

USO DE INHIBIDORES DE P38 PARA REDUCIR LA EXPRESIÓN DE DUX4

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/568,673, presentada el 5 de octubre de 2017; la solicitud provisional estadounidense n.º 62/568,754, presentada el 5 de octubre de 2017; la solicitud provisional estadounidense n.º 62/682,563, presentada el 8 de junio de 2018; y la solicitud provisional estadounidense n.º 62/682,565, presentada el 8 de junio de 2018; todas las cuales se incorporan a la presente en su totalidad mediante referencia.

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presentó por vía electrónica en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Dicha copia de ASCII, creada el 4 de octubre de 2018, se denomina FULC_027_02WO_ST25.txt y tiene un tamaño de 27 KB.

Campo de la descripción

La presente invención hace referencia a composiciones y métodos para inhibir la cinasa p38 para reducir la expresión de proteínas y genes de DUX4 y los genes posteriores regulados por DUX4.

La presente invención hace referencia además a métodos para el tratamiento de sujetos con enfermedades y trastornos asociados con un aumento de la expresión de DUX4 o la expresión de una forma anómala de DUX4, tal como distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD).

Antecedentes

Las distrofias musculares (MD) son un grupo de más de 30 enfermedades genéticas distintas caracterizadas por debilidad progresiva y degeneración de los músculos esqueléticos que controlan el movimiento. Algunas formas de MD se producen en la infancia o niñez, mientras que otras pueden no aparecer hasta la mediana edad o más tarde. Las diversas enfermedades de MD difieren en términos de la distribución y grado del debilitamiento del músculo (algunas formas de MD también afectan el músculo cardíaco), la edad de la aparición, la velocidad de la evolución y el patrón de herencia.

La distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD) es la tercera forma más común de distrofia muscular y afecta aproximadamente a 1 de cada 15 000 personas a nivel mundial. La FSHD es provocada por mutaciones genéticas que dan como resultado la desrepresión epigenética del gen DUX4, lo que hace que esta enfermedad sea única entre las distrofias musculares. Las

manifestaciones primarias de la FSHD son la debilidad y el desgaste de los músculos faciales, cintura escapular, extremidades superiores y tronco, y afectan a las extremidades inferiores en casos más graves.

Las mutaciones genéticas asociadas con la FSHD llevan a una descompresión parcial de la estructura de cromatina D4Z4 y a una falla resultante de la represión de DUX4, un factor de transcripción codificado por la unidad D4Z4, en el músculo esquelético. La FSHD1, que representa alrededor de 95 % de los casos de FSHD indicados, está asociada con delecciones de repeticiones del macrosatélite D4Z4 en la región subtelomérica del cromosoma 4q35, lo que deja 1-10 repeticiones de D4Z4 (reseñado en Tawil et ál., 2014). La FSHD2 es provocada por mutaciones en el gen del dominio 1 portador de mantenimiento estructural de la bisagra flexible de cromosomas (*SMCHD1*) en el cromosoma 18 (reseñado en van der Maarel et ál., 2007). Tanto las mutaciones de FSHD1 como FSHD2 conducen a la pérdida de represión en la matriz de repetición 4q35 de D4Z4, lo que permite la transcripción anómala en el músculo de una forma completa de la caja homeobox doble 4, DUX4, ARNm (*DUX4-fl*), que codifica el factor de transcripción de homeobox doble 4 (DUX4) (Tawil et ál., 2014). Las isoformas de ARN de *DUX4-fl* halladas asociadas con la FSHD solo varían en la región 3' sin traducir y no tienen una distinción funcional identificada.

Actualmente no existe ningún tratamiento aprobado que pueda detener o revertir los efectos de la FSHD, aunque a menudo se recetan medicamentos antiinflamatorios no esteroides para mejorar la comodidad y la movilidad. Es evidente, por lo tanto, que existe una necesidad en la técnica de nuevos métodos para reducir los niveles de expresión de DUX4, por ejemplo, ARNm de *DUX4-fl* y/o proteína DUX4, por ejemplo, para el tratamiento de la FSHD y otras enfermedades. La presente invención satisface esta necesidad.

Breve descripción de las Figuras

Las FIG. 1A y 1B muestran la expresión de la proteína DUX4 y el ARN en miotubos de FSHD. La FIG. 1A incluye micrográficas de miotubos de FSHD teñidos con un anticuerpo que se une a la proteína DUX4 y/o a 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; para detectar núcleos). Los miotubos maduros de FSHD mostraron estrías de actina en cultivo (no se muestra) y expresaron la proteína DUX4 en conjuntos distintos de núcleos contenidos dentro de un miotubo diferenciado (FIG. 1A). La FIG. 1B es una gráfica que muestra la expresión relativa del ARNm de DUX4 en miotubos de FSHD y miotubos de un control isogénico de tipo salvaje (saludable).

La FIG. 2 es una gráfica que muestra la expresión de ARNm de los genes regulados por DUX4 indicados en miotubos de tipo salvaje tratados con DMSO o miotubos de FSHD tratados con FTX-2 o DMSO. Para cada gen indicado, las barras de izquierda a derecha se correlacionan con miotubos de tipo salvaje tratados con DMSO, miotubos de FSHD tratados con DMSO y miotubos

de FSHD tratados con FTX-2 (ASO dirigidos a *DUX4*).

Las FIG. 3A-3C muestran una reducción del ARNm de *MBD3L2* en miotubos de FSHD tratados con ASO dirigidos a *DUX4*. *MBD3L2* se normalizó a ARNm de *POLR2A* según lo medido a través de qPCR. La FIG. 3A es una gráfica que muestra datos agrupados de control de calidad de placas que comparan la expresión de *MBD3L2* en miotubos de FSHD tratados con control de DMSO o ASO dirigidos a *DUX4* 1 μ M, y miotubos isogénicos de tipo salvaje (WT) normales saludables. La FIG. 3B es una gráfica que muestra la reducción dependiente de la dosis de la expresión de ARNm de *MBD3L2* en miotubos de FSHD tratados con distintas diluciones de ASO dirigidos a *DUX4* (FTX-2). La FIG. 3C muestra estadísticas de ensayos a base de placas que comparan la señal de *MBD3L2* en miotubos de FSHD tratados con DMSO con los ASO dirigidos a *DUX4* o miotubos de tipo salvaje tratados con DMSO.

Las FIG. 4A-4D son gráficas que muestran los niveles de expresión de ARNm de *MBD3L2* y ARNm de *MYOG* en miotubos de FSHD tratados con los inhibidores de p38 α / β indicados con respecto al tratamiento con el control de DMSO. Los inhibidores de p38 α / β incluyeron SB 239063 (FIG. 4A), VX-702 (FIG. 4B), Pamapimod (FIG. 4C) y TAK-715 (FIG. 4D). También se proporcionan las estructuras de los inhibidores.

Las FIG. 5A y 5B muestran datos de los miotubos de FSHD tratados con Pamapimod. La FIG. 5A es una gráfica que muestra la reducción dependiente de la dosis en ARNm de *DUX4-fl* (círculos rellenos) y ARNm de *MBD3L2* (círculos abiertos). La FIG. 5B muestra micrográficas de miotubos de FSHD tratados con DMSO o Pamapimod.

Las FIG. 6A-6C son gráficas que muestran los niveles de ARNm de *MAPK14* (FIG. 6A) y *MBD3L2* (FIG. 6B y FIG. 6C) en miotubos de FSHD tratados con ARNip dirigidos a p38a MAPK14 (siMAPK14 85 y siMAPK14 86; FIG. 6A y FIG. 6B) o tratados con la cinasa p38a (MAPK14 y *DUX4* pLAM) Cas9/ARNsg RNP (FIG. 6C), en comparación con el control sin direccionamiento (NT CTRL). En la FIG. 6C, para cada tratamiento, los resultados que se muestran de izquierda a derecha corresponden a *MBD3L2* y *MYOG*, respectivamente.

La FIG. 7 es una gráfica que muestra los niveles de expresión de la proteína *DUX4*, el ARNm de *MBD3L2* y la proteína p-HSP27 en miotubos de FSHD después del tratamiento con dosis crecientes de FTX-1821 (se muestra la estructura), como porcentaje de los niveles de tratamiento con control de DMSO. Las barras representan la desviación estándar.

Las FIG. 8A y 8B muestran el efecto de FTX-1821 sobre la formación de miotubos. La FIG. 8A proporciona imágenes representativas de la morfología de los miotubos de FSHD inmortalizados obtenidos después del tratamiento con vehículo (DMSO) o las concentraciones indicadas de FTX-1821, y tinción con anticuerpos contra MHC y DAPI (tinción nuclear). La FIG. 8B es una gráfica que muestra la cuantificación de núcleos en los miotubos, tal como se define mediante la tinción de

MHC, después del tratamiento con FTX-1821 a las concentraciones analizadas. Las barras representan la desviación estándar de tres replicaciones.

Las FIG. 9A y 9B muestran los resultados de los ensayos de apoptosis en miotubos de FSHD in vitro. La FIG. 9A proporciona micrográficas de miotubos de FSHD teñidos para caspasa-3 activa (como marcador de la apoptosis) o DAPI. La apoptosis se detectó de manera esporádica en un subconjunto de miotubos en cultivo, tal como lo muestran los círculos blancos en el panel izquierdo y en la región ampliada a la derecha. La FIG. 9B es una gráfica que muestra la cuantificación de la señal de caspasa-3 activa en miotubos de FSHD tratados con las concentraciones indicadas de FTX 1821.

Las FIG. 10A y 10B ilustran la identificación de genes regulados por disminución en miotubos de FSHD mediante FTX-1821. La FIG. 10A es un mapa de calor, que ilustra genes expresados de manera diferencial identificados mediante el perfil de RNA-seq. Se analizaron mediante RNA-seq tres duplicados para cada afección y los genes se agruparon según la dirección y la intensidad del cambio, tal como se indica. La barra a color indica los cambios normalizados observados; por ejemplo, los genes que se vieron regulados por disminución con FTX-1821 se enriquecen en muestras tratadas con DMSO solamente. Los genes con regulación por disminución se enumeran en la FIG. 10A. La FIG. 10B es una gráfica que muestra las lecturas normalizadas de niveles de expresión de los genes DUX4 objetivo que se regularon por disminución tras el tratamiento con FTX-1821 en células de tipo salvaje tratadas con el control de vehículo DMSO, células de FSHD tratadas con DMSO o células de FSHD tratadas con FTX-1821.

La FIG. 11 es una gráfica que muestra los niveles de expresión de ARNm según qRT-PCR del gen DUX4 objetivo, *MBD3L2* (normalizado a *POLR2A*), en miotubos derivados de cuatro líneas distintas de mioblastos de pacientes con FSHD, FTCE-016, 020, 197, 196 y dos líneas de control de tipo salvaje (WT), siguiendo el tratamiento indicado con el control de vehículo DMSO, FTX-1821 o FTX-839.

Las FIG. 12A y 12B proporcionan información sobre diversos inhibidores de p38. La FIG. 12A es una tabla de datos que resume la farmacología de los inhibidores de p38 α y β indicados, lo que incluye la IC₅₀ para reducir la expresión de *MBD3L2* en células de FSHD. Se muestran valores comparables de IC₅₀ de *MBD3L2*, lo que indica la inhibición de la expresión génica posterior de DUX4 en miotubos de FSHD a través de un amplio panel estructural de inhibidores de p38 α y β que indicó que tienen potencias enzimáticas similares. Estos datos indican que la inhibición de p38 da como resultado valores de reducción de IC₅₀ del gen objetivo DUX4, *MBD3L2*, dentro del intervalo de ~6-68 nM. La FIG. 12B proporciona las estructuras del compuesto de los inhibidores de p38 indicados en la FIG. 12A.

La FIG. 13 es una tabla de diversas líneas celulares utilizadas en “ensayos clínicos en una placa”,

que muestra la diversidad de genotipos e incluye líneas primarias e inmortalizadas, así como líneas de pacientes con FSHD1 y FSHD2.

Las FIG. 14A y 14B son gráficas que muestran la expresión de ARNm de *MBD3L2* normalizada a POLR2A (mediante qRT-PCR) (FIG. 14A) y la apoptosis según se mide a través de caspasa-3 escindida (FIG. 14D) determinada en nueve miotubos de nueve pacientes con FSHD1 y tres con FSHD2 (enumerados en la Tabla 2, FIG. 14B contiene solo dos líneas celulares de FSHD2) después del tratamiento con el control de vehículo DMSO, FTX-1821 o FTX-839.

La FIG. 15 es una gráfica que muestra el cronograma de la exposición en plasma, la exposición en el músculo trapecio y el acoplamiento al objetivo p38 (relación p38 α fosforilado:p38 α total) en la rata después de la administración oral de 0.3 mg/kg de FTX-1821.

La FIG. 16 es una gráfica que muestra los niveles de ARNm de *MBD3L2* en los músculos TA con xenoinjerto de A4 y C6.

La FIG. 17 es una gráfica que muestra la relación de fósforo/MC2 total en los músculos trapecio de ratón después del tratamiento con el control de vehículo o el inhibidor de p38, FTX-2865.

La FIG. 18 es una gráfica que muestra los niveles de ARNm de *MBD3L2* en los músculos TA con xenoinjertos de C6 después del tratamiento con el control de vehículo o el inhibidor de p38, FTX-2865.

Compendio de la invención

La presente descripción proporciona métodos para reducir la expresión de un ARNm de DUX4-fl, un polipéptido de DUX4 o un polipéptido codificado por un gen objetivo posterior de DUX4 en células, que comprenden poner en contacto a las células con un agente, lo que da como resultado una reducción de la proteína p38 activa en la célula, mediante lo cual se reduce la expresión del polipéptido de DUX4 o el polipéptido codificado por el gen objetivo posterior de DUX4. Estos métodos pueden ponerse en práctica mediante el uso de una variedad de distintos tipos de agentes, y para modular una variedad de distintos procesos biológicos en la célula, así como para el tratamiento de sujetos contra enfermedades asociadas con la expresión anómala de DUX4, tal como la FSHD.

En determinadas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, la célula es una célula muscular, opcionalmente una célula muscular diferenciada de manera terminal. En algunas modalidades, la célula tiene un nivel de expresión mayor del ARNm de DUX4-fl, el polipéptido de DUX4 o el polipéptido codificado por el gen objetivo posterior, en comparación con el nivel de expresión del ARNm de DUX4-fl, el polipéptido de DUX4 o el polipéptido codificado por el gen objetivo posterior en una célula de control, por ejemplo, una célula obtenida de un sujeto saludable. En algunas modalidades, el nivel de expresión mayor del ARNm de DUX4-fl, el

polipéptido de DUX4 o el polipéptido codificado por el gen objetivo posterior se debe a la reducción de la represión en un locus de D4Z4 de la célula. En determinadas modalidades, la célula está asociada con la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD), por ejemplo, se obtuvo de un sujeto diagnosticado con FSHD o está presente dentro de un sujeto diagnosticado con FSHD. En

5 algunas modalidades, la célula comprende una delección de una o más repeticiones del macrosatélite D4Z4 en la región subtelomérica del cromosoma 4q35, opcionalmente donde la célula comprende ≤ 7 repeticiones del macrosatélite D4Z4 en la región subtelomérica del cromosoma 4q35. En algunas modalidades, la célula comprende una o más mutaciones en un gen del dominio 1 portador de mantenimiento estructural de la bisagra flexible de cromosomas
10 (SMCHD1). En algunas modalidades, la célula comprende al menos un alelo 4qA no eliminado.

En determinadas modalidades de los métodos descritos en la presente, el agente inhibe la expresión o actividad, o reduce la cantidad, de la proteína p38, donde la actividad es opcionalmente actividad de cinasa.

En algunas modalidades, el agente inhibe la expresión de la proteína p38. En modalidades
15 particulares, el agente se une a un polinucleótido que codifica la proteína p38 o se une a un polinucleótido antisentido de esta. En determinadas modalidades, el agente comprende o consiste en un ácido nucleico, opcionalmente un ADN, ARN, ARNg, ARNhp, ARNip u oligonucleótido antisentido.

En algunas modalidades, el agente inhibe la actividad de la proteína p38. En modalidades
20 particulares, el agente se une a la proteína p38. En modalidades particulares, el agente comprende o consiste en un polipéptido, opcionalmente una proteína, un péptido, un mimético de proteína, un peptidomimético o un anticuerpo o fragmento funcional de este. En algunas modalidades, el agente comprende una molécula pequeña, opcionalmente una molécula orgánica pequeña o una molécula inorgánica pequeña.

25 En determinadas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el gen objetivo posterior es RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, KHDC1L, ZSCAN4, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 o ZNF280A.

En modalidades particulares de cualquiera de los métodos descritos en la presente, la expresión o la actividad de la proteína p38, o la cantidad de la proteína p38, se reduce al menos 10 %, al
30 menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 %.

En una modalidad relacionada, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado con una mayor expresión de un ARNm de DUX4-fl, una proteína DUX4 o un polipéptido codificado por un gen objetivo posterior de DUX4 en
35 un sujeto que lo necesite, que comprende proporcionarle al sujeto una composición farmacéutica

que comprende un agente que da como resultado una reducción de la cantidad de proteína p38 activa en uno o más tejidos del sujeto, mediante lo cual se reduce la expresión del ARNm de DUX4-fl, la proteína DUX4 o el polipéptido que codifica el gen objetivo posterior en uno o más tejidos del sujeto. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es una distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD), opcionalmente FSHD1 o FSHD2. En determinadas modalidades, el sujeto comprende una represión reducida en un locus de D4Z4. En algunas modalidades, el sujeto comprende una delección de una o más repeticiones del macrosatélite D4Z4 en la región subtelomérica del cromosoma 4q35, opcionalmente donde la célula comprende ≤ 7 repeticiones del macrosatélite D4Z4 en la región subtelomérica del cromosoma 4q35. En algunas modalidades, el sujeto comprende una o más mutaciones en un gen del dominio 1 portador de mantenimiento estructural de la bisagra flexible de cromosomas (SMCHD1). En algunas modalidades, el sujeto comprende al menos un alelo 4qA no eliminado. En determinadas modalidades, la expresión o la actividad de la proteína p38 se reduce al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % en un tejido muscular del sujeto. En algunas modalidades, el método disminuye la degeneración muscular en el sujeto. En algunas modalidades, el método reduce la apoptosis de las células musculares en el sujeto. En algunas modalidades, el tejido muscular está diferenciado de manera terminal. En modalidades particulares, al composición farmacéutica se proporciona al sujeto por vía parenteral u oral. En determinadas modalidades, la composición farmacéutica se proporciona a un tejido muscular del sujeto, opcionalmente por vía parenteral o intramuscular. En modalidades particulares, el método comprende además proporcionarle al sujeto un segundo agente o terapia para el tratamiento de la enfermedad o trastorno asociado con una mayor expresión de una proteína DUX4 o un polipéptido codificado por un gen objetivo posterior de DUX4.

La presente descripción también proporciona una forma de dosificación unitaria de una composición farmacéutica que comprende un agente que da como resultado una reducción de la cantidad de proteína p38 activa en una célula, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, donde la forma de dosificación unitaria es eficaz para reducir la expresión o actividad de un ARNm de DUX4-fl, un polipéptido de DUX4 o un polipéptido codificado por un gen objetivo posterior de DUX4, en una o más células o tejidos de un sujeto al que se le administra la forma de dosificación unitaria. En modalidades particulares, el agente se une al polipéptido de DUX4 o se une a un polinucleótido que codifica el polipéptido de DUX4. En algunas modalidades, el agente comprende o consiste en un ácido nucleico, opcionalmente un ADN, ARN, ARNg, ARNhp, ARNip u oligonucleótido antisentido. En algunas modalidades, el agente comprende o consiste en un polipéptido, opcionalmente una proteína, un péptido, un mimético de

proteína, un peptidomimético o un anticuerpo o fragmento funcional de este. En algunas modalidades, el agente comprende una molécula pequeña, opcionalmente una molécula orgánica o una molécula inorgánica. En determinadas modalidades, el tejido es tejido muscular, donde opcionalmente el tejido comprende células que comprenden una mutación asociada con la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD).

En otra modalidad relacionada, la presente descripción proporciona un método para reducir la apoptosis de una célula, por ejemplo, una célula muscular, que comprende poner en contacto a la célula con un agente que da como resultado una reducción de la cantidad de proteína p38 activa en la célula, donde, opcionalmente, la célula muscular se diferencia de manera terminal, mediante lo cual se reduce la expresión de un ARNm de DUX4-fl, una proteína DUX4 o un polipéptido codificado por un gen objetivo posterior de DUX4 en la célula. En algunas modalidades, la célula tiene un nivel de expresión mayor del ARNm de DUX4-fl, el polipéptido de DUX4 o el polipéptido codificado por el gen objetivo posterior, en comparación con el nivel de expresión del polipéptido de DUX4 o el polipéptido codificado por el gen objetivo posterior en una célula de control. En algunas modalidades, el nivel de expresión mayor del ARNm de DUX4-fl, el polipéptido de DUX4 o el polipéptido codificado por el gen objetivo posterior se debe a la reducción de la represión en un locus de D4Z4 de la célula. En modalidades particulares, la célula comprende una o más mutaciones asociadas con la FSHD. En determinadas modalidades, el agente inhibe la expresión de la proteína p38, donde opcionalmente el agente se une a un polinucleótido que codifica la proteína p38 o un polinucleótido antisentido de esta. Por ejemplo, en algunas modalidades, el agente comprende o consiste en un ácido nucleico, opcionalmente un ADN, ARN, ARNhp, ARNip u oligonucleótido antisentido, por ejemplo, que se dirige a p38. En algunas modalidades, el agente inhibe la actividad de la proteína p38, donde opcionalmente el agente se une a la proteína p38. En algunas modalidades, el agente comprende o consiste en un polipéptido, opcionalmente una proteína, un péptido, un mimético de proteína, un peptidomimético o un anticuerpo o fragmento funcional de este. En algunas modalidades, el agente comprende una molécula pequeña, opcionalmente una molécula orgánica pequeña o una molécula inorgánica pequeña. En modalidades particulares, la expresión o la actividad de la proteína p38, la proteína DUX4 o el polipéptido codificado por el gen posterior de DUX4, se reduce al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 %. En modalidades particulares, el método reduce la apoptosis de las células musculares de un tejido muscular al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % en comparación con un control, por ejemplo, una célula no tratada.

En determinadas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente reduce la expresión de DUX4 o el gen objetivo posterior. En determinadas modalidades, el agente se une a una proteína p38, por ejemplo, p38- α o p38- β , o se une a un polinucleótido que codifica la proteína p38, por ejemplo, p38- α o p38- β , o un polinucleótido antisentido de esta. En modalidades particulares, el agente comprende o consiste en: un ácido nucleico, opcionalmente un ADN, ARN, ARNhp, ARNip, ARNg de CRISPR u oligonucleótido antisentido. En modalidades particulares, el agente comprende o consiste en: un polipéptido, opcionalmente una proteína, un péptido, un mimético de proteína, un peptidomimético o un anticuerpo o fragmento funcional de este. En modalidades particulares, el agente comprende: una molécula pequeña, opcionalmente una molécula orgánica o una molécula inorgánica. En algunas modalidades, el gen objetivo posterior es RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, KHDC1L, ZSCAN4, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 o ZNF280A. En modalidades particulares, el gen objetivo posterior es MBD3L2, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43 o KHDC1L.

En determinadas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente se une a una proteína p38, por ejemplo, p38- α o p38- β , o se une a un polinucleótido que codifica una proteína p38, por ejemplo, p38- α o p38- β . En algunas modalidades, el agente comprende o consiste en: un ácido nucleico, opcionalmente un ADN, ARN, ARNhp, ARNip, ARNm, ARNg de CRISPR, ARNm modificado, morfolino u oligonucleótido antisentido. En algunas modalidades, el ARNm o ARNm modificado codifica un anticuerpo o un fragmento funcional de este. En algunas modalidades, el agente comprende o consiste en: un polipéptido, opcionalmente una proteína, un péptido, un mimético de proteína, un peptidomimético o un anticuerpo o fragmento funcional de este. En algunas modalidades, el agente comprende o consiste en un vector de terapia génica, por ejemplo, un vector viral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de polinucleótido o polipéptido de p38, por ejemplo, p38- α o p38- β , u otro objetivo. En algunas modalidades, el agente comprende o consiste en una molécula pequeña, opcionalmente una molécula orgánica o una molécula inorgánica. En algunas modalidades, el objetivo posterior es RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, KHDC1L, ZSCAN4, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 o ZNF280A. En algunas modalidades, el gen objetivo posterior es MBD3L2, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43 o KHDC1L. En algunas modalidades, el gen objetivo posterior es CCNA1.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la inhibición de la cinasa p38, por ejemplo, p38- α , da como resultado una reducción de la expresión de DUX4 y los genes posteriores regulados por DUX4. Por consiguiente, la invención incluye métodos y composiciones

relacionadas con el uso de un inhibidor de p38, por ejemplo, p38- α (solo o junto con otro agente) para reducir los niveles de expresión y/o actividad de DUX4 y/o cualquiera de sus genes objetivo posteriores, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de enfermedades asociadas con la expresión anómala de DUX4, tales como la FSHD, un tipo de distrofia muscular. Esto puede lograrse de diversas maneras, por ejemplo, mediante la reducción de la expresión del ARNm de DUX4-fl, reducción de la expresión de la proteína DUX4, inhibición de la actividad de la proteína DUX4; edición del genoma de CRISPR y/o inducción de la degradación de la proteína DUX4.

Las distrofias musculares son un grupo diverso de enfermedades genéticas que provocan una debilidad progresiva de los músculos del cuerpo. Algunos tipos de distrofia muscular presentarán síntomas en la primera infancia, mientras que otros tipos aparecerán en la adultez. Distintos grupos musculares también pueden verse afectados en función del tipo de distrofia muscular. Ver, por ejemplo, Isin Dalkilic y Louis M Kunkel. Se conocen alrededor de 30 genes que dan lugar a diversas formas de distrofia muscular, que difieren en cuanto a la edad de aparición, la gravedad y los grupos musculares afectados. La cantidad de genes identificados aumenta cada año, lo que añade a nuestra comprensión y revela la complejidad general de la patogénesis de estas enfermedades.

Por ejemplo, dos distrofias musculares comunes (la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia facioescapulohumeral (FDHS)) se consideran enfermedades únicas con algunas características compartidas. Las similitudes entre la DMD y la FSHD incluyen que ambas son enfermedades genéticas y los síntomas incluyen pérdida muscular con debilidad muscular que lleva a la discapacidad (por lo tanto, tanto la DMD como la FSHD se agrupan en la gran categoría de distrofias musculares, lo que significa degeneración muscular). Sin embargo, la DMD y la FSHD tienen una etiología y un diagnóstico de enfermedades muy diferentes (pérdida de distrofina en la DMD en comparación con la expresión de la miotoxina de DUX4 en la FSHD). Por ejemplo, en la DMD, las mutaciones en el gen de la DMD (>2000 conocidas) dan como resultado una disfunción o ausencia de distrofina. En la FSHD, la enfermedad se debe a la sobreexpresión del gen *DUX4* en el tejido muscular; no se debe a mutaciones puntuales en el gen (la proteína DUX4 se expresa cuando la cantidad de repeticiones de *D4Z4* en el gen *DUX4* se encuentra entre 1 y 8, o cuando se pierde la represión en *D4Z4* a través de mutaciones en otra maquinaria de silenciamiento). Otras diferencias incluyen que en la FSHD solo está implicado el músculo esquelético, mientras que en la DMD tanto el músculo esquelético como el cardíaco se ven afectados; el diafragma se ve afectado en la DMD, pero no en la FSHD; en general, existe una aparición en la infancia de la DMD, pero una aparición en la adultez/adolescencia de la FSHD; y también una aparición con compromiso ambulatorio en la DMD, pero una aparición con cara y brazo proximal/hombros en la FSHD. Otra distinción importante es que existe una respuesta a los esteroides en la DMD, pero no

en la FSHD. Además, el tratamiento aprobado para la DMD (Exondys-51 en EUA; Ataluren en la UE) no tendrá ningún efecto en la FSHD. Por último, solo las personas de sexo masculino se ven afectadas por la DMD, mientras que existe una implicación igual de ambos sexos en la FSHD.

La FSHD también tiene una patología inusual, y es única entre las distrofias musculares en el sentido en que su desarrollo requiere condiciones tanto genéticas como epigenéticas. La afección genética es la presencia de un gen *DUX4* completo. El gen *DUX4* es un retrogén expresado normalmente en la línea germinal y en las células embrionarias tempranas, pero se reprime mediante el silenciamiento inducido por la repetición de *D4Z4* en los tejidos adultos (Ehrlich y Lacey, 2012). Cada elemento de *D4Z4* contiene un promotor y el ORF de *DUX4*, pero carece de una señal de poliadenilación (PAS), lo que da como resultado una rápida degradación del ARNm de *DUX4*. Por el contrario, las transcripciones iniciadas en la unidad distal de *D4Z4* en un alelo permisivo 4qA se extienden fuera de la matriz de repetición y alcanzan una PAS en la secuencia de pLAM flanqueante (reseñado en Tawil et ál., 2014; Himeda et ál., 2015). La cola de poli-A resultante estabiliza los ARNm de *DUX4* y permite su traducción en una proteína que no se expresa normalmente en un músculo saludable y es tóxica para la función del músculo esquelético. Se ha descrito que dos potenciadores, el potenciador miogénico de *DUX4* 1 (DME1) y el DME2, que activan la expresión de *DUX4*-fl en miocitos esqueléticos, regulan la expresión de *DUX4*-fl en la FSHD (Himeda et ál., 2014).

Los estadios de FSHD1, FSHD2 en el desarrollo temprano, así como los estadios de formación de la línea germinal, parecen otorgar una conformación permisiva de forma transcripcional a la cromatina de *D4Z4*. Esto se evidencia mediante cambios en la modificación de la histona, hipometilación parcial pero variable de *D4Z4* en FSHD1 y una hipometilación más extensa en FSHD2 (Himeda et ál., 2015). Sin embargo, la hipometilación de *D4Z4* no es suficiente para la enfermedad, dado que existe una ausencia de síntomas de distrofia muscular en pacientes con ICF (inmunodeficiencia, inestabilidad de la región centromérica y anomalías faciales), una enfermedad rara no relacionada con la hipometilación de ADN en la que *D4Z4* está muy hipometilado (entrada de OMIM - # 614069).

DUX4 es una proteína del factor de transcripción de homeobox, y la expresión de *DUX4* en el músculo induce un programa transcripcional que conduce a la expresión de genes posteriores y productos proteicos que no se expresan normalmente en el músculo esquelético. Por ejemplo, la expresión de *DUX4* da como resultado la inducción de varios genes de la línea germinal en los músculos esqueléticos de la FSHD y en las células transfectadas (Yao et ál., 2014; Ehrlich y Lacey, 2012). Muchas de estas transcripciones novedosas se expresan en las células musculares de la FSHD, pero no en las células musculares del control (Yao et ál., 2014; Homma et ál., 2015; Shadle et ál., 2017; Bosnakovski et ál., 2014). Dado que algunos de los genes objetivo posteriores

de DUX4 codifican factores de transcripción, la activación patológica de DUX4 conduce a una gran cascada de desregulación de la expresión génica en el músculo, que provoca la enfermedad (Yao et ál., 2014; Homma et ál., 2015; Shadle et ál., 2017; Bosnakovski et ál., 2014).

La expresión endógena (en la miofibra de la FSHD) y forzada de DUX4 en las células musculares es tóxica, conduce a apoptosis y estrés oxidativo, e interfiere con la miogénesis y la función sarcomérica (Rickard et ál., 2015; Homma et ál., 2015; Bosnakovski et ál., 2014; Tawil et ál., 2014; Himeda et ál., 2015). La heterogeneidad clínica tanto en la evolución de la enfermedad como en la edad de aparición puede explicarse, en parte, por la inestabilidad epigenética que lleva a cambios progresivos en la transcripción de DUX4. El papel de la hipometilación del ADN y la transcripción permisiva de DUX4 se ejemplifica mediante la gravedad clínica elevada observada en pacientes que heredaron defectos combinados de FSHD1 y 2 (reseñado en Tawil et ál., 2014; van der Maarel et ál., 2007). La heterogeneidad clínica también se explica a través de diferencias en la gravedad del acortamiento de las repeticiones de D4Z4, con fenotipos más graves y edad menor en la aparición en pacientes con repeticiones más cortas (1-3) en comparación con pacientes con repeticiones acortadas de manera menos dramática (4-7).

DUX4 se reconoce ahora como la causa de la patología de la FSHD, dado que la activación de sus genes objetivo es la firma molecular principal en el músculo con FSHD (reseñado en Tawil et ál., 2014; Himeda et ál., 2015). Los principales genes objetivo posteriores son miembros de familias de genes muy homólogos agrupados de manera espacial en cromosomas, lo que incluye las familias PRAMEF (expresadas preferentemente en melanoma), TRIM (que contienen motivos tripartitos), MBDL (similar a la proteína de unión a metilo-CpG), ZSCAN (que contiene dominios de dedos de cinc y SCAN) y RFPL (similar a la proteína con dedos de ret) (Geng et ál., 2012; Yao et ál., 2014; Shadle et ál., 2017; Ehrlich y Lacey, 2012; Tawil et ál., 2014; van der Maarel et ál., 2007). La discriminación entre la FSHD y el músculo esquelético de control puede realizarse mediante el uso de ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15, ZNF280A, etc. (que se describe, de modo no taxativo, en Yao et ál., 2014, Shadle et ál., 2017; Ehrlich y Lacey, 2012).

Se analizaron sondas químicas anotadas para identificar objetivos de fármacos de moléculas pequeñas que modifican enfermedades que reducen la expresión de DUX4 en miotubos de FSHD.

Estos análisis identificaron múltiples supercóntigos químicos que inhiben la actividad de la proteína cinasa alfa activada por mitógenos p38 (MAPK14 o p38 α). Como se describe en los Ejemplos adjuntos, se ha demostrado que la atenuación del gen MAPK14 mediante el uso de la tecnología de ARN interferente pequeño (ARNip) o la edición genómica mediada por CRISPR con ARN guías (ARNg) específicos que se dirigen selectivamente a la isoforma alfa de la cinasa p38 también reduce la expresión génica posterior de DUX4 y relacionada con DUX4 en los miotubos de la

FSHD. También se halló que los inhibidores selectivos de la cinasa p38 α y β redujeron específicamente DUX4 y sus genes posteriores en los miotubos de la FSHD, lo que afecta la fisiopatología básica del proceso de la enfermedad de la FSHD (datos ejemplificados en la presente). Los mismos experimentos revelaron que los inhibidores de la cinasa p38 α y β no afectan a la miogenina ni a la expresión de otros factores miogénicos, ni tampoco afectan a la proliferación de mioblastos ni a la diferenciación de mioblastos manifestada por la fusión miogénica en miotubos de FSHD, lo que demuestra que el efecto no se debe a la toxicidad general del músculo. Estas moléculas pequeñas inhibitoras de la cinasa p38 reducen la expresión de DUX4 y genes posteriores relacionados, lo que afecta la fisiopatología del proceso de la enfermedad de FSHD, incluso la reducción de la muerte celular apoptótica. Se esperaría que la reducción de DUX4 mediada por p38 afecte los procesos inflamatorios, de infiltración grasa y fibróticos posteriores en la FSHD.

Los miembros de la familia p38 MAPK, compuesta por las isoformas α , β , γ y δ , están codificados por genes separados que desempeñan un papel fundamental en las respuestas celulares necesarias para la adaptación al estrés y la supervivencia (reseñado en Whitmarsh 2010; Martin et ál., 2014; Krementsov et ál., 2013). En muchas enfermedades inflamatorias, incluidas las cardiovasculares y otras enfermedades crónicas, estas mismas señales inducidas por el estrés de MAPK p38 pueden desencadenar respuestas no adaptativas que agravan, en lugar de aliviar, la enfermedad (reseñado en Whitmarsh 2010; Martin et ál., 2014). De hecho, en el músculo esquelético, se ha demostrado que una variedad de tensiones celulares, que incluyen el ejercicio crónico, exposición a la insulina y estados endócrinos alterados, la diferenciación de mioblastos en miocitos, especies de oxígeno reactivo, así como la apoptosis, inducen la vía de la cinasa p38 (Keren, et ál., 2006; Zarubin et ál., 2006). De hecho, la vía de cinasa p38 puede activarse a través de un número de estímulos externos, que incluyen citocinas proinflamatorias y estrés celular, lo que lleva a la activación de las cinasas de MAPK de especificidad doble MKK3 y MKK6. La activación de MKK3 y MKK6, que a su vez fosforila p38 en su bucle de activación, desencadena eventos de fosforilación posteriores. Estos incluyen la fosforilación de HSP27, MAPKAPK2 (MK2) y una variedad de factores de transcripción, que culminan en cambios transcripcionales en el núcleo. Se ha identificado una cantidad moderada de transcripciones reguladas por p38 y una gran cantidad de efectores posteriores de la cinasa p38 (descritos en Cuenda et ál., 2007 y Kyriakis et ál., 2001, Viemann et ál., 2004).

Varios compuestos de distintos supercóntigos químicos que inhiben la vía de señalización de p38 α MAPK han entrado en ensayos clínicos en diversas indicaciones (no neuromusculares), que incluyen artritis reumatoide, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dolor, enfermedades cardiovasculares y cáncer. La inhibición de p38 α y β en ensayos clínicos ha demostrado ser

segura. La farmacología in vitro e in vivo sugiere que el acoplamiento del objetivo de p38 α en estos estudios clínicos fue potente, como lo demuestra la medición de la reducción de la fosforilación de HSP27 (un objetivo indirecto) y pMK2 (un objetivo directo).

Se sabe que p38 α MAPK desempeña papeles fundamentales en la biología muscular esquelética, específicamente en la abrogación de los mioblastos proliferantes a la diferenciación y, posteriormente, la fusión para formar miotubos multinucleados. El tratamiento de los pacientes con distrofia muscular que se someten constitutivamente a procesos de degeneración y regeneración con inhibidores de p38 α no sería obvio. La inactivación completa (KO) de p38 α es embrionariamente letal. El rescate embrionario permite la supervivencia de los cachorros hasta unos pocos días después del nacimiento y el aislamiento de las células satélite para estudiar precursores miogénicos que carecen de p38 α . Los mioblastos que carecen completamente de p38 α expresan genes de diferenciación significativamente menos fundamentales y muestran déficits graves en la fusión. La histología de los cachorros P2 muestra un aumento significativo del ciclo de las células satélite y una distribución de fibras desplazada a la izquierda (Perdiguerro et ál., 2007). Es importante destacar que la KO de p38 α en el músculo maduro (cre impulsado por el promotor Myl1) no muestra ninguna deficiencia en los primeros puntos temporales; sin embargo, los ratones con deficiencia de p38 α a los 6 meses de edad muestran una regeneración y fibras tipo I significativamente mayores, así como una distribución de fibras menor en comparación con los controles (Wissing et ál., 2014). Estos datos sugieren que la inhibición de p38 α desencadenaría la regeneración del músculo esquelético en enfermedades con deficiencia de regeneración además de FSHD a través de un mecanismo independiente de la regulación de la expresión de DUX4.

En el músculo esquelético, se ha demostrado que p38 regula la expresión génica durante la miogénesis. Se ha demostrado que p38 γ es necesario para la miogénesis con el uso de abordajes específicos de inactivación génica e inactivación condicional (Cuenda et ál., 2007; Kerin et ál., 2006; Aouadi et ál., 2006). En el adulto, los inhibidores selectivos de p38 α y β evitan el impacto relacionado con p38 γ a la miogénesis.

La presente descripción halla que p38 se activa durante la miogénesis, y que la inhibición de p38 α y β a través de moléculas ejemplificadas en la presente, que incluyen FTX-839, FTX-1821, etc., reduce profundamente la expresión de DUX4 y su programa génico posterior en miotubos de FSHD (datos ejemplificados en la presente). Sin querer limitarse a la teoría, p38 α parece regular directamente la expresión de DUX4 al afectar la actividad de los potenciadores miogénicos fundamentales necesarios para la expresión patológica de DUX4 a nivel del locus de D4Z4 mutado con repeticiones más cortas (FSHD1) o mutaciones de SMCHD1 (FSHD2) o cuando se pierde la represión mediante otros mecanismos en el músculo de pacientes con FSHD. Se trata de un mecanismo diferenciado de los estudios clínicos anteriores, que se dirigió a las funciones de p38

en el citoplasma y no mostró ninguna eficacia en numerosas enfermedades, que incluyen artritis reumatoide, dolor, depresión, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad cardiovascular. Los inhibidores de la p38 nunca se han explorado clínicamente para la FSHD.

Tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno” y “el” incluyen referencias al plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Tal como se usa en esta memoria descriptiva, el término “y/o” se usa en la presente descripción para denotar ya sea “y” u “o”, a menos que se indique lo contrario.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto exija lo contrario, se entenderá que la palabra “comprender” o sus variaciones, tales como “comprende” o “que comprende”, implican la inclusión de un elemento o un número entero señalado, o un grupo de elementos o números enteros, pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Tal como se usan en esta solicitud, las expresiones “alrededor de” y “aproximadamente” se usan como equivalentes. Se pretende que todo número usado en esta solicitud con o sin “alrededor de”/“aproximadamente” abarque cualquier fluctuación normal concebida por un experto en la técnica relevante. En determinadas modalidades, la expresión “aproximadamente” o “alrededor de” hace referencia a un intervalo de valores que se encuentra dentro de 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en cualquier dirección (mayor o menor) del valor de referencia indicado, a menos que se indique lo contrario, o resulte evidente lo contrario a partir del contexto (salvo que dicho número supere el 100 % de un valor posible).

“Administración” hace referencia en la presente a la introducción de un agente o composición en un sujeto o el contacto de un agente o composición con un célula y/o tejido.

En determinados aspectos, la descripción incluye un método para reducir la expresión o la actividad de un ARNm, polipéptido o gen DUX4, o para reducir la expresión o actividad de un gen o polipéptido posterior de DUX4, lo que incluye, de modo no taxativo, cualquiera de los descritos en la presente, en una célula, tejido, órgano o sujeto. En modalidades particulares, el ARNm de DUX4 es DUX4-fl. Tal como se usa en la presente, la expresión “gen posterior de DUX4” hace referencia a un gen que se activa (es decir, su expresión aumenta) de forma transcripcional mediante DUX4, y la expresión “polipéptido posterior de DUX4” hace referencia al polipéptido codificado. Se proporcionan en la presente ejemplos ilustrativos de los genes posteriores de DUX4. En determinadas modalidades, el gen posterior de DUX4 se selecciona de los que se muestran en la FIG. 10A.

Los métodos descritos en la presente pueden ponerse en práctica in vitro o in vivo y, en

determinadas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto una célula, tejido, órgano o sujeto con un inhibidor de p38, lo que da como resultado una cantidad reducida de proteína p38 activa en la célula, tejido, órgano o sujeto. La expresión “inhibidor de p38” puede hacer referencia a cualquier agente que dé como resultado una cantidad reducida de proteína p38 activa en la célula, tejido, órgano o sujeto. La cantidad de proteína p38 activa en una célula puede reducirse a través de una variedad de medios, que incluyen, de modo no taxativo, la reducción de la cantidad total de proteína p38 o inhibición de una o más actividades de la proteína p38. En diversas modalidades, un inhibidor de p38 puede inhibir la expresión de un gen p38, un ARNm de p38 o una proteína p38, y/o un inhibidor de p38 puede inhibir una actividad biológica de una proteína p38. En determinadas modalidades, la actividad biológica es actividad de cinasa. Por ejemplo, un inhibidor de p38 puede unirse de forma competitiva al sitio de unión a ATP de p38 MAPK e inhibir su actividad de cinasa, o puede bloquear alostéricamente la actividad cinasa de p38 MAPK. En determinadas modalidades, un inhibidor de p38 provoca una mayor degradación de una proteína p38. En modalidades particulares, el gen p38 o la proteína p38 es un gen p38 de mamífero o proteína p38 de mamífero, por ejemplo, un gen p38 humano o una proteína p38 humana, por ejemplo, un gen o proteína p38- α (MAPK14) o p38- β (MAPK11) humanos.

La cinasa p38 MAP (MAPK), también denominada RK o CSBP (proteína de unión específica a la citoquinina), es el ortólogo de mamífero de la cinasa Hog1p MAP de levadura, que participa en una cascada de señalización que controla las respuestas celulares a las citocinas y el estrés. Se han identificado cuatro cinasas p38 MAP: p38- α (MAPK14), β (MAPK11), γ (MAPK12 / ERK6) y δ (MAPK13 / SAPK4). Estas incluyen diversas isoformas. En modalidades particulares, cualquiera de estos puede seleccionarse como objetivo en los métodos descritos en la presente. En determinadas modalidades, el inhibidor de p38 inhibe p38- α (MAPK14) o p38- β (MAPK11), por ejemplo, las versiones humanas de estos genes o proteínas.

En determinadas modalidades, la proteína p38 seleccionada como objetivo comprende la secuencia de aminoácidos que se indica a continuación o se describe en el acceso de GenBank NP_001306.1 para la cinasa p38 (proteína cinasa activada por mitógenos 14 isoforma 1, homo sapiens):

```
MSQERPTFYRQELNKTIWEVPERYQNLSPVGSGAYGSVCAAFDTKTGLRVAVKKLSRPFQSIHAK
RTYRELRLLLKHKHENVIGLLDVFTPARSLEEFNDVYLVTHLMGADLNNIVKCQKLTDDHVQFLIYQ
ILRGLKYIHSADIIHRDLKPSNLAVNEDCELKILDFGLARHTDDEMTGYVATRWWYRAPEIMLNWMHY
NQTVDIWSVGCIMAELLTGRTLFPGTDHIDQLKLILRLVGTPGAELLKKISSESARNYIQSLTQMPKM
NFANVFIGANPLAVDLLEKMLVLDSDKRITAAQALAHAYFAQYHDPDDEPVADPYDQSFSERDLLID
EWKSLTYDEVISFVPPPLDQEEMES (SEQ ID NO:1).
```

En determinadas modalidades, el gen p38 seleccionado como objetivo, el ADNc, el ARNm o la

secuencia codificante comprenden la secuencia de ácido nucleico p38- α indicada a continuación o descrita en el acceso de GenBank NM_001315.2, o un complemento de esta:

TTCTCTCACGAAGCCCCGCCCCGCGGAGAGGTTCCATATTGGGTAAAATCTCGGCTCTCGGAG
AGTCCCGGGAGCTGTTCTCGCGAGAGTACTGCGGGAGGCTCCCGTTTGCTGGCTCTTGGAAC
5 CGCGACCACTGGAGCCTTAGCGGGCGCAGCAGCTGGAACGGGAGTACTGCGACGCAGCCCG
GAGTCGGCCTTGTAGGGGCGAAGGTGCAGGGAGATCGCGGCGGGCGCAGTCTTGAGCGCC
GGAGCGCGTCCCTGCCCTTAGCGGGGCTTGCCCCAGTCGCAGGGGCACATCCAGCCGCTGC
GGCTGACAGCAGCCGCGCGCGCGGGAGTCTGCGGGGTGCGGGCAGCCGCACCTGCGCGGG
CGACCAGCGCAAGGTCCCCGCCCCGGCTGGGCGGGCAGCAAGGGCCGGGGAGAGGGTGCG
10 GGTGCAGGCGGGGGCCCCACAGGGCCACCTTCTTGCCCGGCGGCTGCCGCTGGAATATGTC
TCAGGAGAGGCCACGTTCTACCGGCAGGAGCTGAACAAGACAATCTGGGAGGTGCCCGAG
CGTTACCAGAACCTGTCTCCAGTGGGCTCTGGCGCCTATGGCTCTGTGTGTGCTGCTTTTGAC
ACAAAAACGGGGTTACGTGTGGCAGTGAAGAAGCTCTCCAGACCATTTTCAGTCCATCATTAT
GCGAAAAGAACCTACAGAGAACTGCGGTTACTTAAACATATGAAACATGAAAATGTGATTGGTC
15 TGTTGGACGTTTTTACACCTGCAAGGTCTCTGGAGGAATTCAATGATGTGTATCTGGTGACCC
ATCTCATGGGGGCAGATCTGAACAACATTGTGAAATGTCAGAAGCTTACAGATGACCATGTTC
AGTTCCTTATCTACCAAATTCTCCGAGGTCTAAAGTATATACATTCAGCTGACATAATTCACAG
GGACCTAAAACCTAGTAATCTAGCTGTGAATGAAGACTGTGAGCTGAAGATTC
TGGATTTTGGACTGGCTCGGCACACAGATGATGAAATGACAGGCTACGTGGCCACTAGGTGG
20 TACAGGGCTCCTGAGATCATGCTGAACTGGATGCATTACAACCAGACAGTTGATATTTGGTCA
GTGGGATGCATAATGGCCGAGCTGTTGACTGGAAGAACATTGTTTCCTGGTACAGACCATATT
AACCAGCTTCAGCAGATTATGCGTCTGACAGGAACACCCCCCGTTATCTCATTAAACAGGATG
CCAAGCCATGAGGCAAGAACTATATTTCAGTCTTTGACTCAGATGCCGAAGATGAACTTTGCG
AATGTATTTATTGGTGCCAATCCCCTGGCTGTGCACTTGCTGGAGAAGATGCTTGTATTGGACT
25 CAGATAAGAGAATTACAGCGGCCCAAGCCCTTGACATGCCTACTTTGCTCAGTACCACGATC
CTGATGATGAACCAGTGGCCGATCCTTATGATCAGTCCTTTGAAAGCAGGGACCTCCTTATAG
ATGAGTGGAAGGCCTGACCTATGATGAAGTCATCAGCTTTGTGCCACCACCCCTTGACCAAG
AAGAGATGGAGTCCTGAGCACCTGGTTTCTGTTCTGTTGATCCCACTTCACTGTGAGGGGAAG
GCCTTTTTCACGGGAACTCTCCAAATATTATTCAAGTGCCTCTTGTTGCAGAGATTTCTCCATG
30 GTGGAAGGGGGTGTGCGTGCGTGCGTGCTGTTAGTGTGTGTGCATGTGTGTGTCTGTCT
TTGTGGGAGGGTAAGACAATATGAACAACTATGATCACAGTGACTTTACAGGAGGTTGTGGA
TGCTCCAGGGCAGCCTCCACCTTGCTCTTCTTTCTGAGAGTTGGCTCAGGCAGACAAGAGCT
GCTGTCCTTTTAGGAATATGTTCAATGCAAAGTAAAAAATATGAATTGTCCCAATCCCGGTC
ATGCTTTTGCCACTTTGGCTTCTCCTGTGACCCACCTTGACGGTGGGGCGTAGACTTGACAA
35 CATCCACAGTGGCACGGAGAGAAGGCCCATACCTTCTGGTTGCTTCAGACCTGACACCGTC

CCTCAGTGATACGTACAGCCAAAAAGGACCAACTGGCTTCTGTGCACTAGCCTGTGATTAAC
TGCTTAGTATGGTTCTCAGATCTTGACAGTATATTTGAACTGTAAATATGTTTGTGCCTTAAAA
GGAGAGAAGAAAGTGTAGATAGTTAAAAGACTGCAGCTGCTGAAGTTCTGAGCCGGGCAAGT
CGAGAGGGGCTGTTGGACAGCTGCTTGTGGGCCCCGAGTAATCAGGCAGCCTTCATAGGCGG
5 TCATGTGTGCATGTGAGCACATGCGTATATGTGCGTCTCTCTTTCTCCCTCACCCCCAGGTGT
TGCCATTTCTCTGCTTACCCTTCACCTTTGGTGCAGAGGTTTCTTGAATATCTGCCCCAGTAGT
CAGAAGCAGGTTCTTGATGTCATGTACTTCCTGTGTACTCTTTATTTCTAGCAGAGTGAGGATG
TGTTTTGCACGTCTTGCTATTTGAGCATGCACAGCTGCTTGTCTGCTCTCTTCAGGAGGCCC
TGGTGTGAGGCAGGTTTGCCAGTGAAGACTTCTTGGGTAGTTTAGATCCCATGTCACCTCAGC
10 TGATATTATGGCAAGTGATATCACCTCTCTTCAGCCCCTAGTGCTATTCTGTGTTGAACACAAT
TGATACTTCAGGTGCTTTTGATGTGAAAATCATGAAAAGAGGAACAGGTGGATGTATAGCATTT
TTATTCATGCCATCTGTTTTCAACCAACTATTTTTGAGGAATTATCATGGGAAAAGACCAGGGC
TTTTCCCAGGAATATCCCAAACCTTCGAAACAAGTTATTCTCTTCACTCCCAATAACTAATGCTA
AGAAATGCTGAAAATCAAAGTAAAAAATTAAGCCCATAAGGCCAGAACTCCTTTTGCTGTCT
15 TTCTCTAAATATGATTACTTTAAATAAAAAAGTAACAAGGTGTCTTTTCCACTCCTATGGAAAA
GGGTCT
TCTTGGCAGCTTAACATTGACTTCTTGGTTTGGGGAGAAATAAATTTTGTTCAGAATTTTGTAT
ATTGTAGGAATCCTTTGAGAATGTGATTCTTTTGATGGGGAGAAAGGGCAAATTATTTAATA
TTTTGTATTTTCAACTTTATAAAGATAAAATATCCTCAGGGGTGGAGAAGTGTGTTTTCATAAC
20 TTGCTGAATTTCAGGCATTTTGTCTACATGAGGACTCATATATTTAAGCCTTTTGTGTAATAAG
AAAGTATAAAGTCACTTCCAGTGTTGGCTGTGTGACAGAATCTTGTATTTGGGCCAAGGTGTTT
CCATTTCTCAATCAGTGCAGTGATACATGTACTCCAGAGGGACAGGGTGGACCCCCTGAGTCA
ACTGGAGCAAGAAGGAAGGAGGCAGACTGATGGCGATTCCCTCTCACCCGGGACTCTCCCCC
TTTCAAGGAAAGTGAACCTTTAAAGTAAAGGCCTCATCTCCTTTATTGCAGTTCAAATCCTCAC
25 CATCCACAGCAAGATGAATTTTATCAGCCATGTTTGGTTGTAATGCTCGTGTGATTTCTTACA
GAAATACTGCTCTGAATATTTTGTAAATAAAGGTCTTTGCACATGTGACCACATACGTGTTAGGA
GGCTGCATGCTCTGGAAGCCTGGACTCTAAGCTGGAGCTCTTGGAAGAGCTCTTCGGTTTCT
GAGCATAATGCTCCCATCTCCTGATTTCTCTGAACAGAAAACAAAAGAGAGAATGAGGGAAATT
GCTA
30 TTTTATTTGTATTCATGAACTTGGCTGTAATCAGTTATGCCGTATAGGATGTCAGACAATACCAC
TGGTTAAAATAAAGCCTATTTTTCAAATTTAGTGAGTTTCTCAAGTTTATTATATTTTTCTCTGT
TTTTATTTAATGCACAATATGGCATTATATCAATATCCTTTAACTGTGACCTGGCATACTTGTC
TGACAGATCTTAATACTACTCCTAACATTTAGAAAATGTTGATAAAGCTTCTTAGTTGTACATTTT
TTGGTGAAGAGTATCCAG
35 GTCTTTGCTGTGGATGGGTAAAGCAAAGAGCAAATGAACGAAGTATTAAGCATTGGGGCCTGT

CTTATCTACACTCGAGTGTAAAGAGTGGCCGAAATGACAGGGCTCAGCAGACTGTGGCCTGAG
GGCCAAATCTGGCCCACCACCTGTTTGGTGTAGCCTGCTAAGAATGGCTTTTACATTTTAAAT
GGTTGGGAAAGAAAAAAAAGAAGTAGTAGATTTTGTAGCATGTGATGTAAGTAATGTAAACT
TAAATTCCAGTATCCATAAATAAAGTTTTATGAGAACAGA (SEQ ID NO:2).

- 5 En determinadas modalidades, la proteína p38 seleccionada como objetivo comprende la secuencia de aminoácidos que se indica a continuación o se describe en la adhesión de GenBank NP_002742.3 para la cinasa p38 (proteína cinasa activada por mitógenos 11 isoforma 1, homo sapiens):

MSGPRAGFYRQELNKTVWEVPQRLQGLRPVGSAYGSVCSAYDARLRQKVAVKKLSRPFQSLIH
10 ARRTYRELRLKHLKHENVIGLLDVFTPATSIEDFSEVYLVTTLMGADLNNIVKCQALSDEHVQFLVY
QLLRGLKYIHSAGIIHRDLKPSNVAVNEDCELRLDFGLARQADEEMTG YVATRWYRAPEIMLNWM
HYNQTVDIWSVGCIMAELLQGKALFPGSDYIDQLKRIMEVVGTPSPEVLAKISSEHARTYIQSLPPM
PQKDLSSIFRGANPLAIDLLGRMLVLDSDQRVSAEALAHAYFSQYHDPEDPEPEAEPEYDESVEAKE
RTLEEWKELTYQEVLSFKPPEPPKPPGSLEIEQ (SEQ ID NO:3).

- 15 En determinadas modalidades, el gen p38 objetivo, el ADNc, el ARNm o la secuencia de codificación comprende la secuencia de ácido nucleico p38-β indicada a continuación o revelada en la adhesión de GenBank NM_002751.6, o un complemento de esta:

CGCCGCCTCCGCCGCCCTCCGCTCCGCTCGGCTCGGGCTCGGCTCGGGCGCGGGCGCGGG
GCGCGGGGCTGGGCCCCGGGCGGAGCGGCGGCTGCTCCGGACATGTGGGGCCCTCGCGCC
20 GGCTTCTACCGGCAGGAGCTGAACAAGACCGTGTGGGAGGTGCCGCAGCGGCTGCAGGGGC
TGCGCCCCGGTGGGCTCCGGCGCCTACGGCTCCGTCTGTTCCGGCCTACGACGCCCGGCTGCG
CCAGAAGGTGGCGGTGAAGAAGCTGTGCGGCCCTTCCAGTCGCTGATCCACGCGCGCAGA
ACGTACCGGGAGCTGCGGCTGCTCAAGCACCTGAAGCACGAGAACGTCATCGGGCTTCTGGA
CGTCTTCACGCCGGCCACGTCCATCGAGGACTTCAGCGAAGTGTACTTGGTGACCACCCTGA
25 TGGGCGCCGACCTGAACAACATCGTCAAGTGCCAGGCGCTGAGCGACGAGCACGTTCAATTC
CTGGTTTACCAGCTGCTGCGCGGGCTGAAGTACATCCACTCGGCCGGGATCATCCACCGGGA
CCTGAAGCCCAGCAACGTGGCTGTGAACGAGGACTGTGAGCTCAGGATCCTGGATTTCCGGC
TGGCGCGCCAGGCGGACGAGGAGATGACCGGCTATGTGGCCACGCGCTGGTACCGGGCAC
CTGAGATCATGCTCAACTGGATGCATTACAACCAAACAGTGGATATCTGGTCCGTGGGCTGCA
30 TCATGGCTGAGCTGCTCCAGGGCAAGGCCCTCTTCCCGGGAAGCGACTACATTGACCAGCTG
AAGCGCATCATGGAAGTGGTGGGCACACCCAGCCCTGAGGTTCTGGCAAAAATCTCCTCAGA
ACACGCCCGGACATATATCCAGTCCCTGCCCCCATGCCCCAGAAGGACCTGAGCAGCATCT
TCCGTGGAGCCAACCCCTGGCCATAGACCTCCTTGAAGGATGCTGGTGTGGACAGTGAC
CAGAGGGTCAGTGACGCTGAGGCACTGGCCACGCCTACTTCAGCCAGTACCACGACCCCG
35 AGGATGAGCCAGAGGCCGAGCCATATGATGAGAGCGTTGAGGCCAAGGAGCGCACGCTGGA

GGAGTGAAGGAGCTCACTTACCAGGAAGTCCTCAGCTTCAAGCCCCCAGAGCCACCGAAGC
 CACCTGGCAGCCTGGAGATTGAGCAGTGAGGTGCTGCCCAGCAGCCCCTGAGAGCCTGTGG
 AGGGGCTTGGGCCTGCACCCTTCCACAGCTGGCCTGGTTTCCTCGAGAGGCACCTCCCACAC
 TCCTATGGTCACAGACTTCTGGCCTAGGACCCCTCGCCTTCAGGAGAATCTACACGCATGTAT
 5 GCATGCACAAACATGTGTGTACATGTGCTTGCCATGTGTAGGAGTCTGGGCACAAGTGTCCCT
 GGGCCTACCTTGGTCCTCCTGTCCTCTTCTGGCTACTGCACTCTCCACTGGGACCTGACTGTG
 GGGTCCTAGATGCCAAAGGGGTTCCTGCGGAGTTCCCTGTCTGTCCCAGGCCGACCCAA
 GGGAGTGTGAGCCTTGGGCTCTCTTCTGTCCCAGGGCTTTCTGGAGGACGCGCTGGGGCCG
 GGACCCCGGGAGACTCAAAGGGAGAGGTCTCAGTGGTTAGAGCTGCTCAGCCTGGAGGTAG
 10 GGGGCTGTCTTGGTCACTGCTGAGACCCACAGGTCTAAGAGGAGAGGCAGAGCCAGTGTGC
 CACCAGGCTGGGCAGGGACAACCACAGGTGTCAAATGAGAAAAGCTGCCTGGAGTCTTGTG
 TTCACCCGTGGGTGTGTGTGGGCACGTGTGGATGAGCGTGCACTCCCCGTGTTTCATATGTCA
 GGGCACATGTGATGTGGTGCCTGTGAATCTGTGGGCGCCCAAGGCCAGCAGCCATATCTGGC
 AAGAAGCTGGAGCCGGGGTGGGTGTGCTGTTGCCTTCCCTCTCCTCGGTTCTGATGCCTTG
 15 AGGGGTGTTTCAGACTGGCGGCTCCAGTGGGCCAAAGGGCAACCACATGAGCATGGGCAGG
 GGCTTTCTCCTTGGATGTGGGACCCACAGCAGCTTCCCTGAGGCTGGGGGTGGGTGGGTGGG
 TGGTTTGGCCTTGAGGACGCTAGGGCAGGCAGCACACCTGGATGTGGACTTGGA CTGCGACA
 CTTCTGCCCTGCACCCTGGCCCGCTCTCTACCTCTGCCACCGTTGTGGCCCTGCAGCCGGA
 GATCTGAGGTGCTCTGGTCTGTGGGTCAGTCCTCTTTCCTTGTCCCAGGATGGAGCTGATCCA
 20 GTAACCTCGGAGACGGGACCCTGCCCAGAGCTGAGTTGGGGGTGTGGCTCTGCCCTGGAAA
 GGGGGTGACCTCTTGCCTCGAGGGGGCCAGGGAAGCCTGGGTGTCAAGTGCCTGCACCAGG
 GGTGCACAATAAAGGGGGTCTCTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ
 ID NO:4)

En determinadas modalidades, los métodos descritos en la presente que comprenden poner en
 25 contacto una célula, tejido, órgano o sujeto con un inhibidor de p38, se ponen en práctica para
 inhibir o disminuir la expresión o actividad de DUX4 o uno o más genes posteriores de DUX4. En
 determinadas modalidades, el gen DUX4 o posterior de DUX4 es un gen humano. Por ejemplo, el
 gen doble homeobox 4 (Homo sapiens) DUX4 puede comprender la secuencia de nucleótidos que
 se indica a continuación o que se describe en el acceso de GenBank NG_034189.2, o un
 30 complemento de esta:

ATGGCCCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGACGAGGACGG
 CGACGGAGACTCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCCTGCTTTGAGCGGA
 ACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCAGGCCATCGGCATTCCGGAGCC
 CAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTCACGCCAGCTGAGGCAGCACCGGCGGGAAT
 35 CTCGGCCCTGGCCCGGAGACGCGGCCCGCCAGAAGGCCGGCGAAAGCGGACCGCCGTCA

CCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTCCGAGCCTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCC
 GCCCGGGAGGAGCTGGCCAGAGAGACGGGCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTC
 AGAATCGAAGGGCCAGGCACCCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCGGCC
 TGTGCAGCGCGGCCCCCGGCGGGGGTCAACCCTGCTCCCTCGTGGGTGCGCTTCGCCCACAC
 5 CCGCGCGTGGGGAACGGGGCTTCCCGCACCCACAGTGCCCTGCGCGCCTGGGGCTCTCCC
 ACAGGGGGCTTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCCGCGCTGCAGCCCAGCCAGGC
 CGCGCCGGCAGAGGGGATCTCCCAACCTGCCCCGGCGCGCGGGGATTTGCGCTACGCCGC
 CCGGGCTCCTCCGGACGGGGCGCTCTCCACCCCTCAGGCTCCTCGCTGGCCTCCGCACCCG
 GGCAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGGGCCCCCTGCGCGGTG
 10 GCACAGCCTGGGCCCCGCTCAAGCGGGGCCGCAGGGCCAAGGGGTGCTTGCGCCACCCACG
 TCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCCCAGGTGCGCGGGGCGGCGTG
 GGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCCAGCCCGCGCCCCCGGACGCCTCCGCCTCC
 GCGCGGCAGGGGCAGATGCAAGGCATCCCGGCGCCCTCCCAGGCGCTCCAGGAGCCGGCG
 CCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTGCTGCTGGATGAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCT
 15 GCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAGAAACGGAGGCCCGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAAGA
 GGCCGCCTCGCTGGAAGCACCCCTCAGCGAGGAAGAATACCGGGCTCTGCTGGAGGAGCTT
 TAGGACGCGGGGTTGGGACGGGGTTCGGGTGGTTTCGGGGCAGGGCGGTGGCCTCTCTTTTCG
 CGGGGAACACCTGGCTGGCTACGGAGGGGCGTGTCTCCGCCCCGCCCCCTCCACCGGGCT
 GACCGGCCTGGGATTCTGCTTCTAGGTCTAGGCCCGGTGAGAGACTCCACACCGCGGAG
 20 AACTGCCATTCTTTCTGCGCATCCCGGGGATCCAGAGCCGGGCCAGGTACCAGCAGGTGG
 GCCGCCTACTGCGCACGCGCGGGTTTGCGGGCAGCCGCCTGGGCTGTGGGAGCAGCCCGG
 GCAGAGCTCTCCTGCCTCTCCACCAGCCCACCCCGCCGCCTGACCGCCCCCTCCCCACCCC
 CACCCCCCACCCCGGAAAACGCGTCGTCCCCTGGGCTGGGTGGAGACCCCGTCCCGCGA
 AACACCGGGCCCCGCGCAGCGTCCGGGCCTGACACCGCTCCGGCGGCTCGCCTCCTCTGCG
 25 CCCCCGCGCCACCGTCGCCCCGCCCGGGCCCCCTGCAGCCTCCAGCTGCCAGCACGG
 AGCGCCTGGCGGTCAAAAGCATACCTCTGTCTGTCTTTGCCCGCTTCTGGCTAGACCTGCG
 CGCAGTGCGCACCCCGGCTGACGTGCAAGGGAGCTCGCTGGCCTCTCTGTGCCCTTGTTCTT
 CCGTGAAATTCTGGCTGAATGTCTCCCCCACCTTCCGACGCTGTCTAGGCAAACCTGGATTA
 GAGTTACATCTCCTGGATGATTAGTTCAGAGATATATTAATAATGCCCCCTCCCTGTGGATCCTA
 30 TAG (SEQ ID NO:5).

Por ejemplo, el gen de ARNm de doble homeobox 4 [Homo sapiens] DUX4 puede comprender la
 secuencia de nucleótidos que se indica a continuación o que se describe en el acceso de GenBank
 NM_001293798.2, o un complemento de esta:

ATGGCCCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGACGAGGACGG
 35 CGACGGAGACTCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCCTGCTTTGAGCGGA

ACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGCCATCGGCATTCCGGAGCC
 CAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTCACGCCAGCTGAGGCAGCACCCGGCGGGAAT
 CTCGGCCCTGGCCCGGAGACGCGGCCCGCCAGAAGGCCGGCGAAAGCGGACCGCCGTCA
 CCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTCCGAGCCTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCC
 5 GCCCGGGAGGAGCTGGCCAGAGAGACGGGCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTC
 AGAATCGAAGGGCCAGGCACCCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCGGCC
 TGTGCAGCGCGGCCCGCGCGGGGTCAACCCTGCTCCCTCGTGGGTGCGCTTCGCCCCACAC
 CGGCGCGTGGGGAACGGGGCTTCCCGCACCCACAGTGCCCTGCGCGCCTGGGGCTCTCCC
 ACAGGGGGCTTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCCGCGCTGCAGCCCAGCCAGGC
 10 CGCGCCGGCAGAGGGGATCTCCCAACCTGCCCCGGCGCGCGGGGATTTGCGCTACGCCGC
 CCGGGCTCCTCCGGACGGGGCGCTCTCCACCCCTCAGGCTCCTCGCTGGCCTCCGCACCCG
 GGCAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGGGGCCCCTGCGCGGTG
 GCACAGCCTGGGCCCCGCTCAAGCGGGGGCCGCAGGGCCAAGGGGTGCTTGCGCCACCCACG
 TCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCCCAGGTCGCCGGGGCGGCGTG
 15 GGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCCAGCCCGCGCCCCCGGACGCCTCCGCCTCC
 GCGCGGCAGGGGCAGATGCAAGGCATCCCGGCGCCCTCCCAGGCGCTCCAGGAGCCGGCG
 CCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTGCTGCTGGATGAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCT
 GCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAGAAACGGAGGCCCGGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAAGA
 GGCCGCCTCGCTGGAAGCACCCCTCAGCGAGGAAGAATACCGGGCTCTGCTGGAGGAGCTT
 20 TAGGACGCGGGGTCTAGGCCCGGTGAGAGACTCCACACCGCGGAGAACTGCCATTCTTTCT
 GGGCATCCCGGGGATCCCAGAGCCGGCCCAGGTACCAGCAGACCTGCGCGCAGTGCGCAC
 CCGGGCTGACGTGCAAGGGAGCTCGCTGGCCTCTCTGTGCCCTTGTTCTTCCGTGAAATTCT
 GGCTGAATGTCTCCCCCACCTTCCGACGCTGTCTAGGCAAACCTGGATTAGAGTTACATCTC
 CTGGATGATTAGTTCAGAGATATATTAAATGCCCCCTCCCTGTGGATCCTATAG (SEQ ID
 25 NO:6).

En particular, la modalidad, la secuencia de polipéptidos de DUX4 es como se indica a continuación o se describe en el acceso de GenBank NP_001280727.1:

MALPTPSDSTLPAEARGRRRRRLVWTPSQSEALRACFERNPYPGIATRERLAQAIGIPEPRVQIW
 FQNERSRQLRQHRRESRPWPGRRGPEGRRKRTAVTGSQTALLLRAFEKDRFPGIAAREELARE
 30 TGLPESRIQIWFQNRARRHPGQGGRAPAQAGGLCSAAPGGGHPAPSWVAFHTGAWGTGLPAP
 HVPCAPGALPQGAFVSQAARAAPALQPSQAAPAEGISQPAPARGDFAYAAPAPPDGALSHPQAP
 RWPPHPGKSREDRDPQRDGLPGCAVAQPGPAQAGPQQGVLPPTSQGSPPWWGWGRGPQ
 VAGAAWEPQAGAAPPQPAPPDASASARQQMQGIPAPSQALQEPAPWSALPCGLLLDELLASP
 EFLQQAQPLLETEAPGELEASEEAASLEAPLSEEEYRALLEEL (SEQ ID NO:7).

35 Se conocen en la técnica las secuencias de genes u objetivos posteriores de DUX4 y los genes

posteriores de DUX4 ilustrativos se proporcionan mediante los números de acceso que se muestran a continuación:

MBD3L2:

Acceso de nucleótidos genómicos NC_000019.10 (7049340..7051735)

5 Acceso de nucleótidos de ARNm NM_144614.3

Acceso de polipéptidos proteicos NP_653215.2

ZSCAN4:

NC_000019.10 (57651497..57679152)

NM_152677.2

10 NP_689890.1

LEUTX:

NC_000019.10 (39776594..39786135)

NM_001143832.1

NP_001137304.1

15 PRAMEF2:

NC_000001.11 (12857086..12861909)

NM_023014.1

NP_075390.1

TRIM43:

20 NC_000002.12 (95592018..95599723)

NM_138800.2

NP_620155.1

KHDC1L:

NC_000006.12 (73223544..73225452, complemento)

25 NM_001126063.2

NP_001119535.1

Se conocen en la técnica los métodos para determinar el nivel de expresión de p38, DUX4 o un gen o polipéptido posterior de DUX4 en una muestra biológica, por ejemplo, tejido, y estos incluyen, por ejemplo, RT-PCR y FACS.

30 En una modalidad, un método para reducir la expresión de un ARNm de DUX4 (por ejemplo, DUX4-fl), un polipéptido de DUX4 o un polipéptido codificado por un gen objetivo posterior de DUX4 en una célula, tejido, órgano o sujeto, comprende poner en contacto la célula, tejido, órgano o sujeto con un agente que dé como resultado una cantidad reducida de proteína p38 activa (también denominada en la presente inhibidor de p38), por ejemplo, un inhibidor de p38- α y/o p38- β . En determinadas modalidades, el agente inhibe la expresión o la actividad de una proteína p38.

En determinadas modalidades, el agente provoca una mayor degradación de una proteína p38, por ejemplo, p38- α y/o p38- β . En modalidades particulares, la célula o tejido se pone en contacto con una cantidad del agente eficaz para reducir la expresión o actividad de un polipéptido de DUX4, o un polipéptido codificado por un gen objetivo posterior de DUX4, en la célula o el tejido. En determinadas modalidades, la célula o tejido se pone en contacto con una cantidad del agente eficaz para reducir la cantidad de proteína p38 activa en la célula o tejido. En modalidades particulares, las células son células musculares. En determinadas modalidades, las células están diferenciadas de manera terminal, por ejemplo, células musculares diferenciadas de manera terminal. En algunas modalidades, las células tienen un nivel de expresión mayor del polipéptido de DUX4, o el polipéptido codificado por el gen objetivo posterior, en comparación con el nivel de expresión en una célula de control. En determinadas modalidades, las células están asociadas con la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD), por ejemplo, FSHD1 o FSHD2. Por ejemplo, las células pueden derivarse u obtenerse de células o tejidos de un sujeto con diagnóstico de FSHD. Los métodos descritos en la presente pueden ponerse en práctica in vitro o in vivo.

En una modalidad, la descripción proporciona un método para reducir la apoptosis de una célula o tejido, que comprende poner en contacto la célula o tejido con un agente que inhibe la expresión o actividad de una proteína p38 (también denominada en la presente inhibidor de p38), por ejemplo, un inhibidor de p38- α y/o p38- β . En modalidades particulares, la célula o tejido se pone en contacto con una cantidad del agente eficaz para reducir la expresión o actividad de un polipéptido de DUX4, o un polipéptido codificado por un gen objetivo posterior de DUX4, en la célula o el tejido. En determinadas modalidades, la célula o tejido se pone en contacto con una cantidad del agente eficaz para reducir la cantidad de proteína p38 activa en la célula o tejido. En modalidades particulares, las células son células musculares. En determinadas modalidades, las células están diferenciadas de manera terminal, por ejemplo, células musculares diferenciadas de manera terminal. En algunas modalidades, las células tienen un nivel de expresión mayor del polipéptido de DUX4, o el polipéptido codificado por el gen objetivo posterior, en comparación con el nivel de expresión en una célula de control (por ejemplo, antes del tratamiento). En determinadas modalidades, las células están asociadas con la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD), por ejemplo, FSHD1 o FSHD2. Por ejemplo, las células pueden derivarse u obtenerse de células o tejidos de un sujeto con diagnóstico de FSHD. Los métodos descritos en la presente pueden ponerse en práctica in vitro o in vivo.

En un aspecto relacionado, la descripción incluye un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado con una mayor actividad o expresión de una proteína DUX4 o un gen objetivo posterior de DUX4 en un sujeto que lo necesite, que comprende proporcionarle a un sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un agente que

reduce la cantidad de proteína p38 activa (por ejemplo, p38- α y/o p38- β) en el sujeto, o en determinadas células o tejidos del sujeto. En algunas modalidades, el agente inhibe la expresión o actividad de una proteína p38, por ejemplo, p38- α y/o p38- β . En determinadas modalidades, el agente induce la degradación de la proteína p38. En determinadas modalidades, el agente inhibe la actividad de una proteína p38, por ejemplo, inhibe la actividad de cinasa de la proteína p38. En modalidades particulares de cualquiera de los métodos, el inhibidor de p38 reduce la expresión de DUX4 y/o uno o más genes posteriores de DUX4 en las células o tejido del sujeto.

En modalidades particulares de los métodos de tratamiento descritos en la presente, la enfermedad o trastorno se selecciona de FSHD 1, FSHD2, inmunodeficiencia, inestabilidad de centrómeros y síndrome de anomalías faciales (ICF), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), sarcoma de Ewing, sarcoma de tejido blando, rabdomiosarcoma y leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B en adultos y pacientes pediátricos.

En modalidades particulares de los métodos de tratamiento descritos en la presente, el sujeto recibe el diagnóstico de FSHD1 o FSHD2 y, en determinadas modalidades, el sujeto comprende una o más mutaciones genéticas asociadas con FSHD1 y/o FSHD2. En determinadas modalidades, el sujeto comprende una represión reducida en un locus de D4Z4.

En modalidades particulares de los métodos de tratamiento descritos en la presente, se identifica que el sujeto padece FSHD en función de la presencia de un DUX4 transcripcionalmente activo. En otra modalidad, se identifica que sujeto padece FSHD en función de la presencia de niveles de expresión mayores de uno o más genes posteriores, por ejemplo, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 o ZNF280A con respecto a un control saludable. En otra modalidad, se identifica que sujeto padece FSHD en función de la presencia de un DUX4 transcripcionalmente activo y niveles de expresión mayores de uno o más genes posteriores de DUX4, por ejemplo, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 o ZNF280A.

En otra modalidad, el método puede incluir la medición del nivel de expresión de uno o más genes de DUX4 y posteriores de DUX4, por ejemplo, DUX4, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 o ZNF280A, en el sujeto antes de la administración del inhibidor de cinasa p38. El método puede incluir también determinar que el sujeto necesita tratamiento si el nivel de expresión de uno o más genes de DUX4 y posteriores de DUX4, por ejemplo, DUX4, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 y ZNF280A KHDC1L es elevado en relación con un control saludable.

En otra modalidad, el método puede incluir la medición del nivel de expresión de uno o más genes de DUX4 y posteriores de DUX4, por ejemplo, DUX4, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 o ZNF280A, en las células del sujeto antes y después de la administración del inhibidor de cinasa p38. El método puede incluir la comparación del nivel de expresión de uno o más genes de DUX4 y posteriores de DUX4, por ejemplo, DUX4, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 o ZNF280A, en el sujeto antes y después de la administración del inhibidor de cinasa p38. El método puede incluir la determinación de la eficacia del tratamiento mediante la comparación del nivel de expresión de uno o más de los genes de DUX4 y posteriores de DUX4, por ejemplo, DUX4, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 y ZNF280A antes y después de la administración del inhibidor de cinasa p38, donde una disminución del nivel de expresión sugiere un tratamiento eficaz.

En algunas modalidades, el inhibidor de cinasa p38 reduce uno o más genes posteriores que se seleccionan de ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 y ZNF280A.

En una modalidad, un modulador transcripcional de DUX4 y los genes posteriores ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 y ZNF280A se ve inhibido por la cinasa p38.

En modalidades particulares, el sujeto comprende la contracción de la matriz 4q35A D4Z4, de forma tal que el sujeto comprenda ≤ 10 o ≤ 7 repeticiones (FSHD1). En determinadas modalidades, el sujeto, o una o más células o tejidos del sujeto, comprende una delección de una o más repeticiones del macrosatélite D4Z4 en la región subtelomérica del cromosoma 4q35, opcionalmente donde la célula comprende ≤ 7 repeticiones del macrosatélite D4Z4 en la región subtelomérica del cromosoma 4q35. En determinadas modalidades, el sujeto comprende una o más mutaciones en un gen del dominio 1 portador de mantenimiento estructural de la bisagra flexible de cromosomas (SMCHD1). En algunas modalidades, el sujeto comprende al menos un alelo 4qA no eliminado. En algunas modalidades, el sujeto comprende al menos un alelo 4qA no eliminado y una mutación SMCHD1 (FSHD2). En algunas modalidades, el sujeto se encuentra en silla de ruedas (por ejemplo, CSS 4.5 y 5). En determinadas modalidades, durante o después del tratamiento, el sujeto presenta una cantidad o tasa de degeneración muscular reducida o disminuida, por ejemplo, un sujeto con diagnóstico de FSHD1 o FSHD2. En determinadas modalidades, durante o después del tratamiento, el sujeto presenta una reducción de la sustitución de músculo esquelético por grasa, por ejemplo, según se determina a través de MRI cuantitativa,

por ejemplo, una reducción de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 50 % o al menos 70 %. En determinadas modalidades, durante o después del tratamiento, el sujeto presenta una evidencia de beneficios en una o más de las siguientes evaluaciones de resultados clínicos:

- 5 - función del hombro/brazo según se mide a través del espacio de trabajo accesible (RWS) con o sin peso;
- movilidad según se mide a través del tiempo que tarda el sujeto en levantarse de una silla sin posabrazos (“timed up and go”, TUG) o un ensayo similar;
- informes de los pacientes sobre actividades de la vida diaria (ADL) y la calidad de vida (QOL); y
- 10 - fuerza cuantitativa del músculo esquelético según se mide a través de dinamometría.

En algunas modalidades, el sujeto presenta cualquiera de estas mejoras durante al menos un tiempo, por ejemplo, durante al menos una semana, un mes, dos meses, seis meses o un año después del comienzo o la interrupción del tratamiento.

- 15 En otro aspecto, la descripción proporciona los métodos descritos para utilizar los inhibidores de p38, por ejemplo, un inhibidor de p38- α o p38- β , para el tratamiento de FSHD1, FSHD2, ICF y enfermedades en las que se hallan cambios patológicos similares, tales como ALS e IBM (Tawil et ál., 2014).

En modalidades particulares de cualquiera de los métodos descritos en la presente, la composición farmacéutica se proporciona al sujeto por vía parenteral.

- 20 En modalidades particulares de cualquiera de los métodos descritos en la presente, la composición farmacéutica se proporciona a un tejido muscular del sujeto.

En algunas modalidades determinadas, cualquiera de los métodos descritos en la presente que comprenden proporcionar al sujeto un inhibidor de p38 puede comprender además proporcionar al sujeto una terapia adicional.

- 25 En modalidades particulares, la terapia adicional comprende un control clínico. En una modalidad, la presente invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención de FSHD 1, FSHD2, ICF, ALS, IBM, sarcoma de Ewing, sarcoma de tejido blando, rabdomiosarcoma y leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B en pacientes adultos y pediátricos, donde se utilizan inhibidores de p38 para disminuir la expresión y/o actividad de genes y/o proteínas posteriores de DUX4, y puede combinarse con el control clínico que implica fisioterapia, ejercicio aeróbico, terapia
- 30 de función respiratoria y/o intervenciones ortopédicas.

En modalidades particulares, la terapia adicional comprende proporcionarle al sujeto uno o más inhibidores de miostatina, agentes antiinflamatorios o vectores de terapia génica, por ejemplo, para reducir la producción patógena de proteínas DUX4 en la FSHD al controlar la metilación de D4Z4,

35 suprimir el ARNm de DUX4 y/o inhibir las vías de señalización de DUX4. En una modalidad, la

presente descripción proporciona un método para el tratamiento de FSHD 1, FSHD2, ICF, ALS o IBM, en un sujeto que lo necesite, donde se utilizan inhibidores de p38, por ejemplo, inhibidores de p38- α o p38- β , para reducir la expresión de DUX4 y de genes y/o proteínas posteriores, y pueden combinarse con inhibidores de miostatina, agentes antiinflamatorios y/o terapia génica, por ejemplo, para reducir la producción patógena de proteínas DUX4 en la FSHD mediante el control de la metilación de D4Z4, la supresión del ARNm de DUX4 y la inhibición de las vías de DUX4. En determinadas modalidades, los métodos se ponen en práctica mediante el uso de un inhibidor de p38 y un inhibidor de miostatina. Pueden utilizarse en determinadas modalidades inhibidores particulares de la vía de miostatina que actúan de forma extracelular mediante la unión directa a la miostatina (Fstl3, folistatina, anticuerpo de miostatina, GASP1, propéptido de miostatina, péptidos de decorina, ActRIIB-Fc) o la unión de su complejo receptor (anticuerpo ActRIIB) para bloquear el acoplamiento de la miostatina y su complejo receptor y activar la señalización posterior. Algunos de los inhibidores de miostatina son de origen natural (propéptido de miostatina, Gasp1, folistatina, Fstl3), mientras que otros son modificados (anticuerpo de miostatina, anticuerpo ActRIIB, ActRIIB-Fc).

En modalidades particulares, la terapia adicional comprende proporcionarle al sujeto un inhibidor de DUX4 o un gen u objetivo posterior de DUX4, por ejemplo, un inhibidor que inhibe la expresión de ARNm de DUX4 y/o proteína DUX4 (o expresión de ARNm o proteína de un objetivo posterior de DUX4) o un inhibidor que inhibe la actividad de DUX4, por ejemplo, su actividad como activador transcripcional, o la actividad de un objetivo posterior de DUX4. En modalidades particulares, el inhibidor induce la degradación del polipéptido de DUX4 o del polipéptido objetivo posterior de DUX4. En modalidades particulares, el inhibidor es un ARNip, miARN, ARNg, ARNhp u oligonucleótido antisentido que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico o antisentido de este de un gen de DUX4 u objetivo posterior de DUX4. En una modalidad, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de FSHD 1, FSHD2, ICF, ALS o IBM, donde se utilizan inhibidores de p38 para reducir la expresión de DUX4 y genes y proteínas posteriores, y puede combinarse con un inhibidor de DUX4 o un objetivo posterior de DUX4, por ejemplo, ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de horquilla pequeña (ARNhp), ARN guía (ARNg), microARN (miARN) y oligonucleótidos antisentido dirigidos a DUX4 y/o una o más transcripciones objetivo posteriores de DUX4 (por ejemplo, ADN o ARNm).

En determinadas modalidades, la presente invención proporciona un método para utilizar los inhibidores de molécula pequeña de la cinasa p38, por ejemplo, un inhibidor de p38- α o p38- β , para reducir la expresión génica posterior y de DUX4 en miotubos del músculo esquelético con FSHD para tratar la FSHD o cualquier otra enfermedad o trastorno descritos en la presente y/o relacionados con la expresión o actividad anómalas de DUX4.

En algunas modalidades, cualquiera de las moléculas pequeñas u otros agentes descritos en la presente inhiben p38, por ejemplo, p38- α y/o p38- β .

Los inhibidores de p38 y/u otros agentes y composiciones (por ejemplo, inhibidores) descritos en la presente pueden formularse de cualquier manera adecuada para una vía de administración deseada (por ejemplo, administración parenteral u oral). En algunas modalidades, el contacto de un agente o composición con una célula y/o tejido es resultado de la administración o suministro de un agente o composición a un sujeto. En algunas modalidades, un agente o composición (por ejemplo, un inhibidor de p38) se administra al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 o más veces. En algunas incorporaciones de terapias combinadas, la administración de un primer agente o composición se produce antes, de forma simultánea o se superpone con la administración de un segundo agente o composición. El primer y segundo agente o composición pueden ser iguales o pueden ser distintos. En algunas modalidades, el primer y segundo agentes los administra el mismo actor y/o se administran en la misma ubicación geográfica. En algunas modalidades, el primer y segundo agentes los administran distintos actores y/o se administran en distintas ubicaciones geográficas. En algunas modalidades, se administran múltiples agentes descritos en la presente como una única composición.

Es posible utilizar una gran variedad de métodos de administración junto con los inhibidores de p38 de acuerdo con los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, los inhibidores de p38 pueden administrarse o coadministrarse por vía tópica, oral, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, transdérmica, sublingual, intramuscular, rectal, transbucal, intranasal, liposomal, mediante inhalación, por vía vaginal, intraocular, mediante suministro local (por ejemplo, a través de catéter o stent), por vía subcutánea, intraadiposa, intraarticular, intratecal, transmucosa, pulmonar, o parenteral, por ejemplo, mediante inyección, lo que incluye por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardíaca, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea e intraesternal; mediante implante de un depósito o reservorio, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular.

El término “sujetos” incluye animales (por ejemplo, mamíferos, cerdos, peces, aves, insectos, etc.). En algunas modalidades, los sujetos son mamíferos, particularmente primates, especialmente humanos. En algunas modalidades, los sujetos son ganado tales como bovinos, ovejas, cabras, vacas, cerdos y similares; aves tales como pollos, patos, gansos, pavos y similares; y animales domésticos, tales como perros y gatos. En algunas modalidades (por ejemplo, en particular, en contextos de investigación), los sujetos son roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsters), conejos, primates o cerdos, tales como cerdos de línea pura y similares. Los términos “sujeto” y “paciente” se utilizan de forma indistinta en la presente.

Un “tejido” es un conjunto de células similares del mismo origen que, juntas, llevan a cabo una función específica. En determinadas modalidades, el tejido es tejido muscular.

Los métodos descritos en la presente pueden ponerse en práctica con cualquier agente capaz de inhibir la expresión o actividad de un gen o proteína p38, por ejemplo, un inhibidor de un gen o proteína p38- α o p38- β , lo que incluye, de modo no taxativo, cualquiera de los descritos en la presente.

En modalidades particulares, los métodos descritos en la presente dan como resultado una disminución de un nivel de expresión o actividad de DUX4 y/o uno o más genes posteriores de DUX4 en células o tejidos (por ejemplo, dentro de un sujeto), por ejemplo, en comparación con el nivel de expresión o la actividad en tejido o células de control que no hayan entrado en contacto con un inhibidor de p38, o un nivel de referencia. Una “disminución” hace referencia a una disminución de al menos 5 %, por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100 %, por ejemplo, en comparación con el nivel de referencia. Una disminución también significa disminuciones de al menos 1 vez, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000 veces o más, por ejemplo, en comparación con el nivel de células o tejidos de referencia o control.

Los métodos descritos en la presente pueden ponerse en práctica mediante el uso de cualquier tipo de inhibidor que dé como resultado una cantidad o nivel menores de una proteína p38 activa, por ejemplo, en una célula o tejido, por ejemplo, una célula o tejido de un sujeto. En modalidades particulares, el inhibidor de p38 provoca una reducción de la proteína p38 activa (por ejemplo, p38- α y/o p38- β activas), una reducción de la proteína p38 total (por ejemplo, proteína p38- α y/o p38- β total), una reducción del ARNm de p38 (por ejemplo, ARNm de p38- α y/o p38- β) y/o una reducción de la actividad de la proteína p38 (por ejemplo, actividad de la cinasa p38- α y/o p38- β) en una célula o tejido que estuvo en contacto con el inhibidor de p38. En modalidades particulares, el inhibidor de p38 provoca una reducción de la actividad o expresión de la vía de señalización de p38- α y/o p38- β . En determinadas modalidades, la reducción es de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 %, en comparación con el nivel en el mismo tipo de célula o tejido que no haya entrado en contacto con el inhibidor de p38. Se conocen en la técnica los métodos para medir en una célula los niveles totales de ARNm o proteína p38, o la actividad de cinasa p38. En determinadas modalidades, el inhibidor inhibe o reduce la actividad o expresión de p38, por ejemplo, expresión de proteínas y/o ARNm. En determinadas modalidades, el inhibidor provoca una mayor degradación de la proteína p38, lo que da como resultado cantidades menores de proteína p38 en una célula o tejido. Determinados métodos pueden emplear también cualquier tipo de inhibidor de la expresión o actividad de DUX4 o un gen posterior de DUX4. En determinados

casos, el inhibidor inhibe tanto las proteínas p38- α como p38- β , mientras que, en otros casos, el inhibidor inhibe de manera selectiva o preferencial ya sea p38- α o p38- β . En determinadas modalidades, el inhibidor no inhibe p38- γ .

Los inhibidores que pueden utilizarse para poner en práctica los métodos descritos incluyen, de modo no taxativo, agentes que inhiben, reducen o disminuyen la expresión o actividad de una biomolécula (por ejemplo, una proteína o ácido nucleico), tales como, de modo no taxativo, un gen, proteína o ARNm de p38- α o p38- β . En determinadas modalidades, un inhibidor puede provocar una mayor degradación de la biomolécula. En modalidades particulares, un inhibidor puede inhibir una biomolécula a través de medios competitivos o no competitivos. Los ejemplos de inhibidores incluyen, de modo no taxativo, ácidos nucleicos, ADN, ARN, ARNg, ARNhp, ARNip, ARNm modificado (ARNm), microARN (miARN), proteínas, miméticos de proteínas, péptidos, peptidomiméticos, anticuerpos, moléculas pequeñas, moléculas orgánicas pequeñas, moléculas inorgánicas, sustancias químicas, análogos que imitan el sitio de unión de una enzima, receptor u otra proteína, por ejemplo, que está implicada en la transducción de señales, agentes terapéuticos, composiciones farmacéuticas, fármacos y combinaciones de estos. En algunas modalidades, el inhibidor puede ser una molécula de ácido nucleico que incluye, de modo no taxativo, ARNip que reduce la cantidad de proteína funcional en una célula. Por consiguiente, los compuestos o agentes que se dice que son “capaces de inhibir” una proteína particular, por ejemplo, p38, comprenden cualquier tipo de inhibidor. En determinadas modalidades, un inhibidor de p38, un inhibidor de DUX4 o un gen objetivo posterior de DUX4 es cualquiera de las distintas clases de inhibidores descritos en la presente o cualquier otra.

En modalidades particulares, un inhibidor de p38 (u otro inhibidor) comprende un ácido nucleico que se une a un gen p38 (por ejemplo, gen *MAPK14* o *MAPK11*) o ARNm (u otro ARNm o gen objetivo). Por consiguiente, un inhibidor de ácido nucleico puede comprender una secuencia complementaria a una secuencia de polinucleótidos objetivo, por ejemplo, la secuencia de p38- α descrita en la presente, o una región de esta, o un antisentido de esta. En modalidades particulares, un inhibidor de ácido nucleico comprende al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 20, al menos 24 o al menos 30 secuencias de nucleótidos correspondientes o complementarias a una secuencia de polinucleótidos objetivo o antisentido de esta.

En determinadas modalidades, un inhibidor de ácido nucleico es una interferencia de ARN o un agente de ARN antisentido o una parte o mimético de este, o un morfolino, que disminuye la expresión de un gen objetivo cuando se administra a una célula. Típicamente, un inhibidor de ácido nucleico comprende al menos una parte de una molécula de ácido nucleico objetivo, o un ortólogo de esta, o comprende al menos una parte de la cadena complementaria de una molécula

de ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, la expresión de un gen objetivo se reduce un 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o incluso 90-100 %.

Una secuencia de ácido nucleico “complementaria” es una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse con otra secuencia de ácido nucleico compuesta por pares de bases de nucleótidos complementarios. Por “hibridación” se entiende un emparejamiento para formar una molécula de cadena doble entre bases de nucleótidos complementarios (por ejemplo, la adenina (A) forma un par de bases con timina (T), al igual que la guanina (G) con citosina (C) en el ADN) en condiciones adecuadas de rigurosidad (ver, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507).

“Antisentido” hace referencia a una secuencia de ácido nucleico, sin importar su longitud, que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico. En determinadas modalidades, el ARN antisentido hace referencia a moléculas de ARN de cadena simple que pueden introducirse en una célula, tejido o sujeto individual y da como resultado una disminución de la expresión de un gen objetivo a través de mecanismos que no dependen de las vías de silenciamiento de genes endógenos. Un ácido nucleico antisentido puede contener una estructura principal modificada, por ejemplo, fosforotioato, fosforoditioato u otros conocidos en la técnica, o puede contener enlaces internucleósido no naturales. El ácido nucleico antisentido puede comprender, por ejemplo, ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

Tal como se usa en la presente, la “interferencia de ARN” hace referencia al uso de agentes que disminuyen la expresión de un gen objetivo mediante la degradación de un ARNm objetivo a través de vías de silenciamiento de genes endógenos (por ejemplo, Dicer y el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC)). La interferencia de ARN puede lograrse mediante el uso de diversos agentes, que incluyen ARNhp y ARNip. El “ARN de horquilla pequeña” o “ARNhp” hace referencia a una molécula de ARN artificial de cadena doble con un giro de horquilla que puede utilizarse para silenciar la expresión del gen objetivo a través de la interferencia de ARN (iARN). La expresión de ARNhp en las células se logra típicamente a través del suministro de plásmidos o a través de vectores virales o bacterianos. El ARNhp es un mediador favorable de iARN en el sentido en que tiene una tasa relativamente baja de degradación y rotación. El ARN interferente pequeño (ARNip) es una clase de moléculas de ARN de cadena doble, normalmente con una longitud de 20-25 pares de bases, similar al miARN, que funciona dentro de la vía de interferencia de ARN (iARN). Interfiere con la expresión de genes específicos con secuencias de nucleótidos complementarias al degradar el ARNm después de la transcripción, lo que impide la traducción. En determinadas modalidades, un ARNip tiene una longitud de 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos y un excedente de 2 bases en su extremo 3'. Los ARNip pueden introducirse en una célula y/o sistema de cultivo individual y dar como resultado la degradación de secuencias de ARNm

objetivo. Tal como se usa en la presente, “morfolino” hace referencia a un oligómero de ácido nucleico modificado donde las bases de ácido nucleico estándar se unen a anillos de morfolina y se enlazan a través de enlaces de fosforodiamidato. Similar al ARNip y ARNhp, los morfolinos se unen a secuencias de ARNm complementarias. Sin embargo, los morfolinos funcionan a través de la inhibición estérica de la traducción del ARNm y la alteración del corte y empalme del ARNm en vez de dirigirse a secuencias de ARNm complementario para su degradación.

En determinadas modalidades, un inhibidor de ácido nucleico es un ARN mensajero que puede introducirse en una célula, donde codifica un inhibidor de polipéptidos de p38 u otro objetivo descrito en la presente. En modalidades particulares, el ARNm se modifica, por ejemplo, para aumentar su estabilidad o reducir su inmunogenicidad, por ejemplo, mediante la incorporación de uno o más nucleósidos modificados. Se conocen en la técnica modificaciones adecuadas.

En determinadas modalidades, un inhibidor comprende un casete de expresión que codifica un inhibidor de polinucleótidos o polipéptidos de p38 u otro objetivo descrito en la presente. En modalidades particulares, el casete de expresión está presente en un vector de terapia génica, por ejemplo, un vector de terapia génica viral. Se conoce en la técnica una variedad de vectores de terapia génica, que incluyen vectores de terapia génica virales, que incluyen, por ejemplo, vectores de terapia génica a base de AAV.

En algunas modalidades, un inhibidor es un inhibidor de polipéptidos. En modalidades particulares, un inhibidor de polipéptidos se une a un polipéptido objetivo tal como p38, mediante lo cual inhibe su actividad, por ejemplo, la actividad de cinasa. Los ejemplos de inhibidores de polipéptidos incluyen cualquier tipo de polipéptido (por ejemplo, péptidos y proteínas), tal como anticuerpos y fragmentos de estos.

Un “anticuerpo” es una molécula de inmunoglobulina (Ig) que puede unirse de forma específica a un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido o polipéptido, a través de al menos un sitio de reconocimiento de epítopos ubicado en la región variable de la molécula de Ig. Tal como se utiliza en la presente, el término abarca no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de estos, tales como dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, cadena simple (scFv), variantes sintéticas de estos, variantes de origen natural, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo con un fragmento de unión al antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos quiméricos, nanocuerpos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de unión al antígeno o un fragmento de la especificidad requerida.

“Fragmento” hace referencia a una parte de un polipéptido o molécula de ácido nucleico. Esta parte contiene, preferentemente, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la longitud total del polipéptido o molécula de ácido nucleico de referencia. Un fragmento

puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos o aminoácidos. Un "fragmento funcional" de un anticuerpo es un fragmento que mantiene una o más actividades del anticuerpo, por ejemplo, se une al mismo epítipo y/o posee una actividad biológica del anticuerpo. En modalidades particulares, un fragmento funcional comprende las seis CDR presentes en el anticuerpo.

En determinadas modalidades, el inhibidor induce la degradación de un polipéptido objetivo, por ejemplo, la proteína p38. Por ejemplo, los inhibidores incluyen quimeras dirigidas a la proteólisis (PROTAC), que inducen la proteólisis intracelular selectiva de las proteínas objetivo. Las PROTAC incluyen dominios funcionales, que pueden estar unidos de manera covalente a moléculas de unión de proteínas: uno es capaz de acoplarse a una ubiquitina ligasa E3 y el otro se une a la proteína objetivo destinada a la degradación. El reclutamiento de la ligasa E3 a la proteína objetivo produce una ubiquitinación y posterior degradación de la proteína objetivo mediante el proteasoma. En modalidades particulares, un inhibidor es una PROTAC que se dirige a una proteína p38 (por ejemplo, p38- α y/o p38- β).

En determinadas modalidades, un inhibidor es un inhibidor de molécula pequeña, o un estereoisómero, enantiómero, diastereómero, enriquecido de manera isotópica, profármaco o sal farmacéuticamente aceptable de estos. En modalidades particulares, el inhibidor de p38 inhibe p38- α y/o p38- β . En modalidades particulares, no inhibe p38- γ de manera significativa. En modalidades particulares, un inhibidor de molécula pequeña de p38 incluye, de modo no taxativo, cualquiera de los compuestos de molécula pequeña descritos en la presente, que incluyen, de modo no taxativo, los que se muestran en la FIG. 12B. Se conoce una variedad de inhibidores de p38 disponibles, y algunos se encuentran en desarrollo clínico. Es posible utilizar cualquiera de estos. Estos incluyen, de modo no taxativo, ARRY-797, VX-745, VX-702, RO-4402257, SCIO-469, BIRB-796, SD-0006, PH-797804, AMG-548, LY2228820, SB-681323 y GW-856553. Los compuestos inhibidores ilustrativos incluyen, de modo no taxativo:

N-(4-(2-etil-4-(m-tolil)thiazol-5-il)piridin-2-il)benzamida;

2-(2,4-difluorofenil)-6-(1-(2,6-difluorofenil)ureido)nicotinamida;

6-(2,4-difluorofenoxi)-8-metil-2-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona;

6-(2,4-difluorofenoxi)-2-((1,5-dihidroxipentan-3-il)amino)-8-metilpirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona;

(R)-6-(2-(4-fluorofenil)-6-(hidroximetil)-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-2-(o-tolil)piridazin-3(2H)-ona;

6-(5-(ciclopropilcarbamoil)-3-fluoro-2-metilfenil)-N-neopentilnicotinamida;

5-(2-(terc-butil)-4-(4-fluorofenil)-1H-imidazol-5-il)-3-neopentil-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina;

2-(6-cloro-5-((2R,5S)-4-(4-fluorobencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-carbonil)-1-metil-1H-indol-3-il)-N,N-dimetil-2-oxoacetamida;

1-(3-(terc-butil)-1-(p-tolil)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-(2-morfolinoetoxi)naftalen-1-il)urea;
 4-((5-(ciclopropilcarbamoil)-2-metilfenil)amino)-5-metil-N-propilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-carboxamida;
 3-(3-bromo-4-((2,4-difluorobencil)oxi)-6-metil-2-oxopiridin-1(2H)-il)-N,4-dimetilbenzamida;
 5 1-(3-(terc-butil)-1-(p-tolil)-1H-pirazol-5-il)-3-(5-fluoro-2-((1-(2-hidroxietil)-1H-indazol-5-il)oxi)bencil)urea;
 8-(2,6-difluorofenil)-2-((1,3-dihidroxiopropan-2-il)amino)-4-(4-fluoro-2-metilfenil)pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona;
 5-(2,6-diclorofenil)-2-((2,4-difluorofenil)tio)-6H-pirimido[1,6-b]piridazin-6-ona;
 10 (5-(2,4-difluorofenoxi)-1-isobutil-1H-indazol-6-il)((2-(dimetilamino)etil)-l2-azaneil)metanona; y
 (R)-2-((2,4-difluorofenil)amino)-7-(2,3-dihidroxiopoxi)-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d][7]anulen-5-ona.

Determinados compuestos inhibidores de la presente invención pueden existir en formas estereoisoméricas (por ejemplo, pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricos o pueden presentar un isomerismo cis-trans). Algunos compuestos pueden incluir más de un átomo de carbono asimétrico. “Estereoisómero” hace referencia a un compuesto que difiere en cuanto a su orientación (R/S) con respecto a uno o más átomos de carbono asimétricos, o difiere en cuanto a su orientación (cis:trans) con respecto a un enlace doble. El término “estereoisómero” también puede abarcar atropisómeros, que surgen de la rotación obstaculizada alrededor de un enlace simple, por ejemplo, en compuestos que tienen un resto de bifenilo sustituido. Un “enantiómero” es un compuesto que es una imagen especular de otro compuesto, es decir, todos los átomos de carbono asimétricos de un enantiómero existen en orientación opuesta (R/S) con respecto al otro compuesto. Un “diastereómero” es un compuesto que no es una imagen especular de otro compuesto, sino que incluye uno o más átomos de carbono asimétricos existentes en orientación opuesta (R/S) con respecto al otro compuesto. Las modalidades de la presente invención pueden incluir mezclas de estereoisómeros, o pueden incluir un único estereoisómero. Los enantiómeros o diastereómeros simples pueden prepararse partiendo de reactivos quirales o a través de técnicas sintéticas estereoselectivas o estereoespecíficas. De manera alternativa, los enantiómeros o diastereómeros simples pueden aislarse de mezclas a través de técnicas de cristalización o cromatográficas quirales estándar. “Enriquecido de manera isotópica” hace referencia a un compuesto donde uno o más átomos están enriquecidos con un isótopo más allá de su abundancia natural. Por ejemplo, la abundancia natural de deuterio es del 0.015 %. Un experto en la técnica reconoce que, en todos los compuestos químicos con un átomo de H, el átomo de H representa en realidad una mezcla de H y D, donde alrededor de 0.015 % es D. Un compuesto enriquecido de manera isotópica puede tener uno o más sitios químicos específicos donde la

relación de H/D es mayor que 0.015 %. Puede decirse que un compuesto enriquecido de manera isotópica está marcado isotópicamente.

En determinadas modalidades, el inhibidor comprende uno o más componentes de un sistema de edición génica. Tal como se usa en la presente, la expresión “sistema de edición génica” hace referencia a una proteína, ácido nucleico o combinación de estos que puede modificar un locus objetivo de una secuencia de ADN endógeno cuando se introduce en una célula. Se conocen en la técnica numerosos sistemas de edición génica adecuados para utilizar en los métodos de la presente invención, que incluyen, de modo no taxativo, sistemas de nucleasa de dedos de cinc, sistemas de TALEN y sistemas de CRISPR/Cas.

En algunas modalidades, el sistema de edición génica utilizado en los métodos descritos en la presente es un sistema de nucleasas CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas espaciadas y regularmente agrupadas)/Cas (asociado a CRISPR), que es un sistema de nucleasas modificada genéticamente basado en un sistema bacteriano que puede utilizarse para modificar genéticamente el genoma de mamíferos. En general, el sistema comprende una endonucleasa asociada a CRISPR (por ejemplo, una endonucleasa Cas) y un ARN guía (ARNg). El ARNg está compuesto por dos partes: un ARN-crispr (ARNcr) que es específico para una secuencia de ADN genómico objetivo y un ARN de activación en trans (ARNtracr) que facilita la unión de la endonucleasa al ADN en el sitio de inserción objetivo. En algunas modalidades, el ARNcr y el ARNtracr pueden estar presentes en el mismo oligonucleótido de ARN, conocido como ARN simple guía (ARNsg). En algunas modalidades, el ARNcr y el ARNtracr pueden estar presentes como oligonucleótidos de ARN separados. En tales modalidades, el ARNg está compuesto por un oligonucleótido de ARNcr y un oligonucleótido de ARNtracr que se asocian para formar un dúplex de ARNcr:ARNtracr. Tal como se usa en la presente, el término “ARN guía” o “ARNg” hace referencia a la combinación de un ARNtracr y un ARNcr, presente como un ARNsg o un dúplex de ARNcr:ARNtracr.

En algunas modalidades, los sistemas de CRISPR/Cas comprenden una proteína Cas, un ARNcr y un ARNtracr. En algunas modalidades, el ARNcr y el ARNtracr se combinan como una molécula de ARN en dúplex para formar un ARNg. En algunas modalidades, dúplex de ARNcr:ARNtracr se forma *in vitro* antes de la introducción a una célula. En algunas modalidades, el ARNcr y el ARNtracr se introducen en una célula como moléculas de ARN separadas y el dúplex de ARNcr:ARNtracr se forma entonces de manera intracelular. En algunas modalidades, se proporcionan polinucleótidos que codifican el ARNcr y el ARNtracr. En tales modalidades, se introducen en una célula los polinucleótidos que codifican el ARNcr y el ARNtracr, y las moléculas de ARNcr y ARNtracr se transcriben de manera intracelular. En algunas modalidades, el ARNcr y el ARNtracr están codificados por un único polinucleótido. En algunas modalidades, el ARNcr y el

ARNtracr están codificados por distintos polinucleótidos.

En algunas modalidades, una endonucleasa Cas se dirige al sitio de inserción objetivo mediante la especificidad de la secuencia de la parte de ARNcr del ARNg, que puede incluir una secuencia del motivo adyacente al protoespaciador (PAM) cerca del sitio de la inserción objetivo. Se conoce en la técnica una variedad de secuencias de PAM adecuadas para utilizar con una endonucleasa Cas particular (por ejemplo, una endonucleasa Cas9) (ver, por ejemplo, Nat Methods. noviembre de 2013; 10(11): 1116–1121 y Sci Rep. 2014; 4: 5405).

La especificidad de un ARNg para un locus objetivo está mediada por la secuencia de ARNcr, que comprende una secuencia de alrededor de 20 nucleótidos que son complementarios a la secuencia de ADN en un locus objetivo, por ejemplo, complementarios a una secuencia de ADN de p38- α o p-38- β . En algunas modalidades, las secuencias de ARNcr usadas en los métodos de la presente invención son al menos 90 % complementarias a una secuencia de ADN de un locus objetivo. En algunas modalidades, las secuencias de ARNcr usadas en los métodos de la presente invención son al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % complementarias a una secuencia de ADN de un locus objetivo. En algunas modalidades, las secuencias de ARNcr usadas en los métodos de la presente invención son 100 % complementarias a una secuencia de ADN de un locus objetivo, por ejemplo, un gen *MAPK14* o *MAPK11*. En algunas modalidades, las secuencias de ARNcr descritas en la presente están diseñadas para minimizar la unión fuera del objetivo mediante el uso de algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, detector de Cas-OFF) para identificar secuencias objetivo que son únicas para un locus objetivo o gen objetivo particular.

En algunas modalidades, la endonucleasa es una proteína u ortólogo de Cas. En algunas modalidades, la endonucleasa es una proteína Cas9. En algunas modalidades, la proteína Cas9 se deriva de *Streptococcus pyogenes* (por ejemplo, SpCas9), *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, SaCas9) o *Neisseria meningitidis* (NmeCas9). En algunas modalidades, la endonucleasa Cas es una proteína Cas9 o un ortólogo de Cas9 y se selecciona del grupo que consiste en SpCas9, SpCas9-HF1, SpCas9-HF2, SpCas9-HF3, SpCas9-HF4, SaCas9, FnCpf, FnCas9, eSpCas9 y NmeCas9. En algunas modalidades, la endonucleasa se selecciona del grupo que consiste en C2C1, C2C3, Cpf1 (también denominada Cas12a), CasI, CasIB, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también denominada CsnI y Csx12), Cas10, Csyl, Csy2, Csy3, Csel, Cse2, Cscl, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmrl, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csbl, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csfl, Csf2, Csf3 y Csf4. En algunas modalidades, la Cas9 es un mutante de nickasa de Cas9. Los mutantes de nickasa de Cas9 comprenden solo un dominio catalíticamente activo (ya sea el dominio HNH o el dominio RuvC).

En aspectos particulares, la descripción incluye composiciones, por ejemplo, composiciones

farmacéuticas que comprenden un inhibidor de p38, que incluyen cualquiera de las diversas clases de inhibidores descritas en la presente. La invención abarca composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de p38 y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Es posible utilizar en las composiciones de la presente invención todo excipiente inerte que se use comúnmente como portador o diluyente, tal como azúcares, polialcoholes, polímeros solubles, sales y lípidos. Los azúcares y polialcoholes que pueden emplearse incluyen, de modo no taxativo, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol. Los ejemplos de polímeros solubles que pueden emplearse son polioxietileno, poloxámeros, polivinilpirrolidona y dextrano. Las sales útiles incluyen, de modo no taxativo, cloruro de sodio, cloruro de magnesio y cloruro de calcio. Los lípidos que pueden emplearse incluyen, de modo no taxativo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de glicerol, glicolípidos y fosfolípidos.

Además, las composiciones farmacéuticas pueden comprender además aglutinantes (por ejemplo, acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, povidona), agentes desintegrantes (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma guar, glicolato de almidón sódico, Primogel), amortiguadores (por ejemplo, tris-HCL, acetato, fosfato) de pH y fuerza iónica varios, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción en superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácido biliar), inhibidores de proteasa, tensioactivos (por ejemplo, laurilsulfato de sodio), potenciadores de la permeabilidad, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicerol, ciclodextrinas), un deslizante (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metilbisulfito de sodio, hidroxianisol butilado), estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa), agentes que aumentan la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etilcelulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo, sacarosa, aspartamo, ácido cítrico), agentes saborizantes (por ejemplo, menta, salicilato de metilo o saborizante de naranja), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, laurilsulfato de sodio), fluidificantes (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo, ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (por ejemplo, carbómero, hidroxipropilcelulosa, laurilsulfato de sodio, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica), recubrimientos de polímero (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y formadores de películas (por ejemplo, etilcelulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas se preparan con portadores que protegerán el inhibidor de p38 contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, lo que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Es posible

utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de estas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) también pueden usarse como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4,522,811.

Además, la invención abarca composiciones farmacéuticas que comprenden cualquier forma física sólida o líquida de un inhibidor de p38. Por ejemplo, el inhibidor de p38 puede encontrarse en forma cristalina o en forma amorfa y pueden tener cualquier tamaño de partícula. Las partículas pueden estar micronizadas o pueden ser aglomerados, gránulos de partículas, polvos, aceites, suspensiones oleosas o cualquier otra forma de forma física sólida o líquida.

Cuando los inhibidores de p38 presenta una solubilidad insuficiente, es posible usar métodos para solubilizar los compuestos. Los expertos en la técnica conocen dichos métodos y estos incluyen, de modo no taxativo, ajuste del pH y formación de sales, uso de cosolventes tales como etanol, propilenglicol, polietilenglicol (PEG) 300, PEG 400, DMA (10-30 %), DMSO (10-20 %), NMP (10-20 %), uso de tensioactivos, tales como polisorbato 80, polisorbato 20 (1-10 %), cremofor EL, Cremofor RH40, Cremofor RH60 (5-10 %), Pluronic F68/Poloxámero 188 (20-50 %), Solutol HS15 (20-50 %), Vitamina E TPGS y d- α -tocoferil PEG 1000 succinato (20-50 %), uso de formación de complejos tales como HP β -CD y SBE β -CD (10-40 %) y uso de abordajes avanzados tales como micelas, adición de un polímero, suspensiones de nanopartículas y formación de liposomas.

Los inhibidores de p38 también pueden administrarse o coadministrarse en formas de dosificación de liberación lenta. Los inhibidores de p38 pueden encontrarse en forma gaseosa, líquida, semilíquida o sólida, formulados de manera adecuada para la vía de administración que se va a utilizar. Para la administración oral, las formulaciones orales sólidas adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, pastillas, sachets y efervescentes, polvos y similares. Las formulaciones orales líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, jarabes, emulsiones, aceites y similares. Para la administración parenteral, típicamente se utiliza una reconstitución de polvo liofilizado.

Los expertos en la técnica pertinente pueden determinar las dosis adecuadas de los inhibidores de p38 para usar en el tratamiento de las enfermedades o trastornos descritos en la presente. Las dosis terapéuticas se identifican generalmente a través de un estudio de búsqueda de dosis en seres humanos en función de la evidencia preliminar derivada de los estudios en animales. Las

dosis deberían ser suficientes para dar como resultado un beneficio terapéutico deseado sin provocar efectos secundarios no deseados. Los expertos en la técnica pueden utilizar y ajustar de forma adecuada la forma de administración, las formas de dosificación y los excipientes farmacéuticos adecuados. Todos los cambios y modificaciones se contemplan dentro del alcance de la presente solicitud de patente.

En determinadas modalidades, la descripción incluye formas de dosificación unitaria de una composición farmacéutica que comprende un agente que inhibe la expresión o actividad de un polipéptido de p38 (o da como resultado niveles menores de una proteína p38 activa) y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, donde la forma de dosificación unitaria es eficaz para reducir la expresión de un polipéptido de DUX4, o un polipéptido codificado por un gen objetivo posterior de DUX4, en uno o más tejidos en un sujeto al que se le administra la forma de dosificación unitaria. En determinadas modalidades, el gen objetivo posterior es MBD3L2, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43 o KHDC1L. En determinadas modalidades, el gen objetivo posterior es RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, KHDC1L, ZSCAN4, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 o ZNF280A. En determinadas modalidades, el tejido es tejido muscular. En determinadas modalidades, el tejido está diferenciado de manera terminal, por ejemplo, tejido muscular diferenciado de manera terminal. En determinadas modalidades, el tejido comprende células que comprenden una mutación asociada con la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD). En determinadas modalidades, el agente se une a un polipéptido de p38 (por ejemplo, p38- α o p38- β) o se une a un polinucleótido que codifica el polipéptido de p38. En determinadas modalidades, el agente comprende o consiste en: un ácido nucleico, opcionalmente un ADN, ARN, ARNm modificado (ARNmm), ARNhp, ARNip, ARN guía (ARNg), microARN (miARN) u oligonucleótido antisentido. En otras modalidades, el agente comprende o consiste en: un polipéptido, opcionalmente una proteína, un péptido, un mimético de proteína, un peptidomimético o un anticuerpo o fragmento funcional de este. En otras modalidades, el agente comprende: una molécula pequeña, opcionalmente una molécula orgánica o una molécula inorgánica. En otras modalidades, el agente comprende un casete de expresión génica, opcionalmente un vector de terapia génica, que expresa un agente polinucleótido o polipéptido que inhibe la expresión o actividad de un polipéptido de p38.

En modalidades particulares, las formas de dosificación unitaria comprenden una cantidad eficaz, una concentración eficaz y/o una concentración de inhibición, de un inhibidor de p38 para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con una mayor actividad o expresión de DUX4 y/o un gen objetivo de DUX4 posterior, lo que incluye cualquiera de las enfermedades o trastornos descritos en la presente, por ejemplo, FSHD.

Las “composiciones farmacéuticas” incluyen composiciones de uno o más agentes que pueden

administrarse o suministrarse a un sujeto y/o célula para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno en particular.

La frase “farmacéuticamente aceptable” se emplea en la presente para hacer referencia a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, según la opinión médica bien fundada, son adecuados para utilizar en contacto con tejidos humanos y animales sin provocar una toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones, con una relación beneficio/riesgo correspondiente razonable.

La expresión “portador farmacéuticamente aceptable” incluye, de modo no taxativo, todo adyuvante, portador, excipiente, deslizante, agente edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, potenciador de sabor, tensioactivo, agente humectante, agente de dispersión, agente de suspensión, estabilizante, agente isotónico, solvente, tensioactivo y/o emulsionante aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos como aceptable para usar en seres humanos o animales domésticos. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, de modo no taxativo, azúcares, como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa y sus derivados, como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto; malta; gelatina; talco; manteca de cacao, ceras, grasas animales y vegetales, parafinas, siliconas, bentonitas, ácido silícico, óxido de cinc; aceites, como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, como butilenglicol; polioles, como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes amortiguadores, como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógeno; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones amortiguadoras de fosfato; y cualquier otra sustancia compatible empleada en composiciones farmacéuticas. Salvo en la medida en que algún agente y/o medio convencional sea incompatible con los agentes de la presente descripción, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse ingredientes activos complementarios en las composiciones.

Tal como se usa en la presente, “cantidad eficaz” hace referencia a una cantidad de un agente eficaz para lograr un efecto particular, por ejemplo, la reducción de ARNm de DUX4-fl o de la proteína de DUX4, o ARNm o proteína de uno o más agentes posteriores de DUX4 en una célula, tejido, órgano o sujeto. En el contexto del tratamiento terapéutico de un sujeto, una cantidad eficaz puede ser, por ejemplo, una cantidad eficaz o suficiente para reducir uno o más síntomas de la enfermedad en el sujeto, por ejemplo, un sujeto con FSHD. En determinadas modalidades, la reducción es de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos el 40 %, al menos 50 %, al menos 60 % o al menos 70 % en comparación con la cantidad previa al tratamiento o en

ausencia de este.

La “concentración eficaz” utilizada en la presente hace referencia a la concentración mínima (masa/volumen) de un agente y/o composición necesaria para producir un efecto fisiológico particular. Tal como se utiliza en la presente, la concentración eficaz típicamente hace referencia a la concentración de un agente necesaria para aumentar, activar y/o mejorar un efecto fisiológico particular.

La “concentración de inhibición” es la concentración mínima (masa/volumen) de un agente necesaria para inhibir un efecto fisiológico particular. Tal como se utiliza en la presente, la concentración de inhibición típicamente hace referencia a la concentración de un agente necesaria para disminuir, inhibir y/o reprimir un efecto fisiológico particular.

En algunas modalidades, un agente o compuesto descrito en la presente puede administrarse en una dosis de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 300 mg/kg. En otra modalidad, un agente o compuesto descrito en la presente puede administrarse en una dosis de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg. Por ejemplo, el agente o compuesto puede administrarse a un sujeto a una dosificación de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 mg/kg, o dentro de un intervalo entre cualquiera de los valores que anteceden, por ejemplo, entre alrededor de 10 mg/kg y alrededor de 15 mg/kg, entre alrededor de 6 mg/kg y alrededor de 12 mg/kg, y similares. En otra modalidad, un agente o compuesto descrito en la presente se administra a una dosificación ≤ 15 mg/kg. Por ejemplo, un agente o compuesto puede administrarse a 15 mg/kg por día durante 7 días para un total de 105 mg/kg por semana. Por ejemplo, un compuesto puede administrarse a 10 mg/kg dos veces al día durante 7 días para un total de 140 mg/kg por semana.

En muchas modalidades, las dosificaciones descritas en la presente pueden hacer referencia a una sola dosificación, una dosificación diaria, o una dosificación semanal. En una modalidad, un agente o compuesto puede administrarse una vez al día. En otra modalidad, un compuesto puede administrarse dos veces al día. En algunas modalidades, un agente o compuesto puede administrarse tres veces al día. En algunas modalidades, un compuesto puede administrarse cuatro veces al día. En algunas modalidades, un agente o compuesto descrito en la presente puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 veces por semana. En otras modalidades, el compuesto se administra una vez cada dos semanas.

En algunas modalidades, un agente o compuesto descrito en la presente puede administrarse por vía oral. En algunas modalidades, un agente o compuesto descrito en la presente puede administrarse por vía oral a una dosis ≤ 15 mg/kg una vez al día.

La dosificación real empleada puede variar en función de los requisitos del paciente y la gravedad de la afección que se trata. La determinación del régimen de dosificación adecuado para una

situación particular se encuentra dentro del conocimiento en la técnica. Para una mayor conveniencia, la dosificación diaria total puede dividirse y administrarse por partes durante el día, de ser necesario.

El régimen de dosificación que utiliza el compuesto descrito se selecciona de acuerdo con una
5 variedad de factores que incluyen el tipo, la especie, la edad, el peso, el sexo y la afección médica del paciente; la gravedad de la afección a tratar; la vía de administración; la función renal o hepática del paciente; y el compuesto particular descrito que se utiliza. Un médico o veterinario experto en la técnica puede determinar y recetar fácilmente la cantidad eficaz del fármaco necesaria para prevenir, contrarrestar o detener la evolución de la afección.

10 La cantidad y frecuencia de administración de los compuestos de la invención y/o las sales farmacéuticamente aceptables de estos se regulará de acuerdo con el criterio del médico tratante tomando en cuenta factores tales como la edad, la condición y tamaño del paciente, así como la gravedad de los síntomas tratados.

En algunos aspectos, la presente invención se relaciona a métodos usados para el análisis de
15 identificación de objetivos de fármacos mediante el uso de moléculas pequeñas y/o herramientas genómicas (por ejemplo, ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de horquilla pequeña (ARNhp), microARN (miARN), oligonucleótidos antisentido y virus de terapia génica) que reducen la expresión y/o actividad de DUX4 y transcripciones posteriores, MBD3L2, en miotubos de FSHD. En modalidades particulares, los métodos comprenden poner en contacto un miotubo que
20 comprende células FSHD, por ejemplo, células que comprenden una FSHD1 y/o un defecto (por ejemplo, mutación) de FSHD2 con uno o más agentes candidatos, y luego determinar si los miotubos que entraron en contacto con el agente candidato tienen una actividad reducida de DUX4, niveles reducidos de proteína o ARNm de DUX4, actividad reducida de uno o más genes posteriores regulados por DUX4; o niveles reducidos de uno o más genes posteriores regulados
25 por DUX4 en comparación con los niveles en miotubos que entraron en contacto con un control negativo, por ejemplo, solo vehículo. Luego se identifican los agentes candidatos asociados con niveles reducidos de actividad o expresión de DUX4 y/o un gen posterior de DUX4, y pueden identificarse los objetivos que modulan. Por ejemplo, en el caso del ARNip, el objetivo génico del ARNip asociado con la expresión reducida de DUX4 y/o un gen objetivo posterior de DUX4 se
30 identifica como un objetivo farmacológico para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con la expresión anómala de DUX4 y/o un gen objetivo posterior de DUX4, lo que incluye cualquiera de los descritos en la presente, por ejemplo, FSHD. De manera similar, en el caso de las moléculas pequeñas, el objetivo farmacológico de la molécula pequeña asociada con la actividad o expresión reducida de DUX4 y/o un gen objetivo posterior de DUX4 se identifica
35 como un objetivo farmacológico para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con la

expresión anómala de DUX4 y/o un gen objetivo posterior de DUX4, lo que incluye cualquiera de los descritos en la presente, por ejemplo, FSHD. En determinadas modalidades, los métodos pueden ponerse en práctica al evaluar una propiedad física o cualitativa de los miotubos, con el fin de identificar un agente candidato y su objetivo, que puede utilizarse para mejorar la propiedad física o cualitativa de los miotubos, mediante lo cual se identifica el objetivo como un objetivo terapéutico para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con la expresión anómala de DUX4 y/o un gen objetivo posterior de DUX4, lo que incluye cualquiera de los descritos en la presente, por ejemplo, FSHD.

En determinadas modalidades, la descripción incluye un método para identificar un agente que inhibe la expresión de una proteína DUX4, o inhibe la expresión de una proteína codificada por un objetivo génico posterior de DUX4, donde el método comprende: poner en contacto un miotubo preparado a partir de células asociadas con la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD) con un agente candidato; y determinar un nivel de expresión de la proteína DUX4, un polinucleótido que codifica la proteína DUX4, el objetivo génico posterior de DUX4 o un polinucleótido que codifica el objetivo génico posterior de DUX4 en el miotubo, donde el agente candidato se identifica como un agente que inhibe la expresión de la proteína DUX4 o la proteína codificada por el objetivo génico posterior, si el nivel de expresión determinado después del contacto se reduce en comparación con el nivel de expresión de la proteína DUX4 o la proteína codificada por el objetivo génico posterior en un miotubo preparado a partir de células asociadas con la FSHD que no entraron en contacto con el agente candidato o que entraron en contacto con un agente de control negativo.

En determinadas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente candidato puede ser cualquiera de las clases de inhibidores descritos en la presente, que incluyen moléculas pequeñas, polipéptidos y ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, donde el agente candidato comprende o consiste en: un ácido nucleico, opcionalmente un ADN, ARN, ARNg, ARNhp, miARN, ARNip u oligonucleótido antisentido; un polipéptido, opcionalmente una proteína, un péptido, un mimético de proteína, un peptidomimético, un vector de terapia génica o un anticuerpo o fragmento funcional de este; o una molécula pequeña, opcionalmente una molécula orgánica o una molécula inorgánica.

En determinadas modalidades de cualquiera de los métodos, el gen objetivo posterior es, por ejemplo, MBD3L2, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43 o KHDC1L. En determinadas modalidades, el gen objetivo posterior es, por ejemplo, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6 o PRAMEF15.

En determinadas modalidades, cualquiera de los métodos descritos en la presente se lleva a cabo

mediante el análisis de una biblioteca de posibles agentes candidatos. En determinadas modalidades, los métodos se realizan mediante el uso de ensayos de alto rendimiento.

En determinadas modalidades, los métodos se llevan a cabo mediante el uso de miotubos de FSHD derivados de pacientes maduros.

- 5 En una modalidad, se usa una biblioteca de moléculas pequeñas para detectar modificadores objetivo de DUX4 o una expresión o actividad de los genes objetivo posteriores en miotubos de FSHD. Tres días antes del tratamiento, las células se colocan en placas a razón de 15 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos gelatinizada con medio de crecimiento de músculo esquelético (PromoCell, C-23060) con 20 % de FBS y Pen/Strep (Gibco, 15140148). Al día del
- 10 tratamiento, el medio se cambia a medio de diferenciación celular de músculo esquelético (PromoCell, C-23061), complementado con 20 % de reemplazo de suero de inactivación (Gibco, 10828010) o medio NbActiv4 (BrainBits Nb4-500) y Pen/Strep. Se agregan los agentes moduladores de p38 a la concentración deseada en los medios de cultivo que contienen miotubos de FSHD diferenciados y se cultivan durante 3-4 días en incubadora. Los miotubos se extraen de
- 15 la incubadora y se extrae el ARN mediante el kit RNeasy Micro Plus (Qiagen n.º cat/ID:74034). Se prepara ADNc a partir del ARN extraído para el ensayo de expresión génica Taqman a fin de medir la expresión de DUX4 o los genes objetivo posterior. Se usa como control endógeno la transcripción de *POL2RA*.

20

EJEMPLOS

Los estudios descritos en los siguientes Ejemplos se llevaron a cabo mediante el uso de los materiales y métodos descritos más adelante.

25 **Abreviaturas**

ASO	oligonucleótidos antisentido
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (diclorhidrato)
DMSO	dimetilsulfóxido
DUX4	doble homeobox 4
30 DUX4-fl	doble homeobox 4 de longitud completa
FSHD	distrofia muscular facioescapulohumeral
ARNg	ARN guía
<i>MBD3L2</i>	proteína del dominio de unión a CpG-metilo 3 similar a la 2
MHC	cadena pesada de miosina
35 MPAK14	proteína cinasa activada por mitógenos 14

	ARNm	ARN mensajero
	MYOG	miogenina (factor miogénico 4)
	p HSP27	proteína de choque térmico fosforilada 27
	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
5	pLAM	secuencia señal de poliadenilación
	POLR2A	subunidad A de ARN polimerasa II
	qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
	ARN	ácido ribonucleico
	ARNsg	ARN simple guía
10	ARNip	ARN interferente pequeño

Materiales y métodos generales

Mioblastos del músculo esquelético humano:

Para todos los estudios se utilizaron FTCE-00016-01 (línea de mioblastos inmortalizados de FSDH, 6.3 repeticiones) y líneas isogénicas, normal saludable de control A4 y mioblastos de FSDH C12 (como se describe en Mamchaoui et ál., 2011; Thorley et ál., 2016). R. Tawil proporcionó cuatro líneas distintas de mioblastos de pacientes primarios, FTCE-016, 020, 197, 196. Se demostró que los mioblastos de la FSHD expresaban DUX4 anómalo mediante desmetilación del D4Z4 en el cromosoma 4q35.

Los componentes de medios y materiales de cultivo tisular incluyeron:

Medio de crecimiento de músculo esquelético (PromoCell, C-23160) complementado con FBS al 15 % (Hyclone, SH30071) y Pen/Strep (Gibco, 15140148). NbActiv4 (BrainBits Nb4-500) y Pen/Strep (medio de diferenciación). Solución de Gelatina al 0.1 % EmbryoMax (EMDmilipore ES-006-B). PBS (Gibco, 10010023), microplaca de 96 pocillos tratada para cultivo tisular (Corning, CLS3595), placa para cultivo celular de múltiples pocillo tratada con TC (Falcon, 353046).

Reactivos y kits de PCR en tiempo real:

19.5 µL de amortiguador de lisis Roche Realtime Ready (para 20 µL) (Roche, 07248431001), 0.25 µL de DNAsa I (Ambion, AM2222), 0.25 µL de inhibidor Protector RNase (Roche, 3335402001), microkit RNeasy (Qiagen, 74004), mezcla maestra Taqman Preamp (ThermoFisher Scientific, 4391128), mezcla maestra Taqman Multiplex (ThermoFisher Scientific, 4484262), Ensayo Taqman ZSCAN4 (ThermoFisher Scientific, Hs00537549_m1, FAM-MGB), Ensayo Taqman MYOG (ThermoFisher Scientific, Hs01072232_m1, JUN-QSY), Ensayo Taqman RPLP0 (ThermoFisher Scientific, Hs99999902_m1) y Ensayo Taqman LEUTX (ThermoFisher Scientific, Hs00418470_m1).

Oligonucleótido antisentido (ASO):

Se adquirieron ASO de Exiqon: FTSE-000001 (ASO de DUX4 de Exiqon, CAGCGTCGGAAGGTGG (SEQ ID NO:18), 300610)) y ASO sin direccionamiento (Exiqon, AACACGTCTATACGC (SEQ ID NO:19, 300610).

Revestimiento de gelatina de las placas de cultivo tisular:

- 5 Se llevó a cabo tres días antes del tratamiento, se confeccionó una solución de gelatina al 0.1 % al combinar 1 g de gelatina (por ejemplo, Sigma G9391) y 1 L de agua para cultivo tisular; se esterilizó en autoclave durante 30 minutos para disolverlo y esterilizarlo. Se aplicó con una pipeta estéril una cantidad suficiente de gelatina al 0.1 % para recubrir la placa, luego se aspiró la solución y las placas se secaron al aire y se almacenaron a temperatura ambiente.

- 10 Colocación de las células en placas:

Se llevó a cabo tres días antes del tratamiento, se colocaron 10 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos gelatinizadas, o 100 000 células en placas de 6 pocillos gelatinizadas.

Oligonucleótido antisentido y tratamiento con el compuesto:

- 15 Para los tratamientos con ASO o compuestos, se colocaron células en 100 µL de medio de crecimiento Promocell que contenía ASO o compuestos a las concentraciones descritas.

Diferenciación de miotubos del músculo esquelético:

- Al día 0, se cambió el medio a medio de diferenciación. Se retiraron las placas de la incubadora y se aspiró el medio de crecimiento, las placas se lavaron una vez con PBS, 100 µL para las placas 96 pocillos y 1 mL para las de 6 pocillos, se agregaron 100 µL o 2 mL de medio de diferenciación por pocillo, en los 96 o 6 pocillos, respectivamente. Se agregaron oligonucleótidos antisentido o fármaco a la concentración deseada, y las placas se volvieron a colocar en la incubadora y se incubaron durante 3-4 días.

Preparación de ARN:

- 25 Se retiraron las células de la incubadora y se aspiró el medio. Las células se lisaron rápidamente con uno de los siguientes protocolos: para la lisis en placas de 96 pocillos, se llevó a cabo una lisis directa y qPCR de una etapa RT-Preamp de acuerdo con el protocolo descrito más adelante. Para cada placa de 96 pocillos, se preparó una mezcla que contenía: 0.25 µL de amortiguador de lisis Roche Realtime Ready, µL 0.25 de inhibidor de RNAsa, 19.5 µL de DNaseI (de Thermo, no el incluido en el kit). Se agregaron 20 µL de la mezcla a cada pocillo, se mezclaron 5 veces y se incubaron 5 minutos a TA o, de manera alternativa, se agitaron vigorosamente durante 15 minutos. Se observó la lisis con microscopio. Las muestras se congelaron a -80 °C durante al menos 15 minutos.

qPCR en una etapa:

- 35 Para la qPCR, el lisado celular se diluyó 1:10 y se utilizaron 2 µL para una reacción de RT-qPCR de 10 µL en 1 etapa para la detección de GAPDH, RPLP0, TBP, MYOG, FRG1, MYH3, ACTN2,

etc. Para cada reacción de 10 µL, la mezcla de reacción incluyó: 2 µL de ARN (lisado de dilución 1:10), 5 µL de mezcla maestra Fast Advanced Taqman (2X), 0.25 µL de mezcla enzimática RT (40X), 0.5 µL de conjunto de sondas Taqman (20X) y 2.25 µL de H₂O. El siguiente protocolo de reacción se ejecutó en QuantStudio 7: 48 °C durante 15 minutos, 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 30 segundos, 40x, 95 °C durante 5 segundos, 60 °C durante 30 segundos, después de lo cual se leyeron las placas según lo indicado por el fabricante (Thermo).

Se usó preamplificación RT en 1 etapa para la detección de genes posteriores de DUX4, es decir, se utilizaron como control endógeno MBD3L2, ZSCAN4, LEUTX, TRIM43, KHDC1L y POL2RA-VIC. Para cada reacción de 10 µL, la mezcla de reacción incluyó: 2.25 µL de ARN (lisado de dilución 1:10), 5 µL de mezcla maestra Taqman Pre-Amp (2X), 0.25 µL de mezcla enzimática RT (40X), 2.5 µL de conjunto de sondas Taqman (0.2X)*. * Para la agrupación de los ensayos TaqMan, se utilizaron volúmenes iguales de cada ensayo de expresión génica TaqMan® 20X y se combinaron hasta 100 ensayos. Por ejemplo, para agrupar 50 ensayos TaqMan, se combinaron 10 µL de cada ensayo en un tubo de microcentrífuga. Los ensayos TaqMan agrupados se diluyeron con 1X amortiguador de TE, de forma tal que cada ensayo tuviera una concentración final de 0.2X. En el ejemplo que antecede, se agregaron 500 µL de amortiguador de TE 1X a los ensayos TaqMan agrupados para un volumen final total de 1 mL. Se usó el protocolo QuantStudio7 a 48 °C durante 15 min, 95 °C durante 10 min, 10 ciclos: 95 °C durante 15 seg, 60 °C durante 4 min y 4 °C infinito. Luego se diluyeron las muestras a 50 µL y se continuó con la etapa de qPCR. Para cada reacción de 10 µL, la mezcla de reacción incluyó: 2 µL de dilución Preamp, 5 µL de mezcla maestra Fast Advanced Taqman (2X), 0.5 µL de conjunto de sondas Taqman (20X) y 2.5 µL de H₂O. Al multiplejar, el volumen se ajustó a 10 µL en total. Se ejecutó el siguiente programa en QuantStudio7: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 30 segundos, 40x, 95 °C durante 5 segundos, 60 °C durante 30 segundos, y las placas se leyeron según las indicaciones del fabricante (Thermo).

Métodos para la extracción de ARN total de miotubos mediante el uso del kit RNeasy Micro Plus:

En una placa de 6 pocillos, se agregaron 450 µL de amortiguador RLT Plus. El lisado se homogeneizó mediante la transferencia del lisado a una columna de centrifugación gDNA Eliminator colocada en un tubo de recolección de 2 mL (suministrado), la columna se centrifugó durante 30 segundos a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10\,000$ rpm) y luego se descargó la columna y se conservó el flujo de paso. Se agregaron 250 µL de etanol (35 % final) al flujo de paso y se mezcló bien mediante pipeteo (sin centrifugado). Luego se transfirieron las muestras, lo que incluye todo precipitado que pudiera haberse formado, a una columna de centrifuga RNeasy MinElute colocada en un tubo de recolección de 2 mL (suministrado). Las columnas se centrifugaron durante 15 s a

$\geq 8000 \times g$. El flujo de paso se descartó o se recolectó para la precipitación de proteínas. Se agregaron 700 μL de amortiguador RW1 a la columna de centrifugado RNeasy MinElute, que se centrifugó luego durante 15 s a $\geq 8000 \times g$, tras lo cual se descartó el flujo de paso. El tratamiento con DNAsa se llevó a cabo mezclando suavemente 10 μL de DNaseI con 70 μL de amortiguador RDD, y la solución resultante se agregó directamente a la columna, que se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, se agregaron 700 μL de amortiguador RW1 (según las indicaciones del fabricante) a la columna de centrifugado RNeasy MinElute, la columna se centrifugó durante 15 s a $\geq 8000 \times g$. y se descartó el flujo de paso. Se agregaron 500 μL de amortiguador RPE a la columna de centrifugado RNeasy MinElute, que se centrifugó luego durante 15 s a $\geq 8000 \times g$, tras lo cual se descartó el flujo de paso. Se agregaron 500 μL de etanol al 80 % a la columna de centrifugado RNeasy MinElute, la columna se centrifugó durante 2 minutos a $\geq 8000 \times g$ para lavar la membrana de la columna de centrifugado y el tubo de recolección se descartó con el flujo de paso. La columna de centrifugado RNeasy MinElute se colocó en un nuevo tubo de recolección de 2 mL (suministrado), se centrifugó a toda velocidad durante 5 minutos para secar la membrana y se descartó el tubo de recolección con el flujo de paso. La columna de centrifugado RNeasy MinElute se colocó en un nuevo tubo de recolección de 1.5 mL (suministrado). Se agregaron 14 μL de agua son RNAsa directamente al centro de la membrana de la columna de centrifugado, que luego se centrifugó durante 1 minuto a toda velocidad para eluir el ARN. Se eluyeron aproximadamente 12 μL de ARN.

20 Detección de DUX4-fl mediante el uso del método descrito por Himeda et ál. 2015:
 Preparación de ADNc. Las reacciones de 10 μL incluyeron 1 μL de ARN (1 μg), 0.5 μL de Oligo dT, 0.5 μL de dNTPs 10 mM y 4.5 μL de H_2O . Las muestras de reacción se incubaron a 65 °C durante 2 minutos, se movieron rápidamente al hielo y se mantuvieron durante al menos 1 minuto antes de agregar la mezcla enzimática, que incluyó 2 μL de amortiguador de primera cadena 5x, 0.5 μL de DTT 0.1M, 0.5 μL de inhibidor de RNAsa, 0.5 μL de SSIV RT. Las muestras se incubaron a 55 °C durante 20 minutos y 80 °C durante 10 minutos, seguido por enfriamiento a 4 °C. La preamplificación de DUX4 se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 10 μL que contenía 1 μL de reacción RT, 2 μL de amortiguador GC 5X, 0.8 μL de DMSO, 0.2 μL de dNTPs 10 mM, 0.2 μL de TJ38F 10 μM , 0.2 μL de TJ40R 10 μM , 0.1 μL de Phusion II DNA pol y 5.5 μL de H_2O . Se ejecutó el siguiente protocolo en QuantStudio 7: 98 °C durante 2 minutos; 10 ciclos de 98 °C durante 15 segundos, 64 °C durante 20 segundos, 72 °C durante 15 segundos y 4 °C infinito.

Se llevó a cabo una qPCR de DUX4 con cebadores anidados en una reacción de 10 μL que contenía 1 μL de ADN de preamplificación de DUX4, 5 μL de mezcla SYBR IQ 2X, 0.4 μL de TJ38F 10 μM , 0.4 μL de TJ41R 10 μM y 3.2 μL H_2O . Se ejecutó el siguiente protocolo en QuantStudio7: 95 °C durante 3 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 64 °C durante 15

segundos, 72 °C durante 20 segundos, 86 °C durante 10 segundos, luego se leyeron las placas en QuantStudio7 según las instrucciones del fabricante (Thermo). Se extrajeron los valores de Ct del software de PCR en tiempo real QuantStudio y se utilizó Genedata para calcular los niveles relativos de expresión mediante el uso de POLR2A como gen constitutivo.

5 Métodos de RNAseq:

Las lecturas de un solo extremo de 40 bp de Illumina tuvieron una buena calidad al comprobar con FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las lecturas se mapearon a hg19 mediante el uso de TopHat v2.1.1 (Kim et ál., 2013) con opciones tales como modo “solexa1.3-quals” y “no-novel-juncs.” El modelo de gen para TopHat se creó al combinar el gen conocido en formato gtf con la tabla kgXref. Tanto el gen conocido como el kgXref se descargaron del navegador de tablas de UCSC en el ensamblaje hg19. Se obtuvieron los recuentos de lectura mediante el uso de la función featureCounts del paquete Subread con una opción de “strandness” como -r 2. Las lecturas se normalizaron con DESeq2 (Love et ál., 2014).

Inmunocitoquímica de miotubos de FSHD:

15 En resumen, las células se fijaron en paraformaldehído al 4 % y se permeabilizaron en paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron con PBST (1 x solución de PBS con Tritón X-100 al 0.1 %), antes del bloqueo con suero de burro normal (NDS) al 10 % o BSA al 3 % en PBST. Las células se incubaron luego con anticuerpos primarios diluidos de manera adecuada en PBST con NDS al 5 % durante 1 hora a temperatura ambiente o 12 horas a 4 °C, se lavaron con PBST 3 veces a temperatura ambiente y luego se incubaron con anticuerpos secundarios deseados en TBST con NDS al 5 % y DAPI para contrateñir los núcleos. Se detectó DUX4 mediante inmunocitoquímica mediante el uso del anticuerpo E5-5 en miotubos de FSHD diferenciados. Se detectó la Caspasa-3 activada mediante el uso de un anticuerpo disponible en el mercado (<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/cleaved-caspase-3-asp175-antibody/9661>).

Métodos de RNAseq:

Las lecturas de un solo extremo de 40 bp de Illumina tuvieron una buena calidad al comprobar con FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las lecturas se mapearon a hg19 mediante el uso de TopHat v2.1.1. El modelo de gen para TopHat se creó al combinar el gen conocido en formato gtf con la tabla kgXref. Tanto el gen conocido como el kgXref se descargaron del navegador de tablas de UCSC en el ensamblaje hg19. Se obtuvieron los recuentos de lectura mediante el uso de la función featureCounts del paquete Subread con una opción de “strandness” como -r 2. Las lecturas se normalizaron con DESeq2. Las réplicas biológicas en las muestras de neuronas, procesadas en distintos plazos de tiempo, tuvieron un efecto de lote tal como lo sugiere el análisis de componentes principales. Por consiguiente, se usó Combat para reducir este efecto

de lote. Valores de expresión de RPKM estándar calculados. La firma génica total fue muy pequeña y se definió en los límites estadísticos estándar: 86/19 799 genes de ARNm. La firma génica regulada por DUX4 fue una mayoría de la firma total: 77/86 genes de ARNm = 90 %. Los genes no regulados por DUX4 fueron una minoría de la firma total con cambios múltiples moderados: 9/86 genes de ARNm = 10 %; 2-2.7X logFC.

Métodos para la transducción de RNP de ARNip y Cas9/ARNsg de miotubos de FSHD:

Se adquirieron ARNcr sintéticos de Thermo Fisher Scientific y se realizó una hibridación a los ARNtracr de acuerdo con las indicaciones. En resumen, se resuspendieron ARNcr y ARNtracr en amortiguador TE a 100 µM, se mezclaron y se diluyeron 5 veces en amortiguador de hibridación.

La hibridación se llevó a cabo en un sistema de PCR ProFlex siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se incubaron 100 ng de ARNcr:ARNtracr ensamblado con 500 ng de Cas9 TrueCut (ThermoFisher, #A36497) en el amortiguador de resuspensión proporcionado con el kit del sistema de transfección Neon (ThermoFisher, #MPK10096). Después de 15 minutos de incubación, la reacción se utilizó para transfectar 50 000 mioblastos de acuerdo con los métodos descritos. Las secuencias utilizadas para el direccionamiento de MAPK14 (3 ARNsg) y la región de pLAM (secuencia de poliadenilación de DUX4, 4 ARNg) fueron: NT-CTRL, GTATTACTGATATTGGTGGG (SEQ ID NO:8); MAPK14, GCTGAACAAGACAATCTGGG (SEQ ID NO:9), CTGCTTTTGACACAAAAACG (SEQ ID NO:10), CTTATCTACCAAATTCTCCG (SEQ ID NO:11); pLAM, AGAATTTTCACGGAAGAACAA (SEQ ID NO:12), CAGGTTTGCCTAGACAGCGT (SEQ ID NO:13), ATTAATAATGCCCCCTCCCTG (SEQ ID NO:14), AATCTTCTATAGGATCCACA (SEQ ID NO:15) y ARNip MAPK14, antisentido: UAGAUUACUAGGUUUUAGGTC (SEQ ID NO:16), sentido: CCUAAAACCUAGUAAUCUATT (SEQ ID NO:17).

Materiales y métodos in vivo

Ratas para estudios de PK/PD:

Se obtuvieron ratas Sprague Dawley macho (6-8 semanas de vida) de Hilltop Lab Animals, Inc. (EUA). Después de llegar a WuXi AppTec, un miembro del personal veterinario u otro personal designado evaluó la salud general de los animales. Los animales se aclimataron durante al menos 2 días (después de llegar a WuXi AppTec) antes de comenzar el estudio. Los animales se alojaron individualmente durante la aclimatación y durante todo el estudio. El entorno de la sala de animales se controló de acuerdo con el funcionamiento de las instalaciones (condiciones objetivo: temperatura de 20 a 26 °C, humedad relativa de 30 a 70 %, ciclo de 12 horas de encendido y apagado de las luces). Las luces, la temperatura y la humedad relativa se monitorean constantemente a través del sistema de monitoreo ambiental AmegaView. La dieta (dieta certificada de roedores #5002, PMI Feeds, Inc., Brentwood, MO) fueron gránulos irradiados con

paquete doble; el número de lote y las indicaciones de la dieta se registrarán en el cuaderno del estudio y se archivarán en WuXi AppTec. Se proporcionó agua (ósmosis inversa) a los animales ad libitum. Se llevaron a cabo análisis periódicos de la calidad del agua y los resultados se archivaron en WuXi AppTec. No se espera que haya contaminantes conocidos en la dieta ni en el agua que, con los niveles de detección, interfieran con el resultado del estudio. En el estudio # FULTH- 20171120 se sometió a ratas a ayuno nocturno antes de la administración del fármaco: a las ratas se les permitió el acceso libre al agua en todo momento y se les alimentó 4 horas después de la dosificación. Para el estudio # FULTH-20171228 se les otorgó a las ratas acceso ad-libitum a alimentos y agua durante todo el estudio.

10 Ratones para estudios de xenoinjerto:

Se adquirieron ratones NOD.Cg-Rag1tm1Mom Il2rgtm1Wjl/SzJ (Nod-Rag) macho (6-8 semanas de vida) de la colonia de cría VR de la Universidad de Maryland (USA). Los animales se alojaron en la instalación central de animales de UMB en Howard Hall en la Universidad de Maryland. Los animales se alojaron en grupo (4/jaula) durante la aclimatación (4-5 días), durante todo el procedimiento de injerto y durante todo el estudio de tratamiento farmacológico. El entorno de la sala de animales se controló de acuerdo con el funcionamiento de las instalaciones (condiciones objetivo: temperatura de 20 a 26 °C, humedad relativa de 30 a 70 %, ciclo de 12 horas de encendido y apagado de las luces). Las luces, la temperatura y la humedad relativa se monitorean constantemente a través del sistema de monitoreo ambiental AmegaView. La dieta (LabDiets 5P76, alimento de roedores con 22.5 % de proteína) se proporcionó ad libitum durante el estudio. Se proporcionó agua esterilizada ad libitum. No se espera que haya contaminantes conocidos en la dieta ni en el agua que interfieran con el resultado del estudio.

Creación de FSHD y ratones con xenoinjertos de control:

Los ratones con FSHD y de control se generaron mediante el xenoinjerto de líneas celulares de mioblastos isogénicos inmortalizados humanos derivados de iPSC A4 y C6 en los músculos tibialis anterior (TA) bilaterales de ratones Nod-Rag macho de aproximadamente 8 semanas de vida. Para crear los xenoinjertos de músculo humano, se creó un nicho para sembrar las células A4 o C6 dentro del TA del miembro posterior del ratón mediante irradiación con rayos X de los miembros posteriores de ratones NRG inmunodeficientes de 8 semanas de vida, para prevenir la regeneración muscular de los ratones. Un día después, se inyectaron 50 µl de una solución de BaCl₂ al 2 % a lo largo de cada TA para eliminar el tejido muscular del ratón. Tras la ablación del tejido del ratón, se inyectaron 2x10⁶ células C6 en cada región de TA bilateral y se permitió su desarrollo durante cuatro semanas. Tras el injerto de las células A4 o C6, los animales se expusieron a 4 semanas de estimulación eléctrica neuromuscular intermitente (iNMES) para mejorar el injerto de las células humanas según lo descrito por Sakellariou et ál., 2016.

Preparación y formulación del artículo de ensayo

La cantidad adecuada de FTX-1821 se pesó y mezcló con exactitud con el volumen adecuado de excipientes (0.5 % (DMSO al 1 %:metilcelulosa al 99 %) en agua para obtener una suspensión uniforme con una concentración final de 0.03 mg/mL. La formulación se preparó el día del estudio y se administró menos de 1 hora después de prepararse. El volumen de dosis administrado a los animales fue de 10 mL/kg. Se tomaron dos alícuotas de 20-50 µL de solución de dosis de cada formulación y se reservaron para la determinación de la precisión de la dosis mediante LC-MS/MS.

La cantidad adecuada de FTX-2865 se pesó y se mezcló con precisión con el volumen adecuado de solución salina estéril al 0.9 % para inyección, a fin de lograr una solución transparente con una concentración final de 1 mg/mL. La formulación se preparó el día del estudio y se administró a los animales mediante el uso de un volumen de dosis de 10 mL/kg.

Administración del artículo de prueba FTX-1821 y diseño de los estudios de PK/PD

La solución de dosificación de FTX-1821 (0.03 mg/mL) se administró a través de sonda gástrica a un volumen de dosis de 10 mL/kg para proporcionar una dosis final de 0.3 mg/kg, siguiendo los SOP de las instalaciones de Wuxi. El volumen de la dosis se determinó a través del peso corporal medido antes de la dosificación. Las concentraciones de solución de dosificación (mg/ML), los volúmenes de la dosis (mL/kg) y la dosis final (mg/kg) de los grupos de tratamiento respectivos se registraron en la hoja de Excel del estudio incluida. Condición de alimentación: ayuno durante la noche, alimentación 4 horas después de la dosificación.

Administración del artículo de prueba FTX-2865 y diseño de los estudios de xenoinjerto

La solución de dosificación de FTX-2865 (1 mg/mL) se administró a través de inyección IP a un volumen de dosis de 10 mL/kg para proporcionar una dosis final de 10 mg/kg (para cada dosis). Se administró solución salina estéril al 0.9 % a través de inyección IP a un volumen de dosis de 10 mL/kg como control de vehículo (para cada dosis). El volumen de la dosis se determinó a través del peso corporal medido antes de la dosificación por la mañana. Las concentraciones de solución de dosificación (mg/ML), los volúmenes de la dosis (mL/kg) y la dosis final (mg/kg) de los grupos de tratamiento respectivos se registraron en la hoja de Excel del estudio incluida. Las inyecciones BID se administraron con una separación de aproximadamente 12 horas para maximizar la cobertura del objetivo. Los animales del estudio recibieron un total de 14 inyecciones de vehículo o FTX-2865 durante el transcurso de 8 días y se sacrificaron aproximadamente 1 hora después de la última inyección matutina al día 8.

Recolección de muestras:

Muestras de sangre para PK: Se obtuvieron aproximadamente 100 µl de muestras de sangre a través de vena yugular o la vena de cola en cada momento predefinido. Las muestras de sangre se colocaron en tubos de recolección previamente refrigerados tratados con EDTA-K2 como

anticoagulante y se colocaron en hielo hasta la centrifugación.

Recolección de plasma para la evaluación PK: Las muestras de sangre para PK se centrifugaron a 4 °C, 3000 g durante 15 minutos en media hora para la recolección de plasma. Las muestras de plasma se almacenaron en tubos de polipropileno o placas de 96 pocillos, se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -70 °C hasta el análisis de LC/MS/MS.

Recolección de músculos para la evaluación PK y PD: Se recogieron los músculos tibialis anterior y trapecio bilaterales tras la extracción de sangre mediante punción cardíaca. Cada músculo de los lados izquierdo y derecho se pesó rápidamente por separado y se colocó en tubos separados, luego se congeló sobre hielo seco. Se utilizaron músculos de un lado para la medición de la concentración del compuesto y los del otro lado se enviaron al patrocinador para el análisis PD. La dosificación se escalonó de forma que la recolección de muestras se llevara a cabo aproximadamente a la misma hora al final del día.

Procesamiento de muestras para análisis PK:

Preparación de muestras de plasma para análisis de LC/MS: Una alícuota de 10 µL de una muestra de plasma se precipitó en proteínas con 150 µL de solución IS (100 ng/mL de Labetalol y 100 ng/mL de Tolbutamida y 100 ng/mL de Diclofenac en ACN), la mezcla se mezcló bien con vórtice y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos, 4 °C. Se transfirió una alícuota de 80 µL de sobrenadante a la placa de muestra y se mezcló con 80 µL de agua; luego se agitó la placa a 800 rpm durante 10 minutos. Se inyectó después 1 µL de sobrenadante para el análisis de LC-MS/MS.

Preparación de muestras de músculo para análisis de LC/MS: Las muestras de músculo se homogeneizaron en agua en una relación 1:4 (p/v) mediante el uso de Bead Ruptor de Omni. Los homogenizados se utilizaron luego para la medición de la concentración del fármaco. Una alícuota de 20 µL de homogenado de tejido muscular se precipitó en proteínas con 200 µL de solución IS (100 ng/mL de Labetalol y 100 ng/mL de Tolbutamida y 100 ng/mL de Diclofenac en ACN), la mezcla se mezcló bien con vórtice y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos, 4 °C. Se transfirió una alícuota de 80 µL de sobrenadante a la placa de muestra y se mezcló con 80 µL de agua; luego se agitó la placa a 800 rpm durante 10 minutos. Se inyectó después 0.3 µL de sobrenadante para el análisis de LC-MS/MS.

Método analítico (LC/MS, no GLP):

Los detalles técnicos utilizados para llevar a cabo métodos analíticos incluyen: Instrumento: LCMS Triple Quad QTRAP 6500+ (SCIEX, MA, EUA), Matriz: plasma de rata SD macho (EDTA-K2), estándares internos: 100 ng/mL de Labetalol, 100 ng/mL de Tolbutamida y 100 ng/mL de Diclofenac en condiciones MS, CAN. ESI: positivo, detección SRM de FTX-1821: [Ratón + humano]+ m/z 383.838>299.231; Labetalol (IS): [M+H]⁺ m/z 329.2/162.1; Tolbutamida (IS): [M+H]⁺ m/z 271.1/155; curva de calibración: 1.00-3000 ng/mL para FTX001821-02 en plasma de ratas SD

macho (EDTA-K2) y homogenado muscular.

Método de cuantificación: El área pico del artículo de ensayo en las muestras y en la muestra de solución estándar se determinó a través de métodos de LC/UV o LC-MS/MS. Criterios de aceptación del método: Linealidad: ≥ 75 % de las STD se calcularon de forma retroactiva a dentro de ± 20 % de sus valores nominales (± 25 % para LLOQ) en biofluidos y dentro de 25 % de sus valores nominales (30 % para LLOQ) en homogenado tisular y muestra de heces. QC: ≥ 67 % de todos los QC se calcularon de forma inversa a dentro de ± 20 % de sus valores nominales para biofluidos y dentro de 25 % de sus valores nominales para muestras de tejidos y heces. Especificidad: La concentración promedio calculada de analito en la matriz de blanco único fue menor que 0.5 veces la del LLOQ. Sensibilidad: El LLOQ en biofluidos y homogenado tisular fue de 1-3 ng/mL. Remanente: La concentración promedio calculada de remanente en la matriz de blanco único inmediatamente después de la inyección estándar más alta fue menor que el LLOQ.

Protocolo para crio fractura, lisis y preparación de tejido muscular para la evaluación de inmunoensayo del acoplamiento objetivo:

Se colocaron aproximadamente 50 mg de tejido muscular sobre hielo seco. Se cortaron las muestras musculares según fuera necesario para obtener el peso de 50 mg mediante el uso de una hoja de afeitar limpia por muestra. Se colocaron 50 mg de tejido muscular en una bolsa TT1 de Covaris (Covaris, MA, EUA) premarcada y se mantuvo en hielo seco. La bolsa TT1 de Covaris se sumergió en nitrógeno líquido y la muestra se crio fracturó en la cryoPREP de Covaris (Covaris, MA, EUA) en la configuración "5". La bolsa TT1 se hizo girar 180° y se repitieron las etapas 2-a. La muestra se transfirió a un tubo previamente pesado/marcado y se mantuvo en hielo seco hasta haberse preparado todas las muestras. Se registraron los pesos de las muestras. Se preparó amortiguador de lisis RIPA (R0278-500ML, Sigma, MO, EUA). Para 10 ml, se agregaron dos comprimidos de inhibidor de fosfatasa PhosSTOP de Roche y un comprimido de inhibidor de proteasa sin EDTA de Roche. Al material crio fracturado se le agregaron 8 μ l por mg de amortiguador RIPA a cada tubo y cada tubo se sometió a vórtice hasta que el lisado fuera homogéneo. Los lisados se mantuvieron en hielo hasta haberse procesado todas las muestras. El lisado se depuró mediante centrifugado a 13 000g durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido (se reservaron 10 μ l para el ensayo de proteína). Para medir el contenido proteico de cada muestra, se llevó a cabo un ensayo de proteína Bradford DC (5000112, Bio-Rad, CA, EUA). Las muestras se diluyeron 1:20 en PBS para la evaluación de proteínas.

Inmunoensayo de fosfo MK2 y MK2 total:

El lisado de músculo trapecio homogeneizado se evaluó mediante el uso de un inmunoensayo multiplexado de fosfo MK2 / MK2 total de Meno Scale Discovery (MSD) desarrollado internamente

(Meso Scale Diagnostics, MD, EUA). Para cada muestra, se cargaron en el ensayo de MSD 50 μ L de lisado muscular, equivalente a 50 μ g de proteína. Las concentraciones de proteína en lisados musculares se determinaron mediante un ensayo de proteína Bradford DC como se describió anteriormente. Las muestras se evaluaron por duplicado. Las muestras musculares se incubaron en una placa de MSD recubierta previamente durante la noche a 4 °C mientras se encontraban en un agitador orbital (300 rpm) y se evaluaron a la mañana siguiente.

Protocolo para criofractura, extracción de ARN y purificación de ARN de tejido muscular y evaluación del ensayo de PCR cuantitativa de MBD3L2 y CDKN1B:

Se colocaron aproximadamente 3-5 mg de tejido de músculo TA en hielo seco. Se colocó el tejido muscular en una bolsa TT1 de Covaris (Covaris, MA, EUA) premarcada y se mantuvo en hielo seco. La bolsa TT1 de Covaris se sumergió en nitrógeno líquido y la muestra se criofracturó en la cryoPREP de Covaris (Covaris, MA, EUA) en la configuración "5". La bolsa TT1 se hizo girar 180° y se repitieron las etapas 2-a. La muestra se transfirió a un tubo previamente pesado/marcado y se mantuvo en hielo seco hasta haberse preparado todas las muestras. Se purificó el ARN mediante el uso del kit de ARN microprep de Zymo Direct-zol (CA, EUA) a partir de 3-5 mg de tejido muscular criofracturado. El ADNc se sintetizó a partir de la plantilla de ARN mediante transcripción inversa. Las transcripciones objetivo se preamplificaron luego en un ensayo de PCR de 14 ciclos mediante el uso de sondas TaqMan diluidas específicas para seres humanos. Se analizó la expresión génica en un ensayo de qPCR mediante el uso de las sondas TaqMan específicas para seres humanos. El nivel de expresión relativa se normalizó a la expresión de CDKN1B a través del método $2^{-\Delta Ct}$.

Análisis de datos:

Se analizó la concentración plasmática y muscular en función del tiempo a través de abordajes no compartimentales mediante el uso del software Phoenix WinNonlin 6.3 (Cetera, NJ, EUA). Se indicaron los valores de C₀, CL_p, V_{dss}, C_{max}, T_{max}, T_{1/2}, AUC(0-t), AUC(0-inf), MRT(0-t), MRT(0-inf), %F y gráficas de perfil de concentración plasmática y muscular en función del tiempo y puntos finales de PD mediante el uso del software GraphPad Prism, versión 7 (CA, EUA). Se evaluó la PD muscular mediante ANOVA unidireccional con el software GraphPad Prism, versión 7 (CA, EUA). El efecto del injerto de células C6 c. A4 sobre el ARNm de MBD3L2 en los músculos con xenoinjerto se evaluó mediante una prueba T de dos colas con el software GraphPad Prism, versión 7 (CA, EUA). El efecto del tratamiento con FTX-2865 c. vehículo sobre el ARNm de MBD3L2 en los músculos con xenoinjerto de la FSHD se evaluó mediante una prueba T de dos colas con el software GraphPad Prism, versión 7 (CA, EUA).

EJEMPLO 1

LA REPRESIÓN DE DUX4 MEDIANTE EL USO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO DIRIGIDOS A LA
SECUENCIA REDUCE LOS GENES OBJETIVO POSTERIORES

Los miotubos de tipo salvaje se trataron con un vehículo de control de DMSO, y los miotubos de FSHD maduros derivados de pacientes que expresan la proteína de DUX4 se trataron con un control de vehículo de DMSO o 1 μ M de un oligonucleótido antisentido dirigido a la secuencia de DUX4 (ASO; FTX-2) adquirido de Exiqon. Después del tratamiento, los miotubos se lisaron en 19.5 μ L de amortiguador de lisis Real Time Ready de Roche, 0.25 μ L de DNase1 (Ambion, AM2222), 0.25 μ L de inhibidor Protector RNase (Roche, 3335402001), y el ARN se recolectó en una mezcla maestra de microkit RNeasy. Se determinaron los niveles de expresión de los genes posteriores regulados por DUX4 (ZSCAN4, TRIM43, MBD3L2, LEUTX y KHDC1L) mediante PCR en tiempo real (ThermoFisher Scientific, 4484262), ensayo Taqman ZSCAN4 (ThermoFisher Scientific, Hs00537549_m1, FAM-MGB), ensayo Taqman MYOG (ThermoFisher Scientific, Hs01072232_m1, JUN-QSY), ensayo Taqman RPLP0 (ThermoFisher Scientific, Hs99999902_m1) y/o ensayo Taqman LEUTX (ThermoFisher Scientific, Hs00418470_m1). Se extrajeron los valores de Ct del software de PCR en tiempo real QuantStudio y se utilizó Genedata para calcular los niveles relativos de expresión mediante el uso de POLR2A como gen constitutivo.

Los resultados mostraron que los miotubos de FSHD tratados con ASO dirigidos a la secuencia de DUX4 expresan cantidades reducidas de DUX4 y de los genes objetivo del factor de transcripción posterior de DUX4, ZSCAN4, TRIM43, MBD3L2, LEUTX y KHDC1L, en comparación con los miotubos de FSHD tratados con control de vehículo de DMSO (FIG. 2).

Los datos de la FIG. 3A son datos agrupados de control de calidad de placas que comparan la expresión de ARNm de MBD3L2 en miotubos de FSHD tratados con control de DMSO o ASO de DUX4 1 μ M, y miotubos de control isogénico normales saludables. La FIG. 3B muestra datos de control de calidad farmacológico y reducción dependiente de la dosis de DUX4 y el gen posterior, MBD3L2, mediante el uso de distintas diluciones de ASO de DUX4. La FIG. 3C muestra las estadísticas de ensayos basados en placas que comparan los miotubos de FSHD tratados con DMSO con WT: Z' es 0.512 y la señal con respecto a ruido (S/N) es 5.1, y los miotubos de FSHD tratados con DMSO o ASO de DUX4: Z' es 0.319 y la señal con respecto a ruido (S/N) es 4.6.

EJEMPLO 2

LOS INHIBIDORES DE MOLÉCULA PEQUEÑA DE P38 REDUCEN LA EXPRESIÓN DE ARNM DE *MBD3L2*

Los miotubos de tipo salvaje y los miotubos de FSHD maduros derivados de pacientes que expresan la proteína DUX4 se trataron con el control de vehículo de DMSO o con múltiples

concentraciones de diversos inhibidores de p38 α / β con distintos rangos de selectividad de isoforma y cinoma, que incluyen SB239063 (FIG. 4A), VX-702 (FIG. 4B), Pamapimod (FIG. 4C) y TAK-715 (FIG. 4D). Después del tratamiento, se procesaron las células control y tratadas para la cuantificación mediante PCR en tiempo real del ARNm de MBD3L2 (gen posterior de DUX4) y la

5 expresión del ARNm (control) de la miogenina (MYOG). Estos inhibidores de p38 α / β mostraron una potente (IC₅₀ aproximadamente <10 nM, FIG. 4A-D) reducción de la expresión de ARNm de MBD3L2 sin impacto sobre la expresión de ARNm de MYOG en los miotubos de FSHD.

En los miotubos de FSHD, los inhibidores de p38 (por ejemplo, Pamapimod) redujeron de forma dependiente de la dosis la expresión de ARNm de DUX4 y ARNm del gen posterior de DUX4

10 MBD3L2 sin afectar la formación de miotubos. En comparación con el tratamiento con DMSO, FTX000839 (Pamapimod) 10, 100 y 1000 nM redujo de forma dependiente de la dosis los niveles de ARNm del gen posterior MBD3L2 y DUX4-fl normalizados al ARNm de POLR2A, según lo medido a través de qPCR y Taqman en miotubos de FSHD (FIG. 5A) sin afectar a la diferenciación en miotubos (FIG. 5B). Los datos muestran que los inhibidores de p38 reducen de forma

15 dependiente la dosis la expresión de ARNm de MBD3L2 sin afectar la expresión de ARNm de miogenina.

EJEMPLO 3

REDUCCIÓN DE ARNm DE MBD3L2 Y ARNm DE MAPK14 DE P38 MEDIANTE INACTIVACIÓN DE ARNIP

20 Los ARNip de p38 α MAPK14 85 y p38 α MAPK14 86 se transfectaron a miotubos de FSHD de pacientes tal como se describe en Materiales y métodos. Cada uno del ARNip de p38 α MAPK14 85 y ARNip p38 α MAPK14 86 (en menor medida) redujo la expresión de MAPK14 de p38, como se muestra en la FIG. 6A y la expresión de ARNm de MBD3L2 (gen objetivo DUX4), como se muestra

25 en la FIG. 6B, en comparación con los ARNip de control no objetivo (NT CTRL 1 y NT CTRL 2). Los datos muestran que la reducción genómica de MAPK14 de p38 α >50 % redujo específicamente los genes objetivo posteriores y de DUX4, como se indica mediante MBD3L2.

EJEMPLO 4

REDUCCIÓN DE ARNm DE MBD3L2 A TRAVÉS DE RNP DE CINASA CAS9/ARNSG DE P38A

30 El direccionamiento de ARNg de CRISPR de MAPK14 o pLAM (secuencia señal de poliadenilación para DUX4) se realizó como se describe en Materiales y métodos. El ARNm de CRISPR dirigido a MAPK14 o pLAM (secuencia señal de poliadenilación para DUX4) dio como resultado una

35 reducción de la expresión de MBD3L2, pero sin MYOG. Los datos indican que la reducción

genómica de MAPK14 de p38 α redujo específicamente los genes objetivo posteriores y de DUX4, como se indica mediante MBD3L2.

EJEMPLO 5

5 FTX-1821 REGULA POR DISMINUCIÓN LA PROTEÍNA DUX4 Y EL ARNm DE MBD3L2

Los miotubos de FSHD derivados del paciente (con 6 repeticiones de matrices de D4Z4) se trataron con control de vehículo de DMSO y distintas concentraciones de FTX-1821, y los niveles de proteína DUX4 y ARNm de MBD3L2 se determinaron tal como se describe en Métodos y
10 materiales. Para DUX4 y MBD3L2 se analizaron cuatro réplicas biológicas. Además, se determinaron los niveles de pHSP27. Para la cuantificación de pHSP27, se obtuvieron tres réplicas en dos experimentos independientes.

El tratamiento de los miotubos derivados de pacientes con FSHD con FTX 1821 dio como resultado una reducción dependiente de la concentración de la proteína DUX4 (IC_{50} = 25 nM) y
15 ARNm de MBD3L2 (IC_{50} = 25 nM) que se correlacionó con los cambios observados en los niveles de fosfo HSP27 (IC_{50} = 10 nM) como evidencia de acoplamiento al objetivo (FIG. 7). Los resultados sugirieron una reducción dependiente de la concentración de la proteína DUX4 (IC_{50} = 25 nM) y del ARNm de MBD3L2 (IC_{50} = 10 nM). Las reducciones de la proteína DUX4 y el ARNm de MBD3L2 se correlacionaron con los cambios observados en los niveles de p-HSP27 (IC_{50} = 10 nM) como
20 evidencia del acoplamiento al objetivo. Estos resultados indican que la inhibición de la vía de p38 α mediante FTX-1821 da como resultado una potente regulación por disminución de la proteína DUX4 y de ARNm de MBD3L2.

EJEMPLO 6

25 FTX-1821 NO AFECTA LA FORMACIÓN DE MIOTUBOS

Los miotubos de FHSD inmortalizados se diferenciaron y se trataron con control de vehículo de DMSO o FTX-1821 a concentraciones de 1 μ M, 0.33 μ M, 0.11 μ M o 0.037 μ M. Después de 4 días, las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpos dirigidos contra MHC o DAPI. Ver la FIG. 8A. Se
30 cuantificaron los núcleos de los miotubos de acuerdo con la tinción de MHC (FIG. 8B). Los resultados no mostraron cambios en la formación o fusión de miotubos después del tratamiento con FTX-1821 a las concentraciones analizadas.

EJEMPLO 7

35 FTX-1821 REDUCE LA APOPTOSIS EN LOS MIOTUBOS DE FSHD

La apoptosis se midió a través de los niveles activos de Caspasa-3 en los miotubos de FSHD *in vitro*, tal como se describe en Materiales y métodos. La apoptosis se detectó de manera esporádica en un subconjunto de miotubos en cultivo, tal como lo muestran los círculos blancos y la región ampliada en la FIG. 9A. Se cuantificó la señal de Caspasa-3 activa en miotubos de FSHD que habían sido tratados con FTX-1821 a diferentes concentraciones (FIG. 9B). Los resultados mostraron una reducción dependiente de la dosis de la señal apoptótica, tal como lo indica la reducción de la detección de Caspasa 3 activa ($IC_{50} = 45$ nM), y este efecto fue específico para los miotubos de FSHD en comparación con miotubos de control. No se observó ningún cambio en la señal de Caspasa-3 activa tras el tratamiento con DMSO.

EJEMPLO 8

FTX-1821 REDUCE LA EXPRESIÓN PATOLÓGICA DEL PROGRAMA TRANSCRIPCIONAL DE DUX4

Se realizaron estudios tal como se describe en Métodos y materiales para identificar genes en la vía de DUX4 cuya expresión en miotubos de FSHD regulados por disminución tratados con FTX-1821 en comparación con miotubos de FSHD tratados con control de vehículo de DMSO. Además, se determinó también la expresión génica en miotubos de tipo salvaje tratados con DMSO. Se analizaron mediante RNA-seq tres duplicados para cada afección y los genes se agruparon según la dirección y la intensidad del cambio.

Tal como se muestra en el mapa de calor de la FIG. 10A, se identificó una cantidad de genes expresados de manera diferencial mediante perfilado de RNA-seq. La barra indica los cambios normalizados observados; por ejemplo, los genes que se vieron regulados por disminución con FTX-1821 se enriquecen en muestras tratadas con DMSO solamente. La expresión de estos genes se normalizó tras el tratamiento con FTX-1821 (1 μ M) y se asemejó más a las observaciones en células de tipo salvaje. Calculada con valores de expresión estándar de RPKM, la firma génica total fue muy pequeña y se definió en los límites estadísticos estándar: 86/19 799 genes de ARNm. La firma génica regulada por DUX4 fue una mayoría de la firma total, y estos genes se enumeran en la FIG. 10A. Los genes no regulados por DUX4 fueron una minoría de la firma total con cambios múltiples moderados: 9/86 genes de ARNm = 10 %; 2-2.7X logFC. La FIG. 10B muestra las lecturas normalizadas, tal como se describe en Materiales y métodos, de los genes objetivo de DUX4 que se regularon por disminución tras el tratamiento con FTX-1821. Se analizaron tres réplicas independientes por grupo.

61
EJEMPLO 9

REDUCCIÓN DEL ARNm DE MBD3L2 EN DIVERSOS GENOTIPOS Y FENOTIPOS DE FSHD1

La capacidad de los inhibidores de p38 de reducir la expresión de los genes objetivo de DUX4 en
5 células obtenidas de pacientes con distintos genotipos de FSHD1 se llevó a cabo tal como se
describe en Métodos y materiales. Cuatro líneas distintas de mioblastos de pacientes con FSHD,
es decir, FTCE-016, 020, 197 y 196 (proporcionadas por Rabi Tawil) se trataron con FTX-1821 (1
µM) o FTX-839 (1 µM), y se determinaron los niveles de ARNm del gen objetivo de DUX4,
MBD3L2, después del tratamiento.

10 Los niveles de expresión de MBD3L2 se redujeron en todas las líneas de FSHD, lo que dio como
resultado niveles similares a los medidos en los controles saludables, FTCE-396 y FTCE-014 (FIG.
11). Esto es prueba de la reducción del gen objetivo de DUX4 mediante inhibidores de p38 a
través de miotubos derivados de diversos genotipos y fenotipos de FSHD1 (se observaron
resultados similares para FSHD2, no se muestran los datos).

EJEMPLO 10

REDUCCIÓN DEL ARNm DE MBD3L2 DE GENOTIPOS Y FENOTIPOS DE FSHD1 Y FSHD2

Para evaluar el efecto del tratamiento de la inhibición selectiva de p38 mediante el uso de FTX-
20 1821 en células de FSHD1 y FSHD2, Rabi Tawil de la Universidad de Rochester proporcionó las
líneas de mioblastos primarios. La FIG. 13 resume los genotipos y fenotipos de 13 mioblastos de
pacientes con FSHD1 y 3 con FSHD2 utilizados en el estudio. Los diversos mioblastos de FSHD1
y FSHD2 se trataron con DMSO, FTX-1821 o FTX-839 (1 µM), y después del tratamiento se
determinaron los niveles de expresión de ARNm del gen objetivo de DUX4, MBD3L2. Además, se
25 determinó la apoptosis al medir la caspasa-3 activa en las líneas de FSHD1 y FSHD2.

Cada uno de los diversos mioblastos de FSHD1 y FSHD2 mostró una reducción de MBD3L2 (FIG.
14A, 11 líneas superiores). La reducción dio como resultado niveles de expresión similares a los
de las líneas de control saludables (CTRL- FTCE-014) (FIG. 14A, 2 líneas inferiores). Además, el
tratamiento con FTX-839 mostró una reducción de la apoptosis en las líneas de FSHD1 y FSHD2,
30 a un nivel similar a la cantidad determinada en una línea de control saludable (CTRL- FTCE-014)
(FIG. 14B). Estos resultados indican que los mioblastos de biopsia clínica de FSHD, cuando se
diferencian en miotubos, muestran una reducción en la expresión patológica del gen posterior de
DUX4 y la muerte celular resultante en los genotipos y fenotipos de FSHD1 y FSHD2.

EJEMPLO 11

ACOPLAMIENTO AL OBJETIVO EN MÚSCULO DE RATAS DE TIPO SALVAJE DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON
UN INHIBIDOR DE P38 SELECTIVO POTENTE

Se estudiaron en un modelo animal las propiedades farmacocinéticas de FTX-1821. Se administró
5 por vía oral FTX-1821 a ratas Sprague-Dawley macho en ayuno o sin ayuno (N=6 animales por
punto temporal y grupo de tratamiento), y se determinaron los niveles de fosfo p38 α :p38 α total. El
análisis farmacodinámico del acoplamiento al objetivo del sistema de p38 en el tejido muscular se
llevó a cabo al medir el cambio en la relación de proteína cinasa 2 activada por cinasa fosfo MAP
(MK2) con respecto a MK2 total antes y después del tratamiento farmacológico. Todos los métodos
10 utilizados se describen en la sección Materiales y métodos.

FTX-1821 presentó propiedades farmacocinéticas plasmáticas similares a las descritas
anteriormente (Aston et ál., 2009; no se muestran los datos). Estos estudios demostraron además
una distribución rápida de FTX-1821 a múltiples músculos y plasma. Las relaciones de exposición
de músculo con respecto a plasma fueron iguales o mayores que 1 en las ratas cuando se lograron
15 exposiciones plasmáticas clínicamente relevantes.

El análisis farmacodinámico demostró que una única dosis oral de FTX-1821 (0.3 mg/kg) dio como
resultado concentraciones plasmáticas clínicamente relevantes (Barbour et ál., 2012) y redujo
significativamente la relación de fosfo MK2 a con respecto a MK2 total en el músculo trapecio de
rata dentro de 1 hora después del tratamiento farmacológico (FIG. 15). El acoplamiento al objetivo
20 del sistema de p38 persistió durante al menos 12 horas después de la única dosis de FTX-1821
(FIG. 15). El acoplamiento al objetivo del sistema de p38 en el músculo trapecio fue máximo
cuando las concentraciones plasmáticas y musculares de FTX-1821 fueron mayores que 20 ng.mL
o ng.g y disminuyó en los puntos temporales en que disminuyeron las exposiciones. Se prevé que
las concentraciones musculares de FTX-1821 logradas en el estudio de ratas den como resultado
25 una reducción >70 % en Cmax en los genes objetivo dependientes de DUX4 en las biopsias
musculares de pacientes con FSHD basadas en datos *in vitro* en miotubos de FSHD (que
antecedan).

Este análisis farmacocinético y farmacodinámico indicó que la inhibición máxima del sistema de
p38 en el músculo se logró cuando las concentraciones plasmáticas de FTX-1821 fueron mayores
30 que 20 ng/mL y que se esperaba una inhibición significativa de la vía de p38 en el músculo
humano, con dosis clínicas de 7.5 o 15 mg BID (Barbour et ál., 2012).

EJEMPLO 12

INHIBICIÓN DEL PROGRAMA GENÓMICO DE DUX4 EN RATONES CON XENOINJERTO DE FSHD DESPUÉS
35 DEL TRATAMIENTO CON UN INHIBIDOR DE P38 POTENTE Y SELECTIVO

Los ratones con xenoinjerto muscular de FSHD y de control se generaron mediante el xenoinjerto de líneas celulares de mioblastos isogénicos inmortalizados humanos derivados de IPSC C6 (FSHD) y A4 (control) en los músculos tibialis anterior (TA) bilaterales de ratones Nod-Rag macho de aproximadamente 8 semanas de vida, tal como describen Sakellariou et ál., 2016. Después del procedimiento de injerto e INMES de 4 semanas de duración, los animales con xenoinjertos de FSHD se trataron con inyecciones BID de vehículo o FTX-2865 (10 mg/kg) durante 8 días (un total de 14 inyecciones) y se sacrificaron aproximadamente en el momento de las concentraciones plasmáticas máximas (Tmax) 1 hora después de la inyección matutina final al Día 8. En el momento del sacrificio, se recolectó plasma, músculo trapecio y músculos tibiales anteriores bilaterales y se congelaron rápidamente para el análisis de los criterios de valoración farmacocinéticos, acoplamiento al objetivo y ARNm dependientes de DUX4. MBD3L2 se evaluó mediante qPCR con una sonda específica para seres humanos y se normalizó al gen constitutivo CDKN1B. Las concentraciones de proteínas MK2 y pMK2 se evaluaron a través de un ensayo MSD cuantitativo.

El análisis de tejido de TA mediante qPCR de animales injertados durante 4-6 semanas con tejidos con mioblastos de A4 o C6 demostró un aumento significativo ($p < 0.05$) y > 10 veces de MBD3L2 y otros genes dependientes de Dux4 (no se muestran) en los músculos TA con xenoinjerto de FSHD (C6) c. control (A4) (FIG. 16). N=8 muestras de TA por grupo.

El tratamiento de los animales con xenoinjerto de FSHD con el inhibidor de p38 potente y selectivo, FTX-2865, produjo el acoplamiento al objetivo del sistema de p38, según se mide a través de un cambio en la relación de proteína cinasa 2 activada por cinasa fosfo MAP (MK2) con respecto a MK2 total > 50 % en los músculos TA y trapecio de ratones de tipo salvaje tras la administración BID repetida de una dosis de 10 mg/kg otorgada mediante inyección intraperitoneal (IP) (no se muestran los datos). El tratamiento con FTX-2865 disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la relación entre el fosfo MK2 y total en el músculo trapecio de ratón, lo que indica un acoplamiento significativo del sistema de p38 y también una concentraciones farmacológicas suficientes en los músculos esqueléticos de los animales para inhibir el sistema de p38 > 80 % (FIG. 17; N=8 muestras de trapecio por grupo). Además, el tratamiento con FTX-2865 disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la expresión de MBD3L2 en los músculos TA con xenoinjerto de FSHD en comparación con los animales tratados con vehículo, lo que indica la supresión del programa del gen DUX4 patológico mediante inhibición de p38 (FIG. 18; N=5-7 muestras de TA por grupo).

Referencias:

- Tawil R., van der Maarel S. M. y Tapscott S. J. Facioscapulohumeral dystrophy: the path to consensus on pathophysiology. *Skeletal Muscle* 2014, 4:12.
- van der Maarel S. M., Frants R. R., Padberg G. W.. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007, 1772:186–194.
- 5 Ehrlich M. y Lacey M. Deciphering transcription dysregulation in FSH muscular Dystrophy. *J Hum Genet.* 2012, 57(8): 477–484.
- Cuenda A. y Rousseau, S. 2007. *BBA-Mol Cell Res.* Review: p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Vol.1773: 8, p. 1358-1375.
- Himeda C. L., Jones T. I. y Jones P. L. Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy As a Model for
 10 Epigenetic Regulation and Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2015, 22(16): 1463–1482.
- Yao Z., Snider L., Balog J., Lemmers R. J.L.F., Van Der Maarel S. M., Tawil R. y Tapscott S. J. DUX4-induced gene expression is the major molecular signature in FSHD skeletal muscle. *Human Molecular Genetics.* 2014, 23:20 5342–5352.
- Rickard A.M., Petek L. M. y Miller D. G. Endogenous DUX4 expression in FSHD myotubes is
 15 sufficient to cause cell death and disrupts RNA splicing and cell migration pathways. *Human Molecular Genetics*, 2015, 24:20 5901–5914.
- Geng L.N., Yao Z., Snider L., Fong A.P., Cech J.N., Young J.M., van der Maarel S.M., Ruzzo W.L., Gentleman R.C., Tawil R., Tapscott S.J. DUX4 activates germline genes, retroelements and immunemediators: Implications for facioscapulohumeral dystrophy. *Dev Cell.* 2012, 22(1): 38–51.
- 20 Wallace L. M., Garwick S. E., Mei W., Belayew A., Coppee F., Ladner K. J., Guttridge D., Yang J. y Harper S. Q. DUX4, a Candidate Gene for Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy, Causes p53-Dependent Myopathy In Vivo. *Ann Neurol.* 2011, 69(3): 540–552.
- Homma S., Beermann M.- L., Boyce F. M. y Miller J. B. Expression of FSHD-related DUX4-FL alters proteostasis and induces TDP-43 aggregation. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015, 2(2): 151–166.
- 25 Shadle S. C., Zhong J. W., Campbell A. E., Conerly M. L., Jagannathan S., Wong C.-J., Morello T. D., van der Maarel S. M., Tapscott S. J. DUX4-induced dsRNA and MYC mRNA stabilization activate apoptotic pathways in human cell models of facioscapulohumeral dystrophy. *PLOS Genetics.* 2017, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006658>
- Dandapat A., Hartweck L. M., Bosnakovski D. y Kyba M. Expression of the Human FSHD-Linked
 30 DUX4 Gene Induces Neurogenesis During Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2013, 22:(17) 2440–2448.
- Bosnakovski D., Choi S. H., Strasser J. M., Toso E. A., Walters M. A. y Kyba M. High-throughput screening identifies inhibitors of DUX4-induced myoblast toxicity. *Skeletal Muscle.* 2014, 4:4.
- Mamchaoui K, Trollet C, Bigot A, Negroni E, Chaouch S, Wolff A, et ál. Immortalized pathological
 35 human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skeletal*

Muscle 2011, 1:34.

Thorley M, Duguez S, Mazza EM, Valsoni S, Bigot A, Mamchaoui K, Harmon B, Voit T, Mouly V, Duddy W. Skeletal muscle characteristics are preserved in hTERT/cdk4 human myogenic cell lines. Skeletal Muscle 2016, 6:43.

- 5 Isin Dalkilic y Louis M Kunkel. Current Opinion in Genetics & Development 2003, 13:231–238.

Zarubin, T. y Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Research. 2005; 15, 11–18.

Aouadi M., Binetruy, B., Caron, L., Le Marchand-Brustel, Y. 2006. Biochimie. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. Biochimie. 2006; 88:9: 1091–1098.

- 10 Keren, A., Tamir, Y., Bengal, E. The p38 MAPK signaling pathway: A major regulator of skeletal muscle development. Molecular and Cellular Endocrinology. 2006. Volumen 252, ediciones 1–2, páginas 224-230.

Kyriakis JM, Avruch J: Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiol Rev 2001, 81:807-869.

- 15 Himeda, CL, Debarnot, C, Homma S., Beermann M., Miller JB., Jones PL., Jones TI. Myogenic Enhancers Regulate Expression of the Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy-Associated DUX4 Gene. MCB 2014 vol. 34 n.º 11 1942-1955.

Dandapat A., Hartweck L. M., Bosnakovski D. y Kyba M. Expression of the Human FSHD-Linked DUX4 Gene Induces Neurogenesis During Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. Stem Cells Dev. 2013, 22:(17) 2440–2448.

- 20 Bosnakovski D., Choi S. H., Strasser J. M., Toso E. A., Walters M. A. y Kyba M. High-throughput screening identifies inhibitors of DUX4-induced myoblast toxicity. Skeletal Muscle. 2014, 4:4.

Mamchaoui K, Trollet C, Bigot A, Negroni E, Chaouch S, Wolff A, et ál. Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. Skeletal Muscle 2011;1:34.

- 25 Thorley M, Duguez S, Mazza EM, Valsoni S, Bigot A, Mamchaoui K, Harmon B, Voit T, Mouly V, Duddy W. Skeletal muscle characteristics are preserved in hTERT/cdk4 human myogenic cell lines. Skelet Muscle 2016;6:43.

- 30 Zarubin, T. y Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Research.2005; 15, 11–18.

Aouadi M., Binetruy, B., Caron, L., Le Marchand-Brustel, Y. 2006. Biochimie. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. Biochimie. 2006; 88:9: 1091–1098.

- 35 Keren, A., Tamir, Y., Bengal, E. The p38 MAPK signaling pathway: A major regulator of skeletal muscle development. Molecular and Cellular Endocrinology. 2006. Volumen 252, ediciones 1–2, páginas 224-230.

Kyriakis JM, Avruch J: Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001, 81:807-869.

Himeda, CL, Debarnot, C, Homma S., Beermann M., Miller JB., Jones PL., Jones TI. Myogenic Enhancers Regulate Expression of the Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy-Associated DUX4 Gene. *MCB* 2014 vol. 34 n.º 11 1942-1955.

Wissing, ER, Boyer, JG., Kwong, JQ, Sargent, MA, Karch, J, McNally, EM, Otsu, K, Molkentin JD. p38 α MAPK underlies muscular dystrophy and myofiber death through a Bax-dependent mechanism. *Hum Mol Genet.* 15 oct 2014; 23(20): 5452–5463.

Perdiguerro, E, Ruiz-Bonilla, V, Gresh, G, Hui, L, Ballestar, E, Sousa-Victor, P, Baeza-Raja, B, Bosch-Comas, A, Esteller, M, Caelles, C, Serrano, AL, Wagner, EF, Muñoz-Cánoves, P. Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38 α in abrogating myoblast proliferation. *EMBO J.* 7 mar 2007; 26(5): 1245–1256.

Aston, Nicola M.; Bamborough, Paul; Buckton, Jacqueline B.; Edwards, Christopher D.; Holmes, Duncan S.; Jones, Katherine L. et ál. (2009): p38alpha mitogen-activated protein kinase inhibitors. Optimization of a series of biphenylamides to give a molecule suitable for clinical progression. En *J Med. Chem.* 52 (20), pp. 6257–6269.

Barbour, April M.; Sarov-Blat, Lea; Cai, Gengqian; Fossler, Michael J.; Sprecher, Dennis L.; Graggaber, Johann et ál. (2013): Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of losmapimod following a single intravenous or oral dose in healthy volunteers. En *Br. J Clin Pharmacol.* 76 (1), pp. 99–106.

Boudou, T., Legant, W. R., Mu, A., Borochin, M. A., Thavandiran, N., Radisic, M., Chen, C. S. (2012). A Microfabricated Platform to Measure and Manipulate the Mechanics of Engineered Cardiac Microtissues. *Tissue Engineering. Parte A*, 18(9-10), 910–919.

Sakellariou, P., O'Neil, A., Mueller, A.L., Stadler, G., Wright, W.E., Roche, J.A., Bloch, R.J. (2016). Neuromuscular electrical stimulation promotes development in mice of mature human muscle from immortalized human myoblasts. *Skeletal Muscle* 6:4, 1-14.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente descritas en la presente se incorporan en su totalidad mediante esta referencia.

Si bien la presente invención se describió junto con las modalidades específicas indicadas anteriormente, serán evidentes para los expertos en la técnica muchas alternativas, modificaciones y otras variaciones de estas. Se pretende que todas estas alternativas, modificaciones y variaciones se encuentren contempladas dentro del espíritu y alcance de la presente invención.