

PRODUCTOS Y MÉTODOS DE VIRUS ADENOASOCIADO RECOMBINANTE PARA EL TRATAMIENTO DE LA DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS 2A

Esta solicitud reivindica la prioridad a la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Núm. 62/691,934, presentada el 29 de junio de 2018 y la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Núm. 62/865,081, presentada el 21 de junio de 2019, las cuales se incorporan en la presente descripción en su totalidad por referencia.

CAMPO

En la presente descripción se proporcionan productos y métodos para tratar la distrofia muscular de cinturas 2A. En los métodos, los virus adenoasociados recombinantes suministran ADN que codifica una proteína con actividad de calpaína 3 (*CAPN3*).

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DEL LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud contiene, como parte separada de la descripción, un Listado de Secuencias en forma legible por computadora (nombre de archivo: 52684P2_SeqListing.txt; 23,755 bytes - archivo de texto ASCII creado el 26 de junio de 2019) que se incorpora en la presente descripción por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

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

Un grupo de MD es el grupo de cinturas (LGMD) de MD. Las LGMD son afecciones raras y se presentan de manera diferente en diferentes personas con respecto a la edad de aparición, las áreas de debilidad muscular, compromiso cardíaco y respiratorio, la velocidad de progresión y la gravedad. Las LGMD pueden comenzar en la infancia, la adolescencia, la adultez temprana o incluso más tarde. Ambos géneros se ven afectados por igual. Las LGMD causan debilidad en el hombro y la cintura pélvica, y los músculos cercanos en la parte superior de las piernas y los brazos a veces también se debilitan con el tiempo. La debilidad de las piernas a menudo aparece antes que la de los brazos. Los músculos faciales generalmente no se ven afectados. A medida que avanza la afección, las personas pueden tener problemas para caminar y es posible que necesiten usar una silla de ruedas con el tiempo. La participación de los músculos de los hombros y los brazos puede provocar dificultades para levantar los brazos sobre la cabeza y para levantar objetos. En

algunos tipos de LGMD, el corazón y los músculos respiratorios pueden estar involucrados.

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

	Tipo	Patrón de herencia	Gen o cromosoma
5	LGMD1A	Autosómico dominante	Gen de la miotilina
	LGMD1B	Autosómico dominante	Gen de la Lamina A/C
	LGMD1C	Autosómico dominante	Gen de la caveolina
	LGMD1D	Autosómico dominante	Cromosoma 7
	LGMD1E	Autosómico dominante	Gen de la desmina
10	LGMD1F	Autosómico dominante	Cromosoma 7
	LGMD1G	Autosómico dominante	Cromosoma 4
	LGMD2A	Autosómico recesivo	Gen de la calpaína-3
	LGMD2B	Autosómico recesivo	Gen de la disferlina
	LGMD2C	Autosómico recesivo	Gen del gamma-sarcoglicano
15	LGMD2D	Autosómico recesivo	Gen del alfa-sarcoglicano
	LGMD2E	Autosómico recesivo	Gen del beta-sarcoglicano
	LGMD2F	Autosómico recesivo	Gen del delta-sarcoglicano
	LGMD2G	Autosómico recesivo	Gen de la teletonina
	LGMD2H	Autosómico recesivo	TRIM32
20	LGMD2I	Autosómico recesivo	Gen FKRP
	LGMD2J	Autosómico recesivo	Gen de la titina
	LGMD2K	Autosómico recesivo	Gen POMT1
	LGMD2L	Autosómico recesivo	Gen de la fukutina

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

Las mutaciones en el gen calpaína 3 (*CAPN3*) conducen a una de las distrofias musculares de cinturas más comunes en todo el mundo, LGMD2A. En la actualidad, no existe tratamiento para esta enfermedad hereditaria. Estudios anteriores han demostrado el potencial de la transferencia del gen *CAPN3* para corregir los signos patológicos en ratones con deficiencia de *CAPN3*. Sin embargo, la expresión de *CAPN3* conducida por el promotor de desmina resultó en cardiotoxicidad [Bartoli y otros, Mol. Ther., 13: 250-259 (2006)]. En estudios de seguimiento, se estudió la expresión del gen en el músculo esquelético [Roudaut y otros, Circulation, 128: 1094-1104 (2013)].

El virus adenoasociado (AAV) es un parvovirus con deficiencia en la replicación, cuyo genoma de ADN monocatenario tiene aproximadamente 4.7 kb de longitud, lo que incluye dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de 145 nucleótidos. Existen múltiples serotipos de AAV. Se conocen las secuencias de nucleótidos de los genomas de los serotipos de AAV. Por ejemplo, el genoma completo de AAV-1 se

proporciona en el Núm. de Acceso GenBank NC_002077; el genoma completo de AAV-2 se proporciona en el Núm. de Acceso GenBank NC_001401 y Srivastava y otros, J. Virol., 45: 555-564 {1983}; el genoma completo de AAV-3 se proporciona en el Núm. de Acceso GenBank NC_1829; el genoma completo de AAV-4 se proporciona en el Núm. de Acceso GenBank NC_001829; el genoma de AAV-5 se proporciona en el Núm. de Acceso GenBank AF085716; el genoma completo de AAV-6 se proporciona en el Núm. de Acceso GenBank NC_001862; al menos porciones de los genomas de AAV-7 y AAV-8 se proporcionan en los Núm. de Acceso GenBank AX753246 y AX753249, respectivamente; el genoma de AAV -9 se proporciona en Gao y otros, 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 de Estados Unidos 9,434,928, incorporada en la presente descripción como referencia. Las secuencias que actúan en cis que dirigen la replicación (rep) del ADN viral, la encapsidación/empaquetamiento y la integración del cromosoma de la célula huésped están contenidas dentro de los ITR de AAV. Tres promotores de AAV (denominados p5, p19 y p40 por sus ubicaciones relativas en el mapa) dirigen la expresión de los dos marcos de lectura abiertos internos de AAV que codifican los genes rep y cap. Los dos promotores rep (p5 y p19), junto con el empalme diferencial del intrón AAV simple (en los nucleótidos 2107 y 2227), dan como resultado la producción de cuatro proteínas rep (rep 78, rep 68, rep 52 y rep 40) del gen rep. Las proteínas rep poseen múltiples propiedades enzimáticas que son, en última instancia, responsables de replicar el genoma viral. El gen cap se expresa a partir del promotor p40 y codifica las tres proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. EL empalme alternativo y los sitios de inicio de la traducción sin consenso son responsables de la producción de las tres proteínas de la cápside relacionadas. Un único sitio de poliadenilación de consenso está ubicado en la posición 95 del mapa del genoma de AAV. El ciclo de vida y la genética de AAV se revisan en Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992).

El AAV posee características únicas que lo hacen atractivo como vector para administrar ADN extraño a las células, por ejemplo, en la terapia génica. La infección por AAV de células en cultivo es no citopática y la infección natural de humanos y otros animales es silenciosa y asintomática. Además, AAV infecta muchas células de mamíferos, lo que permite la posibilidad de dirigirse a muchos tejidos diferentes *in vivo*. Además, AAV transduce lentamente la división u no división de células, y puede persistir esencialmente durante la vida útil 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 factible 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, algunos o todos los aproximadamente 4.3 kb internos del genoma (que codifican proteínas de la cápside estructural y de replicación, rep-cap) pueden reemplazarse con ADN extraño. Para generar vectores del AAV, las proteínas rep y cap pueden proporcionarse en trans. Otra característica importante de AAV es que

es un virus extremadamente estable y resistente. Resiste fácilmente a las condiciones usadas para inactivar adenovirus (56 ° a 65 °C durante varias horas), lo que hace que la conservación en frío de AAV sea menos crítica. El AAV puede incluso liofilizarse. Finalmente, las células infectadas con AAV no son resistentes a una superinfección.

5 Existe una necesidad en la técnica de tratamientos para LGMD2A.

SUMARIO

En la presente descripción se proporcionan los métodos y productos para administrar ADN que codifica una proteína con actividad de calpaína 3 (*CAPN3*). Tales métodos y productos pueden usarse para tratar diversas enfermedades, por ejemplo, LGMD2A.

10 Se proporcionan virus adenoasociados recombinantes (rAAV) que codifican una proteína con actividad de calpaína 3 (*CAPN3*). Los virus adenoasociados recombinantes comprenden un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína con actividad *CAPN3*. La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína con actividad *CAPN3*, por ejemplo, es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2.

15 Por ejemplo, el rAAV proporcionado comprende un polinucleótido que comprende una primera repetición terminal invertida (ITR) de AAV, un promotor, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con actividad de calpaína 3 (*CAPN3*) y una segunda ITR de AAV. La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína con actividad de *CAPN3*, por ejemplo, es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, o al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, al menos 92 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, al menos 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, al menos 96 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, al menos 97 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2. El rAAV comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con actividad *CAPN3* que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2.

25 Además, el rAAV proporcionado comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con actividad de *CAPN3* que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, al menos 92 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, al menos 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, al menos 96 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, al menos 97 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 7. El rAAV comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con actividad de *CAPN3* que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

30 El rAAV proporcionado comprende una secuencia de polinucleótidos que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, al menos 92 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, al

menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, al menos 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, al menos 96 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, al menos 97 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1. El rAAV comprende una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 1.

5 La secuencia de nucleótidos, en una modalidad, está bajo el control de la transcripción de un promotor específico de músculo. Por ejemplo, el promotor específico del músculo comprende uno o más de un elemento del gen de la actina esquelética humana, un elemento del gen de la actina cardíaca, un promotor de la desmina, un promotor de la alfa-actina esquelética (ASKA), un promotor de la troponina I (TNNI2), elemento de fijación a mef de factor de fijación a potenciador específico de miocitos, un promotor de la creatina quinasa muscular (MCK), un promotor de MCK truncada (tMCK), un promotor de la cadena pesada de la miosina (MHC), un promotor de potenciador de la cadena pesada de a-miosina híbrida/promotor de potenciador de MCK (MHCK7), un promotor C5-12, un elemento potenciador de la creatina quinasa murina, un elemento del gen de la troponina c esquelética de contracción rápida, un elemento del gen de la troponina c cardíaca de contracción lenta, un elemento del gen de la troponina i de contracción lenta, elemento de respuesta (HRE) al factor nuclear inducible por hipoxia (HIF), un elemento inducible por esteroides y un elemento de respuesta a los glucocorticoides (gre). En una modalidad, el promotor específico del músculo es un promotor tMCK, que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3.

10 Por ejemplo, el rAAV comprende un polinucleótido que comprende, en una modalidad, una primera repetición terminal invertida (ITR) de AAV, un promotor tMCK, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína con actividad de calpaína 3 y una segunda repetición terminal invertida (ITR) de AAV. La ITR de AAV (por ejemplo, la primera y/o la segunda ITR de AAV) es, por ejemplo, una repetición terminal invertida de AAV2. Las proteínas de la cápside del rAAV comprenden, por ejemplo, una proteína de la cápside de AVV rh.74 o una proteína de la cápside de AAV9.

20 El rAAV proporcionado comprende uno o más de proteínas de la cápside 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, AAV rh.74 y AAV rh.10.

25 En otra modalidad, se proporcionan las composiciones que comprenden cualquiera de los rAAV descritos. Por ejemplo, las composiciones se formulan para inyección intramuscular o inyección intravenosa.

También se proporcionan métodos para tratar la distrofia muscular de cinturas 2A en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los rAAV descritos o de cualquier composición que comprenda un rAAV descrito. En cualquiera de los métodos proporcionados, el rAAV se administra mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa.

30 Por ejemplo, en estos métodos el tratamiento da como resultado uno o más de: (a) un aumento del diámetro de la fibra muscular, (b) una disminución del número de pequeñas fibras musculares lobuladas, (c) una disminución del número de fibras con núcleos internos, (d) una disminución del contenido de tejido

conectivo endomisio, (e) corrección de la atrofia muscular y (f) una mayor generación de fuerza muscular. La fibra muscular afectada por el tratamiento comprende una o más de fibra muscular oxidativa de contracción lenta (STO), fibra muscular oxidativa de contracción rápida (FTO) y fibra glicolítica de contracción rápida (FTG).

Además, en cualquiera de los métodos proporcionados, el tratamiento da como resultado uno o más de: (a) al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % o 40 % de disminución del número total de fibra muscular por mm² 4 semanas después de la administración; (b) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular a las 4 semanas después de la administración; (c) al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 42 % de disminución del número de fibras musculares STO por mm² a las 4 semanas después de la administración; (d) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular STO a las 4 semanas después de la administración; (e) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del número de fibras musculares FTO por mm² a las 4 semanas después de la administración; (f) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del diámetro de la fibra muscular FTO a las 4 semanas después de la administración; (g) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % del número de fibras musculares FTG por mm² a las 4 semanas después de la administración; y (h) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular FTG a las 4 semanas después de la administración.

En cualquiera de los métodos proporcionados, el músculo cardíaco del sujeto muestra una proteína de calpaína 3 mínima o baja expresada a partir de cualquiera de los rAAV proporcionados, o una composición que comprende cualquiera de los rAAV proporcionados. La fibra muscular afectada por el tratamiento con la composición comprende una o más de fibra muscular oxidativa de contracción lenta (STO), fibra muscular oxidativa de contracción rápida (FTO) y fibra glucolítica de contracción rápida (FTG).

Se proporcionan las composiciones para el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas 2A que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los rAAV descritos o una composición que comprende cualquiera de los rAAV descritos. Estas composiciones para el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas 2A están formuladas para su administración mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa. Además, el tratamiento con cualquiera de las composiciones descritas para el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas 2A da como resultado uno o más de: (a) un aumento del diámetro de la fibra muscular, (b) una disminución del número de pequeñas fibras musculares lobuladas, (c) una disminución del número de fibras con núcleos internos, (d) una disminución del contenido de tejido conectivo endomisio, (e) una corrección de la atrofia muscular y (f) una mayor generación de fuerza muscular. La fibra muscular afectada por el tratamiento con la composición comprende una o más de fibra muscular oxidativa de contracción lenta (STO), fibra muscular oxidativa de contracción rápida (FTO) y fibra glucolítica de contracción rápida (FTG).

Además, el tratamiento con cualquiera de las composiciones descritas para tratar la distrofia muscular de

cinturas 2A da como resultado uno o más de: (a) al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % o 40 % de disminución del número total de fibra muscular por mm^2 a las 4 semanas después de la administración; (b) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular a las 4 semanas después de la administración; (c) al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 42 % de disminución del número de fibras musculares STO por mm^2 a las 4 semanas después de la administración; (d) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular STO a las 4 semanas después de la administración; (e) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del número de fibras musculares FTO por mm^2 a las 4 semanas después de la administración; (f) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del diámetro de la fibra muscular FTO a las 4 semanas después de la administración; (g) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % del número de fibras musculares FTG por mm^2 a las 4 semanas después de la administración; y (h) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular FTG a las 4 semanas después de la administración.

Además, el tratamiento con cualquiera de las composiciones proporcionadas para el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas 2A da como resultado que el músculo cardíaco del sujeto muestre mínima o baja de calpaína 3 expresada a partir de cualquiera de los rAAV proporcionados, o una composición que comprende cualquiera de los rAAV proporcionados. El músculo cardíaco, después de la administración con el rAAV, muestra poco o ningún efecto tóxico, por ejemplo, inflamación, necrosis y/o regeneración.

La descripción también proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los rAAV descritos o una composición que comprende cualquiera de los rAAV descritos para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas 2A. Por ejemplo, el medicamento se formula para su administración mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa.

En cualquiera de los usos, el tratamiento con el medicamento da como resultado uno o más de: (a) un aumento del diámetro de la fibra muscular, (b) una disminución del número de pequeñas fibras musculares lobuladas, (c) una disminución del número de fibras con núcleos internos, (d) una disminución del contenido de tejido conectivo endomisio, (e) corrección de la atrofia muscular y (f) una mayor generación de fuerza muscular. La fibra muscular afectada por el tratamiento con el medicamento es una o más de las fibras musculares oxidativas de contracción lenta (STO), las fibras musculares oxidativas de contracción rápida (FTO) y las fibras glucolíticas de contracción rápida (FTG).

Además, en cualquiera de los usos de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los rAAV descritos o una composición proporcionada, el tratamiento con el medicamento da como resultado uno o más de: (a) al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % o 40 % de disminución del número total de fibra muscular por mm^2 a las 4 semanas después de la administración; (b) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular a las 4 semanas después de la administración; (c) al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 42 % de disminución del

número de fibras musculares STO por mm² a las 4 semanas después de la administración; (d) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular STO a las 4 semanas después de la administración; (e) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del número de fibras musculares FTO por mm² a las 4 semanas después de la administración; (f) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del diámetro de la fibra muscular FTO a las 4 semanas después de la administración; (g) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % del número de fibras musculares FTG por mm² a las 4 semanas después de la administración; y (h) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular FTG 4 a las semanas después de la administración.

Cualquiera de los usos de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los rAAV descritos o una composición proporcionada, después del tratamiento con el medicamento, el músculo cardíaco del sujeto muestra una proteína de calpaína 3 nula, mínima o baja expresada a partir de la composición descrita.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A-1F muestran que la terapia génica restauró la regeneración deteriorada en el músculo CAPN3-KO. El diagrama esquemático del rAAV AAV9.CAPN3 monocatenario se muestra en la Figura 1A. Entre las ITR monocatenarias 5' y 3' (repeticiones terminales invertidas), el promotor de la creatina quinasa muscular (MCK) (563 pb) dirige la expresión del marco de lectura abierto de CAPN3 (2,466 pb). También se etiqueta el sitio de poliadenilación (Poli A, 53 pb). Los músculos tibiales anteriores (TA) de ratones CAPN3-KO se inyectaron primero con CTX y 2 semanas después con 1x10¹¹ vg de AAV.CAPN3 a TA izquierda (Figura 1B) o solución salina amortiguada con fosfato a TA derecha (Figura 1C). Cuatro semanas después de la inyección de rAAV, el diámetro muscular aumentó y las fibras lobuladas fueron menos comunes en comparación con el músculo CAPN3-KO no tratado. En la Figura 1D, las fibras lobuladas con un patrón de orgánulo subsarcolémico, la distribución de las mitocondrias (flechas) sugieren una fusión parcial de miotubos en el músculo CAPN3-KO no tratado con un aumento mayor. Barra de escala = 20 µm para B-D. En la Figura 1E, los histogramas de distribución del tamaño de la fibra muscular (media ± área SEM/mm²; derivados de 3 ratones en cada grupo) del músculo TA tratado y no tratado de los ratones CAPN3-KO muestran un cambio a fibras de mayor diámetro con el tratamiento y un aumento en la subpoblación de pequeño diámetro presente en el grupo no tratado. En la Figura 1F, los histogramas de distribución del tamaño de la fibra oxidativa de contracción lenta (STO) muestran un número mayor de fibras lentas (por ejemplo, diámetros de fibra iguales o inferiores a 30 µm) en el músculo CAPN3-KO no tratado en comparación con el músculo CAPN3-KO tratado.

La Figura 2 muestra un diagrama esquemático del rAAV de esta descripción, denominado "AAVrh.74.tMCK.CAPN3".

Las Figuras 3A-3B proporcionan datos de transferencia Western (panel A) y RT-PCR (panel B) después de la administración de AAVrh.74.tMCK.CAPN3 mediante inyección intramuscular (1E11 vg) e inyección

sistémica (3E12 vg y 6E12 vg). Estos datos se compararon con el lisado muscular humano normal (carga de gel del 60 % de proteína total en comparación con lisados de ratón) y ratones *CAPN3*-KO no tratados.

La Figura 4 proporciona imágenes representativas de secciones de tejido teñidas con SDH de KO *CAPN3* (gen AAV.h*CAPN3* inyectado y no tratado) y músculos TA de tipo salvaje (WT). La media del tamaño de la fibra de las fibras oxidativas de contracción lenta (STO, oscura), oxidativas de contracción rápida (FTO, intermedia) y glicolíticas de contracción rápida (FTG, clara) apareció normalizada hacia los valores de WT en el músculo TA de ratones tratados con AAVrh.74.tMCK. *CAPN3*. Los tamaños de tipo de fibra con y sin tratamiento se ilustran en la Tabla 4.

La Figura 5 proporciona los niveles relativos de expresión de la proteína *CAPN3* en WT (Z18-14) y se muestran los músculos TA de la cohorte de dosis baja (3E12 vg, Z18-13, Z18-15, Z18-16, Z18-17, Z18-18), y gastrocnemio (gastroc), corazón, cuádriceps, tibial anterior (TA) y tríceps de la cohorte de dosis alta (6E12 vg, Z18-20, Z18-21, Z18-23, Z18-24, Z18-22) (UT: sin tratar) .

La Figura 6 proporciona copias del vector AAVrh74.tMCK.h*CAPN3*/µg de ADN genómico en la cohorte de dosis alta sistémica del genoma del vector de 6E12 en los siguientes músculos: cuádriceps (cuad), corazón, tibial anterior (TA), gastrocnemio (gastroc) tríceps e hígado.

La Figura 7 proporciona la media de los diámetros de fibra de las fibras oxidativas de contracción lenta (STO, oscura), oxidativas de contracción rápida (FTO, intermedia) y glicolíticas de contracción rápida (FTG, clara) del músculo TA izquierdo después de la administración sistémica de AAVrh.74.tMCK.*CAPN3* en 3E12 y 6E12 vg. Se incluyeron los datos de ratones *CAPN3*KO y WT no tratados.

La Figura 8 proporciona los datos para la prueba de correr hasta el agotamiento. La Figura 8A proporciona los datos para la cohorte de dosis baja, que recibió 3E12 vg de AAVrh.74.tMCK.*CAPN3*, y la cohorte de dosis alta, que recibió 6E12 vg de AAVrh.74.tMCK.*CAPN3* 4 semanas después de la administración sistémica. Los ratones KO *CAPN3* tratados obtuvieron mejores resultados en la prueba de correr hasta el agotamiento en comparación con su contraparte no tratada. La Figura 8B proporciona los datos para la cohorte de dosis alta, en la que los ratones se analizaron 20-24 semanas después de la administración sistémica de 6E12 vg de AAVrh.74.tMCK.*CAPN3* (n = 5) y las contrapartes no tratadas (n-16)

La figura 9 proporciona secciones congeladas frescas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) de los ventrículos izquierdos de muestras representativas de corazón de ratones KO *CAPN3* a las 4 semanas posteriores a la inyección sistémica del vector AAVrh7.4.tMCK.h*CAPN3* a dosis de 3E12 vg y 6E12 vg con controles no tratados compatibles.

La Figura 10 proporciona un análisis de transferencia Western de los tejidos cardíacos de la cohorte de dosis alta (que recibió 6E12 vg de AAVrh7.4.tMCK.h*CAPN3*. Este análisis mostró una proteína de calpaína 3 nula o mínima detectable en el corazón del animal tratado. Los números de identificación de animales Z18-19 y 22 representan los lisados de los ratones KO *CAPN3* no tratados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los AAV recombinantes (rAAV) proporcionados en la presente descripción comprenden un polinucleótido que comprende una primera repetición terminal invertida (ITR) de AAV, un promotor, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con actividad de calpaína 3 (*CAPN3*) y una segunda ITR de AAV. En una modalidad, el nucleótido codifica *CAPN3*. Las modalidades incluyen, pero no se limitan a, un rAAV que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica *CAPN3* o una proteína con actividad de *CAPN3*, en donde la secuencia de nucleótidos es al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 % o 89 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2. Las modalidades adicionales incluyen, pero no se limitan a, rAAV que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 2 y codifica un polipéptido con actividad proteolítica de *CAPN3*. La actividad proteolítica de *CAPN3* se entiende en la técnica como la actividad de proteolizar sustratos potenciales tales como fodrina y HSP60, y/o la actividad de autoescisión autolítica. Por lo tanto, como se usa en la presente descripción, el término "proteína con actividad de calpaína 3 (*CAPN3*)" se refiere a una proteína con actividad proteolítica de *CAPN3*, que incluye pero que no se limita a la actividad de sustratos proteolíticos tales como fodrina y HSP60, y/o la actividad de autoescisión autolítica. La proteína con actividad de *CAPN3* puede tener la actividad total o parcial de una proteína calpaína 3 de longitud completa. En una modalidad, la proteína con actividad *CAPN3* tiene al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de actividad de una proteína *CAPN3* de longitud completa. En otra modalidad, la proteína con actividad de *CAPN3* comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ. ID NO: 7.

En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína con actividad de *CAPN3* comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2. En otra modalidad, la proteína con actividad de *CAPN3* comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ. ID NO: 7. En otra modalidad, la proteína con actividad de *CAPN3* comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En otra modalidad, el polinucleótido del rAAV comprende una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID. NO: 1. En otra modalidad, el polinucleótido comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1. En una modalidad, el polinucleótido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, en la presente descripción se describe un AAV recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con actividad de *CAPN3* y/o que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, o el complemento de esta. El término "riguroso" se usa para referirse a condiciones que se entienden comúnmente en la técnica como rigurosas. La rigurosidad de la hibridación está determinada principalmente

por la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturalizantes tales como la 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, 0.0015 M de citrato de sodio y 50 % de formamida a 42 °C. Véase Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2da Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989).

En los genomas recombinantes descritos en la presente descripción, el polinucleótido *CAPN3* está operativamente unido a elementos de control de la transcripción (incluidos, entre otros, promotores, potenciadores y/o intrones), específicamente elementos de control de la transcripción funcionales en las células diana de interés. Por ejemplo, varias modalidades proporcionan métodos para traducir las células musculares mediante el uso de elementos de control transcripcionales específicos del músculo, incluidos, entre otros, los derivados de las familias de genes de actina y miosina, como los de la familia de genes myoD [Véase Weintraub y otros, *Science*, 251: 761-766 (1991)], el factor de fijación al potenciador específico de miocitos MEF-2 [Cserjesi y Olson, *Mol Cell Biol*, 11: 4854-4862 (1991)], elementos de control derivados del gen de la actina esquelética humana [Muscat y otros, *Mol Cell Biol*, 7: 4089-4099 (1987)], elementos de la secuencia de la creatina quinasa muscular [véase Johnson y col., *Mol Cell Biol*, 9: 3393-3399 (1989)] y el elemento potenciador de la creatina quinasa murina (mCK), elementos de control derivados del gen de la troponina C esquelética de contracción rápida, el gen de la troponina C cardíaca de contracción lenta y el gen de la troponina I de contracción lenta: factores nucleares inducibles por hipoxia [Semenza y otros, *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos*, 88: 5680-5684 (1991)], elementos inducibles por esteroides y promotores que incluyen el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) [Véase Mader y White, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 90: 5603-5607 (1993)], el promotor de tMCK [véase Wang y otros, *Gene Therapy*, 15: 1489-1499 (2008)], el promotor de CK6 [véase Wang y otros, *supra*] y otros elementos de control. En una modalidad, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con actividad de calpaína 3 (*CAPN3*) está operativamente ligada a un promotor específico de músculo. En una modalidad, el promotor específico del músculo comprende uno o más de un elemento del gen de la actina esquelética humana, un elemento del gen de la actina cardíaca, un promotor de la desmina, un promotor de la alfa-actina esquelética (ASKA), un promotor de la troponina I (TNNI2), un elemento de fijación a mef de factor de fijación a potenciador específico de miocitos, un promotor de la creatina quinasa muscular (MCK), un promotor MCK truncada (tMCK), un promotor de potenciador de la cadena pesada de la miosina (MHC), un promotor de potenciador de la cadena pesada de α -miosina híbrida/promotor de potenciador de MCK (MHCK7), un promotor C5-12, un elemento potenciador de la creatina quinasa murina, un elemento del gen de la troponina c esquelética de contracción rápida, un elemento del gen de la troponina c cardíaca de contracción lenta, un elemento del gen de la troponina i de contracción lenta, elemento de respuesta (HRE) al factor nuclear inducible por hipoxia (HIF), un elemento inducible por esteroides, un elemento de respuesta de glicocorticoides (gre). En otra modalidad, el promotor específico del músculo es un promotor

MCK, un promotor tMCK o un promotor MHCK7. En algunas modalidades, el promotor específico de músculo es tMCK que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3.

Estudios previos mostraron que la expresión de *CAPN3* impulsada por el promotor de desmina daba como resultado cardiotoxicidad. En estudios de seguimiento, la expresión selectiva del músculo esquelético del gen eliminó los defectos cardíacos. Los genomas de AAV descritos en la presente descripción comprenden un promotor específico del músculo, tMCK para restringir la expresión de *CAPN3* al músculo esquelético y no mostraron toxicidad cardíaca después de la administración sistémica del virus a 6E12 vg (el doble de la dosis inicial alta propuesta) 4 semanas después de la inyección del gen.

Los genomas de rAAV descritos en la presente descripción carecen de AAV rep y cap ADN. Los genomas de rAAV proporcionados comprenden un polinucleótido *CAPN3* como se describió anteriormente y uno o más ITR de AAV que flanquean el polinucleótido. El ADN de AAV en los genomas de rAAV puede ser de cualquier serotipo de AAV para el que se pueda derivar un virus recombinante, incluidos, entre otros, los serotipos de AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV -6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, AAV rh.74 y AAV rh.10. También se contemplan otros tipos de variantes de rAAV, por ejemplo, rAAV con mutaciones de la cápside. Véase, por ejemplo, Marsic y otros, Molecular Therapy, 22(11): 1900-1909 (2014). Como se indica en la sección de Antecedentes descrita anteriormente, 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, pueden usarse AAV1, AAV5, AAV6, AAV8 o AAV9.

Los plásmidos de ADN proporcionados comprenden genomas de rAAV. Los plásmidos de ADN se transfieren a células permisibles para la infección con un virus auxiliar de AAV (que incluye, pero no se limita a, adenovirus, adenovirus con delección de E1 o virus del herpes) para ensamblar el genoma de rAAV en partículas virales infecciosas. Las técnicas para producir partículas de rAAV, en las que se proporcionan a una célula un genoma de AAV a empaquetar, los genes rep y cap, y funciones de virus auxiliar, son estándares en la técnica. La producción de rAAV requiere que los siguientes componentes estén presentes dentro de una sola célula (denotada en la presente descripción como una célula empaquetadora): un genoma de rAAV, genes rep y cap de AAV separados (es decir, no en el interior) del genoma de rAAV y las funciones del virus auxiliar. Los genes rep y cap y las ITR 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 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, AAV rh. 10 y AAV rh.74. La producción de rAAV pseudotipado se describe, por ejemplo, en el documento WO 01/83692 que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. Por tanto, en una modalidad, el rAAV comprende uno o más 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, AAV rh.74 o AAV rh. 10 proteínas de la cápside. En otra

modalidad, el rAAV comprende una proteína de la cápside de AAV rh.74 o una proteína de la cápside de AAV9.

Un método para generar célula empaquetadora es crear una línea celular que exprese 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 neomicina, se integran en el genoma una célula. Los genomas de AAV se han introducido en plásmidos bacterianos mediante procedimientos tales como inserción de GC [Samulski y otros, Proc. Natl. Acad. S6. Estados Unidos, 79:2077-2081 (1982)], adición de ligadores sintéticos que contienen sitios de escisión de endonucleasas de restricción [Laughlin y otros, Gene, 23:65-73 (1983)] o mediante unión de extremos romos directa [Senapathy & Carretero, J. Biol. Chem., 259:4661-4666 (1984)]. A continuación, la línea celular empaquetadora se infecta con un virus auxiliar tal como un adenovirus. Las ventajas de este método son que las células pueden seleccionarse y son adecuadas para la producción a gran escala de rAAV. 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 células empaquetadoras.

Los principios generales de la producción de rAAV se revisan, por ejemplo, en Carter, Current Opinions in Biotechnology, 1533-1539 (1992); y Muzyczka, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129 (1992). Se describen varios enfoques en Ratschin y otros, Mol. Cell. Biol., 4: 2072 (1984); Hermonat y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 81:6466 (1984); Tratschin y otros., Mol. Cell. Biol., 5:3251 (1985); McLaughlin y otros, J. Virol., 62:1963 (1988); Lebkowski y otros, Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988); Samulski y otros, J. Virol., 63:3822-3828 (1989); Patente de Estados Unidos Núm. 5,173,414; documento WO 95/13365 y la correspondiente Patente de Estados Unidos Núm. 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 y otros, Vaccine, 13:1244-1250 (1995); Paul y otros, Human Gene Therapy, 4:609-615 (1993); Clark y otros, Gene Therapy 3:1124-1132 (1996); Patente de Estados Unidos Núm. 5,786,211; Patente de Estados Unidos Núm. 5,871,982; Patente de Estados Unidos Núm. 6,258,595; y McCarty, Mol. Ther., 16(10): 1648-1656 (2008). Los documentos anteriores se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad, con especial énfasis en aquellas secciones de los documentos relacionados a la producción de rAAV.

Por tanto, se proporcionan células empaquetadoras siempre y cuando produzcan rAAV infeccioso. En una modalidad, las células empaquetadoras pueden ser células cancerosas transformadas de manera estable tales como células HeLa y células PerC.6 (una línea 293 cognada). En otra modalidad, 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 humanas), células Vero (células de riñón de mono) y

células FRhL-2 (células pulmonares fetales rhesus).

Los AAV recombinantes proporcionados en la presente descripción son, por tanto, partículas virales encapsidadas, infecciosas, de replicación deficiente que comprenden un genoma recombinante. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un rAAV que incluye un genoma que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 1 que codifica *CAPN3*, un rAAV que incluye un genoma que consiste esencialmente en la secuencia establecida en SEQ ID NO: 1 que codifica *CAPN3*, y un rAAV (denominado "AAVrh.74.tMCK.CAPN3") que incluye un genoma que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 que codifica *CAPN3*. Los genomas del rAAV carecen de ADN rep y cap de AAV, es decir, no hay rep o ADN cap de AAV entre las ITR del genoma del rAAV.

La secuencia de la secuencia AAVrh.74.tMCK.CAPN3 se establece en la SEQ ID NO: 1, en la que una ITR AAV2 abarca los nucleótidos 1-128, el promotor tMCK abarca los nucleótidos 165-884, un intrón quimérico abarca los nucleótidos 937-1069, una secuencia Kozak abarca los nucleótidos 1101-1106, el polinucleótido *CAPN3* abarca los nucleótidos 1107-3572, una señal de poli A abarca los nucleótidos 3581-3780 y una segunda ITR AAV2 abarca los nucleótidos 3850-3977.

El rAAV puede purificarse mediante métodos conocidos en la técnica tales como cromatografía en columna o gradientes de cloruro de cesio. Los métodos para purificar los vectores rAAV del virus auxiliar son conocidos en la técnica e incluyen los métodos descritos en, por ejemplo, Clark y otros, Hum. Gene Ther., 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp y Clark, Methods Mol. Med., 69: 427-443 (2002); Patente de Estados Unidos Núm. 6,566,118; y WO 98/09657.

En otra modalidad, se proporcionan las composiciones que comprenden rAAV descritas en la presente descripción. Las composiciones proporcionadas comprenden rAAV en un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también pueden comprender otros ingredientes tales como diluyentes y adyuvantes. Los portadores, diluyentes y adyuvantes aceptables no son tóxicos para los receptores y son preferentemente inertes a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes tales como el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tal 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, pluronics o polietilenglicol (PEG).

Los títulos de rAAV que se administrarán en los métodos descritos en la presente descripción pueden variar en dependencia, por ejemplo, del rAAV particular, el modo de administración, el objetivo del tratamiento, el individuo y los tipos de células a los que se dirige, y pueden determinarse mediante métodos estándar en el arte. Los títulos de rAAV pueden variar de aproximadamente 1×10^{10} , de 1×10^{11} , de 1×10^{12} , de 1×10^{13} , a aproximadamente 1×10^{14} , o más partículas resistentes a DNasa (DRP) por ml. Las dosis también pueden

expresarse en unidades de genomas virales (vg). Las dosis ilustrativas descritas incluyen 1E11 vg, 3E12 vg y 6E12 vg.

Se contemplan en la presente descripción los métodos para transducir una célula diana, tal como una célula muscular, con rAAV, *in vivo* o *in vitro*. Los métodos *in vivo* proporcionados en la presente comprenden la etapa de administrar una dosis efectiva, o múltiples dosis efectivas, de una composición que comprende un rAAV proporcionado en la presente descripción a un sujeto (por ejemplo, un animal que incluye, entre otros, un paciente 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. Una dosis efectiva es una dosis que alivia (elimina o reduce) al menos un síntoma asociado con el trastorno/estado patológico que se trata, que retrasa o previene la progresión de un estado de trastorno/estado patológico, que disminuye la extensión de la enfermedad, que da como resultado la remisión (parcial o total) de la enfermedad y/o que prolonga la supervivencia. En comparación con el sujeto antes del tratamiento, los métodos de la presente descripción dan como resultado uno o más de: un aumento del diámetro de la fibra muscular, una disminución del número de pequeñas fibras musculares lobuladas, una disminución del número de fibras con núcleos internos, una disminución del contenido de tejido conectivo endomisio, corrección de atrofia muscular y aumento de la generación de fuerza muscular. En una modalidad, la fibra muscular comprende una o más de fibra muscular oxidativa de contracción lenta (STO), fibra muscular oxidativa de contracción rápida (FTO) y fibra glicolítica de contracción rápida (FTG). En una modalidad, el tratamiento da como resultado una o más de (a) al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % o 40 % de disminución del número total de fibras musculares por mm² a las 4 semanas después de la administración; (b) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular a las 4 semanas después de la administración; (c) al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 42 % de disminución del número de fibras musculares STO por mm² a las 4 semanas después de la administración; (d) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular STO a las 4 semanas después de la administración; (e) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del número de fibras musculares FTO por mm² a las 4 semanas después de la administración; (f) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del diámetro de la fibra muscular FTO a las 4 semanas después de la administración; (g) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % del número de fibras musculares FTG por mm² a las 4 semanas después de la administración; y (h) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular FTG a las 4 semanas después de la administración. El método de esta descripción, en una modalidad, conduce a una proteína de calpaína 3 nula, mínima o baja expresada a partir del rAAV en el músculo cardíaco del sujeto administrado con el rAAV.

Los ensayos para examinar estos resultados se entienden en la técnica y/o se describen en los ejemplos de la presente descripción. Se contempla el uso de los métodos descritos en la presente descripción para prevenir

o tratar trastornos/enfermedades (por ejemplo, distrofias musculares) causados por defectos en la actividad de *CAPN3* o defectos en la expresión de *CAPN3*. LGMD2A es un ejemplo de una enfermedad contemplada para prevención o tratamiento de acuerdo con los métodos.

También se contemplan terapias de combinación. La combinación, como se usa en la presente descripción, incluye tanto tratamiento simultáneo como tratamientos secuenciales. Se contemplan las combinaciones de métodos descritos en la presente descripción con tratamientos médicos estándar (por ejemplo, corticosteroides), al igual que las combinaciones con terapias nuevas.

La administración de una dosis efectiva de las composiciones puede ser por vías estándar en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, intramuscular, parenteral, intravenosa, intratecal, oral, bucal, nasal, pulmonar, intracraneal, intraósea, intraocular, rectal o vaginal. Las vías de administración y serotipos de los componentes de AAV del rAAV (en particular, los ITR de AAV y la proteína de la cápside) pueden ser elegidos y/o emparejados por los expertos en la técnica teniendo en cuenta el estado de infección y/o enfermedad que se trata y las células/tejidos diana que deben expresar el *CAPN3*. En una modalidad, el rAAV se administra mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, administración epicutánea, inyección intravaginal, administración intradérmica o administración nasal. En otra modalidad, el rAAV se administra mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa.

En particular, la administración real de rAAV descrita en la presente descripción puede lograrse mediante el uso de cualquier método físico que transporte el vector recombinante de rAAV al tejido diana de un animal. La administración incluye, pero no se limita a, inyección en el músculo, el torrente sanguíneo y/o directamente en el hígado. Se ha demostrado que simplemente resuspender un rAAV en solución salina amortiguada con fosfato es suficiente para proporcionar un vehículo útil para la expresión del tejido muscular, y no existen restricciones conocidas sobre los portadores u otros componentes que puedan coadministrarse con el rAAV. Las proteínas de la cápside de un rAAV pueden modificarse de modo que el rAAV se dirija a un tejido diana de interés particular, tal como el músculo. Véase, por ejemplo, el documento WO 02/053703, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse como formulaciones inyectables o como formulaciones tópicas para ser administradas a los músculos por transporte transdérmico. Se han desarrollado previamente numerosas formulaciones tanto para inyección intramuscular como para transporte transdérmico y pueden usarse en la práctica de los métodos. El rAAV puede usarse con cualquier portador farmacéuticamente aceptable para facilitar la administración y el manejo.

Para fines de inyección intramuscular, pueden emplearse soluciones en un adyuvante tal como aceite de sésamo o de maní o en propilenglicol acuoso, así como también soluciones acuosas estériles. Tales soluciones acuosas pueden amortiguarse, si se desea, y el diluyente líquido primero puede volverse isotónico con solución salina o glucosa. Pueden prepararse soluciones de rAAV como un ácido libre (el

ADN contiene grupos fosfato ácidos) o una sal farmacológicamente aceptable en agua mezclada de manera adecuada con un tensioactivo tal como hidroxpropilcelulosa. También puede prepararse una dispersión de rAAV en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. En relación con esto, los medios acuosos estériles empleados son todos fácilmente obtenibles mediante técnicas estándar bien conocidas para los expertos en la técnica.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable sistémico (por ejemplo, intravenoso) 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 fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a las acciones contaminantes de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La correcta fluidez puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse 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 puede lograrse mediante el uso de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de rAAV en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del principio 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 de preparación, en algunas modalidades, comprenden la técnica secado al vacío y/o de liofilización, cada una de las cuales puede producir un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de la solución previamente esterilizada filtrada del mismo.

La transducción con rAAV también puede llevarse a cabo *in vitro*. En una modalidad, las células musculares diana deseadas se extraen del sujeto, se transducen con rAAV y se reintroducen en el sujeto. Alternativamente, pueden usarse células musculares singénicas o xenogénicas cuando esas células no generarán una respuesta inmune inapropiada en el sujeto.

En la técnica se conocen los métodos adecuados para la transducción y reintroducción de células

transducidas en un sujeto. En una modalidad, las células pueden transducirse *in vitro* al combinar rAAV con células musculares, por ejemplo, en medios apropiados, y la evaluación de las células que tienen el ADN de interés mediante el uso de técnicas convencionales tales como transferencias Southern y/o PCR, o mediante el uso de marcadores seleccionables. A continuación, las células transducidas pueden formularse en composiciones farmacéuticas y la composición puede introducirse en el sujeto mediante diversas técnicas, tales como por inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal, o por inyección en el músculo liso y cardíaco, mediante el uso, por ejemplo, de un catéter.

La transducción de células con rAAV mediante los métodos descritos en la presente descripción da como resultado la expresión sostenida de *CAPN3* o una proteína con actividad de *CAPN3*. Por tanto, se proporcionan los métodos para administrar rAAV que expresa *CAPN3* o una proteína con actividad de *CAPN3* a un sujeto, preferentemente un ser humano. El objeto de esta descripción incluye, entre otros, humanos, un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un pollo, un roedor (por ejemplo, ratas y ratones) y un primate. Estos métodos incluyen la transducción de tejidos (que incluyen, pero no se limitan a, tejidos tales como el músculo, órganos tales como el hígado y el cerebro, y glándulas tales como las glándulas salivales) con uno o más rAAV descritos en la presente descripción.

El tejido muscular es una diana atractiva para la administración de ADN *in vivo*, porque no es un órgano vital y es de fácil acceso. Los métodos de la presente descripción proporcionan una expresión sostenida de *CAPN3* a partir de células musculares transducidas.

Por "célula muscular", "fibra muscular" o "tejido muscular" quiere decir una célula o grupo de células derivadas de un músculo de cualquier tipo [por ejemplo, músculo esquelético y músculo liso (por ejemplo, del tracto digestivo, vejiga urinaria, vasos sanguíneos o tejido cardíaco)]. Tales células musculares pueden estar diferenciadas o indiferenciadas, tales como mioblastos, miocitos, miotubos, cardiomiocitos y cardiomioblastos.

El término "transducción" se usa para referirse a la administración/entrega de *CAPN3* a una célula receptora ya sea *in vivo* o *in vitro*, a través de un rAAV descrito que da como resultado la expresión de *CAPN3* por la célula receptora.

Por lo tanto, se proporcionan los métodos para administrar una dosis efectiva (o dosis, administradas esencialmente de manera simultánea o dosis administradas a intervalos) de rAAV que codifica *CAPN3* a un sujeto que lo necesita.

Como indicó anteriormente, los métodos descritos en la presente descripción dan como resultado que el sujeto, en comparación con el sujeto antes del tratamiento, uno o más de: aumento del diámetro de la fibra muscular, una disminución del número de pequeñas fibras musculares oxidativas de contracción lenta (STO) lobuladas, una disminución del número de fibras con núcleos internos, disminución del contenido de tejido conectivo endomisial, corrección de la atrofia muscular y un aumento de la generación de fuerza muscular.

EJEMPLOS

Los aspectos y modalidades se ilustran mediante los siguientes ejemplos. El Ejemplo 1 describe la producción de AAV9.MCK.CAPN3. El Ejemplo 2 describe la administración intramuscular de AAV9.MCK.CAPN3. El Ejemplo 3 describe la producción de AAVrh.74.tMCK.CAPN3. El ejemplo 4 describe la administración intramuscular de AAVrh.74.tMCK.CAPN3. El ejemplo 5 describe la administración intravenosa de AAVrh.74.tMCK.CAPN3. El ejemplo 6 describe estudios de criterios de valoración. El ejemplo 7 describe estudios de toxicología y biodistribución. El ejemplo 8 describe pruebas de biopotencia *in vivo* después de la inyección intramuscular. El ejemplo 9 describe pruebas de biopotencia *in vivo* después de la inyección sistémica. El ejemplo 10 describe la evaluación de la administración sistémica del gen AAVrh.74.tMCK.CAPN3. El Ejemplo 11 describe la evaluación de la toxicidad cardíaca tras la inyección sistémica del vector AAVrh.74.tMCK.CAPN3. El ejemplo 12 describe un análisis fisiológico *in vivo*.

Ejemplo 1

Producción de AAV9.MCK.CAPN3

Se produjo un vector de AAV (denominado AAV.CAPN3) que lleva el gen CAPN3 bajo el promotor MCK específico del músculo (Figura 1A). Un ADN que incluye el marco de lectura abierto de ratón CAPN3 (NM_007601.3) entre dos sitios de restricción Not1 se sintetizó por Eurofin Genomics, Estados Unidos, y luego se subclonó en un vector de AAV.MCK monocatenario (creatina quinasa muscular) previamente descrito en Rodino-Klapac y otros, Journal of Translational Medicine, 5:45-55 (2007)]. Los vectores de rAAV se produjeron mediante un enfoque de empaquetamiento cruzado modificado mediante el cual el genoma del vector AAV tipo 2 puede empaquetarse en múltiples serotipos de cápside de AAV. [Rabinowitz y otros, J Virol. 76 (2):791-801 (2002)]. La producción se realizó mediante el uso de un método estándar de precipitación de tres plásmidos de ADN/CaPO4 mediante el uso de células HEK293. Las células 293 se mantuvieron en DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y penicilina y estreptomycin. Los plásmidos de producción fueron: (i) pAAV.MCK.microdys, (ii) plásmidos auxiliares AAV modificados con rep2-capX que codifican los serotipos cap 1, 6 o un aislado similar a 8, y (iii) un plásmido auxiliar de adenovirus tipo 5 (pAdhelper) que expresan genes de ARN de adenovirus E2A, E4 ORF6 y VA I/II. Para permitir las comparaciones entre serotipos, se usó un método de valoración cuantitativo basado en PCR para determinar un título de genoma de vector encapsidado (vg) utilizando un sistema detector Prism 7500 Taqman (PE Applied Biosystems). [Clark y otros, Hum Gene Ther. 10 (6): 1031-1039 (1999)] El cebador y la sonda fluorescente se dirigieron al promotor MCK y fueron los siguientes: Cebador directo de MCK, 5-CCCGAGATGCCTGGTTATAATT-3 (SEQ ID NO: 4); Cebador inverso de MCK, 5-GCTCAGGCAGCAGGTGTTG-3 (SEQ ID NO: 5); y sonda de MCK, 5-FAM-CCAGACATGTGGCTGCTCCCCC-TAMRA-3 (SEQ ID NO: 6). El título final (vg ml⁻¹) se determinó

mediante PCR cuantitativa con transcriptasa inversa mediante el uso de los cebadores y sondas específicas para el promotor MCK mediante el uso de un sistema detector en tiempo real Prism 7500 (PE Applied Biosystems, Grand Island, NY, Estados Unidos). Los virus divididos en alícuotas se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

Ejemplo 2

Administración intramuscular de AAV9.MCK.CAPN3

Para demostrar si *CAPN3* WT puede restaurar el proceso de regeneración deteriorado en ratones knockout *CAPN3* (*CAPN3*-KO), los músculos TA de los ratones *CAPN3*-KO (n=4) [Kramerova y otros, Hum Mol Genet 13(13):1373-1388 (2004)] bajo anestesia se inyectaron primero con 30 µl de CTX, y 2 semanas después se transdujeron para expresar *CAPN3* de tipo salvaje mediante el uso de AAV9.MCK.CAPN3 a 1×10^{11} vg en 20 µl de volumen mediante inyección intramuscular. Los músculos TA de otra cohorte de *CAPN3*-KO (n=4), que sirvieron como controles, recibieron el mismo volumen de solución salina amortiguada con fosfato 2 semanas después de la inyección de CTX.

Los ratones se sacrificaron 6 semanas después de la inyección de CTX, y los músculos TA se extrajeron y procesaron para la sección del criostato. Las secciones transversales de doce µm de espesor se tiñeron primero con H&E para la evaluación histopatológica de rutina; las mediciones del diámetro específico del tipo de fibra muscular se obtuvieron partir de secciones transversales teñidas con SDH del TA de 3 ratones en cada grupo. Se fotografiaron tres imágenes aleatorias del TA (por sección por animal) con un aumento de X20 y se generaron las medidas del diámetro de la fibra y los histogramas específicos del tipo de fibra.

Se usó la histoquímica de la enzima deshidrogenasa succínica (SDH) para evaluar la diferenciación del tipo de fibra metabólica [oxidativa de contracción lenta (STO), oxidativa de contracción rápida (FTO) y glicolítica de contracción rápida (FTG)]. Las mediciones del diámetro específico del tipo de fibra muscular se obtuvieron mediante el uso de secciones transversales teñidas con SDH de 12 µm de espesor a las 4 y 12 semanas después de la inyección final de cardiotoxina. Tres imágenes, cada una representando tres zonas distintas del músculo gastrocnemio (una zona profunda compuesta predominantemente de STO, zona la intermedia que muestra una apariencia de tablero de ajedrez de STO y FTO o FTG y la zona superficial compuesta predominantemente de fibras FTG) a lo largo del eje de la línea media (por sección por animal) se fotografiaron con un aumento de X20 mediante el uso de un microscopio Olympus BX41 y una cámara SPOT (Olympus BX61, Japón). Este enfoque se eligió para capturar las alteraciones en el estado oxidativo de las fibras en cada zona en respuesta a los cambios metabólicos durante la regeneración. Los diámetros de las fibras oscuras (STO), intermedias (FTO) y ligeras (FTG) se determinaron midiendo la distancia más corta a través de la fibra muscular mediante el uso del software Zeiss Axiovision LE4 (v.4.8). Los histogramas de diámetro de fibra se generaron por separado para STO; FTG y FTO se combinaron para representar la población total de fibras de contracción rápida (FTG/O), derivada de 3 animales y expresada como número por mm² del área endomisial (media ± SEM). La media del diámetro de la fibra se obtuvo al

combinar los 3 tipos de fibras. Se midió un promedio de 900-1,700 fibras por grupo. Los músculos TA se usaron para evaluar la fibrosis (ver más abajo)

Cuatro semanas después de la inyección de AAV9.MCK.CAPN3, se observó un aumento significativo en el diámetro muscular con una aparente disminución de los núcleos internos y un número mucho menor de fibras pequeñas con patrón lobulado (Figura 1B). El músculo CAPN3-KO no tratado tenía un 31.6 % más de fibras por área de mm², compuesta principalmente por fibras STO pequeñas y lobuladas, lo que indica que el tratamiento mejoró la fusión de los miotubos y, por lo tanto, disminuyó el número de fibras pequeñas individuales por unidad de área (Figura 1, C y D; Tabla 1).

Tabla 1 - Tamaño de la fibra del músculo tibial anterior

	No tratado Número por mm2	No tratado Diámetro	Tratado con AAV.CAPN3 Número por mm2	Tratado con AAV.CAPN3 Diámetro
STO	355	32.72 ± 0.4	233	39.81 ± 0.6*
FTG/O	116	44.26 ± 0.9	99	50.40 ± 1.2*
Todas las fibras	471	35.55 ± 0.4	322	43.08 ± 0.6*

*p < 0.0001 en comparación con el mismo parámetro de tipo salvaje

Los histogramas de distribución del tamaño de la fibra del músculo TA tratado mostraron un cambio hacia fibras de mayor diámetro con el tratamiento y el número excesivo de fibras pequeñas en el músculo de control CAPN3-KO no tratado son del tipo de fibra histoquímica STO (Figuras 1E y 1F). En conjunto, estos hallazgos muestran que el reemplazo de CAPN3 a través de la terapia génica en el músculo CAPN3-KO rescató la regeneración defectuosa, evidenciada por la normalización del tamaño de la fibra y una disminución en el número de población de fibra STO.

Ejemplo 3

Producción de AAVrh.74.tMCK.CAPN3

Se produjo un vector de AAV (denominado AAVrh74.tMCK.CAPN3) que lleva el gen CAPN3 bajo un promotor de MCK específico del músculo truncado (promotor tMCK). Un ADN que incluye el marco de lectura abierto de ratón CAPN3 (NM_007601.3) entre dos sitios de restricción Not1 fue sintetizado por Eurofin Genomics, Estados Unidos, y luego insertado en un plásmido de producción de AAV. En la Figura 2 se muestra un mapa del plásmido.

Los vectores de rAAV se produjeron luego mediante el enfoque descrito en el Ejemplo 1.

Ejemplo 4

Administración intravenosa de AAVrh.74.tMCK.CAPN3

Los ratones *CAPN3*-KO, de 6 meses de edad, recibieron AAVrh.74.tMCK.CAPN3 en dosis bajas (3×10^{12} vg) y dosis altas (6×10^{12} vg) mediante inyección en la vena de la cola. Los ratones fueron sacrificados a las 20 semanas después de la inyección del gen para estudios de criterios de valoración. Los ratones *CAPN3*-KO tratados con vehículo de la misma edad sirvieron como controles.

Tabla 2 - Cohortes de tratamiento

Cohortes	Tratamiento	# Total de ratones	Edad al inicio del tratamiento	Dosis de tratamiento (AAVrh.74.tMCK.CAPN3)	Duración del tratamiento	Edad al finalizar el estudio
<i>CAPN3</i> -KO		40				
Dosis baja	AAV.CAPN3	8	24 semanas	3e12 vg en 300 µl de solución salina, iv	20 semanas	44 semanas
	Tratamiento salino	8	24 semanas		20 semanas	44 semanas
Dosis alta	AAV.CAPN3	8	24 semanas	6e12 vg en 300 µl de solución salina, iv	20 semanas	44 semanas
	Tratamiento salino	8	24 semanas		20 semanas	44 semanas
Controles de tipo salvaje	Tratamiento salino	8	24 semanas		20 semanas	44 semanas

Los estudios de criterio de valoración realizados como se describió en el Ejemplo 7 más abajo incluyen la fisiología muscular (generación de fuerza TA o ensayo de contractibilidad muscular *in vivo* y protección contra contracciones excéntricas), histopatología muscular, detección de hCAPN3 mediante el uso de qPCR y análisis de transferencia Western.

Ejemplo 5

Administración intramuscular de AAVrh.74.tMCK.CAPN3

Las respuestas regenerativas se miden en necrosis sincronizada inducida por cardiotoxina (CTX) en músculos viejos y jóvenes CAPN3-KO después de la introducción de CAPN3 en la regeneración muscular mediante tratamiento con rAAV.

- 5 En cohortes de ratones jóvenes (a los 2 meses de edad) y viejos (a los 6 meses de edad), se inyecta CTX en ambos músculos TA para inducir una necrosis sincronizada 2 semanas antes de la inyección de rAAV en el músculo TA izquierdo. AAVrh.74.tMCK.CAPN3 a 1×10^{11} en 20 μ l de volumen se administra mediante inyección intramuscular. Los estudios de criterio de valoración se realizan a las 8 semanas posteriores a la transferencia de genes (a 1×10^{11} vg dosis con la eficacia establecida en nuestros estudios previos) para evaluar la corrección del defecto de regeneración comparando la histología cuantitativa y los resultados fisiológicos de la TA izquierdo con la TA derecha no tratada.

Tabla 3 - Cohortes de tratamiento

Cohortes	Tratamiento	# Total de ratones	Inyección bilateral de CTX en músculo TA; edad/vía de administración/dosis	Edad al inicio de la terapia génica	Dosis de tratamiento (AAVrh.74.tMCK.CAPN3) TA izquierda	Duración del tratamiento	Edad al finalizar el estudio
CAPN3-KO	CTX+AAV.CAPN3	16					
Joven		8	6 semanas/i.m./30 μ l	8 semanas	1×10^{11} vg en 30 μ l de solución salina amortiguada con fosfato, i.m.	8 semanas	16 semanas
Viejo		8	22 semanas/i.m./30 μ l	24 semanas	1×10^{11} vg en 30 μ l de solución salina amortiguada con fosfato, i.m.	8 semanas	32 semanas
Tipo salvaje	Solo CTX	18					
Joven		8	6 semanas/i.m./30 μ l	8 semanas	30 μ l de solución salina amortiguada con fosfato	8 semanas	16 semanas
Viejo		8	22 semanas/i.m./30 μ l	24 semanas	30 μ l de solución salina amortiguada con fosfato	8 semanas	32 semanas

Ocho semanas después de la inyección de rAAV, los estudios de criterios de valoración llevados a cabo como se describió en el Ejemplo 6 más abajo incluyen fisiología muscular (generación de fuerza TA y protección contra contracciones excéntricas), histopatología muscular cuantitativa, detección de hCAPN3 mediante el uso de qPCR y análisis de transferencia Western.

Ejemplo 6

Estudios de criterio de valoración

Generación de fuerza TA y protección contra contracciones excéntricas

Se realiza un protocolo para evaluar los resultados funcionales en el músculo TA en músculos extraídos de ratones [Wein y otros, Nature Medicine, 20(9):992-1000 (2014)]. Los ratones se anestesian mediante el uso de una mezcla de ketamina/xilazina. Mediante el uso de un endoscopio de disección, se quita la piel de la extremidad posterior para exponer el músculo TA y la rótula. Se disecciona el tendón distal TA y se ata un nudo cuadrado doble alrededor del tendón con una sutura 4-0 lo más cerca posible del músculo y se corta el tendón. El músculo expuesto se humedece constantemente con solución salina. Luego, los ratones se transfieren a una plataforma con control térmico y se mantienen a 37 grados. La rodilla se sujeta a la plataforma con una aguja a través del tendón de la rótula, la sutura distal del tendón TA al brazo nivelado del transductor de fuerza (Aurora Scientific, Aurora, ON, Canadá) y el pie se sujeta con cinta adhesiva. Las contracciones del músculo TA se provocan mediante la estimulación del nervio ciático mediante electrodos bipolares de platino. Una vez que el músculo se estabilizó, se determinó la longitud óptima mediante el estiramiento gradual del músculo hasta lograr la fuerza máxima de contracción. Después de un período de descanso de 3 minutos, la TA se estimula a 50, 100, 150 y 200 Hz, lo que permite un período de descanso de 1 minuto entre cada estímulo para determinar la fuerza tetánica máxima. Se mide la longitud del músculo. Después de un descanso de 5 minutos, se evalúa la susceptibilidad del músculo TA al daño inducido por contracción. Después de 500 ms de estimulación, el músculo se alarga en un 10 % de la longitud óptima. Esto incluye estimular el músculo a 150 Hz durante 700 ms. Después de la estimulación, el músculo vuelve a la longitud óptima. El ciclo se repite cada minuto durante un total de 10 ciclos. La fuerza específica se calcula al dividir la fuerza tetánica máxima por el área de sección transversal del músculo TA. Después de las contracciones excéntricas, los ratones se sacrifican y el músculo TA se disecciona, se pesa y se congela para su análisis. El análisis de los datos se realiza de forma ciega pero no aleatoria.

Ensayo de contractibilidad muscular *in vivo*

Este ensayo mide el torque agregado producido por los músculos plantares o dorsiflexores de la extremidad inferior y se lleva a cabo mediante el uso de un aparato de fisiología muscular (Aurora Scientific, ON, Canadá). El animal se anestesia con isoflurano. Una vez que el animal está anestesiado, el pelo de la espalda y la extremidad posterior se eliminarán según sea necesario con las cortadoras. Si la eliminación con las cortadoras es insuficiente, se aplica una fina capa de crema depilatoria (Nair) y se limpia a fondo el sitio con

agua tibia para evitar molestias. El miembro posterior que se va a medir se fija a la placa del pie con cinta adhesiva. La extremidad se mantiene rígida en una abrazadera roma. El componente tibial o peroneo del nervio ciático se estimulará con dos electrodos monopolares de calibre 28 estériles y desechables insertados a través de la piel, por vía subcutánea cerca del nervio. La temperatura del ratón se mantendrá mediante una almohadilla térmica termorregulada conductora (establecida en 37 °C) o una fuente de calor radiante y monitorizada por una sonda de temperatura.

Histopatología

Para el análisis histológico, todos los músculos y órganos están embebidos en tragacanto de goma al 7 % y congelados instantáneamente en isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Las secciones congeladas (12 µm) se recogen para inmunohistoquímica y análisis de transferencia de Western.

Análisis de transferencia de Western para la detección de *CAPN3* humana

La cuantificación de la proteína *CAPN3* en tejidos musculares de ratón se evalúa mediante el uso de un método de transferencia Western. La enzima *CAPN3* se resuelve mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y migra como una banda de 94 kDa con un producto autolítico a aproximadamente 60 kDa mediante el uso de un anticuerpo de grado clínico de Novocastra que reconoce el extremo N-terminal, NCL-CALP-12A2. Adicionalmente, el anticuerpo NCL-CALP-2C4 reconoce este mismo peso molecular de *CAPN3* (94 kD) y un fragmento adicional (30 kD) en el músculo esquelético; ambos anticuerpos son adecuados para la detección de proteínas. Se realiza una medida semicuantitativa de los niveles de expresión de la proteína *CAPN3* dentro de las muestras de ratones knockout para la calpaína después de la administración del vector rAAV terapéutico y se compara con los controles no tratados.

Histología muscular cuantitativa

Las secciones transversales de los músculos TA y cuádriceps de tratados con AAVrh.74.tMCK.*CAPN3* frente al control no inyectado, se tiñen con hematoxilina y eosina y se fotografían mediante el uso del software Zeiss Axiovision L4 (4 imágenes aleatorias de 20x por sección por animal). Los diámetros de tamaño de fibra se comparan entre los tratados y los controles.

Análisis estadístico

La prueba t de Student o las pruebas de comparación múltiple ANOVA de una sola vía se realizan cuando corresponde.

Ejemplo 7

Toxicología/Estudios de biodistribución

Los estudios de toxicología/biodistribución se llevan a cabo mediante el uso de la dosis efectiva establecida y una dosis logarítmica más alta. Los estudios de toxicología se realizan mediante la administración sistémica (vena de la cola) de rAAV a ratones *CAPN3*-KO de 6-8 semanas de edad, incluida la comparación con ratones normales C57Bl6 normales. Se incluyen cohortes de 6-10 ratones y se realizan necropsias

completas mediante el uso de métodos similares a GLP.

El suero extraído de muestras de sangre se usa para las Clínicas Químicas: Alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa, bilirrubina (total y directa), nitrógeno ureico en sangre, creatinina, creatina quinasa, glucosa y proteína total.

Se realiza una necropsia completa con un examen y disección exhaustivos y sistemáticos de las vísceras y el cadáver del animal. Los tejidos/órganos que se recogen incluyen gónadas, cerebro, bazo, riñones, yeyuno, colon, páncreas, corazón, pulmón, estómago, hígado, ganglios linfáticos inguinales, médula espinal, gastrocnemio y cuádriceps. Los tejidos/órganos para estudios histopatológicos se recogen y se fijan en formalina amortiguada neutra al 10 % (10 % NBF), con la excepción de todas las muestras de músculo esquelético que se montan en bloques con OCT y se congelan instantáneamente en metilbutano líquido enfriado con nitrógeno para criosecciones.

Ejemplo 8

Prueba de Biopotencia *in vivo* Después de la Inyección Intramuscular

La prueba de biopotencia *in vivo* se llevó a cabo tras la inyección intramuscular (IM) de AAVrh.74.tMCK.CAPN3 (1E11 vg) en el músculo tibial anterior (TA) en ratones CAPN3 KO (n=3) como se describió anteriormente en el Ejemplo 5.

A las 4 semanas después de la administración, la administración de genes se analizó mediante PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR) y análisis de transferencia Western. Para el análisis de transferencia Western, se separaron muestras correspondientes a 50 µg de extractos de proteína muscular completasen un gel de acrilamida SDS con Tris-Acetato 3-8 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. La inmunodetección se realizó con un anticuerpo monoclonal producido contra un péptido sintético que contiene los AA 1-19 de la secuencia de Calpaína 3 humana (Leica) y el anticuerpo de actina específico de músculo (Leica) como control de carga. La Figura 3A demuestra la presencia de la proteína calpaína 3 de 94 kD en el músculo TA después de la inyección intramuscular. El análisis de RT-qPCR demostró que los niveles de expresión relativa del gen de la calpaína 3 humana 4 semanas después de la transferencia del gen volvieron a niveles normalizados en comparación con los ratones WT (véase Figura 3B). Se usó GAPDH de ratón como gen de referencia y se usó C57BL/6 WT para calibrar los datos de RT-qPCR.

Además, se realizó un análisis histopatológico cuantitativo después de la administración intramuscular. Como se muestra, el diámetro de la fibra del músculo TA de los ratones KO CAPN3 tratados se comparó con el del músculo del control no tratado (TA inyectado con lactato de Ringer). La media del tamaño de la fibra de las fibras oxidativas de contracción lenta (STO, oscura), oxidativas de contracción rápida (FTO, intermedia) y glicolítico de contracción rápida (FTG, clara) apareció normalizada hacia los valores de WT en el músculo TA inyectado con AAV.hCAPN3. La cuantificación del tamaño del tipo de fibra se proporciona en la Tabla 4 e ilustra un aumento con el tratamiento.

Tabla 4

	WT (z18-14)	Tratado (z18-11)	No tratado (z18-22 L)
--	-------------	------------------	-----------------------

	número	diámetro (μm)	número	diámetro (μm)	número	diámetro (μm)
STO	246	28.06±0.27	142	28.89±0.32	240	25.57±0.27
FTO	63	36.65±0.53	86	36.71±0.58	110	32.19±0.48
FTG	82	42.55±0.53	86	43.68±0.66	128	35.49±0.50
Toda la fibra	391	32.45±0.38	314	35.08±0.45	478	29.75±0.30

En resumen, las pruebas de biopotencia *in vivo* después de la inyección IM del vector (1E11 vg) en el músculo tibial anterior (TA) en ratones KO *CAPN3* (n=2) demostraron que 4 semanas después de la administración del gen 1) RT-qPCR y los análisis de transferencia Western mostraron expresiones de transcripciones de *CAPN3* y de la proteína calpaína 3 de 94 kDa de longitud completa y 2) el análisis histológico mostró un aumento en el diámetro de la fibra muscular de TA en comparación con el músculo de control (TA inyectada con lactato de Ringer).

Ejemplo 9

Prueba de Biopotencia *in vivo* Después de una Inyección Sistémica

La prueba de biopotencia *in vivo* se llevó a cabo después de la inyección sistémica de AAVrh.74.tMCK.*CAPN3* (3E12 vg o 6E12 vg) a través de la vena de la cola de ratones *CAPN3*-KO. La cohorte de *CAPN3*KO de dosis baja (n=5; los ratones se denominaron Z18-13, Z18-15, Z18-16, Z18-17, Z18-18) recibieron 3E12 vg en 300 μl de lactato de Ringer. A las 4 semanas posteriores a la inyección del gen, se evaluó la fatiga de los ratones al correr mediante la prueba de correr hasta el agotamiento y luego se sacrificaron para la recolección de tejido. Se extrajeron los músculos de las extremidades superiores e inferiores (TA, gastrocnemio (GAS), cuádriceps, tríceps), corazón, hígado, bazo, pulmón, ovarios y testículos, y las muestras de tejido se congelaron en isopentano y se enfriaron en nitrógeno líquido.

Se evaluó la expresión de RT-qPCR *CAPN3* en músculos TA. Para la dosis baja de 3E12 vg, los niveles de expresión de ARNm de *CAPN3* fueron bajos según lo observado por los valores altos de CT, >27. El análisis de transferencia Western mostró bandas de proteína correspondientes indetectables. Aunque se observaron datos de baja expresión en este tejido para la dosis baja, se demostraron beneficios tanto funcionales como histológicos con la administración sistémica de 3E12 vg.

Subsecuentemente, se administró sistémicamente una dosis más alta (6E12 vg) para investigar si se podía detectar la expresión de proteínas a una dosis más alta de administración de vector. Los ratones *CAPN3*-KO de la cohorte de dosis alta (ratones denominados como Z18-20, Z18-21, Z18-23 y Z18-24), recibieron el vector 6E12 vg AAVrh7.4.tMCK.h*CAPN3* (el doble de la dosis usada en la cohorte de dosis baja a través de inyección sistémica en la vena de la cola) y fueron sacrificados 4 semanas después de la inyección. RT-qPCR mostró niveles variables de expresión de *CAPN3* en el cuádriceps, tríceps, GAS, TA y músculo

cardíaco.

Para determinar la expresión relativa del ARNm de *CAPN3*, se recogieron muestras de tejido muscular de ratones KO *CAPN3* tratados con el vector tMCK.h*CAPN3* a la dosis de 3E12 vg (cohorte de dosis baja 1) y 6E12 vg (cohorte de dosis alta 2). Se aisló el ARN total de ambas cohortes y se ensayó qPCR de *CAPN3* frente a GAPDH de ratón junto con las muestras previas de la cohorte que recibió el vector mediante inyección IM (1E11 vg; véase más arriba en el Ejemplo 8).

La expresión relativa de *CAPN3* se determinó mediante el método siguiente:

$$CT = CT_{CAPN3} - CT_{mGAPDH}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT - \Delta CT_{\text{Calibrador}^*}$$

$$\text{Expresión relativa de } CAPN3 = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

La expresión relativa de *CAPN3* en cada tejido y el valor de CT original se muestran en la Tabla 5 más abajo y en la Figura 5. La Tabla 5 proporciona los datos para la administración IM (ratones núm. Z18-11 y Z18-12) y para la administración sistémica

Tabla 5: RT-PCR de CAPN3:

Ratones Núm.	Tejido	Genotipo	Dosis de Tratamiento o (DRAP por ratones)	Valor CT				Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{(-\Delta\Delta$ CT)
				CAPN3		mGAPDH				
Z18-14*	TA	WT	0	22.437	22.456	15.234	15.274	7.193	0.000	1.0003
Z18-19	TA	KO CAPN3	0	35.259	32.705	15.159	15.176	18.814	11.621	0.0003
Z18-11	TA		1E11	24.338	24.217	15.800	15.835	8.460	1.267	0.4155
Z18-12	TA			21.030	21.104	14.906	15.058	6.085	-1.108	2.1548
Z18-13	TA		3E12	32.376	32.430	15.236	15.203	17.183	9.990	0.0010
Z18-15	TA			27.407	27.443	14.510	14.520	12.910	5.717	0.0190
Z18-16	TA			28.609	28.333	15.229	15.259	13.227	6.034	0.0153
Z18-17	TA			28.675	28.670	14.997	15.005	13.671	6.478	0.0112
Z18-18	TA			27.869	28.128	14.522	14.544	13.466	6.273	0.0129
Z18-20	Gastroc		6E12	22.271	22.439	15.939	15.974	6.398	-0.795	1.7347
	Corazón			21.996	22.051	15.267	15.315	6.732	-0.461	1.3762
	Cuádriceps	21.008		21.202	15.203	15.407	5.800	-1.393	2.6262	

5	Z18-21	TA			23.806	24.173	16.169	16.385	7.713	0.520	0.6975
		Tríceps			24.083	24.361	15.978	16.097	8.185	0.992	0.5027
		Gastroc			25.330	25.221	15.461	15.462	9.814	2.621	0.1625
		Corazón			25.024	24.819	15.032	15.097	9.857	2.664	0.1577
		Cuádriceps			26.278	26.108	15.285	15.370	10.866	3.673	0.0784
		TA			26.649	26.697	15.017	15.010	11.659	4.466	0.0452
10	Z18-23	Tríceps			27.040	27.134	15.321	15.343	11.755	4.562	0.0423
		Gastroc			24.150	24.144	16.225	16.117	7.976	0.783	0.5812
		Corazón			22.799	22.495	14.593	14.502	8.099	0.906	0.5335
		Cuádriceps			24.248	24.076	16.511	16.504	7.655	0.462	0.7262
		TA			25.554	25.338	16.124	16.054	9.357	2.164	0.2231
		Tríceps			24.396	24.383	15.363	15.277	9.070	1.877	0.2723
15	Z18-24	Gastroc			24.444	24.165	18.083	18.036	6.245	-0.948	1.9297
		Corazón			22.769	22.425	15.100	15.077	7.508	0.315	0.8037
		Cuádriceps			22.754	22.521	15.637	15.672	6.983	-0.210	1.1568
		TA			23.491	23.555	15.979	15.974	7.547	0.354	0.7826
		Tríceps			24.554	24.403	16.370	16.329	8.128	0.935	0.5229
20	Z18-22	Gastroc	0		31.878	31.962	15.433	15.527	16.440	9.247	0.0016
		Corazón			31.407	32.964	16.006	15.972	16.197	9.004	0.0019
		Cuádriceps			32.332	33.464	16.528	16.468	16.400	9.207	0.0017
		TA			35.584	33.917	16.451	16.372	18.339	11.146	0.0004
		Tríceps			33.615	32.786	15.742	15.628	17.516	10.323	0.0008
25	Tejido Humano	Músculo			23.547	23.539	37.743	38.262			
	pAAV.t MCK.	1 pg/uL			16.328	16.413	UD	38.302			
	hCAPN3										
*Calibrador											

En general, la expresión del ARNm de *CAPN3* en el músculo KO *CAPN3* después de la administración sistémica tuvo una variabilidad específica de animales y tejidos y una expresión relativa más baja en comparación con la administración IM en 1E11 vg (< 1 % de la administración IM); esto fue especialmente cierto para la cohorte de dosis baja 3E12. En consecuencia, la proteína de 94 kDa de longitud completa

estaba por debajo del límite de detección por transferencia Western. Sin embargo, después de la inyección sistémica de la dosis sistémica de 6E12 vg en la cohorte de dosis altas, se mostró una expresión génica sólida y cantidades prominentes de proteína Calpaína 3 de longitud completa.

Ejemplo 10

Evaluación de la administración del gen sistémico AAVrh74.tMCK.hCAPN3

La eficiencia de la transferencia de genes se evaluó mediante qPCR, calculando copias del genoma del vector dentro de muestras de tejido de ratón KO *CAPN3* después de la administración sistémica de AAVrh74.tMCK.hCAPN3 a 6E12 vg. Se determinó la carga del genoma del vector de los músculos esqueléticos de las extremidades inferiores y superiores (cuádriceps, TA, gastroc, tríceps), corazón e hígado. El ADN genómico se aisló de muestras de tejido congelado. El ensayo de qPCR se realizó en un ABI 7500 (Applied Biosystems) mediante el uso del siguiente conjunto de cebadores: “5'-CGGAGAGCAACTGCATAAG-3' (Directo; SEQ ID NO: 8);

“5'-GGCTGATGATGGCTGAATAG-3' (Inverso; SEC ID NO: 9). El par de cebadores amplifica exclusivamente un producto de la región 5' del ORF de hCAPN3, y la región corriente abajo exclusiva del vector de expresión, incluidas las porciones de un elemento intrónico. Los resultados finales se expresan como la media del número de copias del vector AAVrh74 por microgramo de ADN genómico.

Como se muestra en la Figura 6, el mayor número de copias del genoma del vector estaba presente en el hígado después de la administración sistémica del vector. La distribución del genoma del vector fue variable entre los grupos musculares. En general, los valores fueron más altos en el cuádriceps y el tejido cardíaco en comparación con otros músculos. También se observó variabilidad experimental; como el caso del Ratón núm. Z18-21 que mostró un número de copias relativamente más bajo en todos los grupos de músculos en comparación con otros 3 ratones.

Se observaron mejoras tanto en las características funcionales e histológicas en los ratones KO *CAPN3* tratados sistémicamente con 3E12 vg; sin embargo, solo se detectaron niveles bajos de expresión de Calpaína 3 muscular en los aislados de ARN total mediante RT-qPCR y la proteína de 94 kDa de longitud completa no fue detectable por transferencia Western para el tejido muscular particular (Véase Figura 3A).

Sin embargo, después de la dosificación sistémica de 6E12 vg se exhibieron una fuerte expresión génica y cantidades prominentes de proteína Calpaína 3 de longitud completa (véase Figura 3B). Los datos demuestran que la expresión del gen de Calpaína 3 volvió a los niveles normalizados en comparación con los ratones WT después de 4 semanas después de la transferencia del gen de las partículas AAVrh74.tMCK.hCAPN3. Se usó GAPDH de ratón como gen de referencia y C57BL/6 WT para calibrar los datos de RT-qPCR.

Histopatología

Como se discutió anteriormente, se observó una tendencia de eficacia 4 semanas después de la inyección. Se observó un aumento significativo en el tamaño de la fibra en el músculo TA de los ratones KO *CAPN3*

después de la administración sistémica de AAVrh.74.tMCK.hCAPN3 a las 4 semanas después de la inyección en ambas cohortes (3E12 y 6E12). Como se muestra en la Figura 7, el diámetro total de la fibra aumentó significativamente en ambas cohortes tratadas en comparación con las contrapartes KO no tratadas ($p < 0.00001$). El tratamiento dio como resultado la normalización del tamaño de la fibra y no hubo diferencias relacionadas con la dosis entre las cohortes de tratamiento ($p = 0.78058$). La Tabla 6 proporciona el tamaño de la fibra muscular en ratones de tipo salvaje y KO CAPN3 después de la terapia génica sistémica AAV.hCAPN3 a 3E12 y 6E12 vg.

Tabla 6

	WT (n=3)		6 E12 CAPN3 (n=3)		3E12 CAPN3 (n=4)		KO (n=4)	
	Número	Diámetro (μm)	Número	Diámetro (μm)	Número	Diámetro (μm)	Número	Diámetro (μm)
STO	532	30.0 ± 0.6	441	31.7 ± 0.8	464	30.7 ± 1.2	858	27.2 ± 0.8
FTO	278	40.7 ± 1.1	345	38.8 ± 1.1	447	40.8 ± 1.4	364	35.4 ± 1.1
FTG	275	46.1 ± 1.3	226	45.8 ± 1.4	403	44.1 ± 1.6	455	39.7 ± 1.2
Todas las fibras	1085	38.9 ± 1.8	1012	38.8 ± 2.0	1314	38.5 ± 2.4	1677	34.1 ± 1.8

No hubo evidencia histopatológica de toxicidad cardíaca después de la inyección sistémica del vector AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3 a las 4 semanas en ninguna de las cohortes. Se encontraron cantidades variables de virus en el tejido cardíaco, sin embargo, no se detectaron bandas de proteínas en el tejido cardíaco mediante transferencia Western en ninguna de las cohortes.

Estudio de Funcionalidad: Prueba de correr hasta el agotamiento

Los ratones estaban acostumbrados a la caminadora (Columbus Instruments) con una carrera de 15 minutos una vez al día a 10 m/min durante 3 días antes de la adquisición de los datos para la prueba de correr hasta el agotamiento. El protocolo usado requería tener ratones en una cinta rodante con una inclinación de 15 grados. La caminadora se encendió a una velocidad de 1 m/min y la velocidad se incrementó en 1 m cada minuto hasta que el ratón se agotó. El agotamiento se determinó cuando el ratón se sienta en la almohadilla de descanso durante al menos 15 segundos. Se registraron el tiempo, la velocidad y la distancia hasta el agotamiento.

La Figura 8A proporciona datos para la prueba de correr hasta el agotamiento para la cohorte de dosis baja, que recibió 3E12 vg de AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3, y la cohorte de dosis alta 2, que recibió 6E12 vg de AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3 según se evaluó 4 semanas después de la administración sistémica. Los ratones KO CAPN3 tratados en ambas cohortes obtuvieron mejores resultados en la prueba de correr hasta el agotamiento en comparación con sus homólogos no tratados. No hubo una diferencia aparente relacionada con la dosis en el rendimiento de la prueba de correr hasta el agotamiento o una diferencia estadística en el diámetro de la fibra muscular entre las cohortes de dosis baja y alta.

Los ratones de la cohorte 2 de dosis alta ($n = 16$) se analizaron adicionalmente 20-24 semanas después de la administración de 6E12 vg de AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3. Como se muestra en la Figura 8B, los ratones tratados con KO CAPN3 continuaron teniendo un mejor desempeño en la prueba de Correr hasta el

Agotamiento en comparación con sus contrapartes no tratadas ($p < 0.00001$).

Ejemplo 11

Evaluación de la toxicidad cardíaca tras la inyección sistémica de vector AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3

5 Después de que los ratones de las cohortes fueron sacrificados 4 semanas después de la inyección, se recolectaron muestras de suero y órganos. La cohorte de la dosis baja 1 de CAPN3KO ($n=5$) recibió 3E12 vg en 300 μ l de lactato de Ringer del vector AAVrh.74.tMCK.hCAPN3 mediante inyección en la vena de la cola. Los ratones de la cohorte de dosis alta 2 de CAPN3-KO recibieron el vector 6E12 vg del vector de AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3 a través de la vena de la cola, y ambas cohortes se sacrificaron 4 semanas después de la inyección. Se examinaron dos secciones a través del vértice del corazón, las regiones superficial y profunda de los ventrículos. No se encontró inflamación, necrosis o regeneración en las secciones de tejido, lo que indica que no se observaron efectos tóxicos en el músculo cardíaco por la administración sistémica del vector AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3 en dos dosis diferentes 4 semanas después de la inyección. Ratones número Z18-19 y Z18-22 (inyectado con lactato de Ringer/no tratado) sirvieron como animal KO de control. La figura 9 proporciona secciones congeladas frescas teñidas con H&E del corazón. No se observó necrosis, regeneración o inflamación de las fibras musculares. Aunque hubo cantidades variables de virus presentes en el tejido cardíaco, no se detectaron bandas de proteínas mediante transferencia Western en ninguna de las cohortes. La Figura 10 proporciona el análisis de transferencia Western que muestra que la proteína Calpaína 3 de longitud completa está por debajo del límite de detección en los tejidos del corazón después de la transducción.

Ejemplo 12

20 Análisis Fisiológico *in vivo*

La evaluación fisiológica se lleva a cabo después de la administración intramuscular o sistémica del vector AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3. Durante las evaluaciones fisiológicas *in vivo*, los ratones se anestesian con isoflurano inhalado. Una vez que el animal está anestesiado, se quita el pelo de la espalda y la extremidad trasera según sea necesario con cortadoras. Si la eliminación del pelo con maquinilla es insuficiente, se aplica una fina capa de crema para eliminar el pelo. Durante las mediciones de la fuerza fisiológica *in vivo*, el torque del miembro posterior se mide con una placa de pie de fuerza no invasiva conectada al motor de detección de fuerza (Aurora Scientific, Canadá) después de estimulaciones supramáximas del nervio ciático. La extremidad posterior que va a medirse se fija a la placa del pie con cinta adhesiva. La extremidad se mantiene rígida en una abrazadera roma. El componente tibial o peroneo del nervio ciático se estimula con dos electrodos monopolares estériles desechables de calibre 28 insertados subcutáneamente cerca del nervio. La temperatura del ratón se mantiene mediante una placa calefactora termorregulada conductora (fijada a 37 °C) o fuente de calor radiante y monitorizada por sonda de temperatura infrarroja.

Si bien la presente descripción proporciona modalidades específicas, se entiende que se producirán

variaciones para los expertos en la técnica . En consecuencia, sólo las limitaciones que aparecen en las reivindicaciones deben aplicarse a la invención.

Todos los documentos a los que se hace referencia en esta solicitud se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

5

10

15

20

25

30

REIVINDICACIONES

1. Un virus adenoasociado recombinante (rAAV) comprende un polinucleótido que comprende una primera repetición terminal invertida (ITR) de AAV, un promotor, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con actividad de calpaína 3 (CAPN3) y una segunda ITR de AAV.

5 2. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína con actividad de CAPN3 es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

10 3. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína con actividad de CAPN3 es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

4. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína con actividad de CAPN3 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2.

15 5. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la proteína con actividad de CAPN3 comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 7.

20 6. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la proteína con actividad de CAPN3 comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 7.

7. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la proteína con actividad de CAPN3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

25 8. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polinucleótido comprende una secuencia que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

30 9. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polinucleótido comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

10. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polinucleótido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

11. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el promotor es un promotor específico del músculo.

12. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el promotor específico del músculo comprende uno o más de un elemento del gen de la actina esquelética humana, un elemento del gen de la actina cardíaca, un promotor de la desmina, un promotor de la alfa-actina esquelética (ASKA), un promotor de la troponina I (TNNI2), elemento de fijación a mef de factor de unión potenciador específico de miocitos, un promotor de la creatina quinasa muscular (MCK), un promotor de MCK truncado (tMCK), un promotor de cadena pesada de la miosina (MHC), un potenciador de la cadena pesada de a-miosina híbrida/promotor de potenciador de MCK (MHCK7), un promotor C5-12, un elemento potenciador de la creatina quinasa murina, un elemento del gen de la troponina c esquelética de contracción rápida, un elemento del gen de troponina c cardíaca de contracción lenta, un elemento del gen de troponina i de contracción lenta, elemento de respuesta (HRE) al factor nuclear inducible por hipoxia (HIF), un elemento inducible por esteroides y un elemento de respuesta a glucocorticoides (gre).

13. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el promotor específico del músculo es un promotor MCK, un promotor tMCK o un promotor MHCK7.

14. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el promotor específico del músculo es un promotor MCK truncado que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3.

15. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la primera y la segunda repeticiones de terminales invertidas de AAV son repeticiones terminales invertidas de AAV2.

16. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el rAAV comprende uno o más proteínas de la cápside 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, AAV rh.74 y AAV rh.10.

17. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el rAAV comprende una proteína de la cápside rh.74 o una proteína de la cápside del AAV9.

18. Una composición que comprende el rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17.

19. Un método para tratar la distrofia muscular de cinturas 2A en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o la composición de acuerdo con la reivindicación 18.

5 20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, donde el tratamiento da como resultado uno o más de:

- (a) un aumento del diámetro de la fibra muscular,
- (b) una disminución del número de pequeñas fibras musculares lobuladas,
- (c) una disminución del número de fibras con núcleos internos,
- (d) una disminución del contenido de tejido conectivo endomisio,
- 10 (e) corrección de la atrofia muscular, y
- (f) un aumento de la generación de fuerza muscular.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la fibra muscular comprende una o más de fibra muscular oxidativa de contracción lenta (STO), fibra muscular oxidativa de contracción rápida (FTO) y fibra glicolítica de contracción rápida (FTG).

22. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en donde el tratamiento da como resultado uno o más de:

(a) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 %, o 40 % del número total de fibra muscular por mm^2 a las 4 semanas después de la administración;

20 (b) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular a las 4 semanas después de la administración;

(c) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 42 % del número de fibras musculares STO por mm^2 a las 4 semanas después de la administración;

25 (d) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de las fibra muscular STO a las 4 semanas después de la administración;

(e) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del número de fibras musculares FTO por mm^2 a las 4 semanas después de la administración;

25 (f) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del diámetro de la fibra muscular FTO a las 4 semanas después de la administración;

30 (g) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % del número de fibras musculares FTG por mm^2 a las 4 semanas después de la administración; y

(h) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular FTG a las 4 semanas después de la administración.

23. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19-22, en donde la administración es mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa.

5 24. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19-23, en donde el músculo cardíaco del sujeto muestra proteína de calpaína 3 mínima o baja expresada a partir del rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o la composición de acuerdo con la reivindicación 18.

10 25. Una composición para el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas 2A que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o la composición de acuerdo con la reivindicación 18.

26. La composición de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el tratamiento con la composición da como resultado uno o más de:

- 15
- (a) un aumento del diámetro de la fibra muscular,
 - (b) una disminución del número de pequeñas fibras musculares lobuladas,
 - (c) un número reducido de fibras con núcleos internos,
 - (d) una disminución del contenido de tejido conectivo endomisio,
 - (e) corrección de la atrofia muscular, y
 - (f) una aumento de la generación de fuerza muscular.

20 27. La composición de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la fibra muscular comprende una o más de fibra muscular oxidativa de contracción lenta (STO), fibra muscular oxidativa de contracción rápida (FTO) y fibra glucolítica de contracción rápida (FTG).

25 28. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25-27, en donde el tratamiento con la composición da como resultado uno o más de:

- 30
- (a) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 %, o 40 % del número total de fibra muscular por mm^2 a las 4 semanas después de la administración;
 - (b) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular a las 4 semanas después de la administración;
 - (c) al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 42 % de disminución del número de fibras musculares STO por mm^2 a las 4 semanas después de la administración;
 - (d) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular STO a las 4 semanas después de la administración;

(e) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del número de fibras musculares FTO por mm² a las 4 semanas después de la administración;

(f) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del diámetro de la fibra muscular FTO a las 4 semanas después de la administración;

5 (g) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % del número de fibras musculares FTG por mm² a las 4 semanas después de la administración; y

(h) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular FTG a las 4 semanas después de la administración.

10 29. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25-28, en donde la composición se formula para la administración mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa.

15 30. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25-28, en donde después del tratamiento con la composición, el músculo cardíaco del sujeto muestra una proteína de calpaína 3 mínima o baja expresada a partir del rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o la composición de acuerdo con la reivindicación 18.

31. El uso de una cantidad terapéuticamente eficaz del rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o la composición de acuerdo con la reivindicación 18 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas 2A.

20 32. El uso de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el tratamiento con el medicamento da como resultado uno o más de:

- (a) un aumento del diámetro de la fibra muscular,
- (b) una disminución del número de pequeñas fibras musculares lobuladas,
- (c) un número reducido de fibras con núcleos internos,
- 25 (d) una disminución del contenido de tejido conectivo endomisio,
- (e) corrección de la atrofia muscular, y
- (f) una aumento de la generación de fuerza muscular.

30 33. El uso de acuerdo con la reivindicación 32, en donde la fibra muscular comprende una o más de fibra muscular oxidativa de contracción lenta (STO), fibra muscular oxidativa de contracción rápida (FTO) y fibra glucolítica de contracción rápida (FTG).

34. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31-33, en donde el tratamiento con el

medicamento da como resultado uno o más de:

(a) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 %, o 40 % del número total de fibra muscular por mm^2 a las 4 semanas después de la administración;

(b) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de las fibra muscular a las 4 semanas después de la administración;

(c) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 42 % de del número de fibras musculares STO por mm^2 a las 4 semanas después de la administración;

(d) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular STO a las 4 semanas después de la administración;

(e) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del número de fibra muscular FTO por mm^2 a las 4 semanas después de la administración;

(f) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % del diámetro de la fibra muscular FTO a las 4 semanas después de la administración;

(g) al menos una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % del número de fibras musculares FTG por mm^2 a las 4 semanas después de la administración; y

(h) al menos un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % del diámetro de la fibra muscular FTG a las 4 semanas después de la administración.

35. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31-34, en donde el medicamento se formula para la administración mediante inyección intramuscular o inyección intravenosa.

36. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31-35, en donde después del tratamiento con el medicamento, el músculo cardíaco del sujeto muestra una proteína de calpaína 3 mínima o baja expresada a partir del rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o la composición de acuerdo con la reivindicación 18.

RESUMEN

Se proporcionan productos y métodos para tratar la distrofia muscular de cinturas 2A. En los métodos, los virus adenoasociados recombinantes administran ADN que codifica una proteína con actividad de calpaína 3.

Figura 1

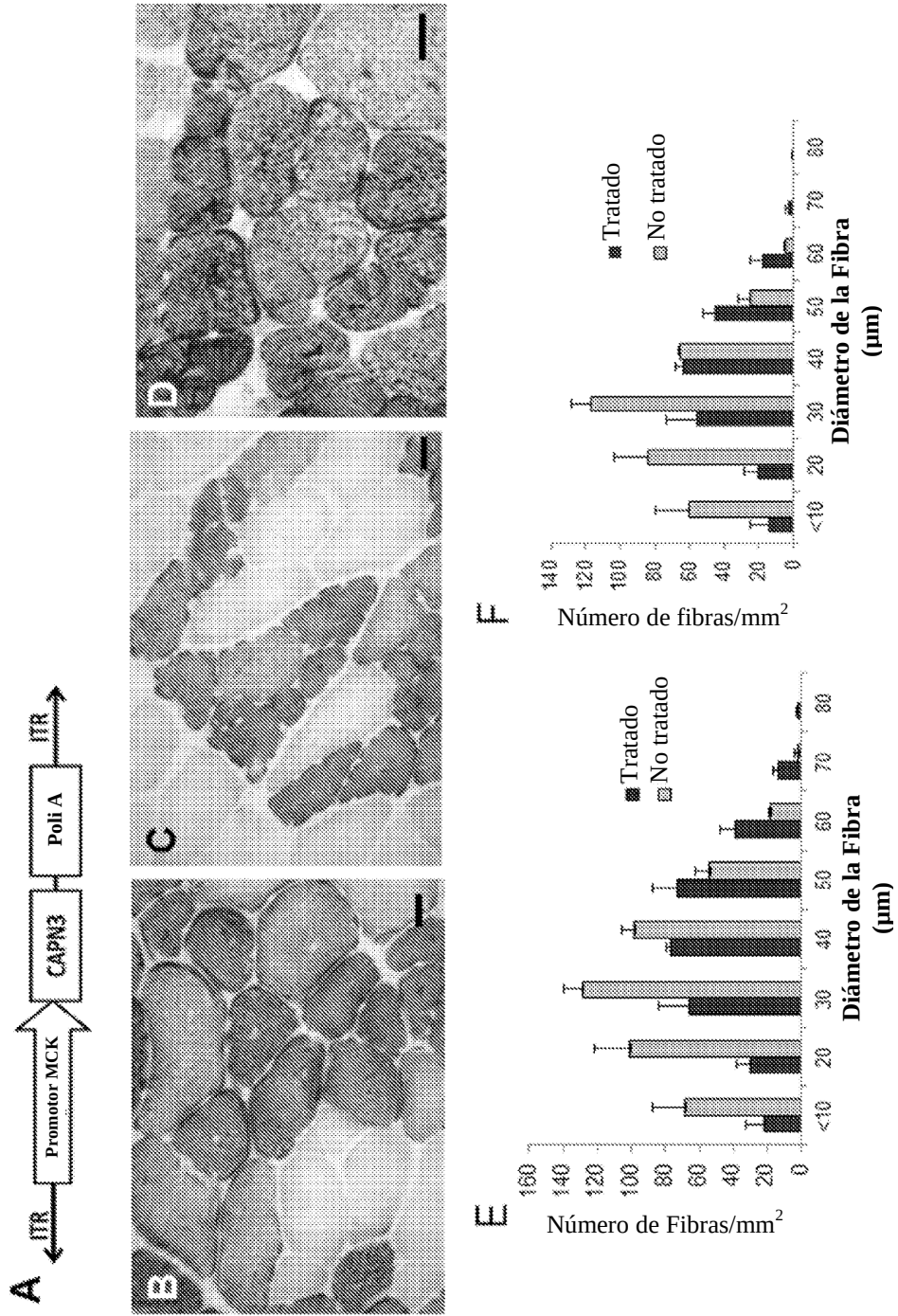


Figura 2

Creado con [ilegible]

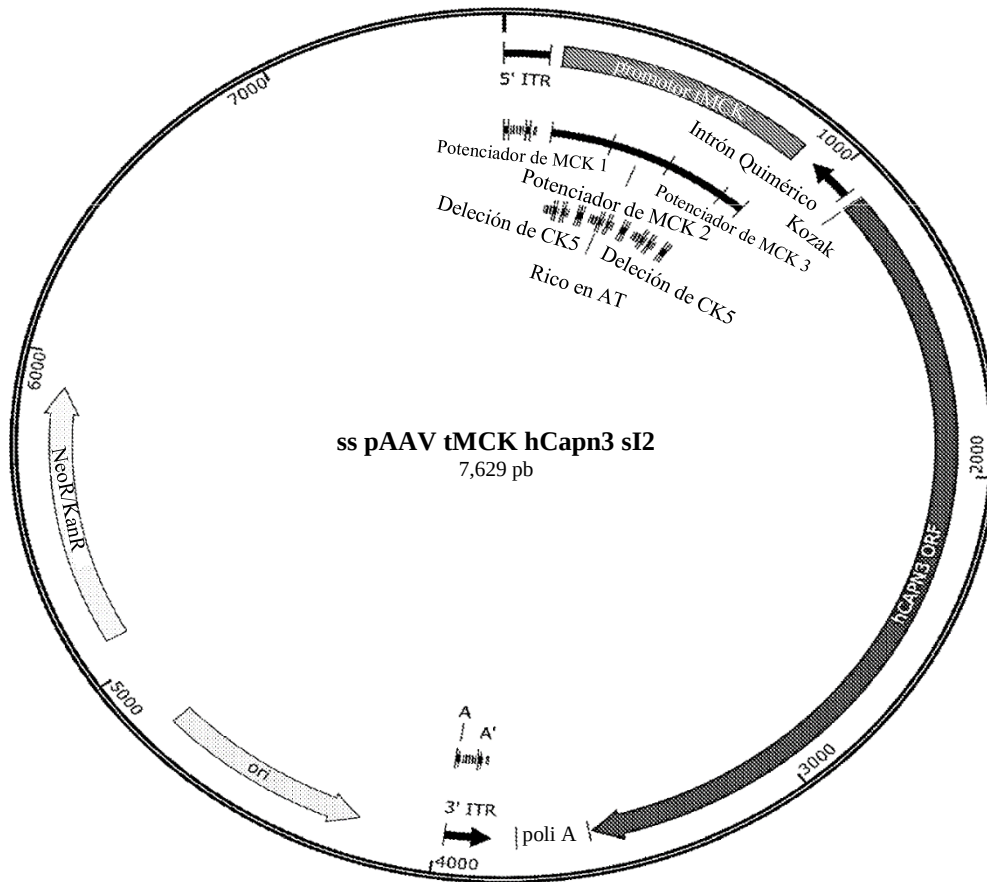


Figura 3

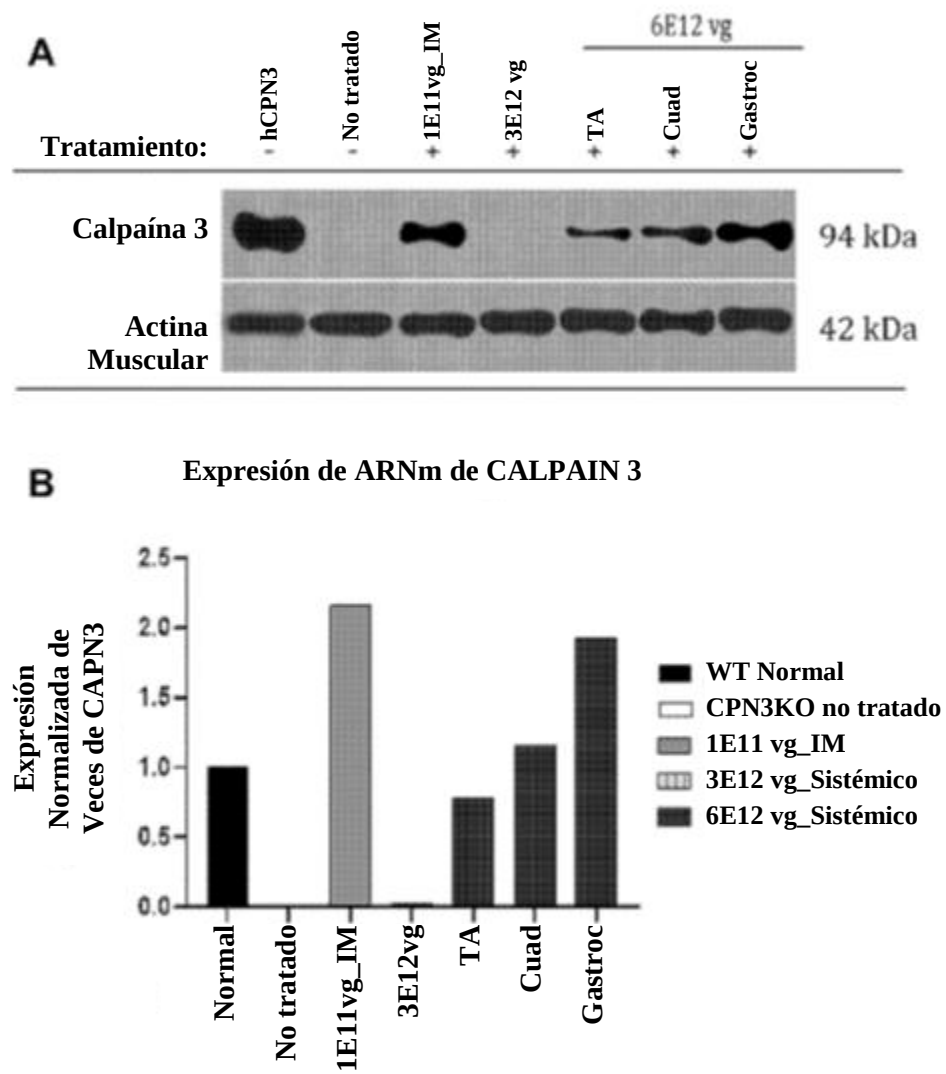


Figura 4

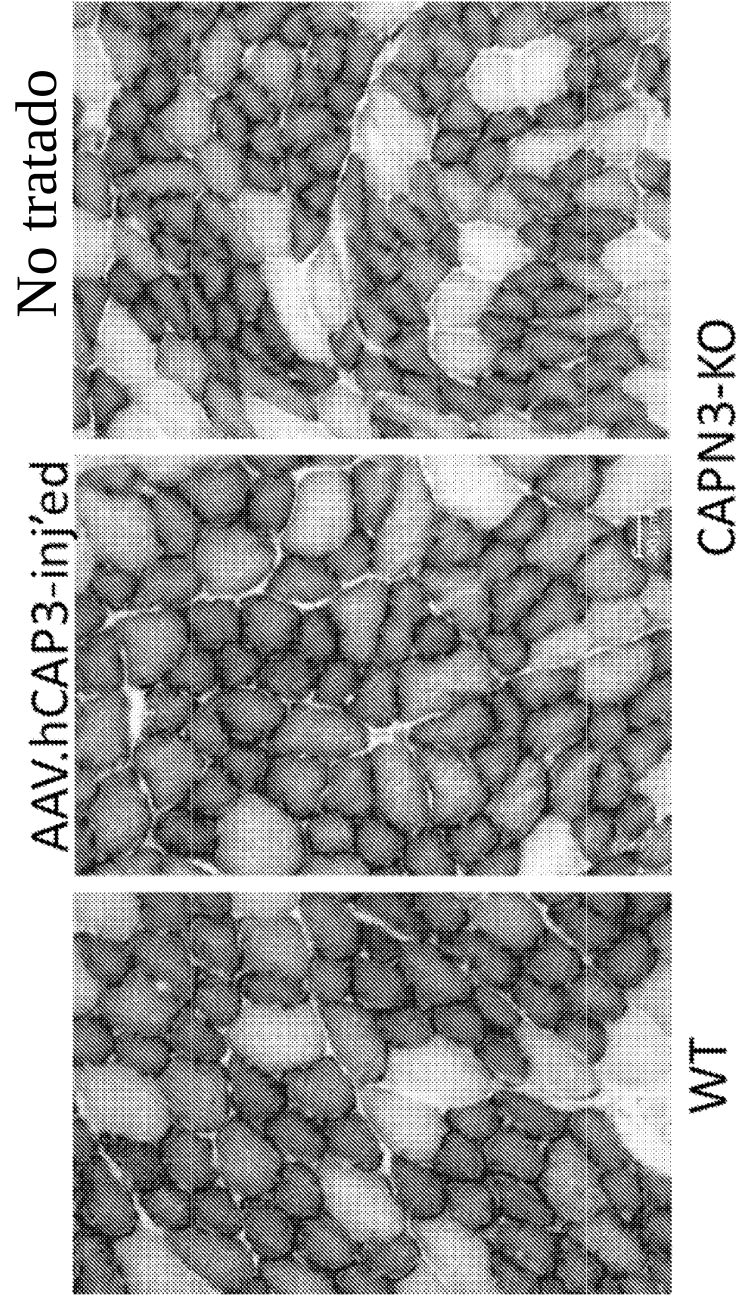


Figura 5

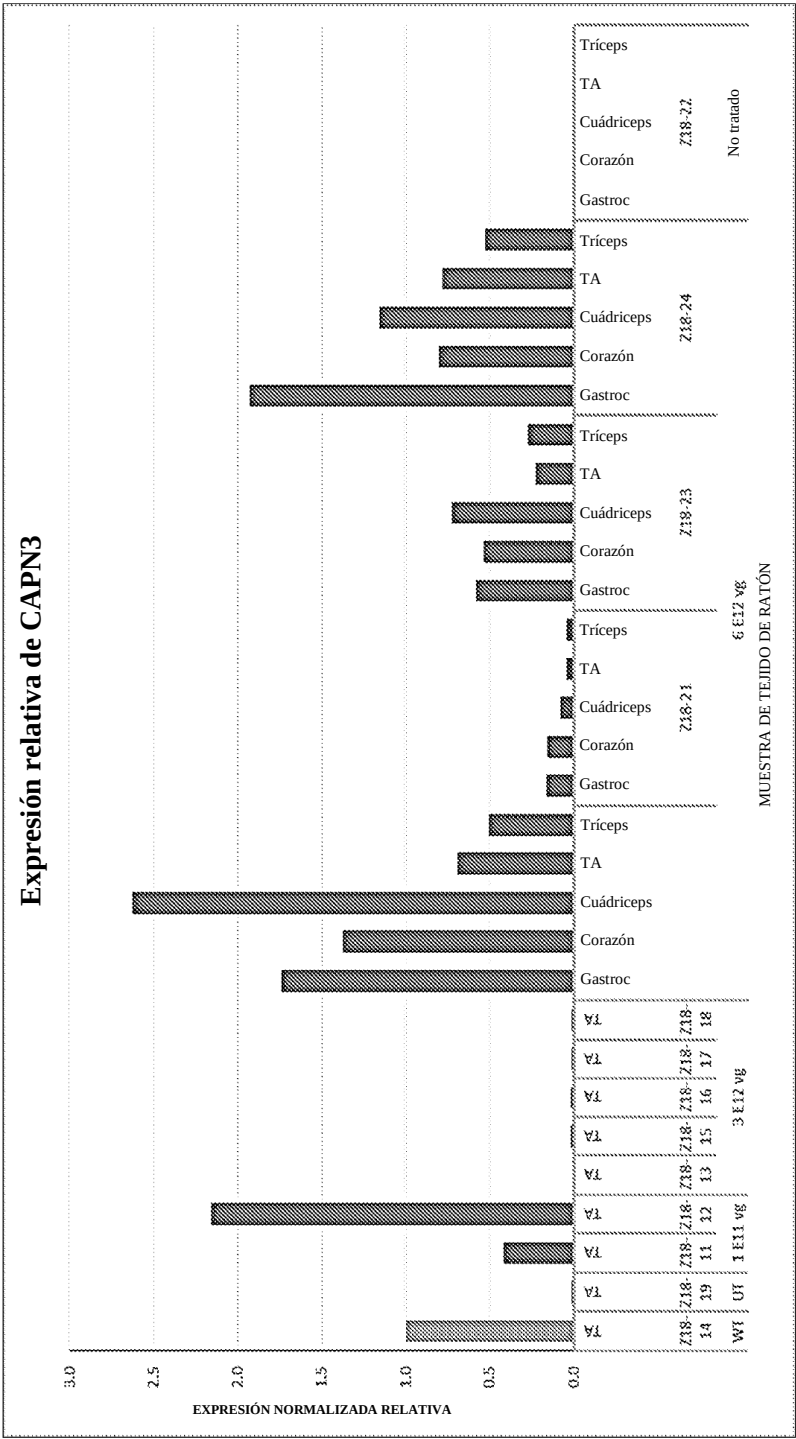


Figura 6

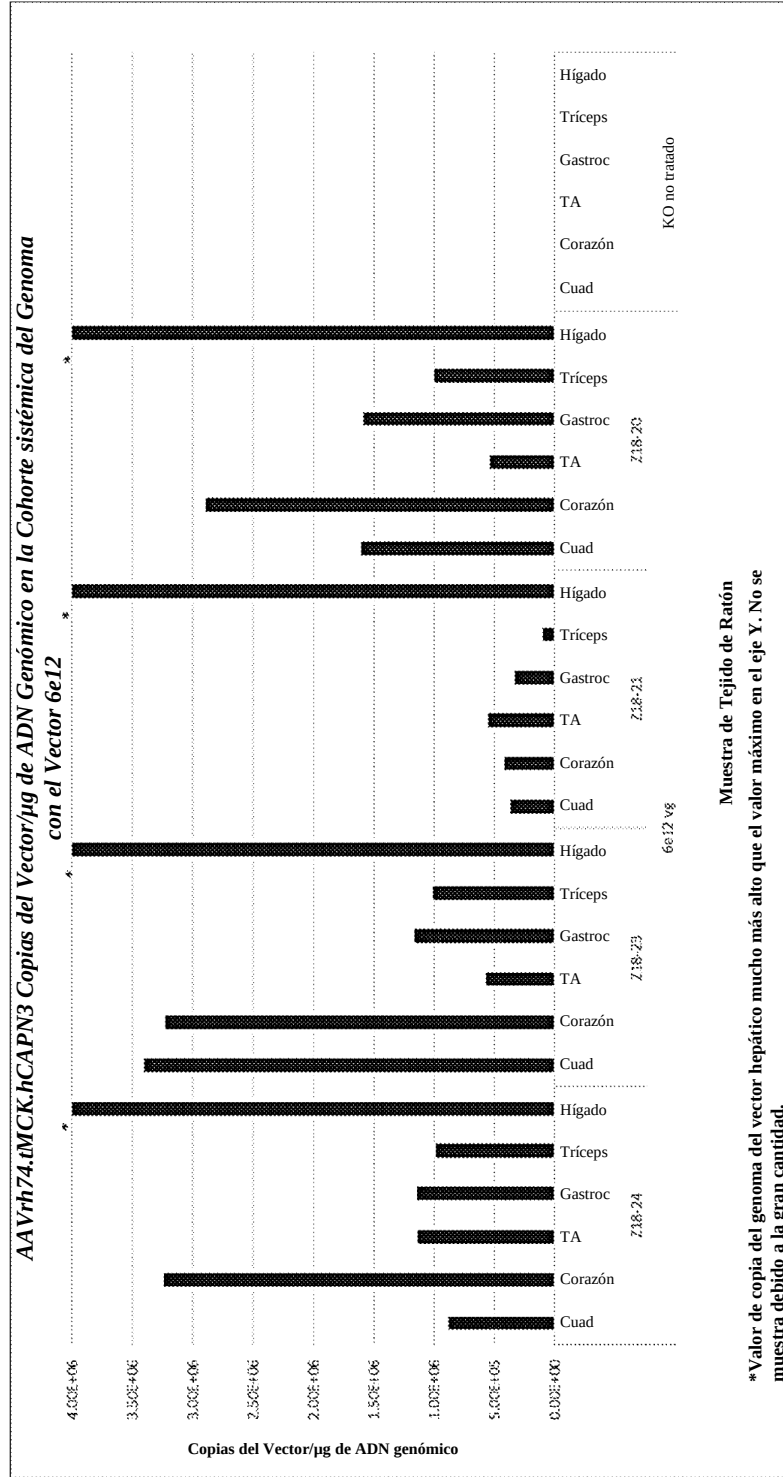


Figura 7

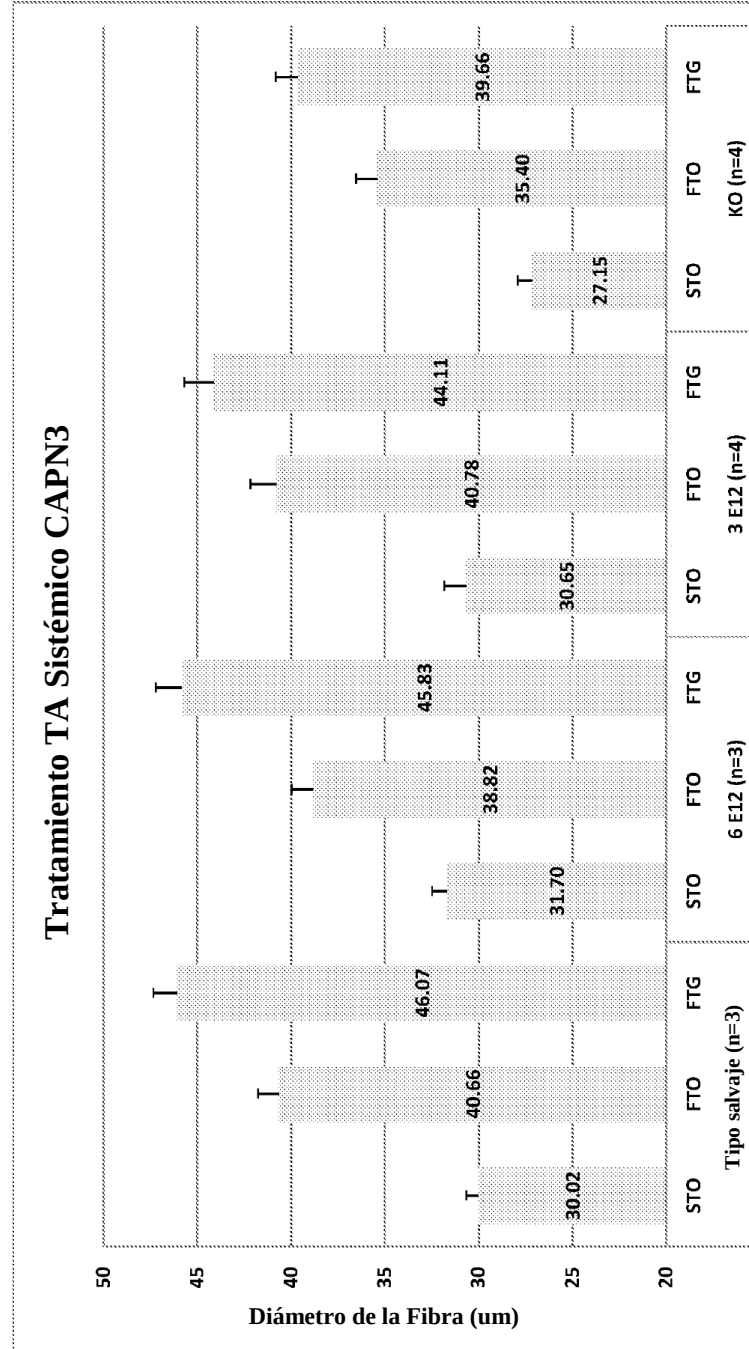


Figura 8A

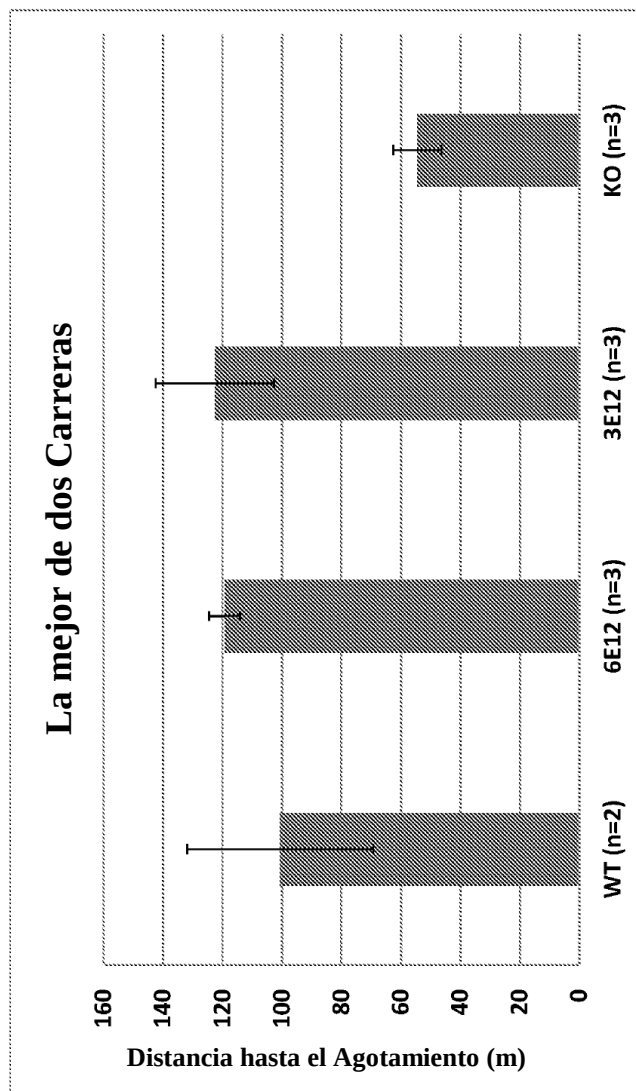


Figura 8B

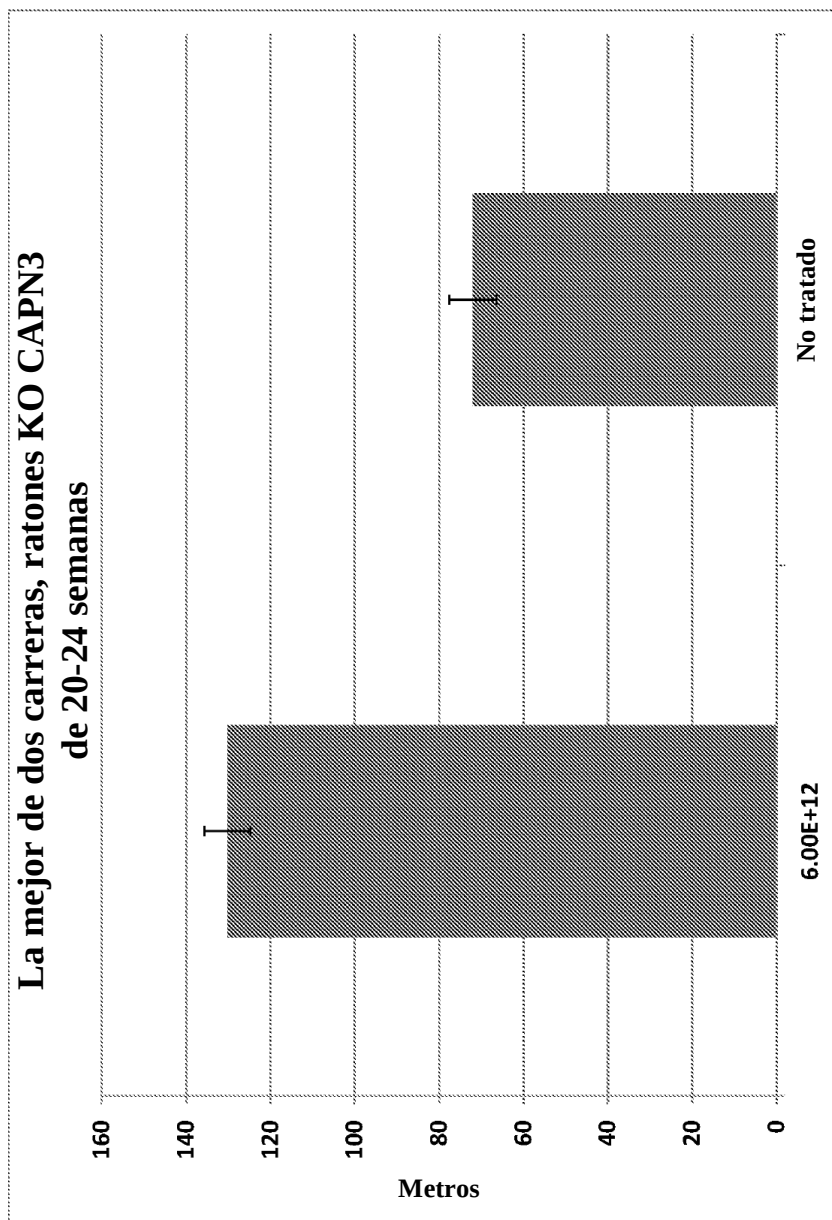


Figura 9

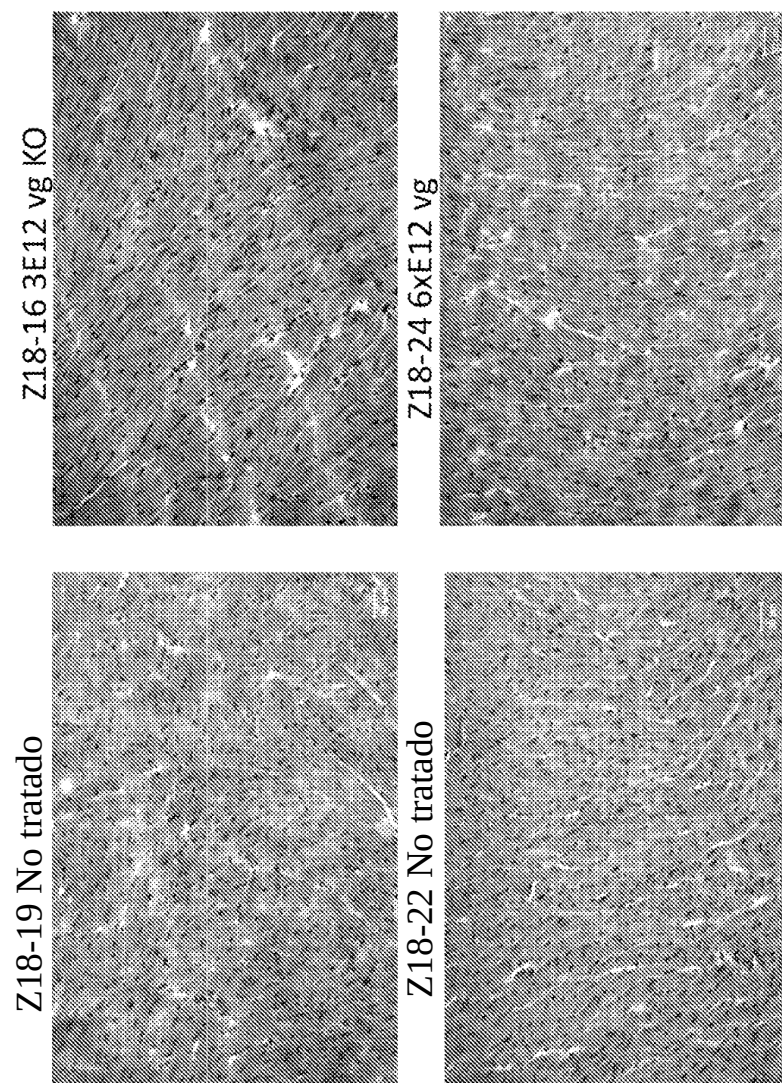
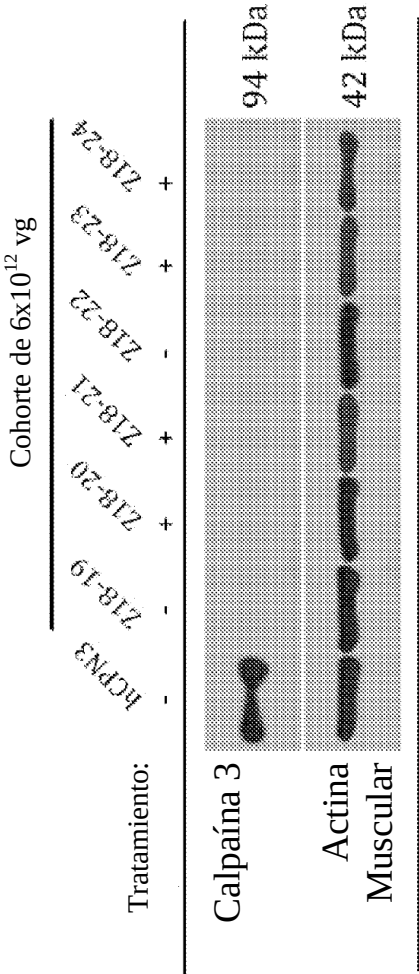


Figura 10

Evaluación de la expresión de la proteína Calpaína 3 Cardíaca
Tras la administración sistémica del gen
AAVrh.74tMCK.CAPN3



La proteína Calpaína 3 de longitud completa está más abajo del límite de detección. 6×10^{12} vg AAVrh.74tMCK.CAPN3 Los ratones CPN3KO administrados sistémicamente no muestran expresión de la proteína Calpaína 3 detectable en el músculo cardíaco. Lisado de músculo cuádriceps humano de control positivo (hCPN3).