser Asp Pro Ser
 785 790 795 800
 Glu His Phe Lys Cys Glu Ala Trp Thr Met Pro Glu Pro Gly Pro Ala
 805 810 815
 Tyr Asp Leu Thr Phe Cys Glu Val Arg Asp Thr Ser Leu Val Met Leu
 820 825 830
 Trp Lys Ala Pro Val Tyr Ser Gly Ser Ser Pro Val Ser Gly Tyr Phe
 835 840 845
 Val Asp Phe Arg Glu Glu Asp Ala Gly Glu Trp Ile Thr Val Asn Gln
 850 855 860
 Thr Thr Thr Ala Asn Arg Tyr Leu Lys Val Ser Asp Leu Gln Gln Gly
 865 870 875 880
 Lys Thr Tyr Val Phe Arg Val Arg Ala Val Asn Ala Asn Gly Val Gly

ES 2 732 208 T3

Gly Pro His Phe Ala Glu Tyr Leu His Trp Asp Val Thr Glu Glu
 1130 1135 1140

Cys Glu Val Arg Leu Val Cys Lys Val Ala Asn Thr Lys Lys Glu
 1145 1150 1155

Thr Val Phe Lys Trp Leu Lys Asp Asp Val Leu Tyr Glu Thr Glu
 1160 1165 1170

Thr Leu Pro Asn Leu Glu Arg Gly Ile Cys Glu Leu Leu Ile Pro
 1175 1180 1185

Lys Leu Ser Lys Lys Asp His Gly Glu Tyr Lys Ala Thr Leu Lys
 1190 1195 1200

Asp Asp Arg Gly Gln Asp Val Ser Ile Leu Glu Ile Ala Gly Lys
 1205 1210 1215

Val Tyr Asp Asp Met Ile Leu Ala Met Ser Arg Val Cys Gly Lys
 1220 1225 1230

Ser Ala Ser Pro Leu Lys Val Leu Cys Thr Pro Glu Gly Ile Arg
 1235 1240 1245

Leu Gln Cys Phe Met Lys Tyr Phe Thr Asp Glu Met Lys Val Asn
 1250 1255 1260

Trp Cys His Lys Asp Ala Lys Ile Ser Ser Ser Glu His Met Arg
 1265 1270 1275

Ile Gly Gly Ser Glu Glu Met Ala Trp Leu Gln Ile Cys Glu Pro
 1280 1285 1290

Thr Glu Lys Asp Lys Gly Lys Tyr Thr Phe Glu Ile Phe Asp Gly
 1295 1300 1305

Lys Asp Asn His Gln Arg Ser Leu Asp Leu Ser Gly Gln Ala Phe
 1310 1315 1320

Asp Glu Ala Phe Ala Glu Phe Gln Gln Phe Lys Ala Ala Ala Phe
 1325 1330 1335

Ala Glu Lys Asn Arg Gly Arg Leu Ile Gly Gly Leu Pro Asp Val
 1340 1345 1350

Val Thr Ile Met Glu Gly Lys Thr Leu Asn Leu Thr Cys Thr Val
 1355 1360 1365

ES 2 732 208 T3

Phe Gly Asn Pro Asp Pro Glu Val Ile Trp Phe Lys Asn Asp Gln
1370 1375 1380

Asp Ile Gln Leu Ser Glu His Phe Ser Val Lys Val Glu Gln Ala
1385 1390 1395

Lys Tyr Val Ser Met Thr Ile Lys Gly Val Thr Ser Glu Asp Ser
1400 1405 1410

Gly Lys Tyr Ser Ile Asn Ile Lys Asn Lys Tyr Gly Gly Glu Lys
1415 1420 1425

Ile Asp Val Thr Val Ser Val Tyr Lys His Gly Glu Lys Ile Pro
1430 1435 1440

Asp Met Ala Pro Pro Gln Gln Ala Lys Pro Lys Leu Ile Pro Ala
1445 1450 1455

Ser Ala Ser Ala Ala Gly Gln
1460 1465

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico, el pronóstico, el seguimiento de la evolución o la determinación del riesgo de tener o desarrollar una distrofia muscular en un sujeto, o para determinar la eficacia de un tratamiento de una distrofia muscular en un sujeto, que comprende detectar mediante un inmunoensayo, en particular mediante un ensayo de tipo sándwich, un ensayo competitivo, una transferencia western o un ELISA, o mediante espectrometría de masas, la presencia o ausencia de miomesina 2 o miomesina 3 o de un fragmento específico de dicha miomesina 2 o miomesina 3 en una muestra de fluido biológico de dicho sujeto; en donde el fluido biológico es sangre, suero o plasma.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho método es para el pronóstico o para el seguimiento de la evolución de una distrofia muscular en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende: medir el nivel de miomesina 2 o de miomesina 3, o de un fragmento específico de las mismas, en una muestra de fluido biológico del sujeto, siendo comparado después este nivel con el nivel de dicha miomesina o de dicho fragmento específico en una muestra de fluido biológico previamente recolectada en el mismo sujeto; siendo la evolución del nivel de dicha miomesina o de dicho fragmento específico de la misma indicativa de la progresión de la enfermedad.
3. El método según la reivindicación 1, en el que dicho método es para determinar la eficacia de un tratamiento de una distrofia muscular en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende: medir el nivel de miomesina 2 o miomesina 3 o de un fragmento específico de la misma en una muestra de fluido biológico del sujeto, comparándose entonces este nivel con el nivel de dicha miomesina 2 o miomesina 3 de dicho fragmento específico en una muestra de fluido biológico previamente recogida en el mismo sujeto; siendo la evolución del nivel de dicha miomesina 2 o miomesina 3 o de dicho fragmento específico de la misma indicativa de la progresión de la enfermedad.
4. El método según la reivindicación 3, que comprende:
- medir el nivel de dicha miomesina 2 o miomesina 3 o de un fragmento específico de la misma en una muestra de fluido biológico del sujeto, determinándose un nivel de referencia;
 - medir entonces el nivel de dicha miomesina 2 o miomesina 3 o de dicho fragmento específico en una segunda muestra de fluido biológico recolectada en el mismo sujeto en un momento después de la administración del tratamiento, determinándose un nivel de prueba; y
 - comparar los niveles de referencia y de prueba, siendo la evolución del nivel de dicha miomesina 2 o miomesina 3 o de un fragmento específico de las mismas indicativa de la progresión de la enfermedad.
5. El método según la reivindicación 3 o 4, en el que una reducción del nivel de dicha miomesina 2 o miomesina 3 o de dicho fragmento es indicativa de un tratamiento eficaz de la distrofia muscular.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende la detección de la presencia o ausencia de miomesina 3 o de un fragmento específico de la miomesina 3.
7. El método según la reivindicación 6, en el que el fragmento de miomesina 3 es un fragmento C-terminal.
8. El método según las reivindicaciones 1 a 6, en el que el fragmento específico de la miomesina 3 es un fragmento de aproximadamente 110 o 140 kDa.
9. El método según las reivindicaciones 1 a 6, en el que el fragmento específico de la miomesina 3 está comprendido entre los aminoácidos 350 y 1350 de la SEQ ID NO: 1 o de cualquier variante natural de la miomesina 3.
10. El método según las reivindicaciones 1 a 6, en el que el fragmento específico de la miomesina 3 se elige entre la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 16.
11. El método según la reivindicación 10, siendo el fluido biológico suero.
12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la distrofia muscular es distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (BMD) y distrofias musculares de cintura y extremidades (LGMD), como la alfa-sarcoglicanopatía (LGMD2D), gamma-sarcoglicanopatía (LGMD2C), calpainopatía (LGMD2A), disferlinopatía o distrofia muscular de Miyoshi.
13. El uso de miomesina 2 o miomesina 3, en particular de miomesina 3, o de un fragmento específico de miomesina 2 o miomesina 3, como biomarcadores para el diagnóstico, el pronóstico, el seguimiento de la evolución, o para determinar el riesgo de tener o de desarrollar una distrofia muscular, o para determinar la eficacia de un tratamiento de una distrofia muscular.
14. El uso de un *kit* para implementar un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende los medios para detectar miomesina 2 o miomesina 3, en particular miomesina 3, o un fragmento de las mismas, en particular un fragmento específico de miomesina 3.

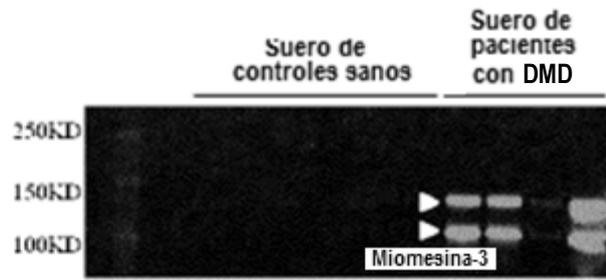


Figura 1

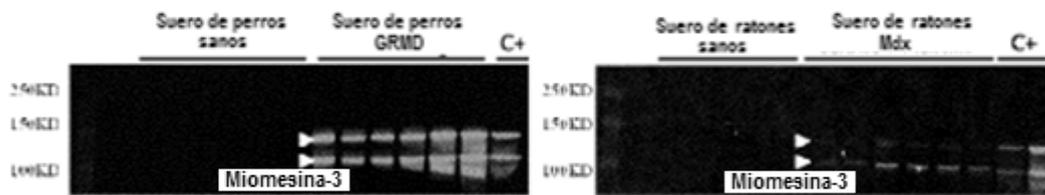


Figura 2

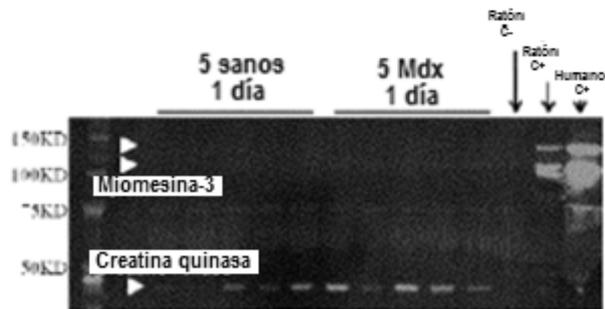


Figura 3

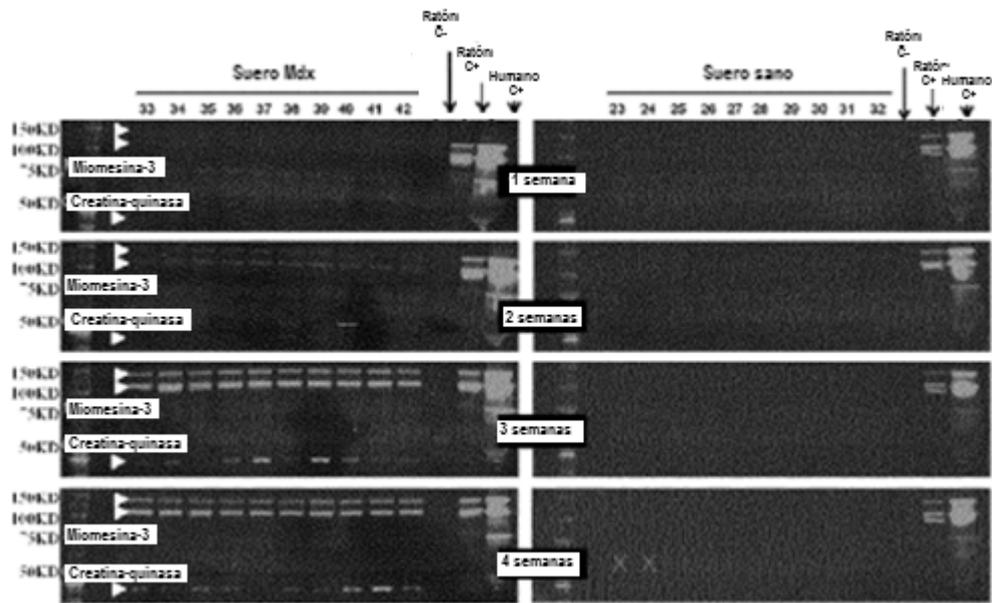


Figura 4

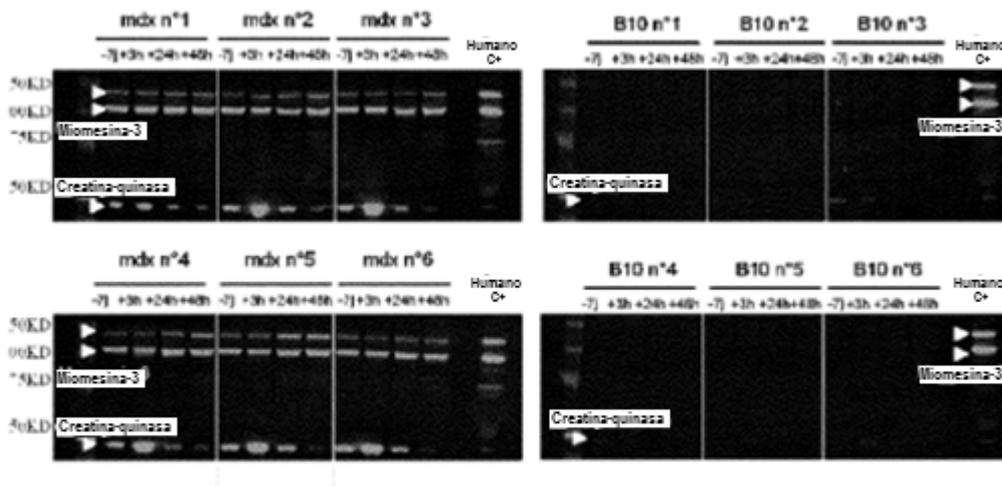
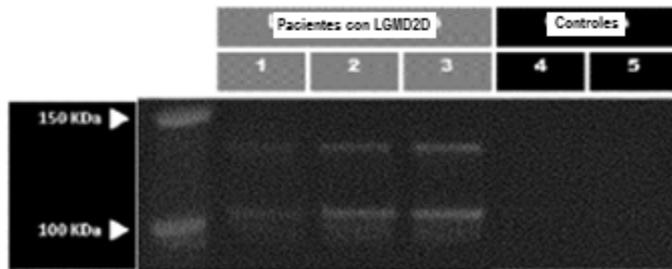


Figura 5



Actividad de CK en el suero (U/mL)

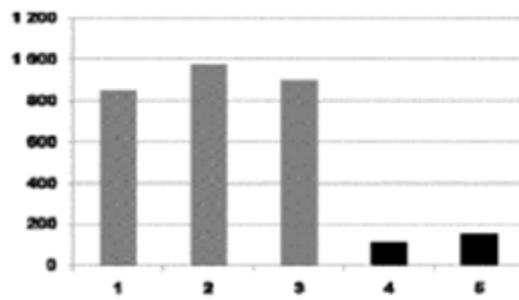


Figura 6

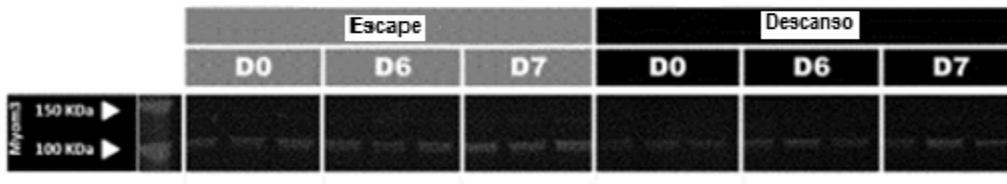


Figura 7

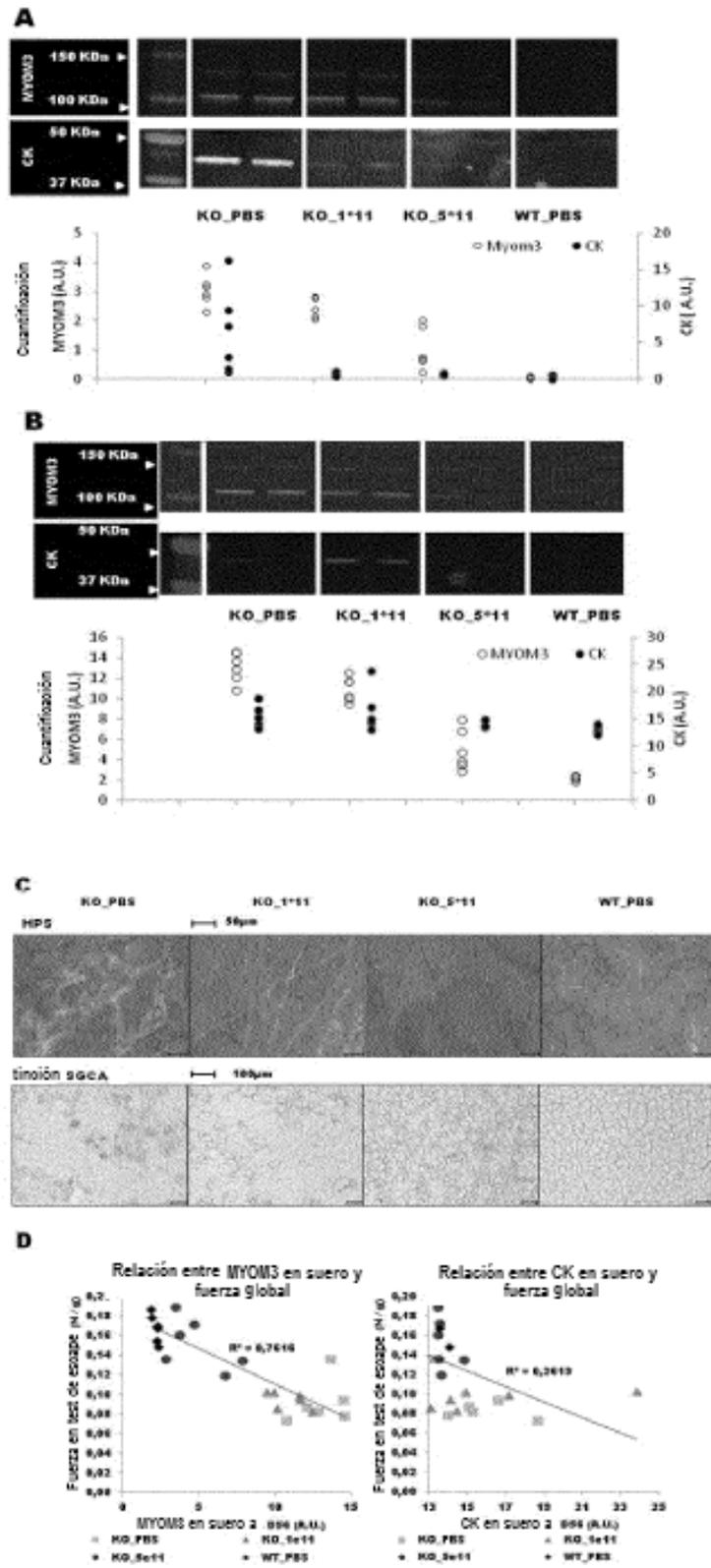


Figura 8

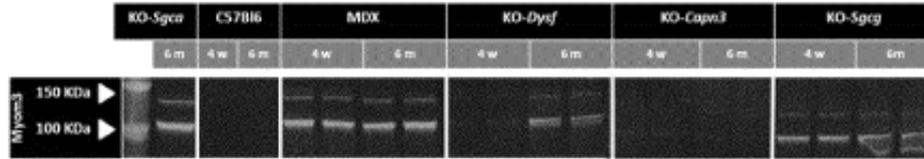


Figura 9

Secuencia	Localización	Puntuación Ion DMD 1	Puntuación Ion DMD 2	Puntuación Ion DMD 3	Puntuación Ion DMD 4
EQSTYVLVR	355-363				15
DAEAENPGAPGSPLNVR	364-380				40
ASELVVMGDHDAAR	461-474				34
SVIGSGTWEAISSESPVR	539-556	71			89
FAVLDEK	560-567	23	29		31
AMNQYGLSDPSEPSEPIALR	577-596				58
VGTSWQTVNNKPIQGTR	640-657	32			41
QALATPSAPYGFALLNCGK	695-713				65
VSDLHEGHFYEFR	761-773				32
AANWAGVGEISAPSSLFECK	776-795	30	17		68
LISGWNIDILER	1008-1019				34
GSYTAQLQDGK	1076-1086				24
VTEDCQVQLTCK	1130-1141				50
IGALSATPLK	1219-1228				54
QLSTDLSGQAFEDAMAHQK	1303-1322				49

Figura 10

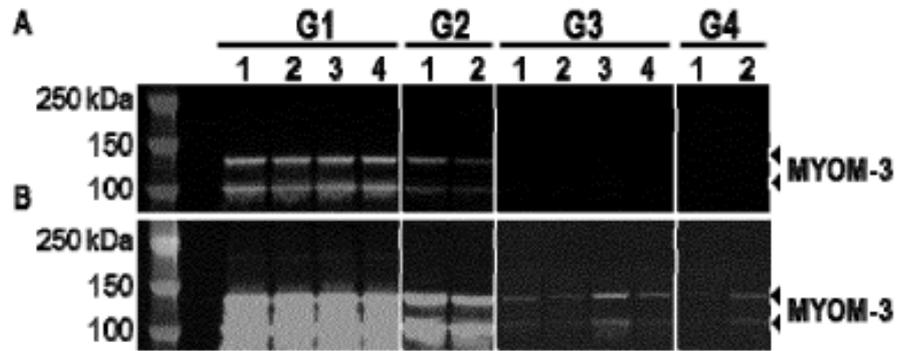


Figura 11

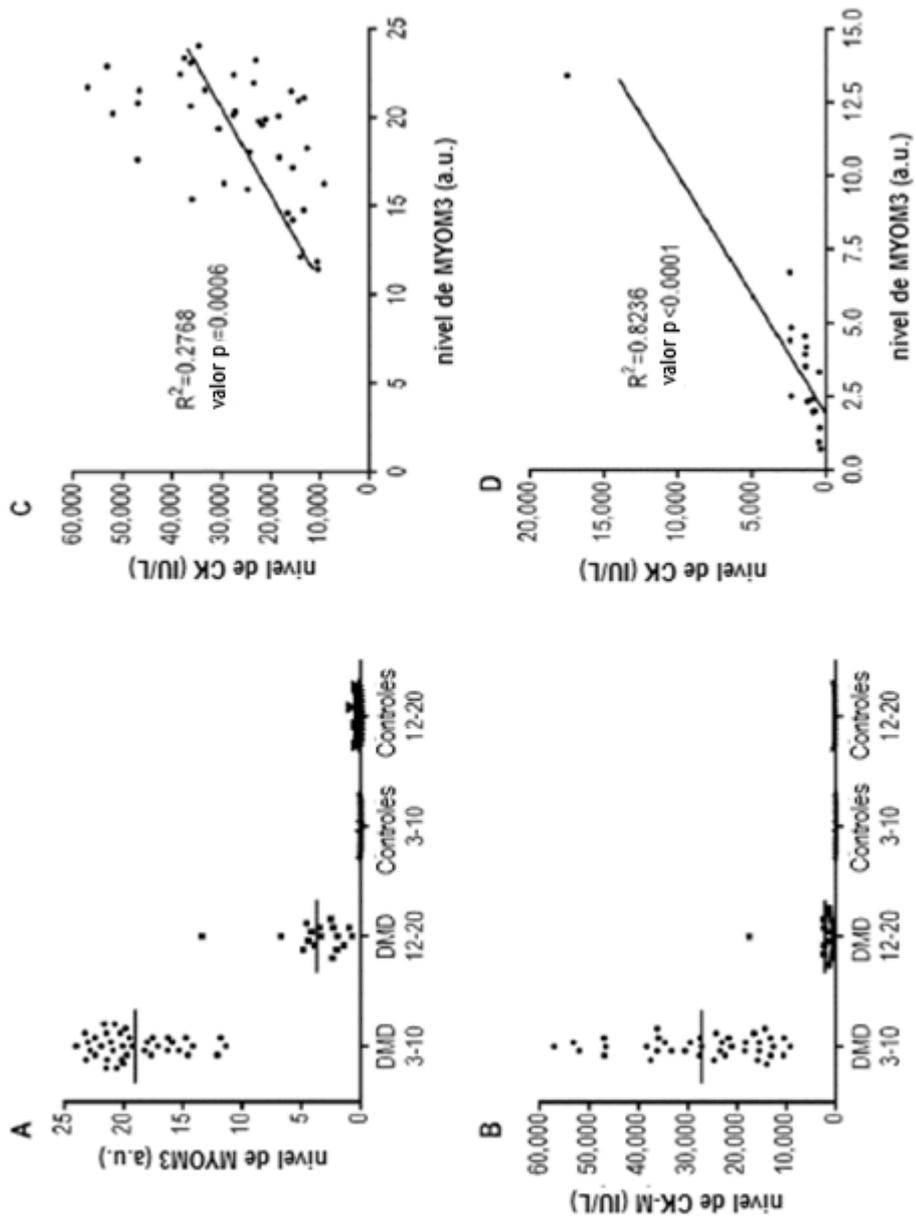


Figura 12

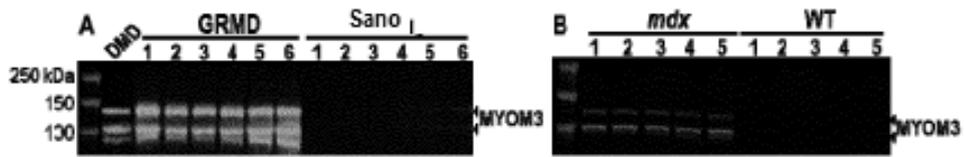


Figura 13

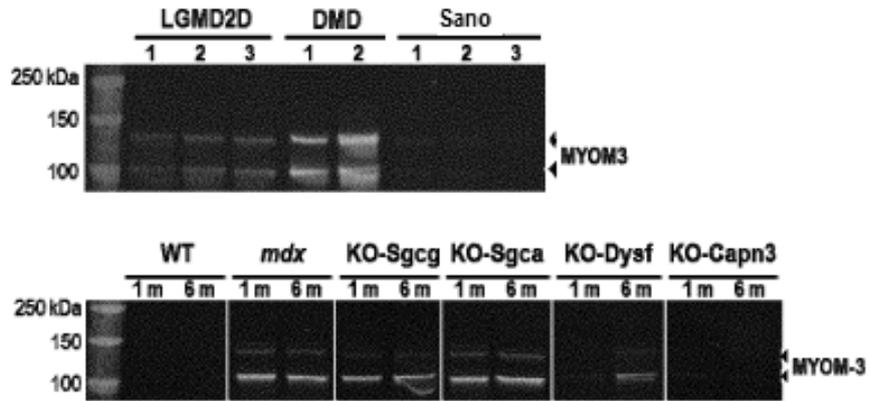


Figura 14

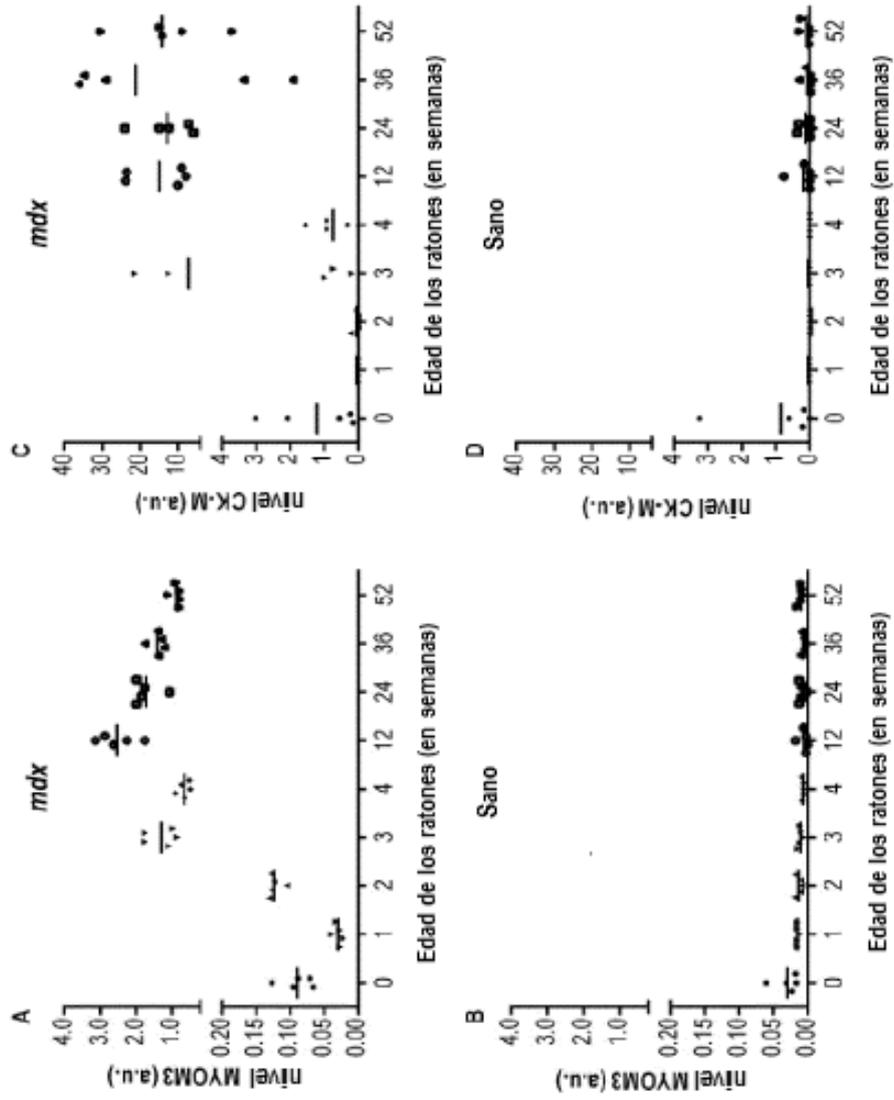


Figura 15

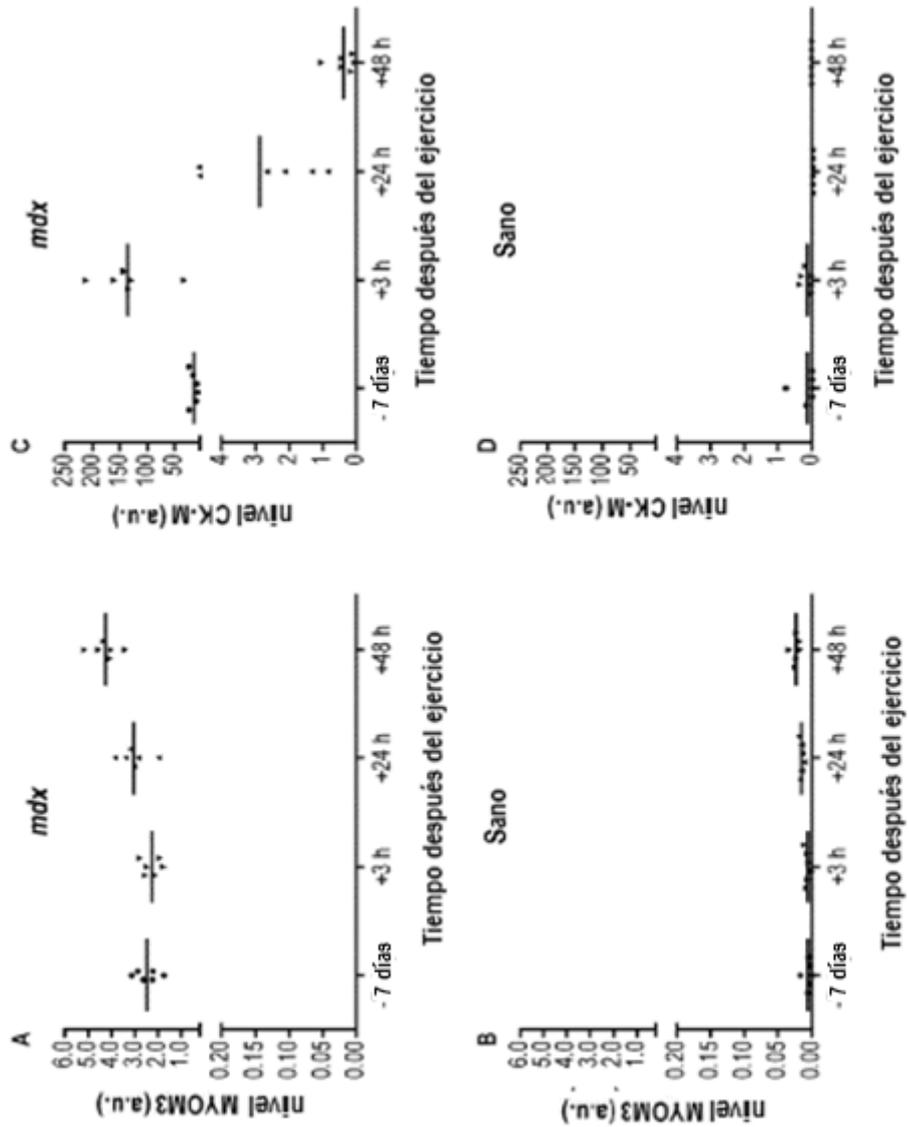


Figura 16

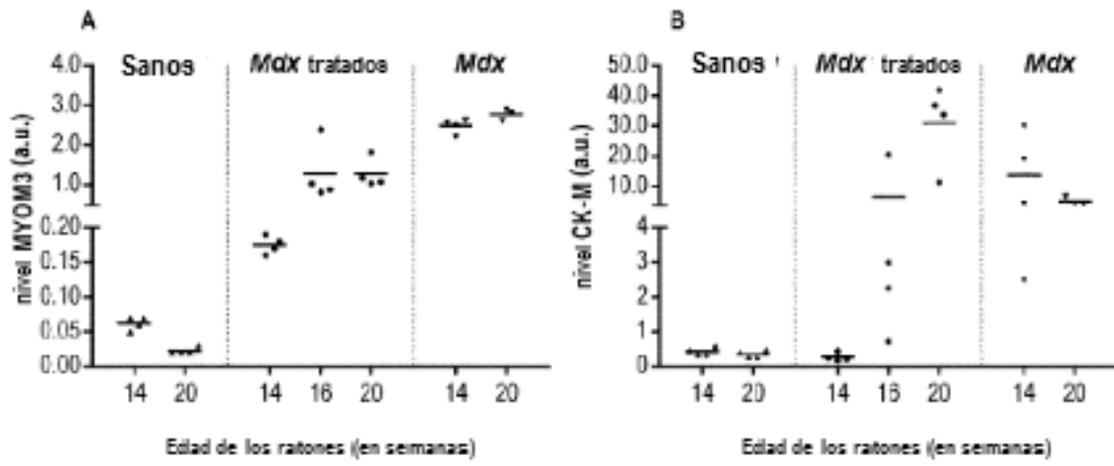


Figura 17

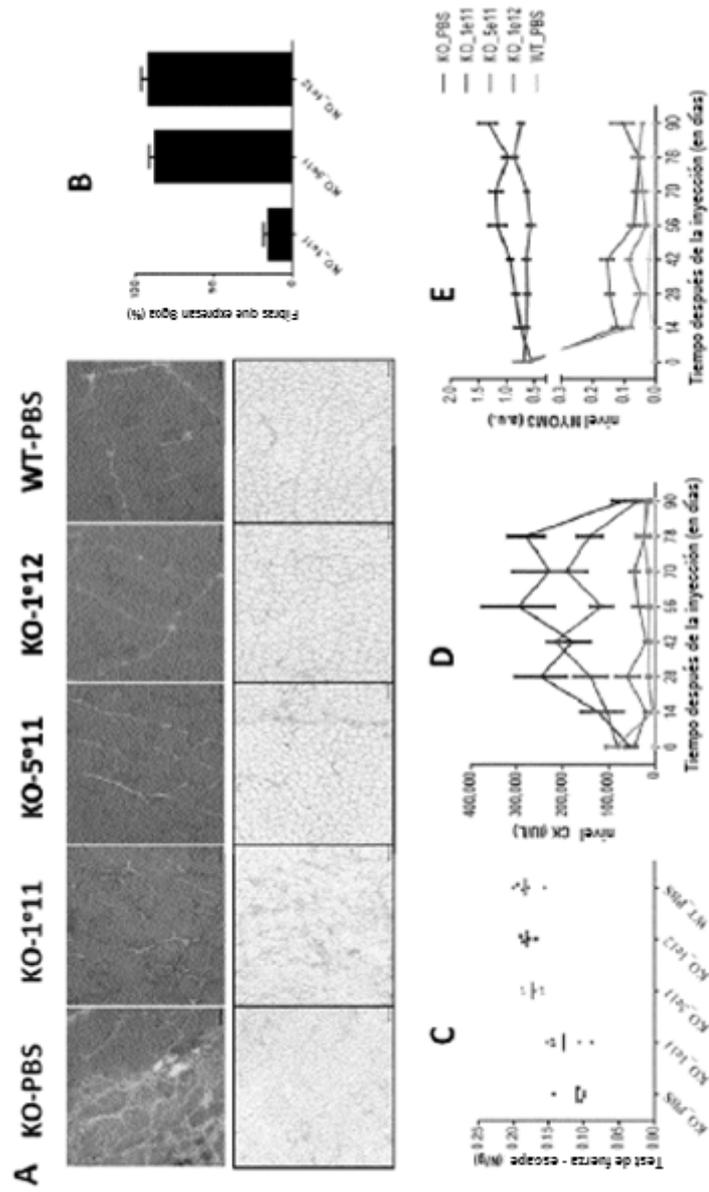


Figura 18

F

	KO_PBS / KO_1e11		KO_PBS / KO_5e11		KO_PBS / KO_1e12		KO_PBS / WT		KO_1e11 / KO_5e11	
	MYOM3	CK	MYOM3	CK	MYOM3	CK	MYOM3	CK	MYOM3	CK
J0	0,193	0,338	0,616	0,436	0,459	0,210	0,000	0,003	0,253	0,229
J14	0,409	0,709	0,003	0,022	0,003	0,031	0,002	0,028	0,000	0,046
J28	0,023	0,147	0,000	0,025	0,000	0,008	0,000	0,012	0,001	0,116
J42	0,009	0,394	0,000	0,013	0,000	0,011	0,000	0,009	0,001	0,000
J56	0,010	0,061	0,002	0,029	0,002	0,022	0,002	0,020	0,001	0,032
J70	0,002	0,695	0,001	0,082	0,000	0,054	0,000	0,046	0,000	0,029
J79	0,352	0,025	0,000	0,003	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,010
J90	0,021	0,272	0,001	0,085	0,001	0,073	0,001	0,046	0,000	0,231

	KO_1e11 / KO_1e12		KO_1e11 / WT		KO_5e11 / KO_1e12		KO_5e11 / WT		KO_1e12 / WT	
	MYOM3	CK	MYOM3	CK	MYOM3	CK	MYOM3	CK	MYOM3	CK
J0	0,986	0,888	0,001	0,036	0,517	0,137	0,000	0,002	0,026	0,027
J14	0,000	0,049	0,000	0,045	0,095	0,023	0,002	0,015	0,003	0,073
J28	0,000	0,025	0,000	0,019	0,002	0,155	0,001	0,082	0,200	0,078
J42	0,001	0,000	0,001	0,000	0,028	0,381	0,002	0,013	0,000	0,049
J56	0,001	0,014	0,001	0,011	0,132	0,142	0,027	0,046	0,035	0,083
J70	0,000	0,010	0,000	0,013	0,320	0,030	0,010	0,011	0,064	0,020
J79	0,000	0,011	0,000	0,007	0,882	0,875	0,036	0,080	0,059	0,197
J90	0,000	0,076	0,000	0,027	0,164	0,507	0,054	0,119	0,003	0,071

Figura 18 (cont.)

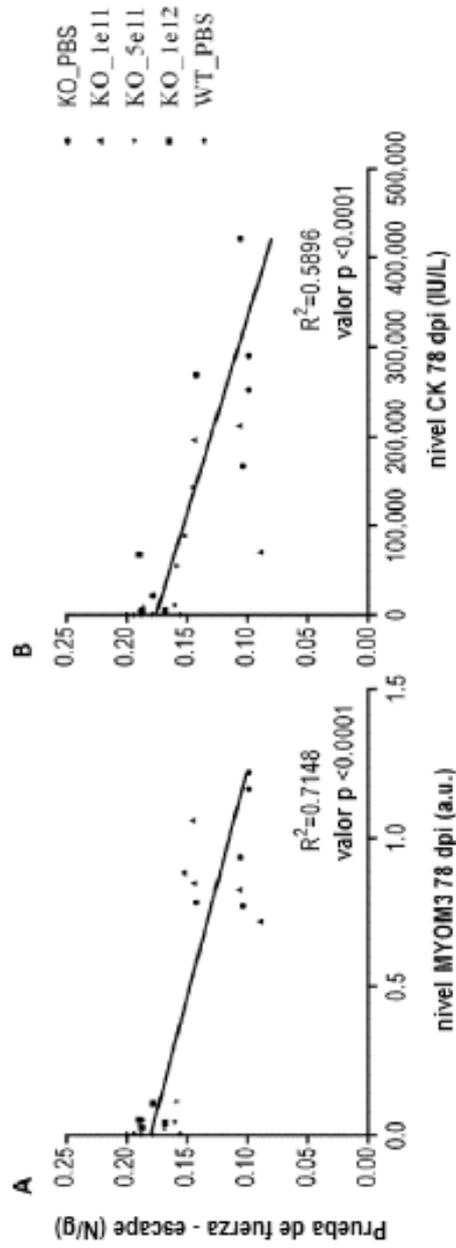


Figura 19

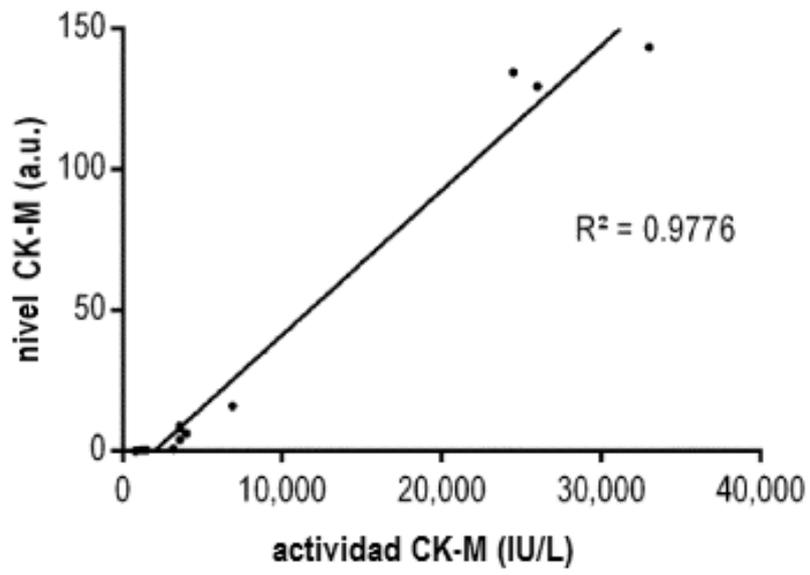


Figura 20

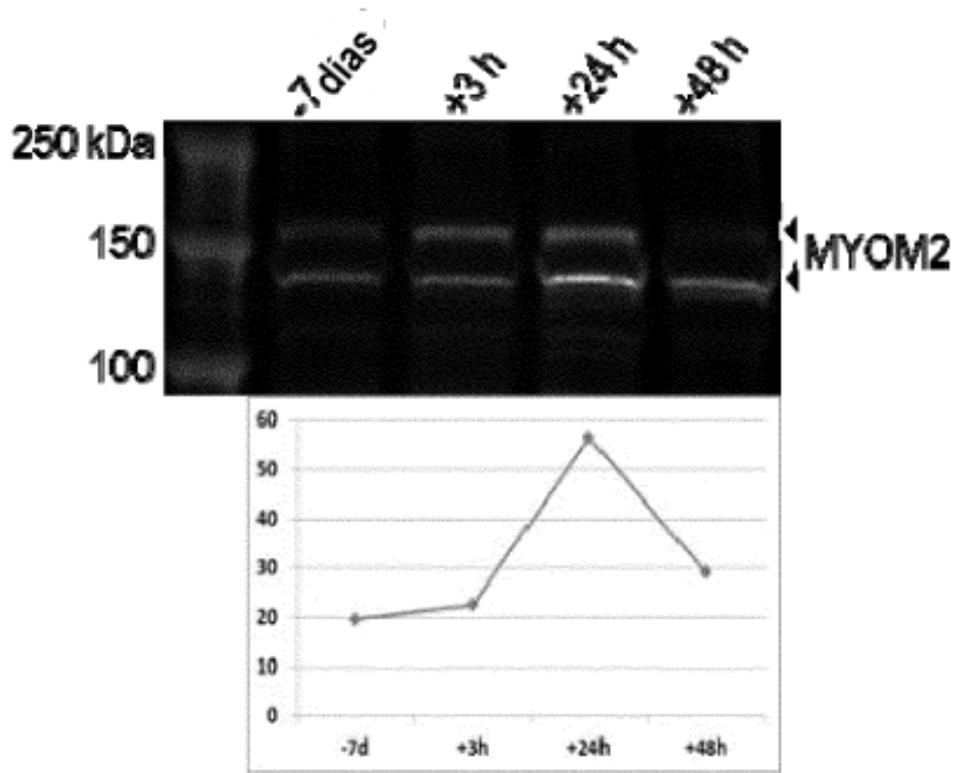


Figura 21