

ADMINISTRACIÓN DE VECTORES DEL VIRUS ADENOASOCIADO DE B-SARCOGLICANO Y MICROARN-29 Y EL TRATAMIENTO DE LA DISTROFIA MUSCULAR

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 62/323.333, presentada el 15 de abril de 2016 y la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 62/433.548, presentada el 13 de diciembre de 2016, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

**INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DE MATERIAL PRESENTADO
ELECTRÓNICAMENTE**

[0002] Esta solicitud contiene, como parte separada de la divulgación, un listado de secuencias en formato legible en computadora que se incorpora por referencia en su totalidad y se identifica de la siguiente manera: nombre del archivo: 50622A_Seqlisting.txt; tamaño: 21,466 bytes, creado: 13 de abril 2017.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0003] Se describen en la presente vectores de tratamiento, tales como vectores AAV, que expresan β -sarcoglicano y método para usar estos vectores para reducir y prevenir la fibrosis en sujetos que padecen distrofia muscular. La invención también proporciona métodos de tratamiento génico conjunto que comprenden la administración de un primer vector AAV que expresa β -sarcoglicano y un segundo vector AAV que expresa miR-29 para reducir y prevenir la fibrosis en pacientes que padecen distrofia muscular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0004] La distrofia muscular de cinturas (LGMD) tipo 2E (LGMD2E) es un trastorno autosómico recesivo que resulta de mutaciones en el gen que codifica β -sarcoglicano (SGCB), y causa la pérdida de la proteína funcional.¹ LGMD2E representa una forma relativamente común y grave de LGMD en los Estados Unidos con informes mundiales de incidencia de 1/200.000-1/350.000. (2) La ausencia de β -sarcoglicano conduce a una distrofia progresiva con pérdida crónica de fibras musculares, inflamación, reemplazo de grasa y fibrosis, todo lo cual resulta en el deterioro de la función y fuerza muscular. (3,4) Como un complejo, los sarcoglicanos (α -, β -, γ -, δ -), que varían en tamaño entre 35 y 50 kD, (5) son todas proteínas transmembrana que proporcionan estabilidad al sarcolema que ofrece protección del estrés mecánico durante la actividad muscular. (3) La pérdida de β -sarcoglicano en LGMD2E generalmente da como resultado grados

variables de pérdida concomitante de otras proteínas sarcoglicano que contribuyen a la fragilidad de la membrana muscular que conduce a la pérdida de miofibras.¹ Aunque el rango de fenotipo clínico de LGMD2E varía, el diagnóstico ocurre típicamente antes de los 10 años y la pérdida de la ambulación se produce entre mediados y finales de la adolescencia.^{1,6,7} Los pacientes presentan creatina quinasa (CK) sérica elevada, debilidad muscular proximal, dificultad para levantarse del piso y pérdida progresiva de ambulación. La afectación cardíaca ocurre en hasta el cincuenta por ciento de los casos.

[0005] El virus adenoasociado (AAV) es un parvovirus con deficiencia de replicación, cuyo genoma de ADN monocatenario es de alrededor de 4,7 kb de longitud, lo que incluye dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de 145 nucleótidos. Existen múltiples serotipos de AAV. Las secuencias de nucleótidos de genomas de los serotipos de AAV son conocidas. Por ejemplo, el genoma completo de AAV-1 se proporciona en el N.º de acceso a GenBank NC_002077; el genoma completo de AAV-2 se proporciona en el N.º de acceso a GenBank NC_001401 y Srivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 {1983}; el genoma completo de AAV-3 se proporciona en el N.º de acceso a GenBank NC_1829; el genoma completo de AAV-4 se proporciona en el N.º de acceso a GenBank NC_001829; el genoma de AAV-5 se proporciona en el N.º de acceso a GenBank AF085716; el genoma completo de AAV-6 se proporciona en el N.º de acceso a GenBank NC_001862; al menos porciones de genomas de AAV-7 y AAV-8 se proporcionan en los N.ºs de acceso a GenBank AX753246 y AX753249, respectivamente; el genoma de AAV -9 se proporciona en Gao et al., J. Virol., 78: 6381 - 6388 (2004); el genoma de AAV-10 se proporciona en Mol. Ther., 13 (1): 67 - 76 (2006); y el genoma de AAV-11 se proporciona en Virology, 330 (2): 375-383 (2004). La secuencia del genoma de AAV rh.74 se proporciona en la patente estadounidense 9.434.928, que se incorpora en la presente por referencia. Las secuencias de actuación de cis que dirigen la replicación (rep) de ADN viral, la encapsidación/empaquetado y la integración del cromosoma de la célula huésped están contenidos dentro de las ITR de AAV. Tres promotores de AAV (denominados p5, p19 y p40 por sus ubicaciones relativas en el mapa) dirigen la expresión de dos marcos de lectura abiertos internos de AAV que codifican los genes rep y cap. Los dos promotores de rep (p5 y p19), acoplados con el empalme diferencial del intrón AAV simple (en nucleótidos 2107 y 2227), generan la producción de cuatro proteínas rep (rep 78, rep 68, rep 52 y rep 40) del gen rep. Las proteínas rep poseen múltiples propiedades enzimáticas que son en última instancia responsables de replicar el genoma viral. El gen cap se expresa del promotor p40 y codifica las tres proteínas de cápside VP1, VP2, y VP3. El empalme alternativo y los

sitios de inicio de traducción sin consenso son responsables de la producción de las tres proteínas de cápside relacionadas. Un sitio de poliadenilación de consenso simple se ubica en la posición 95 del mapa del genoma de AAV. El ciclo de vida y la genética de AAV se analizan en Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

[0006] AAV posee características únicas que hacen que resulte atractivo como vector para administrar ADN extraño a las células, por ejemplo, en el tratamiento génico. La infección por AAV de células en cultivo es nocitopática, y la infección natural de humanos y otros animales es asintomática. Además, AAV infecta muchas células de mamífero lo que otorga la posibilidad de actuar sobre muchos tejidos distintos in vivo. Además, AAV transduce lentamente la división y no división de células, y puede persistir esencialmente durante la vida de esas células como un episoma nuclear transcripcionalmente activo (elemento extracromosómico). El genoma proviral de AAV se inserta como ADN clonado en plásmidos, lo que hace viable la construcción de genomas recombinantes. Además, debido a que las señales que dirigen la replicación de AAV y la encapsidación del genoma están contenidas dentro de las ITR del genoma de AAV, una parte o toda la parte interna de aproximadamente 4,3 kb del genoma (replicación de codificación y proteínas de la cápside estructural, rep-cap) se puede reemplazar con ADN extraño. Para generar vectores AAV, las proteínas rep y cap se pueden proporcionar en trans. Otra función significativa de AAV es que es un virus extremadamente estable y resistente. Resiste fácilmente a las condiciones usadas para inactivar el adenovirus (56 ° a 65 °C durante varias horas), haciendo que la conservación en frío de AAV sea menos crítica. AAV puede incluso ser liofilizado. Por último, las células infectadas por AAV no son resistentes a una superinfección.

[0007] Estudios múltiples demostraron la expresión de proteína mediada por AAV recombinante a largo plazo (> 1,5 años) en el músculo. Véanse, Clark et al., *Hum Gene Ther*, 8: 659-669 (1997); Kessler et al., *Proc Nat. Acad Sc. USA*, 93: 14082-14087 (1996); y Xiao et al., *J Virol*, 70: 8098-8108 (1996). Véanse también, Chao et al., *Mol Ther*, 2:619-623 (2000) y Chao et al., *Mol Ther*, 4:217-222 (2001). Además, dado que el músculo está altamente vascularizado, la transducción de AAV recombinante dio como resultado la aparición de productos transgénicos en la circulación sistémica luego de la inyección intramuscular, como se describe en Herzog et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 5804-5809 (1997) y Murphy et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13921-13926 (1997). Además, Lewis et al., *J Virol*, 76: 8769-8775 (2002) demostró que las miofibras esqueléticas poseen los factores celulares necesarios para la glucosilación, la secreción

y el plegamiento correctos del anticuerpo, lo que indica que el músculo es capaz de expresar de manera estable las proteínas terapéuticas secretadas.

[0008] Una forma emergente de tratamiento para LGMD2E es la administración de genes mediada por virus para restaurar la proteína de tipo silvestre (WT) al músculo afectado, lo que da como resultado la recuperación de la función muscular. Considerando que un subconjunto de pacientes puede desarrollar miocardiopatía (8, 9, 10, 13), esto debería tenerse en cuenta en el cuidado a largo plazo de estos pacientes. En informes anteriores, el ratón *Sgcb*-null estaba bien caracterizado. Araishi et al.³ desarrollaron el ratón con deficiencia de β -sarcoglicano con la pérdida concomitante de todos los sarcoglicanos y sarcospan, con al menos preservación menor de merosina, distroglicanos y distrofina, reproduciendo el cuadro clínico observado en LGMD2E. Los cambios histológicos en este modelo animal también fueron un prototipo para la contraparte clínica, que incluye la prominencia de la fibrosis del músculo esquelético.⁽¹⁴⁾ Dressman et al. ⁽²⁵⁾ inyectaron el músculo abdominal transversal utilizando rAAV2.CMV.SGCB. La expresión persistió durante 21 meses, y las fibras musculares se protegieron contra la necrosis recurrente. También se ha descrito el uso de AAV autocomplementario para mejorar la expresión transgénica,¹⁶ un promotor específico del músculo para dirigirse mejor al músculo esquelético (20, 26) y la optimización de un gen de β -sarcoglicano humano (hSGCB).

[0009] La mejora funcional en pacientes que padecen LGMD y otras distrofias musculares requiere tanto la recuperación de genes como la reducción de fibrosis. Existe la necesidad de métodos para reducir la fibrosis que puedan aparearse con métodos de recuperación de genes para tratamientos más eficaces de LGMD y otras distrofias musculares.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0010] Se describen en la presente vectores de tratamiento génico, por ejemplo AAV, que expresan el gen de β -sarcoglicano y métodos para administrar β -sarcoglicano al músculo para reducir y/o prevenir la fibrosis; y/o para aumentar la fuerza muscular, y/o para tratar una β -sarcoglicanopatía en un sujeto mamífero que padece distrofia muscular.

[0011] Además, la invención proporciona tratamientos conjuntos y enfoques que usan vectores de tratamiento génico para administrar β -sarcoglicano para abordar el defecto del gen observado en LGMD2E y vectores de tratamiento génico que administran miR-29 para suprimir adicionalmente la fibrosis.

[0012] En un aspecto, se describe en la presente un vector AAV recombinante que

comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica β -sarcoglicano. En algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótidos que codifica β -sarcoglicano comprende una secuencia, por ejemplo, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 % o 89 %, más típicamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 1 y codifica la proteína que conserva la actividad de β -sarcoglicano. En algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótidos que codifica β -sarcoglicano comprende la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, la secuencia de polinucleótidos que codifica β -sarcoglicano consiste en la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 1.

[0013] En otro aspecto, un vector AAV recombinante descrito en la presente comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica β -sarcoglicano que tiene al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 % o 89 %, más típicamente al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 % o 94 % y aún más típicamente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y la proteína conserva la actividad de β -sarcoglicano.

[0014] En otro aspecto, se describe en la presente un vector AAV recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica β -sarcoglicano funcional que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1, o un complemento de esta.

[0015] El término “riguroso” se usa para referirse a las condiciones que se entienden habitualmente en la técnica como rigurosas. La rigurosidad de hibridación se determina principalmente por la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturizantes conocidos como formamida. Los ejemplos de condiciones rigurosas para la hibridación y el lavado son 0,015 M de cloruro de sodio, 0,0015 M de citrato de sodio a 65-68 °C o 0,015 M de cloruro de sodio, 0,0015M de citrato de sodio, y 50 % de formamida a 42 °C. Véase Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). También se pueden usar más condiciones rigurosas (tales como mayor temperatura, fuerza iónica inferior, mayor cantidad de formamida, u otros agentes desnaturizantes), sin embargo, la tasa de hibridación se verá afectada. En lo que respecta a la hibridación de desoxioligonucleótidos, las condiciones de hibridación rigurosa de ejemplo incluyen el lavado en 6 x SSC 0,05 % de pirofosfato de sodio a 37 °C (para oligómeros de base 14),

48 °C (para oligómeros de base 17), 55 °C (para oligómeros de base 20), y 60 °C (para oligómeros de base 23).

[0016] Se pueden incluir otros agentes en la hibridación y el lavado de amortiguadores con el fin de reducir la hibridación no específica y/o de fondo. Los ejemplos son 0,1 % de albúmina de suero bovino, 0,1 % de polivinilpirrolidona, 0,1 % de pirofosfato de sodio, 0,1 % de dodecilsulfato de sodio, NaDodSO₄, (SDS), Ficoll, solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sometido a ultrasonido (u otro ADN no complementario), y sulfato de dextrano, aunque se pueden usar otros agentes adecuados. La concentración y los tipos de estos aditivos se pueden cambiar sin afectar sustancialmente la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los experimentos de hibridación se realizan normalmente en un pH de 6,8 a 7,4, sin embargo, en condiciones de fuerza iónica normales, la tasa de hibridación es casi independiente del pH. Véase Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Cap. 4, IRL Press Limited (Oxford, Inglaterra). Las condiciones de hibridación se pueden ajustar por una persona del oficio de nivel medio para acomodar estas variables y permitir la relación de ADN de diferentes secuencias para formar híbridos.

[0017] En otro aspecto, los vectores rAAV de la invención se pueden ligar operativamente a un elemento de control específico del músculo. Por ejemplo, el elemento de control específico del músculo es un elemento génico de actina esquelética humana, un elemento génico de actina cardíaca, un factor de fijación del potenciador específico de miocitos MEF, una creatina quinasa muscular (MCK), una tMCK (MCK truncada), una cadena pesada de miosina (MHC), MHCK7 (una versión híbrida de MHC y MCK), C5-12 (promotor sintético), un elemento potenciador de la murina creatina quinasa, un elemento génico de la troponina C de contracción rápida esquelética, un elemento génico de la troponina C de contracción lenta cardíaca, el elemento génico de la troponina I de contracción lenta, factores nucleares inducibles por hipoxia, un elemento inducible por esteroide o un elemento de respuesta glucocorticoide (GRE).

[0018] En algunas formas de realización, el promotor específico del músculo es MHCK7 (SEQ ID NO: 4). Un rAAV de ejemplo descrito en la presente es pAAV.MHCK7.hSCGB que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3; en donde el promotor de MCHK7 abarca los nucleótidos 130-921, un intrón quimérico de SV40 abarca los nucleótidos 931-1078, la secuencia de β -sarcoglicano abarca los nucleótidos 1091-2047 y la poli A abarca los nucleótidos 2054-2106.

[0019] En algunas formas de realización, el promotor específico del músculo es tMCK (SEQ ID NO: 6). Un AAVr de ejemplo descrito en la presente es pAAV.tMCK.hSCGB

que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5; en donde el promotor tMCK abarca los nucleótidos 141-854, un intrón quimérico de SV40 abarca los nucleótidos 886-1018, la secuencia de β -sarcoglicano abarca los nucleótidos 1058-2014 y la poli A abarca los nucleótidos 2021-2073.

[0020] El AAV puede ser cualquier serotipo, por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 y AAV rh.74. La producción de rAAV pseudotipificado se describe, por ejemplo, en WO 01/83692. También se contemplan otros tipos de variantes de rAAV, por ejemplo, rAAV con mutaciones de cápside. Véase, por ejemplo, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014).

[0021] También se contemplan las composiciones que comprenden cualquiera de los vectores rAAV descritos en la presente.

[0022] También se proporcionan métodos para producir una partícula de vector AAV recombinante que comprende cultivar una célula que ha sido transfectada con cualquier vector AAV recombinante descrito en la presente y recuperar las partículas de AAV recombinante del sobrenadante de las células transfectadas. También se contemplan las partículas virales que comprenden cualquiera de los vectores AAV recombinantes descritos en la presente.

[0023] También se proporcionan métodos para reducir la fibrosis en un sujeto mamífero que lo necesita. En este caso, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector AAV descrito en la presente (o una composición que comprende un vector AAV descrito en la presente) al sujeto mamífero. En algunas formas de realización, el sujeto mamífero padece distrofia muscular. En algunas formas de realización, la administración de un vector AAV descrito en la presente (o una composición que comprende un vector AAV descrito en la presente) reduce la fibrosis en el músculo esquelético o en el músculo cardíaco del sujeto. Estos métodos pueden comprender además la etapa de administrar un segundo vector AAV recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que comprende miR29C.

[0024] La expresión "distrofia muscular", como se usa en la presente, se refiere a un trastorno en el que la fuerza y el volumen muscular disminuyen gradualmente. Ejemplos no limitantes de distrofia muscular pueden incluir distrofia muscular de Becker, distrofia muscular tibial, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular facioescapulohumeral, sarcoglicanopatías, distrofia muscular congénita tal como distrofia muscular congénita debida a la deficiencia parcial de LAMA2, distrofia muscular congénita con deficiencia de merosina, distrofia muscular

congénita tipo 1D, distrofia muscular congénita de Fukuyama, distrofia muscular de cinturas tipo 1A, distrofia muscular de cinturas tipo 2A, distrofia muscular de cinturas tipo 2B, distrofia muscular de cinturas tipo 2C, distrofia muscular de cinturas tipo 2D, distrofia muscular de cinturas tipo 2E, distrofia muscular de cinturas tipo 2F, distrofia muscular de cinturas tipo 2G, distrofia muscular de cinturas tipo 2H, distrofia muscular de cinturas tipo 2I, distrofia muscular de cinturas tipo 2I, distrofia muscular de cintura tipo 2J, distrofia muscular de cinturas tipo 2K, distrofia muscular de cinturas tipo 1C, distrofia muscular rígida de la columna vertebral con epidermólisis ampollosa simple, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular congénita de Ullrich y distrofia muscular escleroatónica de Ullrich. En algunas formas de realización, el sujeto padece distrofia muscular de cinturas. En algunas formas de realización, el sujeto padece distrofia muscular de cinturas tipo 2E (LGMD2E).

[0025] El término “fibrosis”, como se usa en la presente, se refiere al depósito excesivo o no regulado de componentes de matriz extracelular (ECM) y procesos de reparación anormales en tejidos tras lesiones, que incluyen el músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, pulmón, riñón y páncreas. Los componentes de ECM que se depositan incluyen colágeno, por ejemplo, colágeno 1, colágeno 2 o colágeno 3, y fibronectina.

[0026] En otro aspecto, se describe en la presente un método para aumentar la fuerza muscular y/o la masa muscular en un sujeto mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector AAV descrito en la presente (o una composición que comprende un vector AAV descrito en la presente) al sujeto mamífero.

[0027] En cualquiera de los métodos de la invención, el sujeto puede estar padeciendo distrofia muscular tal como distrofia muscular de cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a la distrofina.

[0028] También se proporciona un método para tratar la distrofia muscular en un sujeto mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector AAV descrito en la presente (o una composición que comprende un vector AAV descrito en la presente) al sujeto mamífero. En algunas formas de realización, la distrofia muscular es distrofia muscular de cinturas. Cualquiera de los métodos descritos en la presente pueden comprender además la etapa de administrar un segundo vector AAV recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que comprende miR29C.

[0029] Los tratamientos conjuntos también se contemplan. En este caso, cualquiera de los métodos anteriores descritos en la presente pueden comprender además

administrar un segundo vector AAV recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que comprende miR29C. En algunas formas de realización, el polinucleótido que comprende miR29C está ligado operativamente a un elemento de control específico del músculo. Por ejemplo, el elemento de control específico del músculo es un elemento génico de actina esquelética humana, un elemento génico de actina cardíaca, un factor de fijación del potenciador específico de miocitos MEF, una creatina quinasa muscular (MCK), una tMCK (MCK truncada), una cadena pesada de miosina (MHC), MHCK7 (una versión híbrida de MHC y MCK), C5-12 (promotor sintético), un elemento potenciador de la murina creatina quinasa, un elemento génico de la troponina C de contracción rápida esquelética, un elemento génico de la troponina C de contracción lenta cardíaca, el elemento génico de la troponina I de contracción lenta, factores nucleares inducibles por hipoxia, un elemento inducible por esteroide o un elemento de respuesta glucocorticoide (GRE). En algunas formas de realización, el segundo vector recombinante comprende una secuencia de polinucleótidos indicada en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 8, como se describe en la solicitud provisional estadounidense N.º 62/323.163 (cuya descripción se incorpora en la presente por referencia en su totalidad).

[0030] En los métodos de tratamiento conjunto descritos en la presente en los que tanto un vector rAAV que expresa β -sarcoglicano como un vector rAAV que expresa miR29c se administran al sujeto mamífero, los vectores rAAV pueden administrarse de manera concurrente o administrarse de manera consecutiva con el vector rAAV que expresa β -sarcoglicano administrado inmediatamente antes o después del rAAV que expresa miR29c. Alternativamente, el vector AAV que expresa β -sarcoglicano se administra dentro de alrededor de 1-24 horas (por ejemplo, 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 horas) después de administrar el rAAV que expresa miR-29 o de que los métodos de la invención se lleven a cabo en donde el vector AAV que expresa el β -sarcoglicano se administra dentro de alrededor de 1-24 horas (por ejemplo, 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 horas) antes de administrar el rAAV que expresa miR-29. En algunas formas de realización, el vector AAV que expresa β -sarcoglicano se administra dentro de alrededor de 1-5 horas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 horas) después de administrar el rAAV que expresa miR-29 o de que los métodos de la invención se lleven a cabo en donde el vector AAV que expresa el β -sarcoglicano se administra en alrededor de 1-5 horas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 horas) antes de administrar el rAAV que expresa miR-29c.

[0031] En cualquiera de los métodos de la invención, el rAAV se administra mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa. Además, en cualquiera de los métodos de la invención, el rAAV se administra de manera sistémica, tal como la administración parenteral mediante inyección, infusión o implantación.

[0032] Las composiciones de la invención se formulan para la inyección intramuscular o intravenosa. Además, las composiciones de la invención se formulan para la administración sistémica, tal como administración parenteral mediante inyección, infusión o implantación.

[0033] Además, cualquiera de las composiciones formuladas para la administración a un sujeto que padece distrofia muscular (tal como distrofia muscular de cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina). En algunas formas de realización, la composición puede comprender adicionalmente un segundo vector AAV recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos indicada en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 8.

[0034] En cualquiera de los usos de la invención, el medicamento se formula para inyección intramuscular o inyección intravenosa. Además, en cualquiera de los usos de la invención, el medicamento se formula para la administración sistémica tal como administración parenteral mediante inyección, infusión o implantación. Además, cualquiera de los medicamentos se puede preparar para la administración a un sujeto que padece distrofia muscular (tal como distrofia muscular de cinturas o cualquier otra distrofia muscular asociada a distrofina). En algunas formas de realización, el medicamento puede comprender adicionalmente un segundo vector AAV recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos indicada en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 8.

[0035] Los párrafos anteriores no pretenden definir cada aspecto de la invención, y los aspectos adicionales se describen en otras secciones, tales como la Descripción detallada de la invención. Se pretende que todo el documento se relacione como una divulgación unificada, y se debe entender que se contemplan todas las combinaciones de características descritas en la presente, incluso si la combinación de características no se encuentran juntas en la misma oración, párrafo o sección de este documento. La invención incluye, como un aspecto adicional, todas las formas de realización de la invención de alcance más restrictivo en cualquier forma que las variaciones definidas por los párrafos específicos anteriores. Por ejemplo, cuando ciertos aspectos de la invención se describen como un género, debe entenderse que cada miembro de un género es, individualmente, un aspecto de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0036] Las Figuras 1A-1D demuestran que la expresión de β -sarcoglicano mediada por AAV restaura las proteínas asociadas a la distrofina y protege la integridad de la membrana. (a) Vector AAV autocomplementario que contiene el gen de β -sarcoglicano humano optimizado mediante codones (hSGCB) dirigido por el promotor de tMCK específico del músculo. El casete también contiene un intrón quimérico para aumentar el procesamiento y la señal de poliadenilación para la estabilidad. (b) La tinción de inmunofluorescencia con anticuerpo anti- β -SG muestra niveles elevados de tinción sarcolemal del transgén SGCB en ratones de 5 semanas de vida tanto 6 como 12 semanas después de la inyección. Se muestra imágenes $\times 20$. El porcentaje de fibras que expresan beta-sarcoglicano por músculo TA tuvo un promedio de $88,4 \pm 4,2$ % después de 6 semanas ($n = 9$, 4 machos, 5 hembras) y $76,5 \pm 5,8$ % después de 12 semanas ($n = 6$, 4 machos, 2 hembras). Expresión de proteína confirmada en la transferencia Western con transferencia de gamma-tubulina mostrada para un control de carga. (c) la administración de AAV de β -sarcoglicano conduce a la restauración de otros miembros del complejo de sarcoglicano; α -sarcoglicano, distrofina. Imágenes $\times 20$. (d) scAAVrh.74.hSGCB protege las membranas *sgcb*^{-/-} contra el daño. Imagen que muestra un área grande de fibras azul Evans positivas (rojo) yuxtapuestas a un grupo de fibras que expresan β -sarcoglicano que se han protegido de la incorporación de colorante azul Evans. Se muestra la imagen $\times 40$.

[0037] Las Figuras 2A-2D muestran el análisis histológico del músculo esquelético tratado con deficiencia de β -SG. El tratamiento con scAAVrh.74.hSGCB normaliza los parámetros histológicos de ratones *sgcb*^{-/-}. La tinción con hematoxilina y eosina y la tinción con rojo picrosirio se realizaron en el músculo TA de ratones *sgcb*^{-/-} junto con ratones C57/BL6 de control normales y ratones tratados con scAAVrh.74.hSGCB seguida de la cuantificación de parámetros histológicos y el % de tinción de colágeno. (a) La tinción de H y E muestra la presencia de fibras centralmente nucleadas, células inflamatorias y una gran distribución del diámetro de fibra en el músculo con deficiencia de β -SG y una mejora en la histopatología después de la transferencia de genes. (b) La tinción de rojo picrosirio muestra una disminución en la tinción de colágeno con rojo en el músculo tratado. (c) Cuantificación de fibras centralmente nucleadas que muestran una disminución después del tratamiento ($P < 0,0005$, ANOVA de un factor) y (d) representación de la distribución del tamaño de fibra y aumento en el tamaño promedio de fibra del músculo TA de los controles C57/BL6 y ratones *sgcb*^{-/-} en comparación con ratones tratados ($P < 0,0001$, ANOVA de un factor). (e) Cuantificación del % de colágeno

en el músculo TA de controles C57/BL6 y ratones *sgcb*^{-/-} en comparación con ratones tratados *sgcb*^{-/-} ($P < 0,0001$, ANOVA de un factor). Se muestra una barra de escala de 100 μm para imágenes $\times 20$. *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

[0038] Las Figuras 3A-3C muestran que la administración intramuscular de scAAVrh.74.hSGCB corrige la fuerza tetánica y la resistencia a la lesión inducida por la contracción. El músculo TA de ratones *sgcb*^{-/-} tratados con 3×10^{10} vg de scAAVrh.74.hSGCB a través de una inyección IM se recolectó 6 semanas después de la transferencia de genes, y se sometió a un protocolo para evaluar la fuerza tetánica y un protocolo de contracción excéntrica para evaluar resistencia a la lesión inducida por la contracción. (a) Los TA tratados con AAVrh.74.hSGCB demostraron una mejora significativa tanto en la fuerza tetánica absoluta ($P < 0,01$, prueba t pareada) como en la (b) fuerza específica normalizada ($P < 0,05$, prueba t pareada), que no fue diferente de la fuerza de tipo silvestre (C57/BL6). (c) Los TA tratados con AAVrh.74.hSGCB exhibieron una mejora significativa en la resistencia a la lesión inducida por la contracción en comparación con los controles *sgcb*^{-/-} no tratados ($P < 0,01$, ANOVA de dos factores). Se muestra la retención de fuerza después de 10 contracciones. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

[0039] Las Figuras 4A-4C muestran los resultados del análisis de ratones viejos tratados por vía intramuscular con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. (a) La tinción de inmunofluorescencia del músculo TA de ratones *sgcb*^{-/-} de 6 meses de vida 12 semanas después de la inyección ($n = 5$, 5 machos) muestra la expresión sarcolemal del transgén SGCB a niveles promedio de 80 % en ratones inyectados en comparación con los no tratados ($n = 4$, 4 machos). (b) Tinción con rojo picrosirio del músculo TA tratado y no tratado. (c) La cuantificación del colágeno presente en el tejido teñido con rojo picrosirio muestra una reducción significativa en la cantidad de colágeno después del tratamiento con rAAVrh.74.tMCK.hSGCB ($P < 0,0001$, ANOVA de un factor). Se muestra una barra de escala de 100 μm para imágenes $\times 20$. **** $P < 0,0001$.

[0040] Las Figuras 5A-5C muestran los resultados de la administración vascular de scAAVrh.74.hSGCB. A las cuatro ($n = 5$, 5 machos) y cinco ($n = 4$, 2 machos, 2 hembras) semanas, los ratones con deficiencia de β -SG fueron tratados con vector a través de la arteria femoral para administrar el vector a los músculos de los miembros inferiores. En una dosis de 5×10^{11} vg, la expresión de β -SG fue $90,6 \pm 2,8$ % en TA y $91,8 \pm 4,7$ % en GAS de ratones tratados, acompañado de mejoras en la histopatología que dieron como resultado una mejora significativa en fuerza específica en comparación con animales no tratados incluso de acuerdo con un paradigma de lesión. (a) Expresión de la proteína β -SG de tres ratones representativos. El músculo de un ratón KO β -SG no

tratado se muestra para comparar en el recuadro (abajo a la derecha). Se muestran imágenes $\times 20$. La expresión en los músculos tratados confirmados mediante transferencia Western y de gamma-tubulina se muestra como un control de carga. (b) La histopatología mejora significativamente después del tratamiento con dosis altas. Paneles superiores-músculos TA y gastrocnemio tratados. Paneles inferiores-músculo de control con deficiencia de β -SG. Se muestra una barra de escala de 100 μm para imágenes $\times 20$. (c) Porcentaje de fuerza específica conservada en el músculo EDL después de 10 ciclos de lesión inducida por la contracción excéntrica. El tratamiento con 5×10^{11} vg de AAVrh.74.hSGCB condujo a una mejora significativa en la fuerza que era equivalente al músculo de control WT (normal) ($P < 0,05$, ANOVA de un factor). $*P < 0,05$.

[0041] Las Figuras 6A-6B muestran la reducción de la fibrosis en ratones KO β -SG tratados con ILP. (a) La tinción con rojo de picosirio muestra una fibrosis reducida en los ratones tratados, indicada por una disminución en el depósito de colágeno, en comparación con los ratones *sgcb*^{-/-} no tratados. (b) La cuantificación de niveles de colágeno en los músculos TA y GAS de ratones *sgcb*^{-/-} no tratados, BL6 WT y ratones tratados confirma la reducción en los niveles de colágeno en ratones tratados ($P < 0,001$, ANOVA de un factor). Se muestra una barra de escala de 100 μm para imágenes $\times 20$. $***P < 0,001$.

[0042] Las Figuras 7A y 7B muestran la biodistribución del vector y la expresión de proteína. (a) Histograma de la distribución promedio de vector en tejidos recolectados de ratones tratados con ILP en copias de transcripto por microgramo de ADN agregado a qPCR. Se trató el miembro izquierdo. (b) No se observó expresión de proteína a través de transferencia Western en los órganos diana.

[0043] Las Figuras 8A-D proporcionan déficits histológicos y funcionales en ratones *sgcb*^{-/-} a los 7 meses de vida. La tinción tricrómica en el diafragma (A) y el corazón (C) de los ratones SGCB^{-/-} muestra una fibrosis extensa (roja). La producción de fuerza del diafragma se reduce significativamente en el diafragma (B) y la fracción de eyección cardíaca también se reduce en ratones *sgcb*^{-/-} (D).

[0044] La Figura 9 proporciona un esquema del casete de transgén de β -sarcoglicano terapéutico. Vector AAV autocomplementario que contiene el gen de β -sarcoglicano humano optimizado mediante codones (hSGCB). Un promotor de MHCK7 específico del músculo dirige la expresión. El casete también contiene un intrón quimérico para aumentar el procesamiento y la señal de poliadenilación para la estabilidad.

[0045] La Figura 10 proporciona tinción de inmunofluorescencia para β -sarcoglicano en diversos músculos esqueléticos que demuestra una expresión robusta con fibras

negativas raras después de 1, 4 o 6 meses de tratamiento (se muestra 1 mes).

[0046] La Figura 11 proporciona tinción de inmunofluorescencia para β -sarcoglicano en el diafragma y el corazón que demuestra una expresión robusta con fibras negativas raras después de 1, 4 o 6 meses de tratamiento (se muestra 1 mes).

[0047] Las Figuras 12A-D representan la restauración de la expresión de SGCB después de la administración intravenosa de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. (A) casete de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. (b) Imágenes de inmunofluorescencia 6 meses después de la inyección de músculos esqueléticos, diafragma y corazón de ratones *sgcb*^{-/-} inyectados por vía intravenosa con una dosis total de 1e12 vg de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. Imágenes representativas de los músculos esqueléticos que muestran un promedio de $98,13 \pm 0,31$ % de transducción. Se muestran imágenes 20X. Imágenes representativas de tejido cardíaco que muestran niveles altos de expresión de transgén hSGCB. Se muestran imágenes 10X. (c) Transferencia Western de todos los músculos de un ratón *sgcb*^{-/-} tratado que confirma la expresión transgénica de hSGCB. (d) Transferencia Western para la expresión de hSGCB en corazones de cinco ratones *sgcb*^{-/-} tratados con cuantificación por densitometría que muestra la sobreexpresión de hSGCB hasta 72,0 % de los niveles de BL6 WT.

[0048] Las Figuras 13A-D representan el efecto del tratamiento sistémico con scAAVrh74.MHCK7.hSGCB en la patología muscular. (a) Tinción H y E de diafragma y músculo QUAD de ratones C57BL/6 WT, *sgcb*^{-/-} y tratados con scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB que muestran histopatología normalizada. (b) Cuantificación de la reducción de fibras centralmente nucleadas en músculo de *sgcb*^{-/-} tratado en comparación con músculo de *sgcb*^{-/-} no tratado (TA, GAS, GLUT, diafragma, $p < 0,0001$) (QUAD, PSOAS, TRI, $p < 0,05$). (c) Normalización de la distribución de fibra en GAS, PSOAS y TRI, y (d) aumento en el tamaño promedio de fibra en los músculos tratados en comparación con los músculos de *sgcb*^{-/-} no tratados ($p < 0,001$) (ANOVA DE UN FACTOR) (n = 5 por grupo).

[0049] Las Figuras 14A y 14B representan un depósito de colágeno reducida en ratones KO β -SG tratados por vía intravenosa. (a) La tinción con rojo picrosirio mostró una fibrosis reducida en los ratones tratados, indicada por una disminución en el depósito de colágeno en comparación con los ratones *sgcb*^{-/-} no tratados en diafragma y GAS. (b) La cuantificación de los niveles de colágeno en los músculos diafragma y GAS de ratones C57BL/6 WT (n = 4), ratones *sgcb*^{-/-} no tratados (n = 4) y ratones *sgcb*^{-/-} tratados (n = 5) confirman la reducción en los niveles de colágeno en ambos músculos tratados ($p < 0,0001$, ANOVA DE UN FACTOR). Se muestra una barra de escala de 100

µm para imágenes 20X.

[0050] La Figura 15 demuestra la administración de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB a través de la vena de la cola de ratones *sgcb*^{-/-} recupera completamente la fuerza en el diafragma después de 6 meses de tratamiento (administración IV (1e12 vg)). Se recolectaron tiras de músculo diafragma de ratones SGCB^{-/-} tratados y de control y ratones WT y se sometieron a mediciones de fuerza, el tratamiento recuperó la fuerza a los niveles de WT.

[0051] La Figura 16 proporciona un esquema del vector rAAV de scAACrh.74.CMV.miR29c y la secuencia de nucleótidos de miR-29c en una estructura principal de miR-30 natural.

[0052] La Figura 17 demuestra que después de 3 meses de tratamiento con AAVrh.74.CMV.miR29C, los músculos TA se recolectaron de ratones SGCB^{-/-} tratados y de control y ratones WT y se analizaron para determinar la fibrosis (niveles de colágeno) (n = 5 por grupo). Mediante el uso de tinción con rojo sirio y cuantificación, los niveles de colágeno se redujeron después del tratamiento (véase la Figura 18). Los resultados indicaron que los niveles de transcripto de Col1A, Col3A y Fbn se normalizaron, y se aumentó el tamaño de la fibra muscular.

[0053] La Figura 18 proporciona imágenes representativas de secciones completas escaneadas de músculos tibiales anteriores no tratados y tratados con AAVrh.74.CMV.miR29C teñidos con rojo sirio, que tiñe el colágeno 1 y 3. La cuantificación se muestra en la Figura 17

[0054] Las Figuras 19A y 19B demuestran la corrección de la cifoescoliosis en la columna dorsal. (a) Cifoescoliosis en ratones *sgcb*^{-/-} como se evidencia mediante radiografía de rayos X. (b) El puntaje del índice cifótico (KI) de ratones *sgcb*^{-/-} (3,69) es bajo en comparación con C57BL/6 WT (6,01) (p<0,01), pero aumenta después del tratamiento con scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB (5,39) (p<0,05 en comparación con *sgcb*^{-/-}) (ANOVA DE UN FACTOR) (n = 6 por grupo).

[0055] Las Figuras 20A-D proporcionan la evaluación de la miocardiopatía en el músculo cardíaco. (a) Tinciones con H y E y rojo picrosirio de corazones de BL6 WT, *sgcb*^{-/-} y *sgcb*^{-/-} tratados con AAV.MHCK7.hSGCB de 7 meses de vida 6 meses después del tratamiento que indican la degeneración miocárdica en músculo de *sgcb*^{-/-} no tratado y mejora después del tratamiento. (b) Análisis de MRI cardíaca que muestra reducción en corazones de *sgcb*^{-/-} en volumen sistólico (p<0,01), gasto cardíaco y fracción de eyección (p<0,05) (ANOVA DE UN FACTOR) y mejoras 6 meses después del tratamiento (n = 6 por grupo). (c) Transferencia Western de dos corazones de C57BL/6

WT, dos corazones de *sgcb*^{-/-} y cinco corazones de *sgcb*^{-/-} tratados con AAV.MHCK7.hSGCB que muestran niveles disminuidos de troponina I cardíaca en ratones enfermos. (d) Cuantificación por densitometría que muestra la reducción de troponina I cardíaca (cTrpI) a 60,38 % de los niveles de BL6 WT y una sobreexpresión de hasta 135,8 % de los niveles de BL6 WT.

[0056] Las Figuras 21A-B demuestran la corrección de la función del diafragma y el aumento de la actividad de la caja de campo abierto. (a) Se recolectaron tiras de músculo diafragma para medir la fuerza y la resistencia a la fatiga en ratones BL6 WT (n = 5), ratones *sgcb*^{-/-} (n = 4) y ratones *sgcb*^{-/-} tratados con AAV.MHCK7.hSGCB (n = 5) a los 7 meses de vida. Seis meses de tratamiento recuperaron la fuerza a los niveles de WT (p<0,01 en comparación con *sgcb*^{-/-}) y mejoraron la resistencia a la fatiga. (b) La ambulación total en los planos x e y se disminuye significativamente en ratones *sgcb*^{-/-} (p<0,0001) y ligeramente mejorada en ratones tratados con MCHK7 (p<0,05). La actividad vertical sobre los miembros posteriores también disminuyó en ratones *sgcb*^{-/-} (p<0,01) y aumentó significativamente en ratones tratados con MCHK7 (p<0,05) (ANOVA DE UN FACTOR) (n = 6 por grupo).

[0057] Las Figuras 22A-B proporcionan la biodistribución y el análisis de expresión transgénica no diana de la administración sistémica de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. (a) Histograma de distribución de copias de vg promedio de transcripto por microgramo de ADN agregado a la reacción de qPCR en diversos tejidos de dos ratones *sgcb*^{-/-} después de la administración IV de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB en una dosis total de 1e12 vg. (b) La biodistribución se transfiere a músculos y órganos de ratones *sgcb*^{-/-} inyectado de manera sistémica con scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB que indican que no hay expresión del transgén hSGCB en ninguna muestra no muscular.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0058] La presente divulgación se basa en el descubrimiento de que la administración de un vector AAV que comprende un polinucleótido que expresa β -sarcoglicano da como resultado una reducción o reversión completa de la fibrosis muscular en un modelo animal de distrofia muscular de cinturas. Como se demuestra en los Ejemplos, la administración del vector AAV descrito en la presente dio como resultado la reversión de características distróficas que incluyen menos fibras degenerativas, inflamación reducida y recuperación funcional mejorada mediante la protección contra la contracción excéntrica con una mayor generación de fuerza.

[0059] Como se usa en la presente, el término "AAV" es una abreviatura habitual para el virus adenoasociado. El virus adenoasociado es un parvovirus con ADN

monocatenario que crece únicamente en células en donde algunas funciones se proporcionan mediante un virus auxiliar de coinfección. Actualmente, existen trece serotipos de AAV que han sido caracterizados. La información general y las reseñas de AAV se pueden encontrar en, por ejemplo, Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169-228, y Berns, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (Nueva York). Sin embargo, se prevé plenamente que estos mismos principios se puedan aplicar a los serotipos de AAV adicionales ya que se sabe que diversos serotipos están estrechamente relacionados, tanto estructural como funcionalmente, incluso a nivel génico. (Véase, por ejemplo, Blacklowe, 1988, pp. 165-174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; y Rose, Comprehensive Virology 3:1-61 (1974)). Por ejemplo, todos los serotipos de AAV exhiben aparentemente propiedades de replicación muy similares mediadas por genes rep homólogos; y todos tienen tres proteínas de cápside relacionadas, tales como aquellas expresadas en AAV2. El grado de relación resulta más evidente a partir del análisis heterodúplex que revela hibridación cruzada extensa entre los serotipos a lo largo de todo el genoma; y la presencia de segmentos de autoapareamiento análogos en el terminal que corresponde a "secuencias repetidas del terminal invertido" (ITR). Los patrones de infectividad similares también sugieren que las funciones de replicación en cada serotipo se encuentran bajo control regulador similar.

[0060] Un "vector AAV", como se usa en la presente, se refiere a un vector que comprende uno o más polinucleótidos de interés (o transgenes) que están flanqueados por las secuencias repetidas del terminal (ITR) de AAV. Dichos vectores AAV se pueden replicar y empaquetar en partículas virales infecciosas cuando se encuentran en una célula huésped que fue transfectada con un vector que codifica y expresa productos de genes rep y cap.

[0061] Un "virión de AAV", una "partícula viral de AAV" o una "partícula de vector AAV" se refiere a una partícula viral compuesta de al menos una proteína de la cápside de AAV y un vector AAV de polinucleótidos encapsidados. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido que no sea un genoma de AAV de tipo silvestre, tal como un transgén que se debe administrar a una célula de un mamífero), se denomina generalmente "partícula de vector AAV " o simplemente "vector AAV". De este modo, la producción de partícula de vector AAV incluye necesariamente la producción de vector AAV, ya que dicho vector está contenido dentro de una partícula de vector AAV.

AAV

[0062] Los genomas de AAV recombinantes de la invención comprenden moléculas de ácido nucleico de la invención y una o más ITR de AAV que flanquean una molécula de ácido nucleico. El ADN de AAV en los genomas de rAAV puede ser de cualquier serotipo de AAV del que puede derivar un virus recombinante incluyendo, entre otros, un serotipo de AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 y AAV rh.74. La producción de rAAV pseudotipificado se describe, por ejemplo, en WO 01/83692. También se contemplan otros tipos de variantes de rAAV, por ejemplo, rAAV con mutaciones de cápside. Véase, por ejemplo, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Como se puede observar en la sección de “antecedentes” antes descrita, las secuencias de nucleótidos de los genomas de varios serotipos de AAV se conocen en la técnica. Para promover la expresión específica del músculo esquelético, se pueden usar AAV1, AAV5, AAV6, AAV8 o AAV9.

[0063] Los plásmidos de ADN de la invención comprenden genomas de rAAV. Los plásmidos de ADN se transfieren a células posibles de infección con un virus auxiliar de AAV (por ejemplo, adenovirus, adenovirus con eliminación de E1 o virus del herpes) para ensamblar el genoma de rAAV en partículas virales infecciosas. Las técnicas para producir partículas de rAAV, en donde un genoma de AAV que se debe envasar, los genes rep y cap, y las funciones del virus auxiliar se proporcionan a una célula, son estándares en el estado de la técnica. Para la producción de rAAV, es necesario que los siguientes componentes estén presentes dentro de una sola célula (denominada en la presente célula de empaquetamiento): un genoma de rAAV, genes rep y cap de AAV separados (es decir, no en el interior) del genoma de rAAV, y funciones del virus auxiliar. Los genes rep y cap de AAV pueden ser de cualquier serotipo de AAV para el que puede derivarse virus recombinante y pueden ser de un serotipo de AAV diferente de las ITR de genomas de rAAV, que incluye, entre otros, los serotipos de AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 y AAV rh.74. La producción de rAAV pseudotipificado se describe, por ejemplo, en WO 01/83692, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

[0064] Un método para generar una célula empaquetadora es crear una línea celular que expresa de manera estable todos los componentes necesarios para la producción de partículas AAV. Por ejemplo, un plásmido (o múltiples plásmidos) que comprende un genoma de rAAV que carece de genes rep y cap de AAV, genes rep y cap de AAV separados del genoma de rAAV, y un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a la neomicina, están integrados en el genoma de una célula. Los genomas

de AAV se introdujeron en plásmidos bacterianos mediante procedimientos tales como inserción de GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. S6. USA, 79:2077-2081), adición de ligadores sintéticos que contienen sitios de escisión de endonucleasa de restricción (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73) o mediante unión de extremos romos directa (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). La línea de células empaquetadoras se infecta luego con un virus auxiliar, tal como adenovirus. Las ventajas de este método consisten en que las células se pueden seleccionar y son adecuadas para la producción de rAAV a gran escala. Otros ejemplos de métodos adecuados emplean adenovirus o baculovirus en lugar de plásmidos para introducir genomas de rAAV y/o genes rep y cap en las células empaquetadoras.

[0065] Los principios generales de la producción de rAAV se analizan en, por ejemplo, Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; y Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). Se describen distintos enfoques en Ratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963 (1988); y Lebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828); patente estadounidense N.º 5.173.414; WO 95/13365 y la patente estadounidense correspondiente N.º 5.658.776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al. (1995) Vaccine 13:1244-1250; Paul et al. (1993) Human Gene Therapy 4:609-615; Clark et al. (1996) Gene Therapy 3:1124-1132; patente estadounidense N.º 5.786.211; patente estadounidense N.º 5.871.982; y patente estadounidense N.º 6.258.595. Los documentos anteriores se incorporan en la presente por referencia en su totalidad, con énfasis particular en aquellas secciones de los documentos que se refieren a la producción de rAAV.

[0066] Por lo tanto, la invención proporciona células empaquetadoras que producen rAAV infeccioso. En una forma de realización, las células empaquetadoras pueden ser células de cáncer transformadas de manera estable, tales como células HeLa, células 293 y células PerC.6 (una línea 293 cognada). En otra forma de realización, las células empaquetadoras son células que no son células de cáncer transformadas, tales como células 293 de pase bajo (células de riñón fetal humano transformadas con E1 de adenovirus), células MRC-5 (fibroblastos fetales humanos), células WI-38 (fibroblastos fetales humanos), células Vero (células de riñón de mono) y células FRhL-2 (células de pulmón fetal de Macaca mulatta).

[0067] El AAV recombinante (es decir, partículas de rAAV encapsidadas infecciosas) de la invención comprende un genoma de rAAV. Las formas de realización incluyen, entre otros, el rAAV denominado pAAV.MHCK7.hSCGB que comprende la secuencia de polinucleótidos indicada en SEQ ID NO: 3; y pAAV.tMCK.hSCGB que comprende la secuencia de polinucleótidos indicada en SEQ ID NO: 5.

[0068] El rAAV se puede purificar mediante métodos estándares en la técnica, tales como cromatografía en columna o gradientes de cloruro de cesio. Los métodos para purificar vectores rAAV de virus auxiliar son conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos en, por ejemplo, Clark *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp y Clark, *Methods Mol. Med.*, 69 427-443 (2002); patente estadounidense N.º 6.566.118 y WO 98/09657.

[0069] En otra forma de realización, la invención contempla composiciones que comprenden rAAV de la presente invención. Las composiciones descritas en la presente comprenden rAAV en un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Las composiciones también pueden comprender otros ingredientes, tales como diluyentes y adyuvantes. Los portadores, diluyentes y adyuvantes aceptables no son tóxicos para los receptores y son preferentemente inertes en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, plurónicos o polietilenglicol (PEG).

[0070] Los títulos de rAAV que se desea administrar en los métodos de la invención variarán en función, por ejemplo, del rAAV particular, el modo de administración, el objetivo del tratamiento, el individuo, y los tipos de células en los que se administran, y se pueden determinar mediante métodos estándares en la técnica. Los títulos de rAAV pueden variar de alrededor de 1×10^6 , alrededor de 1×10^7 , alrededor de 1×10^8 , alrededor de 1×10^9 , alrededor de 1×10^{10} , alrededor de 1×10^{11} , alrededor de 1×10^{12} , alrededor de 1×10^{13} , a alrededor de 1×10^{14} o más partículas resistentes a DNasa (DRP) por ml. Las dosis también se pueden expresar en unidades de genomas virales (vg).

[0071] La invención contempla los métodos para transducir una célula diana con

rAAV, *in vivo* o *in vitro*. Los métodos *in vivo* comprenden la etapa de administrar una dosis eficaz, o múltiples dosis eficaces, de una composición que comprenden un rAAV de la invención a un animal (que incluye un ser humano) que lo necesita. Si la dosis se administra antes del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es profiláctica. Si la dosis se administra después del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es terapéutica. En formas de realización de la invención, una dosis eficaz es una dosis que alivia (elimina o reduce) al menos un síntoma asociado con el estado de trastorno/enfermedad que se trata, que retrasa o previene la progresión a un estado de trastorno/enfermedad, que retrasa o previene la progresión de un estado de trastorno/enfermedad, que disminuye la extensión de la enfermedad, que provoca la remisión (parcial o total) de la enfermedad, y/o que prolonga la supervivencia. Un ejemplo de una enfermedad contemplada para la prevención o el tratamiento con los métodos de la invención es la FSHD.

[0072] La invención también contempla tratamientos conjuntos. Como se usa en la presente, conjunto incluye tratamiento simultáneo o tratamiento secuencial. Se contemplan específicamente los métodos de combinación de la invención con tratamientos médicos estándares (por ejemplo, corticoesteroides), así como las combinaciones con tratamientos nuevos.

[0073] Una cantidad terapéuticamente eficaz del vector rAAV es una dosis de rAAV que varía de alrededor de 1×10^{13} vg/kg a alrededor de 5×10^{14} vg/kg, o de alrededor de 1×10^{13} vg/kg a alrededor de 2×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 1×10^{13} vg/kg a alrededor de 3×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 1×10^{13} vg/kg a alrededor de 4×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 1×10^{13} vg/kg a alrededor de 5×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 1×10^{13} vg/kg a alrededor de 6×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 1×10^{13} vg/kg a alrededor de 7×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 1×10^{13} vg/kg a alrededor de 8×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 1×10^{13} vg/kg a alrededor de 9×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 1×10^{13} vg/kg a alrededor de 1×10^{14} vg/kg, o de alrededor de 1×10^{13} vg/kg a alrededor de 2×10^{14} vg/kg, o de 1×10^{13} vg/kg a alrededor de 3×10^{14} vg/kg, o de alrededor de 1×10^{13} a alrededor de 4×10^{14} vg/kg, o de alrededor de 3×10^{13} vg/kg a alrededor de 4×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 3×10^{13} vg/kg a alrededor de 5×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 3×10^{13} vg/kg a alrededor de 6×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 3×10^{13} vg/kg a alrededor de 7×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 3×10^{13} vg/kg a alrededor de 8×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 3×10^{13} vg/kg a alrededor de 9×10^{13} vg/kg, o de alrededor de 3×10^{13} vg/kg a alrededor de 1×10^{14} vg/kg, o de alrededor de 3×10^{13} vg/kg a alrededor de 2×10^{14} vg/kg, o de 3×10^{13} vg/kg a alrededor de 3×10^{14} vg/kg, o de alrededor de 3×10^{13} a alrededor de 4×10^{14} vg/kg, o de alrededor de 3×10^{13} vg/kg a alrededor de 5×10^{14} vg/kg, o de alrededor de 5×10^{13} vg/kg a

alrededor de 6e13 vg/kg, o de alrededor de 5e13 vg/kg a alrededor de 7e13 vg/kg, o de alrededor de 5e13 vg/kg a alrededor de 8e13 vg/kg, o de alrededor de 5e13 vg/kg a alrededor de 9e13 vg/kg, o de alrededor de 5e13 vg/kg a alrededor de 1e14 vg/kg, o de alrededor de 5e13 vg/kg a alrededor de 2e14 vg/kg, o de 5e13 vg/kg a alrededor de 3e14 vg/kg, o de alrededor de 5e13 a alrededor de 4e14 vg/kg, o de alrededor de 5e13 vg/kg a alrededor de 5e14 vg/kg, o de alrededor de 1e14 vg/kg a alrededor de 2e14 vg/kg, o de 1e14 vg/kg a alrededor de 3e14 vg/kg, o de alrededor de 1e14 a alrededor de 4e14 vg/kg, o de alrededor de 1e14 vg/kg a alrededor de 5e14 vg/kg. La invención también comprende composiciones que comprenden estos rangos de vector rAAV.

[0074] Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de vector rAAV es una dosis de 1e13 vg/kg, alrededor de 2e13 vg/kg, alrededor de 3e13 vg/kg, alrededor de 4e13 vg/kg, alrededor de 5e13 vg/kg, alrededor de 6e13 vg/kg, alrededor de 7e13 vg/kg, alrededor de 8e13 vg/kg, alrededor de 9e13 vg/kg, alrededor de 1e14 vg/kg, alrededor de 2e14 vg/kg, alrededor de 3e14 vg/kg, alrededor de 4e14 vg/kg y 5e14 vg/kg. La invención también comprende composiciones que comprenden estas dosis de vector rAAV.

[0075] La administración de una dosis eficaz de las composiciones puede ser por medio de vías estándares en la técnica que incluyen, entre otras, intramuscular, parenteral, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, intracraneal, intraósea, intraocular, rectal o vaginal. Las vías de administración y serotipos de componentes de AAV del rAAV (en particular, las ITR de AAV y proteína de cápside) de la invención pueden ser seleccionadas y/o apareadas por las personas del oficio de nivel medio considerando el estado de infección y/o enfermedad que se trata y las células/tejidos diana que deben expresar el β -sarcoglicano.

[0076] La invención proporciona administración local y administración sistémica de una dosis eficaz de rAAV y composiciones de la invención. Por ejemplo, la administración sistémica es la administración en el sistema circulatorio de modo que el cuerpo entero está afectado. La administración sistémica incluye la administración entérica, tal como la absorción a través del tubo gastrointestinal, y la administración parenteral a través de inyección, infusión o implantación.

[0077] En particular, la administración real de rAAV de la presente invención se puede lograr mediante cualquier método físico que transporte el vector recombinante rAAV al tejido diana de un animal. La administración de acuerdo con la invención incluye, entre otros, inyección en el músculo, el torrente sanguíneo y/o directamente en el hígado. Se demostró que simplemente resuspender un rAAV en una solución salina amortiguada

con fosfato es suficiente para proporcionar un vehículo útil para la expresión en el tejido muscular, y no existen restricciones conocidas en los portadores u otros componentes que se pueden coadministrar con el rAAV (aunque se deben evitar las composiciones que degradan el ADN de manera normal con rAAV). Las proteínas de la cápside de un rAAV se pueden modificar con el fin de que el rAAV se dirija a un tejido diana particular de interés, tal como músculos. Véase, por ejemplo, WO 02/053703, cuya descripción se incorpora por referencia en la presente. Se pueden preparar composiciones farmacéuticas como formulaciones inyectables o como formulaciones tópicas para ser administradas a los músculos mediante transporte transdérmico. Varias formulaciones para inyección intramuscular y transporte transdérmico se desarrollaron anteriormente y se pueden usar en la práctica de la invención. El rAAV se puede usar con cualquier portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico para facilitar la administración y el manejo.

[0078] Para los fines de inyección intramuscular, se pueden usar soluciones en un adyuvante tal como aceite de sésamo o de maní, o en propilenglicol acuoso, y también soluciones acuosas estériles. Dichas soluciones acuosas se pueden amortiguar, si se desea, y el diluyente líquido se puede volver isotónico en primer lugar con solución salina o glucosa. Las soluciones de rAAV como un ácido libre (ADN que contiene grupos fosfato ácidos), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacológico, se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. Una dispersión de rAAV también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de estos, y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. En este sentido, los medios acuosos estériles empleados son fácilmente obtenibles mediante técnicas estándares conocidas por las personas del oficio de nivel medio.

[0079] Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de elaboración y almacenamiento y se debe preservar contra las acciones contaminantes de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de estos, y aceites vegetales. La correcta fluidez se puede

mantener, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en caso de una dispersión y usando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0080] Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de rAAV en la cantidad necesaria en el solvente adecuado con varios otros ingredientes mencionados anteriormente, según sea necesario, y la posterior esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del ingrediente activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son la técnica de secado al vacío y de liofilización que producen un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente deseado adicional de la solución previamente esterilizada por filtración de este.

[0081] La transducción con rAAV también se puede llevar a cabo *in vitro*. En una forma de realización, las células musculares diana deseadas se retiran del sujeto, se transducen con rAAV y se reintroducen en el sujeto. De manera alternativa, se pueden usar células musculares singénicas o xenogénicas cuando esas células no generarán una respuesta inmunitaria no adecuada en el sujeto.

[0082] Los métodos adecuados para la transducción y reintroducción de células transducidas en un sujeto se conocen en la técnica. En una forma de realización, las células se pueden transducir *in vitro* mediante combinación de rAAV con células musculares, por ejemplo, en medios adecuados, y cribado de esas células que tienen el ADN de interés mediante técnicas convencionales tales como transferencia Southern y/o PCR, o usando marcadores seleccionables. Las células transducidas pueden luego formularse en composiciones farmacéuticas, y la composición puede introducirse en el sujeto mediante diversas técnicas, tales como mediante inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal, o mediante inyección en músculo liso y cardíaco, usando, por ejemplo, un catéter.

[0083] La transducción de células con rAAV de la invención genera expresión sostenida de β -sarcoglicano. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos

para administrar rAAV que expresa β -sarcoglicano a un sujeto mamífero, preferentemente, un ser humano. Estos métodos incluyen transducir tejidos (que incluyen, entre otros, tejidos tales como músculos, órganos tales como hígado y cerebro, y glándulas tales como glándulas salivales) con uno o más rAAV de la presente invención. La transducción se puede llevar a cabo con casetes génicos que comprenden elementos de control específicos de tejidos. Por ejemplo, una forma de realización de la invención proporciona métodos de transducción de células musculares y tejidos musculares dirigidos por elementos de control específicos del músculo, que incluyen, entre otros, los derivados de las familias génicas de actina y miosina, tales como de la familia génica myoD [véase Weintraub *et al.*, *Science*, 251: 761-766 (1991)], el factor de fijación del potenciador específico de miocitos MEF-2 [Cserjesi y Olson, *Mol Cell Biol* 11: 4854-4862 (1991)], elementos de control derivados del gen de actina del músculo esquelético humano [Muscat *et al.*, *Mol Cell Biol*, 7: 4089-4099 (1987)], el gen de actina cardíaca, elementos de secuencia de creatina quinasa muscular [véase Johnson *et al.*, *Mol Cell Biol*, 9:3393-3399 (1989)] y el elemento potenciador de creatina quinasa murina (mCK), elementos de control derivados del gen de la troponina C de contracción rápida esquelética, el gen de la troponina C de contracción lenta cardíaca y el gen de la troponina I de contracción lenta: factores nucleares inducibles por hipoxia (Semenza *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 5680-5684 (1991)), elementos y promotores inducibles por esteroides, que incluyen el elemento de respuesta glucocorticoide (GRE) (véase Mader y White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5603-5607 (1993)), y otros elementos de control.

[0084] El tejido muscular es una diana atractiva para la administración de ADN *in vivo*, ya que no es un órgano vital y es de fácil acceso. La invención contempla la expresión sostenida de miARN de miofibras transducidas.

[0085] “Célula muscular” o “tejido muscular” se refieren a una célula o grupo de células derivadas de un músculo de cualquier tipo (por ejemplo, músculo esquelético y músculo suave, *por ejemplo*, del tracto digestivo, vejiga urinaria, vasos sanguíneos o tejido cardíaco). Dichas células musculares pueden ser diferenciadas o no diferenciadas, tales como mioblastos, miocitos, miotubos, cardiomiocitos y cardiomioblastos.

[0086] El término “transducción” se usa para referirse a la administración de un polinucleótido de interés (por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos que codifica β -sarcoglicano) a una célula receptora *in vivo* o *in vitro*, a través de un rAAV con deficiencia de replicación descrito que resulta en la expresión de β -sarcoglicano por la célula

receptora.

[0087] Por lo tanto, también se describen en la presente métodos de administración de una dosis eficaz (o más de una dosis, administradas esencialmente de forma simultánea o más de una dosis administradas en intervalos) de rAAV que codifica β -sarcoglicano a un sujeto mamífero que lo necesita.

[0088] Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la presente se incorporan por referencia en su totalidad como si se indicara de manera específica e individual que cada publicación o patente individual se incorpora por referencia. En caso de conflicto, la presente solicitud, que incluye cualquiera de las definiciones en la presente, prevalecerá.

[0089] La invención se describe adicionalmente en los siguientes Ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

[0090] *Modelos animales:* todos los procedimientos fueron aprobados por el Research Institute del Nationwide Children's Hospital Institutional Animal Care and Use Committee (protocolo AR12-00040). Se adquirieron ratones heterocigotos B6.129-Sgcb^{tm1Kcam/1J} del Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME, EE.UU.; cepa # 006832). Los ratones Sgcb^{-/-} se generaron reproduciendo ratones heterocigotos. Los ratones KO se reprodujeron y se mantuvieron como animales homocigotos en condiciones estandarizadas del Animal Resources Core del Research Institute en el Nationwide Children's Hospital. Los ratones se mantuvieron en una dieta para roedores Teklad Global Rodent Diet (alimento con 3,8z5 de fibra, 18,8 % de proteína, 5 % de grasa) con un ciclo de oscuridad:luz de 12 h. La identificación de ratones SGCB^{-/-} se realizó mediante genotipificación utilizando PCR. Todos los animales se alojaron en jaulas de ratón estándares con alimento y agua a demanda.

[0091] *Construcción de gene de beta-sarcoglicano.* El cADN de beta-sarcoglicano humano de longitud completa (N.º de acceso a GenBank NM_0034994.3) fue optimizado mediante codones y sintetizado por GenScript Inc, Piscataway, NJ, EE.UU. La optimización mediante codones a través de GenScript utiliza un algoritmo que considera los parámetros que incluyen la transcripción, el procesamiento y la estabilidad del mRNA, la traducción y el plegamiento de proteínas para diseñar una secuencia de cADN que produce la máxima expresión en el tejido muscular (www.genscript.com).

[0092] Para el constructo pAAV.tMCK.hSGCB, el cADN se clonó luego en un plásmido que contenía ITR de AAV2 y el casete incluía una secuencia de consenso

Kozak (CCACC), un intrón quimérico SV40 y un sitio de poliadenilación sintético (53 pb). El promotor de tMCK recombinante fue un obsequio del Dr. Xiao Xiao (Universidad de Carolina del Norte). Es una modificación del promotor de CK6 previamente descrito²⁷ e incluye una modificación en el potenciador corriente arriba de la región promotora que contiene sitios de fijación del factor de transcripción. El potenciador está compuesto por dos cajas E (derecha e izquierda). La modificación del promotor de tMCK incluye una mutación que convierte la caja E izquierda en una caja E derecha (modificación 2R) y una inserción de 6 bp (modificación S5). El vector pAAV.tMCK.hSGCB se construyó mediante ligadura del fragmento KpnI/XbaI de 1040 pb de pUC57-BSG (Genscript Inc.) en los sitios KpnI/XbaI de pAAV.tMCK.hSGCA.²⁶

[0093] El vector pAAV.MHCK7.hSGCB se construyó eliminando el promotor de tMCK y el intrón quimérico SV40 con sitios NotI/KpnI e insertando un fragmento amplificado por PCR que contenía el promotor de MHCK7 y el intrón quimérico SV40 idéntico con sitios NotI/KpnI. MHCK7 es un promotor a base de MCK que utiliza un potenciador de 206 pb tomado de ~1,2 kb 5' del sitio de inicio de la transcripción dentro del gen de la creatina quinasa del músculo endógeno con un promotor proximal (enh358MCK, 584-bp)^{3,12}. El promotor de MHCK7 contiene en sí mismo este casete CK7 modificado de la familia MCK de genes ligados a un potenciador 5' de α -MyHC (cadena pesada de α -miosina) de 188 pb de la porción CK para mejorar la expresión cardíaca¹². La porción creatina quinasa del promotor (CK) es 96 % idéntica entre tMCK y MHCK7. Finalmente, el vector pAAV.MHCK7.hSGCB se construyó mediante ligadura del fragmento de intrón NotI/KpnI MHCK7+ de 960 pb de pAAV.MHCK7.DYSF5'DV44 en los sitios NotI/KpnI de pAAV.tMCK.hSGCB (Pozgai et al., *Gene Ther.* 23: 57-66, 2016)

[0094] *Producción de rAAV.* Un enfoque de empaquetamiento cruzado modificado, previamente informado por Rodino-Klapac et al. (*J. Trans. Med.* 5:45, 2007), se usó para producir el vector rAAV. Aquí, un método de transfección triple con precipitación de CaPO_4 en células HEK293 permite que las ITR de AAV2 se empaqueten en un serotipo de la cápside de AAV diferente. (28,29) Los plásmidos de producción eran (i) pAAV.tMCK.hSGCB o pAAV.MHCK7.hSGCB, (ii) plásmidos auxiliares de AAV modificados por rep2-caprh.74 que codifican el aislado similar a serotipo 8 cap rh.74 y (iii) un plásmido auxiliar de adenovirus tipo 5 (pAdhelper) que expresa los genes de ARN E2A, E4 ORF6 y VA I/II de adenovirus. Los vectores se purificaron y encapsidaron (utilizando un sistema de detector Prism 7500 Taqman; PE Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.). El título vg se determinó como se describió previamente. 30 El cebador y la sonda fluorescente se dirigieron al promotor de tMCK y eran los siguientes:

cebador directo de tMCK, 5'-ACC CGA GAT GCC TGG TTA TAA TT-3 '(SEQ ID NO: 10); cebador inverso de tMCK, 5'-TCC ATG GTG TAC AGA GCC TAA GAC-3 '(SEQ ID NO: 11); y sonda de tMCK, 5'-FAM-CTG CTG CCT GAG CCT GAG CGG TTA C-TAMRA-3 '(SEQ ID NO: 12). El cebador y la sonda fluorescente se dirigieron al promotor de MHCK7 y eran los siguientes: cebador directo de MHCK7, 5'-CCA ACA CCT GCT GCC TCT AAA-3 '(SEQ ID NO: 16); cebador inverso de MHCK7, 5'-GTC CCC CAC AGC CTT GTT C-3 '(SEQ ID NO: 17); y sonda de MHCK7, 5'-FAM-TGG ATC CCC-Zen-TGC ATG CGA AGA TC-3IABKFQ-3 '(SEQ ID NO: 18).

[0095] *Administración de genes intramusculares.* Para inyección intramuscular, los ratones se anestesiaron y se mantuvieron en 1-4 % de isoflurano (en O₂). El compartimento anterior del miembro inferior izquierdo de los ratones SGCB^{-/-} de 4 a 6 semanas de vida se limpió con EtOH al 95 %, y luego se inyectó el músculo abdominal transversal (TA) con 3×10^{11} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB diluido en solución salina en un volumen de 30 μ l usando una jeringa de insulina ultrafina de calibre 30. El músculo contralateral no se trató para servir como control. El músculo TA de ambos miembros se retiró 6 (n = 9, 4 machos, 5 hembras) o 12 (n = 6, 4 machos, 2 hembras) semanas después de la inyección para evaluar la eficacia de la transferencia de genes. En experimentos con ratones de 6 meses de vida (n = 5, 5 machos), el tratamiento consistió en inyección intramuscular en el TA izquierdo con 3×10^{11} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. Para experimentos de perfusión de miembros aislados, se perfundieron ratones sgcb^{-/-} de 4 (n = 5, 5 machos) y 5 (n = 4, 2 machos, 2 hembras) semanas de vida con 5×10^{11} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB mediante inyección en la arteria femoral como se describió previamente¹⁹. Los animales se sometieron a eutanasia, y los músculos se analizaron 8 semanas después de la transferencia de genes.

[0096] *Administración sistémica de genes:* la administración sistémica se logró mediante la inyección de un vector en la vena de la cola de ratones sgcb^{-/-}. Se inyectó a los ratones con 1×10^{12} vg de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB diluido en solución salina en un volumen de 212 μ l mediante una jeringa de insulina ultrafina de calibre 30. Los ratones se contuvieron en un tubo de retención colocando la cola hacia atrás a través de la ranura de la cola para calentarla y dilatar los vasos sanguíneos para facilitar la inyección. Después de ubicar la arteria en la línea central de la cola, la inyección se realizó en una de las venas laterales violeta/azul que se extienden a lo largo de la arteria de la cola. Todos los ratones tratados se inyectaron a las 4-5 semanas de vida y se sometieron a eutanasia 6 meses después de la inyección.

[0097] *Generación de fuerza de EDL y protección contra contracciones excéntricas.* Se realizó un análisis fisiológico de los músculos EDL de ratones tratados mediante perfusión aislada (ILP). El músculo EDL de ambos miembros inferiores de los ratones tratados se disecó en los tendones y se sometió a un protocolo de fisiología para evaluar la función que fue descrita previamente por nuestro laboratorio y otros (19,31) con algunas adaptaciones. Durante el protocolo de contracción excéntrica, se realizó un procedimiento de estirado-realargamiento del 5 % ejecutado entre 500 y 700 ms (estirado del 5 % durante 100 ms, seguido del retorno a la longitud óptima en 100 ms). Después del protocolo de contracción tetánica y excéntrica, se extrajo el músculo, se pesó en húmedo, se montó en un portabrocas utilizando goma tragacanto y luego se congeló en metilbutano enfriado en nitrógeno líquido.

[0098] *Generación de fuerza de TA y protección contra contracciones excéntricas.* Se realizó un protocolo para evaluar los resultados funcionales en el músculo TA en músculos extraídos de ratones tratados mediante inyección IM. Este procedimiento TA se describe en varios estudios previos. (32,33) Después de las contracciones excéntricas, los ratones se sometieron a eutanasia y el músculo TA se disecó, se pesó y se congeló para el análisis. El análisis de los datos se realizó a ciegas, pero no al azar.

[0099] *Inmunofluorescencia.* Las secciones de criostato (12 µm) se incubaron con un anticuerpo primario monoclonal de beta-sarcoglicano humano (Leica Biosystems, New Castle, Cat; N.º NCL-Lb-SARC) a una dilución de 1:50 en un amortiguador de bloqueo (1 × TBS, 10 % de suero de cabra, 0,1 % de Tween) durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Luego, las secciones se lavaron con TBS tres veces, cada una durante 20 minutos y se volvieron a bloquear durante 30 minutos. Se aplicó el anticuerpo IgG1 secundario anti-ratón de cabra conjugado AlexaFluor 594 (Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.; N.º A21125) a una dilución 1:250 durante 45 min. Las secciones se lavaron en TBS tres veces durante 20 min y se montaron con un medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Se tomaron cuatro imágenes × 20 aleatorias que cubrían los cuatro cuadrantes diferentes de la sección muscular usando una cámara Zeiss AxioCam MRC5. Se determinó el porcentaje de fibras positivas para la tinción de beta-sarcoglicano (450 % de la intensidad de tinción de la membrana muscular) para cada imagen y se promedió para cada músculo.

[00100] *Análisis de transferencia Western.* Las secciones de tejido del músculo TA tratado izquierdo y el músculo TA contralateral derecho (20-20 micrómetros de espesor) se recolectaron en una microcentrífuga y se homogeneizaron con 100 µl de

amortiguador de homogeneización (125 mM de Tris-HCl, 4 % de SDS, 4 M de urea). en presencia de 1 comprimido de cóctel de inhibidor de proteasa (Roche, Indianapolis, IN, EE.UU.). Después de la homogeneización, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. La proteína se cuantificó en NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Las muestras de proteínas (20 µg) se sometieron a electroforesis en un gel de tris-acetato de poliacrilamida al 3-8 % (NuPage, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) durante 1 h 5 min a 150 V y luego se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE.UU.) durante 1 h 15 min a 35 V. La membrana se bloqueó en leche descremada en polvo al 5 % en TBST durante 1 h, y luego se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo de beta-sarcoglicano humano (Novus Biologicals, Littleton, CO, EE.UU.; Cat. N.º NBP-1–90300 1:100 o dilución 1:250) y un anticuerpo monoclonal de ratón de gamma-tubulina 1:5000 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.; Cat. N.º T6557) o una dilución 1:5000 de un anticuerpo de a-actinina de ratón monoclonal de ratón (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.; N.º A7811). Se usaron una dilución 1:500 de un anticuerpo de troponina I cardíaca de ratón policlonal de conejo (Abcam, Cambridge, MA; N.º ab47003) y una dilución 1:1000 de un anticuerpo de vinculina de ratón monoclonal de conejo (Invitrogen, Frederick, MD; Cat. N.º 70062). Se utilizaron anticuerpos de HRP secundarios anti-ratón (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.; Cat. N.º AP308P) y anti-conejo (Life Technologies; Cat N.º 656120) para la inmunodetección ECL.

[00101] *Ensayo EBD.* Se administró una dosis de 3×10^{10} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB en ratones sgcb^{-/-} de 4 semanas de vida en el TA izquierdo mediante una inyección intramuscular. Cuatro semanas después de la inyección, se inyectó a los ratones en la cavidad intraperitoneal del lado derecho a 5 µl/g de peso corporal de un EBD esterilizado por filtración de 10 mg/ml en una solución de amortiguador de fosfato 1x. Los ratones se sometieron a eutanasia 24 horas después de la inyección y los tejidos se recolectaron y se dividieron. Las secciones se fijaron en acetona fría durante 10 minutos y luego se usó el protocolo de inmunofluorescencia para teñir el beta-sarcoglicano humano.

[00102] *Análisis morfométrico.* Los diámetros de fibras musculares y el porcentaje de miofibras con núcleos ubicados en el centro se determinaron a partir de los músculos TA y GAS teñidos con hematoxilina y eosina (H&E). Se tomaron cuatro imágenes aleatorias $\times 20$ por sección por animal con una cámara Zeiss AxioCam MRC5. Las fibras centralmente nucleadas se cuantificaron usando el software NIH ImageJ (Bethesda, MD, EE.UU.). Los diámetros de fibras se midieron como el diámetro más corto a través de la

fibra muscular utilizando el software Zeiss Axiovision LE4 (Carl Zeiss Microscopy, Múnich, Alemania).

[00103] *Análisis de biodistribución de qPCR.* La PCR cuantitativa Taqman se realizó para cuantificar el número de copias del genoma del vector presentes en el músculo contralateral diana y no diana, así como en órganos no diana como se describió anteriormente. (18,30) Se utilizó un conjunto de sonda de cebador específico del vector para amplificar una secuencia de la región intrónica directamente corriente abajo del promotor de tMCK que es único y que está localizado dentro del casete de transgén scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. Los siguientes cebadores y sonda se usaron en este estudio: cebador directo de intrón tMCK y MHCK7 5'-GTG AGG CAC TGG GCA GGT AA -3' (SEQ ID NO: 13); cebador inverso de intrón tMCK y MHCK7 5'-ACC TGT GGA GAG AAA GGC AAA G -3' (SEQ ID NO: 14); y sonda de intrón tMCK y MHCK7 5'-6FAM-ATC AAG GTT ACA AGA CAG-GTT TAA GGA GAC CAA TAG AAA -tamra-3' (IDT) (SEQ ID NO: 15). El número de copias se informa como genomas del vector por microgramo de ADN genómico. *Inmunohistoquímica para la tinción de células inmunitarias.* La inmunohistoquímica se usó para identificar células inmunitarias. Se incubaron secciones de tejido congelado en portaobjetos de microscopio Fisherbrand Superfrost con anticuerpos monoclonales anti-ratón de rata usando un kit de detección de anti-Ig de rata HRP (BD Pharmagen, San José, CA, EE. UU.; Cat: 551013): CD3 (Cat: 555273), CD4 (Cat: 550280), CD8 (Cat: 550281) y Mac-3 para macrófagos (Cat: 550292). Todos los anticuerpos primarios se diluyeron a 1:20 con solución salina amortiguada con fosfato. La tinción inmunológica positiva se visualizó usando cromógeno DAB diluido en amortiguador DAB con estreptavidina peroxidasa HRP Vectastain ABC Peroxidase. Se tomaron diez imágenes aleatorias $\times 40$ para cada músculo y cada tinción correspondiente. El número de células mononucleares se contó y se expresó como número total por mm^2 .

[00104] *Tinción con rojo picrosirio y cuantificación de colágeno.* Las secciones congeladas colocadas en los portaobjetos de microscopio cargados Fisherbrand Superfrost se fijaron en formalina amortiguada neutra al 10 % durante 5 min, luego se enjuagaron en agua destilada. Los portaobjetos fueron incubados en la solución A (ácido fosfomolibdico) del kit de tinción con rojo picrosirio (Polysciences Inc., Warrington, PA, EE.UU., catálogo N.º 24901) durante 2 min. Después de un enjuague exhaustivo en agua destilada, los portaobjetos se colocaron en la solución B (rojo directo 80/2 4 6-trinitrofenol) durante 15 min, y luego se enjuagaron adicionalmente en agua destilada y luego se incubaron en la solución C (ácido clorhídrico 0,1 N) durante 2 min. Los

portaobjetos se contratiñeron durante 2,5 minutos con 1 % de verde rápido en ácido acético glacial al 1 % de Poly Scientific (catálogo N.º S2114) usando una dilución 1:10 en agua desionizada. Finalmente, los portaobjetos se enjuagaron nuevamente en agua destilada, se deshidrataron en etanol graduado, se aclararon en xileno y se montaron con cubreobjetos utilizando medio Cytoseal 60 de Thermo-Scientific (Waltham, MA, EE.UU.; cat. N.º 8310). Las imágenes se tomaron usando el software AxioVision 4.9.1 (Carl Zeiss Microscopy). Para el análisis de la tinción con rojo sirio y la cuantificación del % de colágeno, el contraste entre los colores rojo y verde se mejoró con Adobe Photoshop. Se seleccionó el *plugin* de deconvolución de color en el programa de software ImageJ y se utilizó la opción de deconvolución de color RGB. La imagen roja incluye todo el tejido conectivo de la tinción con rojo sirio. La imagen verde incluye todos los músculos de la contratinción con verde rápido. Solo se usaron la imagen roja y la imagen original. Luego se aplicó un umbral a las imágenes para obtener imágenes en blanco y negro con áreas positivas para colágeno en negro y áreas negativas en blanco. Se calculó el área de colágeno usando la función de medición. Luego se determinó el área de tejido total convirtiendo la imagen original a "8 bits" y ajustando el umbral a 254, que será una unidad por debajo de la saturación completa de la imagen. El área total del tejido se midió luego como se hizo previamente y se registró el área total. El porcentaje de colágeno se calculó luego dividiendo el área del colágeno con el área total del tejido. Se calculó el porcentaje promedio para cada individuo.

[00105] *Contracción tetánica del diafragma para la evaluación funcional:* los ratones se sometieron a eutanasia, y se disecó el diafragma con las uniones de las costillas y el tendón central intactos, y se colocaron en el amortiguador K-H como se describió previamente por Beasom et al. (*Am. J. Pathol.* 179: 2464-74, 2011), Rafael-Forney et al. (*Circulation* 124: 582-8, 2011 and Moorwood et al. (*J. Visualized Experiments* 71:e50036, [¿año?]). Se aisló una sección de 2 a 4 mm de ancho de diafragma. Las tiras de diafragma se ataron firmemente con seda quirúrgica trenzada (6/0; Surgical Specialties, Reading, PA) en el tendón central, y se suturaron a través de una porción de costilla fijada al extremo distal de la tira. Cada músculo se transfirió a un baño de agua lleno de solución K-H oxigenada que se mantuvo a 37 ° C. Los músculos se alinearon horizontalmente y se unieron directamente entre un pasador fijo y un servomotor transductor de fuerza de modo dual (305C; Aurora Scientific, Aurora, Ontario, Canadá). Dos electrodos de placa de platino se colocaron en el baño de órganos para flanquear la longitud del músculo. El músculo se estiró a la longitud óptima para la medición de contracciones y luego se dejó reposar durante 10 minutos antes del

inicio del protocolo tetánico. Una vez que el músculo se estabiliza, el músculo se establece en una longitud óptima de 1 g y se somete a un calentamiento que consta de tres contracciones de 1 Hz cada 30 segundos, y luego tres contracciones de 150 Hz por minuto. Después de un período de descanso de 3 minutos, el diafragma se estimula a 20, 50, 80, 120, 150, 180 Hz, lo que permite un período de descanso de 2 minutos entre cada estímulo, cada uno con una duración de 250 ms para determinar la fuerza tetánica máxima. Se midió la longitud y el peso muscular. La fuerza se normalizó para el peso y la longitud del músculo.

[00106] *Imagen por resonancia magnética cardíaca:* La función cardíaca se analizó usando un sistema de imagen por resonancia magnética (IRM) de orificio horizontal 9.4T y una bobina de volumen de ratón (Bruker BioSpin, Billerica, MA, EE.UU.). Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2,5 % mezclado con carbógeno (1 l/min) durante 3 minutos antes de la colocación en el lecho de imagen. Tras la colocación de los ratones en los aparatos de imágenes y el inicio de la formación de imágenes, la mezcla de isoflurano/ carbógeno se redujo al 1,5 % durante el resto del estudio. EKG y la respiración se controlaron usando un sistema compatible con MRI (Modelo 1025, Small Animal Instruments, Stonybrook, NY, EE.UU.). Se adquirieron imágenes FLASH cine-T1 con eje corto cardíaco obloqueadas en todo el ventrículo izquierdo (LV) del ratón (TR = 8 ms; TE = 2,8 ms; α = 180; matriz = 256 × 256; FOV = 3,0 × 3,0 cm); espesor de corte = 1 mm, nrebanadas = 7, hasta 20 cuadros por ciclo cardíaco). Para el análisis de imágenes, se identificaron el punto de tiempo telediastólico y telesistólico de cada imagen de eje corto y se trazaron manualmente los límites cardíacos endocárdico y epicárdico. Los músculos papilares fueron excluidos del límite endocardiaco del LV. A partir de estas áreas medidas, se calcularon el volumen telediastólico (EDV), el volumen telesistólico (EVS), el volumen sistólico (SV), el gasto cardíaco (GC), la fracción de eyección (FE) y la masa de LV promedio.

[00107] *Inmunofluorescencia:* secciones de crióstato (12 μ m) del tibial anterior (TA), gastrocnemio (GAS), cuádriceps (QUAD), psoas mayor (PSOAS), glúteos (GLUT), tríceps (TRI) y músculos del diafragma junto con el corazón fueron sometidos a la tinción por inmunofluorescencia para el transgén hSGCB a través del protocolo usado previamente como se describe en Pozgai et al., Gene Therap. 23: 57-66, 2016. Las secciones se incubaron con un anticuerpo primario monoclonal de ratón de beta-sarcoglicano humano (Leica Biosystems, New Castle, U.K.; Cat; N.º NCL-Lb-SARC) a una dilución de 1:100. Se tomaron cuatro imágenes × 20 aleatorias que cubrían los cuatro cuadrantes diferentes de la sección muscular usando una cámara Zeiss AxioCam

MRC5. Se determinó el porcentaje de fibras positivas para la tinción de beta-sarcoglicano (>50 % de la tinción de la membrana muscular) para cada imagen y se promedió para cada músculo.

[00108] *Análisis morfométrico:* la tinción con hematoxilina y eosina (H y E) se realizó en criosecciones de músculo de 12 µm de espesor de ratones C57BL6 WT de 7 meses de vida (n = 5), ratones *sgcb*^{-/-} (n = 5) y ratones *sgcb*^{-/-} tratados con rAAV.MHCK7.hSGCB durante 6 meses (n = 5) para el análisis. El porcentaje de miofibras con núcleos centrales se determinó en los músculos TA, GAS, QUAD, PSOAS, GLUT, TRI y diafragma. Además, se midieron los diámetros de fibras musculares en los músculos GAS, PSOAS y TRI. Se tomaron cuatro imágenes aleatorias × 20 por músculo por animal con una cámara Zeiss AxioCam MRC5. Las fibras centralmente nucleadas se cuantificaron usando el software NIH ImageJ y los diámetros de fibras se midieron usando el software Zeiss Axiovision LE4.

[00109] *Imágenes de rayos X:* Se realizaron radiografías de cuerpo completo en ratones C57BL6 WT de 7 meses de vida anestesiados (n = 6), ratones *sgcb*^{-/-} no tratados (n = 6) y ratones *sgcb*^{-/-} tratados con rAAV.MHCK7.hSGCB durante 6 meses (n = 6) que utilizan el sistema digital de rayos X Faxitron MX-20 a 26 kV durante 3 segundos (Faxitron X-Ray Corp, Lincolnshire, EE.UU.).

[00110] *Monitoreo láser de la actividad de la caja de campo abierto:* Se usó una cámara de actividad de campo abierto para determinar la actividad general de los ratones experimentales. Los ratones a los 7 meses de vida de los grupos de control C57BL6 WT (n = 6) y *sgcb*^{-/-} no tratado (n = 6) junto con los ratones *sgcb*^{-/-} tratados con rAAV.MHCK7.hSGCB durante 6 meses (n = 6) fueron sometidos al análisis siguiendo un protocolo previamente descrito (Kobayashi y col., *Nature* 456: 511-5, 2008, Beasom y col., *Am. J. Pathol.* 179: 2464-74, 2011) con varias modificaciones. Todos los ratones fueron evaluados a la misma hora del día temprano en la mañana cerca del final del ciclo nocturno cuando los ratones están más activos. Todos los ratones fueron probados en una habitación aislada, con poca luz y con el mismo controlador cada vez. Para reducir la ansiedad y mantener al mínimo las variables de comportamiento, que podrían afectar potencialmente la actividad normal de los ratones y, en consecuencia, los resultados del ensayo, los ratones evaluados no se alojaron individualmente (Voikar y col., *Genes Brain Behav.* 4: 240 - 52, 2005). Se controló la actividad de los ratones usando el sistema Photobeam Activity (San Diego Instruments, San Diego, CA). Este sistema usa una red de haces de luz infrarroja invisibles que atraviesan la cámara del animal de adelante para atrás y de izquierda a derecha para controlar la posición y el

movimiento del ratón dentro de un plano X-Y-Z. La actividad se registró durante ciclos de 1 hora a intervalos de 5 minutos. Los ratones se aclimataron a la sala de prueba de actividad durante una sesión inicial de 1 hora varios días antes de comenzar la adquisición de datos. Los ratones se evaluaron en cámaras individuales en grupos de 4. El equipo de prueba se limpió entre cada uso para reducir las variables de comportamiento reaccionario del ratón que podrían alterar los resultados. Los datos recopilados se convirtieron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel y todos los cálculos se realizaron dentro del programa Excel. Los cortes del haz individuales para el movimiento en los planos X e Y se suman para cada ratón para representar la ambulación total, y los cortes del haz en el plano Z se suman para obtener actividad vertical dentro del intervalo de tiempo de 1 hora.

Ejemplo 1

Construcción de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB y potencia del vector

[00111] Se construyó el casete de transgén que contiene un cADN SCGB humano de longitud completa optimizado mediante codones, como se muestra en la Figura 1A. El casete incluye una secuencia de consenso Kozak (CCACC), un intrón quimérico SV40, un sitio de poliadenilación sintético y el promotor de tMCK específico del músculo (20) usado para dirigir la expresión del casete. El casete se empaquetó en un vector AAVrh.74 autocomplementario (sc) que es homólogo en un 93 % a AAV8. Se ha demostrado que AAVrh.74 en ratones y primates no humanos es seguro y eficaz, particularmente al cruzar la barrera vascular cuando se administra al músculo a través de la circulación. (17, 18, 21) La potencia del vector se estableció mediante inyección intramuscular en el músculo TA izquierdo en el ratón Sgcb-null. La administración de 3×10^{10} vg transdujo $70,5 \pm 2,5$ % de fibras musculares y de 1×10^{11} vg transdujo $89,0 \pm 4,0$ % de fibras musculares, 3 semanas después de la transferencia de genes.

Ejemplo 2

Administración intramuscular de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

[00112] Después de la potencia del vector, los estudios se ampliaron para analizar la eficacia de la terapia 6 y 12 semanas después de la transferencia de genes. Como resultado de los altos niveles de expresión después del breve estudio de potencia de 3 semanas, se seleccionó una dosis de 3×10^{10} vg total para estudios posteriores para utilizar la dosis efectiva más baja. Se trataron ratones sgcb^{-/-} de cinco semanas de vida con 3×10^{10} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB por vía intramuscular al abdominal transversa izquierda (TA), y se demostró la expresión de β -sarcoglicano mediante inmunofluorescencia en $88,4 \pm 4,2$ % de fibras musculares 6 semanas después de la

inyección ($n = 9$), y en $76,5 \pm 5,8$ % de fibras musculares 12 semanas después de la inyección ($n = 6$), y la expresión se confirmó a través transferencia Western (Figura 1B). La expresión de β -sarcoglicano estuvo acompañada por la restauración de los componentes del complejo proteico asociado a la distrofina (α -sarcoglicano y distrofina) (Figura 1C). Mediante el uso del colorante azul Evans (EBD) como marcador de permeabilidad de la membrana (22, 23), se descubrió que todas las fibras que expresan β -sarcoglicano exógeno estaban protegidas contra la filtración y la inclusión de EBD (Figura 1D). El músculo de los ratones $sgcb^{-/-}$ exhibe una distrofia muscular grave con fibras centralmente nucleadas, necrosis frecuente de fibras musculares, tejido fibrótico y variabilidad significativa del tamaño de las fibras representada por fibras atróficas e hipertróficas. (3, 4) Como se ve en la Figura 2A, la tinción con hematoxilina y eosina muestra una mejora global en el fenotipo distrófico del músculo enfermo, que incluye una reducción en los núcleos centrales ($sgcb^{-/-}$ no tratados— $76,8 \pm 2,3$ % en comparación con los tratados con AAV.hSGCB — $38,86 \pm 3,5$ %; $P < 0,0001$) (Figura 2C). También se observó la normalización de la distribución del tamaño de fibra, con un aumento en el diámetro promedio de fibra después del tratamiento ($sgcb^{-/-}$ no tratados— $32,6 \pm 0,31$ μm en comparación con los tratados con AAV.hSGCB— $35,56 \pm 0,22$ μm ; $P < 0,0001$) (Figura 2D).

[00113] La característica histopatológica del ratón $sgcb^{-/-}$ es la fibrosis caracterizada por un reemplazo generalizado del tejido muscular principalmente con colágenos junto con otros componentes de la matriz extracelular tales como fibronectina, elastina, laminina y decorina. (14) Este reemplazo del tejido muscular por el tejido conectivo supone un desafío al valor potencial del reemplazo génico y puede limitar el grado de mejora. (24) Para evaluar esto, los ratones tratados durante 12 semanas se sometieron a un ensayo para la reducción de la fibrosis. El músculo TA se evaluó específicamente ya que se estableció su grado inherente de fibrosis en el modelo KO y porque representa un objetivo potencial después de la administración del gen ILP vascular. La tinción con rojo picrosirio para el colágeno, tipos I y III, de músculos TA mostró una reducción significativa (52,74 %) en la cantidad de colágeno presente en músculo tratado con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB en comparación con músculo de ratón $sgcb^{-/-}$ no tratado ($20,7 \pm 0,57$ % en comparación con $43,8 \pm 2,3$ %, tratado con AAV.hSGCB en comparación con $sgcb^{-/-}$ no tratado, respectivamente; $P < 0,0001$) (Figuras 2b y e). El músculo de $sgcb^{-/-}$ no tratado de ratones de 5 semanas de vida a la edad de la inyección tenía un depósito de colágeno de $24,05 \pm 1,5$ %, lo que indicaba una leve reducción (14,0 %) en la cantidad de colágeno después de las 12 semanas de tratamiento.

Ejemplo 3

Corrección funcional en el músculo esquelético después de la transferencia de genes scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

[00114] Para determinar si la transferencia del gen hSGCB puede mejorar la función muscular, se evaluaron las propiedades funcionales del músculo TA de ratones *sgcb*^{-/-} tratados con scAAVrh.74.tMCK. Después de la administración intramuscular de 3×10^{10} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB al TA de ratones *sgcb*^{-/-} de 4 semanas de vida, 6 semanas después del tratamiento, los músculos TA se sometieron a mediciones de fuerza *in situ* (n = 4). Los músculos tratados se compararon con los músculos contralaterales no tratados y los de los ratones C57BL/6 WT. El músculo tratado con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB mostró una mejora significativa tanto en la fuerza tetánica absoluta como en la fuerza específica normalizada (Figuras 3A y B). Los músculos tratados tenían una fuerza absoluta promedio de $1436,9 \pm 199,5$ mN en comparación con $770,9 \pm 118,3$ mN para los controles *sgcb*^{-/-} no tratados ($P < 0,01$). De manera similar, los músculos TA tratados produjeron una fuerza específica promedio de $254,01 \pm 6,9$ mN/mm² y los músculos no tratados produjeron $124,2 \pm 13,9$ mN/mm² de fuerza ($P < 0,01$). Finalmente, los músculos tratados con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB mostraron una mayor resistencia a la lesión inducida por la contracción en comparación con los músculos de control no tratados (Figura 3C). Los músculos TA tratados perdieron $34,0 \pm 5,1$ % de fuerza que se produjo después de la primera contracción mientras que los músculos enfermos no tratados perdieron $54,1 \pm 3,8$ % ($P < 0,01$) de fuerza después del protocolo de contracción excéntrica. Estos datos muestran que la transferencia de genes hSGCB proporciona un beneficio funcional al músculo enfermo con deficiencia de β -sarcoglicano.

Ejemplo 4

Tratamiento de músculo envejecido con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

[00115] Los estudios de progresión de la enfermedad en este modelo murino de LGMD2E han demostrado que aunque la reestructuración tisular más grave en el músculo ocurre entre 6 y 20 semanas, la histopatología del músculo continúa empeorando con la edad, y se asemeja a la progresión de la enfermedad en pacientes (3, 4, 14). En consecuencia, para imitar un entorno clínico donde el tratamiento ocurriría a una edad más avanzada con deterioro muscular más avanzado y fibrosis endomisial, se trataron ratones *sgcb*^{-/-} de 6 meses de vida (n = 5) por vía intramuscular en el TA con 3×10^{10} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. Después de 12 semanas de tratamiento, a los 9 meses de vida, se transdujeron $80,1 \pm 4,8$ % de las fibras musculares (Figura 4A).

La tinción con rojo picrosirio para colágeno tipos I y III mostró una reducción del 42,2 % en la cantidad de colágeno presente en los ratones tratados en comparación con el músculo de ratón *sgcb*^{-/-} no tratado (tratado con AAV.hSGCB—20,0±0,80 % en comparación con *sgcb*^{-/-} no tratado—34,6±1,4 %, $P<0,0001$) (Figuras 4B y C). A la edad del tratamiento, los ratones *sgcb*^{-/-} de 6 meses de vida tienen un depósito de colágeno de 30,8±2,0 % ($n = 4$, 4 machos); por lo tanto, estos resultados indican que el tratamiento con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB no solo previene, sino que también tiene el potencial de revertir la fibrosis existente.

Ejemplo 5

ILP de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB en ratones *sgcb*^{-/-}

[00116] La capacidad de dirigirse a múltiples músculos en un miembro permite un método de administración clínicamente más relevante para la aplicación a pacientes con LGMD2E. La administración de 5×10^{11} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB mediante ILP en ratones *sgcb*^{-/-} de 4 a 6 semanas de vida ($n = 9$, 7 machos, 2 hembras) se analizó 2 meses después de la transferencia de genes. La expresión de β -sarcoglicano alcanzó 91,8±4,7% de fibras en el músculo gastrocnemio (GAS) y 90,6±2,8 % en TA (Figura 5A). La administración ILP de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB resultó en una protección significativa contra la lesión inducida por la contracción excéntrica ($P<0,05$), que no fue diferente de WT, en comparación con los músculos contralaterales no tratados (Figura 5C). La administración vascular también restauró los parámetros histopatológicos del músculo (Figura 5B). Los núcleos centrales disminuyeron en el TA (*sgcb*^{-/-} no tratado—76,9±2,8 % en comparación con el tratado con AAV.hSGCB—23,2±5,7 %, $P<0,001$) y GAS (*sgcb*^{-/-} no tratado—78,2 ± 2,4 % en comparación con el tratado con AAV.hSGCB—16,8±6,6 %, $P<0,001$). La transferencia de genes también condujo a un aumento en el tamaño promedio de fibra en el TA (*sgcb*^{-/-} no tratado—30,53±0,52 μm en comparación con el tratado con AAV.hSGCB—41,9±0,46 μm ; $P<0,0001$) y GAS (*sgcb*^{-/-} no tratado—38,9±0,37 μm en comparación con tratado con AAV.hSGCB—33,3±0,44 μm ; $P<0,0001$), con la normalización de la distribución del diámetro de fibra. se observó una disminución sustancial (~60 %) en la cantidad de células CD3, células CD4 y macrófagos (Tabla 1).

Tabla 1. Respuesta inmunitaria en ratones tratados con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB mediante ILP

<i>Tipo de células</i>	Células de TA izq. tratado/mm ²	Células de TA der. no tratado/mm ²	Células de TA SGCB -/- no inyectado/mm ²
CD3	15.6 ± 3.2	37.85 ± 6.2	29.8 ± 1.7
CD4	20.9 ± 4.7	58.1 ± 2.9	49.0 ± 0.8
CD8	8.2 ± 1.8	12.7 ± 2.4	15.5 ± 5.8
Macrófago	28.2 ± 5.0	75.2 ± 5.6	100.2 ± 5.9

Abreviaturas: ANOVA, análisis de varianza; ILP, perfusión de miembros aislados; SGCB, β -sarcoglicano; TA, tibial anterior. Cuantificación de células inmunitarias presentes en ratones SGCB -/- no inyectados, y músculo no tratado o tratado con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. Los datos mostrados son luego de la administración IPL del virus y representan la media de la cantidad de células/mm² ± s.e.m., $n=8$ por grupo. Un ANOVA de un factor se usó para comparar valores de tres cohortes diferentes. Los niveles de células inmunitarias disminuyeron con una diferencia estadísticamente significativa ($P<0.01$) entre TA izquierdo tratado y TA derecho no tratado y/o TA izquierdo tratado y TA no inyectado en todas las tinciones excepto para CD8.

[00117] La tinción con rojo picrosirio de los músculos TA y GAS también mostró una reducción significativa en la cantidad de colágeno en comparación con el músculo de sgcb^{-/-} no tratado tras la administración vascular (Figura 6a). Los niveles de colágeno en el TA se redujeron a 21,6±1,3 % en el músculo tratado en comparación con 40,2±1,5 % en los ratones sgcb^{-/-} no tratados a la edad del final del estudio ($P<0,0001$). Como se indicó anteriormente, los ratones sgcb^{-/-} a la edad de la inyección presentaron 24,1±1,5 % de colágeno en el músculo TA, lo que indica nuevamente una leve reducción (10,0 %) en el depósito de colágeno después de 8 semanas de tratamiento. De manera similar, la tinción del músculo GAS mostró que los ratones tratados tenían 22,9 ± 0,99% de colágeno en comparación con 37,9±1,3 % en ratones sgcb^{-/-} no tratados en la final del estudio ($P<0,0001$). La PCR cualitativa se realizó para detectar los niveles de transcripto de colágeno en el músculo, lo que se correlaciona con los resultados de la tinción con rojo sirio. Tomados en conjunto, estos datos muestran que la administración mediada por AAV de β -sarcoglicano humano reduce la fibrosis muscular, mejora la función muscular y revierte la patología distrófica de músculo enfermo de sgcb^{-/-}.

Ejemplo 6

Seguridad y biodistribución de rAAVrh.74.tMCK.hSGCB

[00118] Inicialmente, los ratones WT normales inyectados con 3×10^{10} vg de

scAAVrh.74.tMCK.hSGCB por vía intramuscular en el TA no mostraron signos de toxicidad por la tinción con H y E, lo que indica que no hay efectos adversos debidos al virus. Tras la administración vascular ILP de una dosis total de 5×10^{11} vg de scAAVrh.74.tMCK.hSGCB como se describe en la sección anterior, se evaluó la seguridad en un pequeño grupo de ratones en esta cohorte (n = 4). En primer lugar, se analizaron los músculos diana con expresión génica significativa, así como los órganos no diana, que incluyen corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, gónadas y diafragma histológicamente. Las secciones de parafina fueron analizadas formalmente por un patólogo veterinario, y no hubo evidencia de toxicidad en ningún órgano anotado (no se muestran los datos). La expresión de proteínas y la biodistribución de vectores también se evaluaron en todos los tejidos y órganos anteriores con transferencia Western y qPCR, respectivamente. Se detectaron copias del genoma de vector en todos los órganos evaluados; sin embargo, no se detectó expresión de proteína en ninguna muestra que no sea el músculo tratado (Figura 7). Finalmente, un análisis de los pesos húmedos de músculo tratado y no tratado no muestra una diferencia o tendencia significativa cuando se comparan los pesos promedio de cualquier cohorte (no se muestran los datos). Estos datos proporcionan evidencia de que el promotor de tMCK específico del músculo limita la expresión al músculo esquelético, y el vector no es tóxico.

Ejemplo 7

Déficits histológicos y funcionales en el corazón y el diafragma de ratones SGCB-/-

[00119] Los ratones WT y SGCB-/- de 7 meses de vida (n = 6 por cepa) que no fueron tratados fueron analizados mediante MRI cardíaca y fisiología de diafragma para buscar déficits. Después de estos análisis, los animales fueron sacrificados y evaluados mediante histopatología (Figura 8). La tinción con tricromo mostró fibrosis extensa (tinción roja) tanto en el diafragma (Figura 8A) como en el corazón (Figura 8C). Esto fue acompañado por déficits funcionales de fuerza específica en el diafragma (116,24 mN/mm² SGCB-/- en comparación con 236,67 mN/mm² WT, Figura 8B), y un déficit significativo en la fracción de eyección se midió mediante MRI (WT, 78 % en comparación con SGCB-/-, 65 %, la Figura 8D).

Ejemplo 8

Construcción de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB y potencia del vector

[00120] Se construyó el casete de transgén que contiene un cADN SCGB humano de longitud completa optimizado mediante codones, como se muestra en la Figura 9A.

El casete incluye una secuencia de consenso Kozak (CCACC), un intrón quimérico SV40, un sitio de poliadenilación sintético y el promotor de MHCK7 específico del músculo usado para dirigir la expresión del casete. Este es un promotor a base de MCK que utiliza un potenciador de 206 pb tomado de ~1,2 kb 5' del sitio de inicio de la transcripción dentro del gen de la creatina quinasa del músculo endógeno con un promotor proximal (enh358MCK, 584-bp)^{3,12}. El casete se empaquetó en un vector AAVrh.74 autocomplementario (sc) que es homólogo en un 93 % a AAV8. Se ha demostrado que AAVrh.74 en ratones y primates no humanos es seguro y eficaz, particularmente al cruzar la barrera vascular cuando se administra al músculo a través de la circulación. (17, 18, 21) La potencia del vector se estableció mediante inyección intramuscular en el músculo TA izquierdo en el ratón Sgcb-null. La administración de 3×10^{10} vg transdujo >90 % de fibras musculares 4 semanas después de la transferencia de genes.

Ejemplo 9

Administración sistémica de scAAV.MHCK7.hSGCB

[00121] Se administró el vector a través de una inyección en la vena de la cola a 14 ratones SGCB-/- en una dosis total de 1×10^{12} vg (5×10^{13} vg/kg) para evaluar la expresión transgénica y la eficacia del vector cuando se administra de manera sistémica en un punto temporal a largo plazo de 6 meses. Los ratones se inyectaron a las 4 semanas de vida, y se realizó una necropsia completa a los 6 meses después de la inyección (1 ratón se retiró al mes y 2 ratones se retiraron a los 4 meses como evaluaciones intermedias para la expresión). Todos los músculos esqueléticos analizados anteriormente junto con el diafragma y el corazón fueron extraídos para su análisis. Los órganos también se retiraron para realizar análisis de toxicología y de biodistribución. La tinción por inmunofluorescencia para beta-sarcoglicano humano se utilizó para determinar la expresión del transgén hSGCB en 5 músculos del miembro, izquierdo y derecho, además del diafragma y corazón de 6 ratones KO a los que se les administró una inyección sistémica del vector de hSGCB. Estos músculos incluyeron TA, gastrocnemio (GAS), cuádriceps (QUAD), glúteo (GLUT) (no se muestra), psoas mayor (PSOAS) y tríceps (TRI) (Figura 10). También se utilizó un análisis cualitativo del tejido cardíaco para evaluar el nivel relativo de expresión transgénica en el músculo cardíaco al momento de la administración.

[00122] Se tomaron cuatro imágenes 20X de cada músculo, y se determinó el porcentaje de fibras que expresan hSGCB para cada imagen, lo que dio como resultado el porcentaje de transducción promedio para cada músculo de cada ratón. Los

resultados que se muestran en la Figura 10 y la Figura 11 demuestran una transducción ≥ 98 % en todos los músculos analizados, que incluyen el diafragma y el corazón. Los ratones con deficiencia de β -sarcoglicano tenían una ausencia completa de la proteína cuando se analizaron mediante inmunofluorescencia. La dosis terapéutica de 1×10^{12} vg de dosis total dio como resultado un promedio de $97,96 \pm 0,36$ % ($\pm$ SEM) de transducción de vector en todos los músculos esqueléticos, que incluyen el diafragma, y alrededor de 95 % o más en el músculo cardíaco (no se muestran los datos).

Ejemplo 10

Administración sistémica a largo plazo de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB en ratones SGCB^{-/-}

[00123] Para construir sobre los resultados del ensayo de potencia de un mes descrito en el Ejemplo 9, se investigó la administración sistémica a un plazo más largo (duración de 6 meses) del casete transgénico de β -sarcoglicano a ratones *sgcb*^{-/-}. Los ratones *sgcb*^{-/-} de cuatro a cinco semanas de vida fueron tratados con una dosis total de 1×10^{12} vg de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB por vía intravenosa en la vena de la cola (n = 5). Los ratones se sometieron a necropsia 6 meses después de la inyección y se demostró la expresión del transgén hSGCB mediante inmunofluorescencia en seis músculos esqueléticos, tanto a los izquierdos como los derechos, además del diafragma y el corazón de todos los ratones tratados. Los músculos esqueléticos analizados incluyeron TA, GAS, QUAD, glúteo (GLUT), PSOAS y TRI. La expresión promedio de hSGCB resultante de la administración sistémica en ratones tratados fue de $98,13 \pm 0,31$ % ($\pm$ SEM) en todos los músculos esqueléticos, que incluyen el diafragma, con expresión en el corazón que excede >95 %. Las imágenes representativas se muestran en la **Figura 12b**. El promedio de los niveles de expresión en cada tipo de músculo individual de todos los ratones tratados se muestran en la **Tabla 2**. La transferencia Western en la **Figura 12c** confirma la expresión transgénica en todos los músculos. Los valores de expresión en la Tabla 2 se presentan para distintos músculos como el promedio de los músculos izquierdo y derecho de ratones inyectados de manera sistémica (n = 5). Los valores se indicaron como PROM $\pm$ SEM. Además, la cuantificación de la expresión del transgén hSGCB en corazones de ratones tratados mediante transferencia Western y densitometría indica sobreexpresión de hSGCB hasta 72,0 % por encima de los niveles de expresión de BL6 WT (**Figura 12d**), que se correlaciona con los niveles altos cuantificados en músculo esquelético.

Tabla 2. Expresión por inmunofluorescencia de β -sarcoglicano

Músculo	Vía de administración	Dosis (dosis total de vg)	Final del estudio (meses)	% de fibras que expresan SGCB
TA	IV	1e12	6	98,88 $\pm$ 0,55
GAS	IV	1e12	6	98,24 $\pm$ 0,82
QD	IV	1e12	6	99,32 $\pm$ 0,19
GLUT	IV	1e12	6	97,50 $\pm$ 0,39
PSOAS	IV	1e12	6	98,75 $\pm$ 0,23
TRI	IV	1e12	6	97,21 $\pm$ 1,35
Diafragma	IV	1e12	6	97,00 $\pm$ 1,26
Corazón	IV	1e12	6	$\geq$ 95 %

[00124] Una característica importante del músculo de *sgcb*^{-/-} descrito en informes anteriores (Araishi et al, Hum. Mol. Genet 8: 1589-98, 1999, Durbeej et al., Mol. Cell. 5: 141-51, 2000) e ilustrado por la tinción con hematoxilina y eosina del GAS y el diafragma en la Figura 13a es una patología distrófica grave que incluye nucleación central, necrosis, infiltración inflamatoria y fibrosis. La transferencia de genes mejoró significativamente esta patología, y alivió muchas de estas características distróficas (Figura 13a). La cuantificación de los parámetros histológicos mostró una reducción significativa en la nucleación central en los diversos músculos esqueléticos analizados como resultado de la transferencia de genes (Figura 13b). Con los niveles bajos previstos de nucleación central en ratones BL6 WT en todos los músculos con un promedio de 1,89 $\pm$ 0,39 %, como se nota aquí, teniendo en cuenta todos los músculos analizados, un promedio de 66,85 $\pm$ 1,86 % de núcleos centrales en ratones *sgcb*^{-/-} no tratados en comparación con 36,30 $\pm$ 5,16 % en músculo de *sgcb*^{-/-} tratado con AUG.MHCK7.hSGCB ($p < 0,0001$) La Tabla 3 a continuación proporciona recuentos de núcleos centrales y diámetros de fibra indicados para varios músculos como el promedio ($\pm$ SEM) de los músculos izquierdo y derecho de BL6 WT, *sgcb*^{-/-}, y ratones inyectados de manera sistémica ($n = 5$ por grupo). Es de destacar que la curva más significativa de degeneración/regeneración ocurre a las 3 semanas en músculo de *sgcb*^{-/-} indicado por núcleos ubicados centralmente. Los animales fueron tratados siguiendo esta agresión y, por lo tanto, no se anticipó una reversión completa de los núcleos centralizados. Un análisis más profundo de la histopatología muscular reveló una normalización de la distribución del tamaño de fibra acompañada de un aumento en el diámetro promedio de fibra en ratones enfermos tratados con vector en comparación con ratones *sgcb*^{-/-} no tratados en los tres músculos examinados (GAS: *sgcb*^{-/-} no tratados – 28,37 $\pm$ 0,23 μ m en comparación con los tratados con AAV.hSGCB – 36,04 $\pm$ 0,17 μ m; $p < 0,0001$) (PSOAS: *sgcb*^{-/-} no tratados – 24,75 $\pm$ 0,23 μ m en comparación con los tratados con AAV.hSGCB – 38,43 $\pm$ 0,28 μ m; $p < 0,0001$) (TRI: *sgcb*^{-/-} no tratados – 28 $\pm$ 0,31 μ m en comparación con los tratado con AAV.hSGCB – 35,56 $\pm$ 0,22 μ m; $p < 0,0001$) (Figuras

13c, 13d, Tabla 3).

Tabla 3. Análisis del porcentaje de nucleación central

Grupo de animales	Dosis (dosis total de vg)	Músculo	% de núcleos centrales (Prom $\pm$ SEM)	% de CN prom. combinado ($\pm$ SEM)	Diámetro de fibra μ m (Prom $\pm$ SEM)
C57BL6 WT	N/A	TA	1,78 $\pm$ 0,86	1,89 $\pm$ 0,39	N/A
		GAS	0,83 $\pm$ 0,41		39,69 $\pm$ 0,18
		QD	0,98 $\pm$ 0,31		N/A
		GLUT	2,50 $\pm$ 0,68		N/A
		PSOAS	1,26 $\pm$ 0,28		40,96 $\pm$ 0,22
		TRI	2,13 $\pm$ 0,36		41,53 $\pm$ 0,24
		DIA	3,75 $\pm$ 1,30		N/A
<i>Sgcb</i> ^{-/-}	N/A	TA	70,45 $\pm$ 3,04	66,85 $\pm$ 1,86	N/A
		GAS	67,26 $\pm$ 1,81		28,37 $\pm$ 0,23
		QD	63,57 $\pm$ 2,09		N/A
		GLUT	61,34 $\pm$ 2,05		N/A
		PSOAS	62,73 $\pm$ 5,20		24,75 $\pm$ 0,22
		TRI	67,11 $\pm$ 2,83		28,74 $\pm$ 0,22
		DIA	75,47 $\pm$ 3,79		N/A
tratado con AAV.MHCK7.hSGCB	1,00E+12	TA	43,85 $\pm$ 3,89	36,30 $\pm$ 5,16	N/A
		GAS	38,71 $\pm$ 3,50		36,04 $\pm$ 0,18
		QD	46,10 $\pm$ 6,26		N/A
		GLUT	42,11 $\pm$ 5,48		N/A
		PSOAS	21,00 $\pm$ 4,69		38,43 $\pm$ 0,28
		TRI	48,39 $\pm$ 6,20		39,92 $\pm$ 0,27
		DIA	11,59 $\pm$ 2,08		N/A

[00125] Debido al importante papel que desempeña la fibrosis en la patogénesis de LGMD2E y la efectividad de los tratamientos, fue fundamental demostrar la misma eficacia para reducir la fibrosis. Eso se observó con la transferencia de genes de β -sarcoglicanos localizados, ahora luego de la administración sistémica de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. Mediante el uso de la tinción con rojo picosirio para colágeno tipos I y III, se analizaron los niveles de colágeno en el gastrocnemio y se analizó el músculo diafragma en ratones BL6 WT de 7 meses de vida ($n = 4$), ratones *sgcb*^{-/-} no tratados ($n = 4$) y ratones *sgcb*^{-/-} tratados ($n = 5$) 6 meses después de la inyección. Los músculos tratados exhibieron significativamente menos depósito de colágeno en comparación con los músculos *sgcb*^{-/-} no tratados (Figura 14a). El músculo GAS transducido por vectores contenía 17,55 $\pm$ 0,59 % de colágeno en comparación con 43,55 $\pm$ 3,33 % de colágeno en músculos GAS de *sgcb*^{-/-} no tratados ($p < 0,0001$). Además, el músculo del diafragma tratado exhibió 21,67 $\pm$ 1,09 % de colágeno en comparación con 44,05 $\pm$ 2,39 % en músculo de *sgcb*^{-/-} no tratado ($p < 0,0001$) (Figura 14b), lo que demuestra la capacidad de transferencia del gen hSGCB para mitigar el componente fibrótico del fenotipo de LGMD2E.

Ejemplo 11

Recuperación de la función del diafragma después de la administración sistémica

[00126] Para determinar si la transferencia del gen hSGCB puede mejorar la función muscular, se evaluaron las propiedades funcionales del músculo diafragma de ratones SGCB^{-/-} tratados con scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB (véase Griffin et al. para los métodos). Se estableció por primera vez un déficit funcional en diafragmas de ratones SGCB^{-/-}. Los diafragmas KO demostraron una reducción de 50,9 % de la producción de fuerza específica (116,24 mN/mm²) en comparación con los ratones WT (BL6 116,24 mN/mm² en comparación con 236,67 mN/mm²) y una mayor pérdida de fuerza después de un protocolo de fatiga riguroso (pérdida del 23 % en SGCB^{-/-}, pérdida del 7 % en BL6 WT). La administración en vena de la cola de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB que resulta en casi 100 % de expresión de hSGCB en el diafragma conduce a la recuperación de la función del diafragma con una producción de fuerza específica mejorada a 226,07 mN/mm² y una mayor resistencia a la fatiga con solo un 12 % de pérdida de fuerza (n = 5) (Figura 15).

Ejemplo 12

La administración de scAAVrh.74.CMV.miR29C reduce la fibrosis en ratones SGCB^{-/-}

[00127] La extensa fibrosis que se identificó tanto en el músculo esquelético (Figuras 2, 4 y 6) como en el corazón y el diafragma (Figura 8) demostraron la necesidad de tratar el depósito de colágeno (fibrosis) en LGMD2E. Anteriormente, se descubrió que Mir29C se redujo más severamente (de Mir29A, B y C) en la distrofia muscular de Duchenne. Él formuló la hipótesis de que Mir-29C también se reduciría en ratones con deficiencia de beta-sarcoglicano (un modelo de ratón para LGMD2E). Se probó que esto era cierto (Figura 15). Los niveles de Mir29C disminuyeron, los niveles de fibrosis (colágeno) aumentaron, y tres componentes de la fibrosis (Co1A, Col3A y Fbn) aumentaron a nivel de ARN. Para probar si se podía prevenir la fibrosis con Mir29C, se inyectó el vector de tratamiento génico scrAAVrh.74.CMV.miR29c (3x10¹¹ vg) en el músculo tibial anterior de ratones SGCB^{-/-} de 4 semanas de vida (n = 5). El scrAAVrh.74.CMV.miR29c se muestra en la Figura 16 y se describe en la solicitud provisional estadounidense N.º 62/323.163, cuya descripción se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Después de 2 meses de tratamiento con AAVrh.74.CMV.miR29C, los músculos TA se recolectaron de ratones SGCB^{-/-} tratados y de control y ratones WT y se analizaron para determinar la fibrosis (niveles de colágeno) (n = 5 por grupo). Mediante tinción con rojo sirio y cuantificación, los niveles

de colágeno se redujeron después del tratamiento (véase la Figura 17). Los niveles de transcritos de Col1A, Col3A y Fbn se normalizaron, y se aumentó el tamaño de la fibra muscular. Imágenes representativas de secciones completas escaneadas de músculos tibiales anteriores no tratados y tratados con AAVrh.74.CMV.miR29C, teñidos con rojo sirio, que tiñen para colágeno 1 y 3 se muestran en la Figura 118. Esto demuestra la prueba del principio de que scAAVrh.74.CMV.miR29C reduce la fibrosis en ratones SGCB^{-/-} y podría usarse en combinación con el reemplazo génico con scAAVrh.74.tMCK.hSGCB o scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB.

Ejemplo 13

La transferencia de genes intravenosa a ratones SGCB^{-/-} reduce la cifoescoliosis de la columna dorsal

[00128] La degeneración de los músculos del torso debido al empeoramiento de la histopatología en pacientes que padecen LGMD2E se puede atribuir a la cifosis. La cifoescoliosis de la columna dorsal debido al debilitamiento de los músculos que sostienen la columna vertebral puede hacer que el diafragma se empuje hacia adelante, y así compromete aún más la capacidad pulmonar y la función del diafragma. Como resultado de la gravedad del fenotipo en el ratón *sgcb*^{-/-} con la apariencia anatómica macroscópica de la cifoescoliosis, se utilizó una radiografía de cuerpo completo para determinar el grado de cifosis en ratones BL6 WT de 7 meses de vida (n = 6), ratones *sgcb*^{-/-} (n = 6), y ratones *sgcb*^{-/-} tratados 6 meses después de la inyección (n = 6). El puntaje del índice cifótico (KI) determina un valor cuantitativo para el nivel de cifoescoliosis (Laws et al. *J. Appl. Physiol.* 97: 1970-7, 2004). Como se representa en el panel de WT en la Figura 19a, el puntaje de KI es una relación de longitud desde el miembro anterior al miembro posterior en comparación con la longitud de la línea media hasta el vértice de la curvatura en la columna vertebral. Mientras que los ratones *sgcb*^{-/-} presentan una columna vertebral severamente curvada y un puntaje de KI inferior de $3,64 \pm 0,16$ (n = 6), los ratones BL6 WT tienen una columna vertebral significativamente más recta, lo que da como resultado un puntaje de KI más alto de $6,01 \pm 0,41$ (n = 6) (p<0,01) (Figura 19b). Los ratones *sgcb*^{-/-} tratados muestran una reducción significativa en el grado de cifosis en la columna vertebral con un aumento en la puntuación KI de $5,39 \pm 0,58$ (n = 6) (p<0,05) (Figura 19b). Estos datos indicaron que la administración intravenosa de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB es beneficiosa para la integridad general de la columna vertebral y puede aliviar la cifosis y las contracturas articulares presentes en la enfermedad. Estos datos demostraron el alivio de la cifosis y el aumento de la actividad física en ratones *sgcb*^{-/-} después de la administración sistémica del vector rAAV

de la invención. Estos datos son evidencia adicional de que el tratamiento génico de la invención mejora la calidad de vida para pacientes con LGMD2E.

Ejemplo 14

Evaluación de miocardiopatía

[00129] La destrucción histológica del músculo de los miembros y el diafragma también se detecta en el miocardio de ratones *sgcb*^{-/-} de 7 meses de vida particularmente con la presencia de necrosis y fibrosis de miocardio como se evidencia mediante la tinción con H y E y tinción con rojo picosirio (Figura 20a). Presentación de insuficiencia cardíaca a menudo en forma de miocardiopatía dilatada con gasto cardíaco reducido y menor fracción de eyección (Semplicini et al., Neurology 84: 1772-81, 2015, Fanin et al., Neuromuscul Disorder 13: 303-9, 2003) La imagen por resonancia magnética cardíaca (MRI) se usó para evaluar varios parámetros funcionales del corazón con el fin de establecer déficits funcionales en el miocardio de ratones *sgcb*^{-/-} en comparación con ratones BL6 WT para usarlos como una medida de resultado funcional. La obtención de imágenes de ratones de control a los 7 meses de vida mostró una reducción del 29,4 % en el volumen sistólico de $0,041 \pm 0,0019$ ml en corazones de *sgcb*^{-/-} a $0,029 \pm 0,0024$ ml en corazones BL6 WT ($p < 0,01$), un gasto cardíaco 31,7 % inferior de $14,70 \pm 0,74$ ml/min en corazones de *sgcb*^{-/-} a $12,72 \pm 0,97$ ml/min en corazones BL6 WT, y finalmente una fracción de eyección 14,3 % menor, $66,21 \pm 3,83$ % en corazones de *sgcb*^{-/-} en comparación con $76,90 \pm 1,67$ % en corazones BL6 WT ($p < 0,05$) (Figura 20b). Esto indica una disminución modesta en la función cardíaca general a esta edad y una tendencia hacia el desarrollo de miocardiopatía. La restauración de la expresión de hSGCB en corazones de ratones KO mediante administración sistémica corrigió parcialmente estos déficits, y mejoró el volumen sistólico a $0,032 \pm 0,0027$ ml, el gasto cardíaco a $14,66 \pm 0,75$ ml/min y la fracción de eyección a $68,16 \pm 2,31$ % (Figura 19b). Como correlato a la disrupción histológica y funcional del tejido cardíaco informado aquí, la transferencia Western para la expresión de la troponina I cardíaca (cTrpI), un importante regulador de la función cardíaca y un indicador (biomarcador) de daño cardíaco, se reduce en corazones de *sgcb*^{-/-} a 60,38 % de los niveles observados en ratones BL6 WT (Figura 20c). Los niveles de cTrpI se restablecen después del tratamiento a niveles del 35,80 % de la expresión observada en corazones WT (Figura 20d).

Ejemplo 15

Restauración funcional en el músculo del diafragma con aumento de la actividad física

[00130] La afectación significativa de la disfunción del diafragma y la insuficiencia respiratoria en LGMD2E obligan a un beneficio funcional para el diafragma esencial para la validación del tratamiento sistémico clínico. Con el uso de un protocolo experimental *ex vivo* en tiras tomadas del músculo del diafragma, se evaluó si la restauración de β -sarcoglicano proporciona un beneficio funcional a este músculo severamente comprometido. De acuerdo con la histopatología significativa identificada en diafragmas de ratones enfermos de 7 meses de vida, los diafragmas de *sgcb*^{-/-} (n = 4) exhibieron un déficit funcional con una reducción significativa (51 %) en la producción de fuerza específica en comparación con ratones BL6 WT (n = 5) ($116,24 \pm 10,49$ mN/mm² en comparación con $236,67 \pm 15,87$ mN/mm², respectivamente, $p < 0,001$), así como una mayor pérdida de fuerza de la producida después de la primera contracción siguiendo un protocolo de fatiga riguroso ($23 \pm 1,0$ % de pérdida en *sgcb*^{-/-}; $7,0 \pm 3,0$ % de pérdida en BL6 WT, $p < 0,05$) (Figura 6a). Seis meses después de la administración en la vena de la cola de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB, se observó una mejora espectacular en la producción de fuerza específica. La producción de fuerza específica aumentó a $226,07 \pm 27,12$ mN/mm² (n = 5) ($p < 0,05$ en comparación con *sgcb*^{-/-}), y se observó una mejor protección del músculo contra la fatiga repetida con solo un $12,0 \pm 4,0$ % de pérdida de fuerza ($p < 0,05$ en comparación con *sgcb*^{-/-}) (Figura 21a). En general, estos datos respaldan hallazgos previos en el músculo TA y muestran que la restauración del β -sarcoglicano proporciona una recuperación funcional en el músculo del diafragma.

[00131] En muchas enfermedades neuromusculares se informan con frecuencia síntomas de aumento de la fatiga y reducción de la actividad general, parcialmente atribuidos a la aparición de cifosis. Como resultado y teniendo en cuenta el fenotipo de LGMD2E, se formuló la hipótesis de que los ratones KO serían naturalmente menos activos en comparación con los ratones WT sanos, y además la administración sistémica de rAAV.MHCK7.hSGCB a ratones *sgcb*^{-/-} daría como resultado ratones físicamente más activos. Con el fin de probar esta hipótesis y los beneficios funcionales potenciales adicionales de la transferencia de genes, un monitoreo láser del protocolo de actividad de caja de campo abierto similar al descrito en Kobayashi et al., Nature 456: 511-5, 2008 y Beastrom et al., A.m. J. Pathol. 179: 2464-74, 2011, se realizó en todos los grupos de ratones. Los gráficos en la Figura 21b representan una disminución significativa (55,5 %) en ratones KO en comparación con WT, tanto en ambulación total (movimiento horizontal en los planos x e y) como en la movilidad vertical de los miembros posteriores. El número promedio de cortes del haz de láser ambulatorio horizontales durante un período de 1 hora en ratones WT fue de $7355 \pm 400,8$ (n = 6) en comparación con 3271

$\pm 483,8$ ($n = 6$) en ratones KO ($p < 0,0001$). Además, el número promedio de cortes del haz de movilidad vertical registrados en ratones WT fue de $626,7 \pm 53,76$ en comparación con $264,5 \pm 63,36$ en ratones KO ($p < 0,01$) (Figura 21b). De acuerdo con la hipótesis inicial, los ratones tratados con rAAV.MHCK7.hSGCB eran visiblemente más activos en comparación con KO, que se ilustraba en la cuantificación de la actividad, donde la ambulación total aumentaba en un 22 % a $5143 \pm 293,2$ cortes del haz ($p < 0,05$) y la movilidad vertical de los miembros posteriores aumentó drásticamente en un 77 % a $615,3 \pm 95,93$ cortes del haz ($p < 0,05$) en ratones tratados ($n = 6$) (Figura 21b).

Ejemplo 16

Análisis de seguridad y biodistribución de rAAVrh.74.MHCK7.hSGCB

[00132] Se evaluaron los posibles problemas de toxicidad o seguridad del tratamiento génico con hSGCB en ratones *sgcb*^{-/-} a los 6 meses después de la administración sistémica de scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB en una dosis total de $1,0 \times 10^{12}$ vg (5×10^{13} vg/kg). La biodistribución del vector y la expresión del transgén no diana se analizaron en muestras de tejido (TA, TRI, diafragma, corazón, gónada, pulmones, riñón, hígado y bazo) a partir de animales *sgcb*^{-/-} a los que se les administró el vector mediante qPCR y transferencia Western, respectivamente. Mediante el uso de conjuntos de sondas de cebador específicas de vector, se detectaron genomas de vector MHCK7.hSGCB a niveles variables en todos los tejidos recolectados. Como estaba previsto, los niveles más altos se observaron en el hígado, así como en el músculo esquelético y el corazón, lo que indica que el artículo de prueba se administró eficazmente en todos los músculos pretendidos de ratones a los que se les administró el vector (Figura 22a). Además, la transferencia Western para detectar la expresión de la proteína hSGCB confirmó la funcionalidad del promotor de MHCK7 específico del músculo y la expresión del transgén limitado al músculo cardíaco y esquelético. La expresión de la proteína beta-sarcoglicano se observó en cantidades variables en todas las muestras de músculo esquelético así como en muestras de corazón, y de manera importante, no se detectó en ningún tejido no muscular (Figura 22b), respaldado por el hecho de que se sabe que el beta-sarcoglicano es una proteína específica de músculo. Finalmente, se realizó tinción con hematoxilina y eosina en criosecciones de tejido muscular y todos los órganos no diana de cinco ratones *sgcb*^{-/-} junto con cinco ratones C57BL6 WT tratados de manera sistémica con el vector en la dosis terapéutica utilizada en este estudio. Estas secciones fueron luego analizadas formalmente por toxicidad por un patólogo veterinario, y no se detectaron efectos adversos en ninguna muestra de ninguno de los ratones. En conjunto, estos datos indican que este artículo de prueba fue bien tolerado por los

animales de prueba.

[00133] El hecho de que tales altos niveles de transducción en todos los músculos del cuerpo se lograron sin efectos adversos con una dosis relativamente baja (dosis total de 1×10^{12} vg, 5×10^{13} vg/kg) ofrece una gran promesa para la aplicación a pacientes con LGMD2E. Desde una perspectiva clínica, la dosis utilizada en los experimentos descritos en la presente es mucho menor que la dosis utilizada para la administración sistémica de un tratamiento de AAV que expresa SMN1 administrado a bebés con SMA, que se encuentra actualmente en ensayo clínico (Mendell et al., Mol. Ther. 24: S190, 2016). La restauración altamente eficiente de la expresión de β -sarcoglicano usando el promotor de MHCK7 acompañado con beneficios funcionales es muy alentador en niveles de dosis que podrían aplicarse clínicamente, y dada la alta incidencia de la afectación cardíaca en la deficiencia de β -sarcoglicano en pacientes con LGMD2E, la administración sistémica proporciona un gran beneficio a estos pacientes.

Referencias:

- 1 Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E et al. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet* 1995; 11: 266–273.
- 2 Moore SA, Shilling CJ, Westra S, Wall C, Wicklund MP, Stolle C et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 995–1003.
- 3 Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E et al. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1589–1598.
- 4 Durbeej M, Cohn RD, Hrstka RF, Moore SA, Allamand V, Davidson BL et al. Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol Cell* 2000; 5: 141–151.
- 5 Bonnemann CG, Passos-Bueno MR, McNally EM, Vainzof M, de Sa Moreira E, Marie SK et al. Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E). *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1953–1961.
- 6 Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP. The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology* 1999; 52: 176–179.
- 7 Sandona D, Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Exp Rev Mol Med* 2009; 11: e28.
- 8 Fanin M, Melacini P, Boito C, Pegoraro E, Angelini C. LGMD2E patients risk developing dilated cardiomyopathy. *Neuromusc Disord* 2003; 13: 303–309.
- 9 Sveen ML, Thune JJ, Kober L, Vissing J. Cardiac involvement in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2 and Becker muscular dystrophy. *Arch Neurol* 2008; 65: 1196–1201.
- 10 Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Berardinelli A, Danieli GA et al. Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve* 1999; 22: 473–479.
- 11 Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G et al. Evidence-based guideline summary: diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology and the practice issues review panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology* 2014; 83: 1453–1463.
- 12 Wong-Kisiel LC, Kuntz NL. Two siblings with limb-girdle muscular dystrophy type 2E responsive to deflazacort. *Neuromusc Disord* 2010; 20: 122–124.

- 13 Barresi R, Di Blasi C, Negri T, Brugnoli R, Vitali A, Felisari G et al. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J Med Genet* 2000; 37: 102–107.
- 14 Gibertini S, Zanotti S, Savadori P, Curcio M, Saredi S, Salerno F et al. Fibrosis and inflammation are greater in muscles of beta-sarcoglycan-null mouse than mdx mouse. *Cell Tissue Res* 2014; 356: 427–443.
- 15 McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* 2003; 10: 2112–2118.
- 16 McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 2001; 8: 1248–1254.
- 17 Chicoine LG, Rodino-Klapac LR, Shao G, Xu R, Bremer WG, Camboni M et al. Vascular delivery of rAAVrh74.MCK.GALGT2 to the gastrocnemius muscle of the rhesus macaque stimulates the expression of dystrophin and laminin alpha2 surrogates. *Mol Ther* 2014; 22: 713–724.
- 18 Rodino-Klapac LR, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Malik V, Davis N et al. Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Mol Ther* 2010; 18: 109–117.
- 19 Rodino-Klapac LR, Janssen PM, Montgomery CL, Coley BD, Chicoine LG, Clark KR et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med* 2007; 5: 45.
- 20 Wang B, Li J, Fu FH, Chen C, Zhu X, Zhou L et al. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Ther* 2008; 15: 1489–1499.
- 21 Chicoine LG, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Griffin DA, Heller KN et al. Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on micro-dystrophin gene expression following vascular delivery. *Mol Ther* 2014; 22: 338–347.
- 22 Matsuda R, Nishikawa A, Tanaka H. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J Biochem* 1995; 118: 959–964.
- 23 Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 1997; 139: 375–385.
- 24 Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP et al. A phase

- 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Mol Ther* 2015; 23: 192–201.
- 25 Dressman D, Araishi K, Imamura M, Sasaoka T, Liu LA, Engvall E et al. Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1631–1646.
- 26 Rodino-Klapac LR, Lee JS, Mulligan RC, Clark KR, Mendell JR. Lack of toxicity of alpha-sarcoglycan overexpression supports clinical gene transfer trial in LGMD2D. *Neurology* 2008; 71: 240–247.
- 27 Shield MA, Haugen HS, Clegg CH, Hauschka SD. E-box sites and a proximal regulatory region of the muscle creatine kinase gene differentially regulate expression in diverse skeletal muscles and cardiac muscle of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5058–5068.
- 28 Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002; 76: 791–801.
- 29 Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc* 2006; 1: 1412–1428.
- 30 Clark KR, Liu X, McGrath JP, Johnson PR. Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1031–1039.
- 31 Liu M, Yue Y, Harper SQ, Grange RW, Chamberlain JS, Duan D. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* 2005; 11: 245–256.
- 32 Hakim CH, Grange RW, Duan D. The passive mechanical properties of the extensor digitorum longus muscle are compromised in 2- to 20-mo-old mdx mice. *J Appl Physiol* 2011; 110: 1656–1663.
- 33 Wein N, Vulin A, Falzarano MS, Szegarty CA, Maiti B, Findlay A et al. Translation from a DMD exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice. *Nat Med* 2014; 20: 992–1000.