

PLASMIDO PARA EL TRATAMIENTO DE LA DISTROFIA

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 62/254539, presentada el 12 de noviembre de 2015 y la
5 Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 62/419793, presentada el 9 de noviembre de 2016, que se incorporan como referencia en este documento en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

10

La invención proporciona vectores de AAV que expresan el gen ANO5 y terapia antioxidante como métodos para inducir la regeneración muscular y un método para tratar la distrofia muscular.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La importancia de la masa muscular y la fuerza para actividades diarias tales como la locomoción y la respiración
20 y para el metabolismo de todo el cuerpo es inequívoca. Los déficits en la función muscular producen distrofias musculares (MD) que se caracterizan por debilidad y desgaste muscular y tienen graves repercusiones en la calidad de vida. Los MD más caracterizados son el resultado de mutaciones en
25 genes que codifican miembros del complejo proteico asociado a

la distrofina (DAPC). Estos MD son el resultado de la fragilidad de la membrana asociada con la pérdida del anclaje sarcolema-citoesqueleto por el DAPC. Por el contrario, se cree que un subconjunto de otros MD está causado por defectos

5 en la reparación sarcolemal. Debido al estrés mecánico que experimenta el sarcolema durante la contracción, incluso el músculo sano necesita constantemente mecanismos de reparación para parchar la membrana lesionada. La reparación del parche sarcolemal se basa en la fusión de vesículas de membrana en

10 los sitios de daño, y la atenuación de este proceso se considera putativamente como una causa importante de disferlinopatías, MD causadas por mutaciones en la disferlina.

Recientemente, un MD nuevo con características

15 similares a las disferlinopatías y caracterizado por lesiones sarcolemales se ha relacionado con mutaciones recesivas en ANO5 (TMEM16E). Las mutaciones ANO5 producen distrofia muscular de cintura y extremidades tipo 2L (LGMD2L) y distrofia de miopatía Miyoshi tipo 3 (MMD3). El fenotipo

20 asociado con mutaciones ANO5 es variable, pero típicamente la enfermedad se presenta en la edad adulta (edad 20 a 50) con debilidad proximal de las extremidades inferiores, niveles de creatina quinasa de suero alta, atrofia muscular asimétrica y debilidad y generalmente se acompaña de lesiones

25 sarcolemales, similares a la disferlinopatía ((Bolduc et al.,

American journal of human genetics 86, 213-221 (2010)), Hicks et al., *Brain : a journal of neurology* 134, 171-182 (2011), Bouquet et al., *Revue neurologique* 168, 135-141 (2012)). Hasta la fecha, ~72 diferentes mutaciones ANO5 han sido reportadas en pacientes con MD, y las pantallas para mutaciones ANO5 en pacientes LGMD que carecen de mutaciones en otros genes LGMD conocidos indican que las mutaciones ANO5 pueden ser una de las causas más comunes de LGMD (Bolduc et al., *American journal of human genetics* 86, 213-221 (2010)), Hicks et al., *Brain : a journal of neurology* 134, 171-182 (2011), Penttila et al., *Neurology* 78, 897-903 (2012)).

La familia Anoctamina/TMEM16 se ha dividido funcionalmente en dos categorías. Los miembros fundadores, ANO1 (TMEM16A) y ANO2 (TMEM16B) codifican los canales de cloruro activados por calcio, mientras que otros ANO no pueden conducir las corrientes de cloruro y han sido identificados por su papel en la aleatorización de fosfolípidos (PLS). Sin embargo, no se ha encontrado que ANO5 muestre ninguna de estas dos actividades sugiriendo una nueva función en el músculo esquelético. Dada esta novedad, no está claro cómo la deficiencia en la función de ANO5 provoca un fenotipo de LGMD, y específicamente por qué las mutaciones de *Ano5* se manifiestan de una manera clínicamente similar a la MD asociada a la disferlina.

El virus adeno-asociado (AAV) es un parvovirus

deficiente en replicación, cuyo genoma de ADN de cadena sencilla tiene una longitud de aproximadamente 4.7 kb, que incluye 145 repeticiones terminales invertidas de 145 nucleótidos (ITR). Hay varios serotipos de AAV. Las

5 secuencias de nucleótidos de los genomas de los serotipos de AAV son conocidas. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del genoma de serotipo AAV 2 (AAV2) se presenta en Srivastava *et al.*, *J Virol*, 45: 555-564 (1983) corregido por Ruffing *et al.*, *J Gen Virol*, 75: 3385-3392 (1994). Como otros ejemplos,

10 el genoma completo de AAV-1 se proporciona en el número de acceso de GenBank NC_002077; el genoma completo de AAV-3 se proporciona en el número de acceso de GenBank NC_1829; el genoma completo de AAV-4 se proporciona en el número de acceso de GenBank NC_001829; el genoma de AAV-5 se

15 proporciona en el número de acceso de GenBank AF085716; el genoma completo de AAV-6 se proporciona en el número de acceso de GenBank NC_001862; al menos porciones de genomas de AAV-7 y AAV-8 se proporcionan en los números de acceso de GenBank AX753246 y AX753249, respectivamente (véase también

20 las patentes de los Estados Unidos Nos. 7,282,199 y 7,790,449 que se refieren a AAV-8); el genoma de AAV-9 se proporciona en Gao *et al.*, *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); el genoma de AAV-10 se proporciona en *Mol. Ther.*, 13 (1): 67-76 (2006); y el genoma de AAV-11 se proporciona en *Virology*, 330(2): 375-

25 383 (2004). La secuencia del genoma de AAV rh.74 se

proporciona aquí. Las secuencias de acción CIS que dirigen la replicación del ADN viral (rep), la encapsidación/empaquetado y la integración del cromosoma de la célula hospedera están contenidas en el ITR. Tres promotores de AAV (denominados p5, p19 y p40 para sus ubicaciones de mapa relativas) 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), acoplados con la escisión diferencial del único intrón de AAV (por ejemplo, en los nucleótidos AAV2 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 cápsida VP1, VP2 y VP3. Los sitios de inicio de traducción alternativos de escisión y no consenso son responsables de la producción de las tres proteínas de cápsida relacionadas. Un solo sitio de poliadenilación consenso se encuentra en la posición del mapa 95 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 suministrar ADN extraño a las células, por ejemplo, en terapia génica. La infección por AAV

de células en cultivo no es citopática, y la infección natural de humanos y otros animales es silenciosa y asintomática. Además, AAV infecta muchas células de mamíferos permitiendo la posibilidad de dirigirse a muchos tejidos diferentes *in vivo*. Además, el AAV transduce células que se dividen lentamente y que no se dividen, y puede persistir esencialmente durante la vida de esas células como un episoma nuclear transcripcionalmente activo (elemento extracromosómico). El genoma proviral de AAV es infeccioso como ADN clonado en plásmidos, lo que hace factible el constructo de genomas recombinantes. Además, debido a que las señales que dirigen la replicación del AAV, la encapsidación del genoma y la integración están contenidas dentro del ITR del genoma del AAV, algunos o todos de los internos de aproximadamente 4.3 kb del genoma (que codifica la replicación y las proteínas de la cápsida estructural, rep-cap) pueden reemplazarse con ADN extraño, tal como un casete génico que contiene un promotor, un ADN de interés y una señal de poliadenilación. Las proteínas rep y cap pueden proporcionarse en *trans*. Otra característica importante de AAV es que es un virus extremadamente estable y abundante. Resiste fácilmente las condiciones utilizadas para inactivar el adenovirus (de 56° a 65°C durante varias horas), por lo que la preservación en frío del AAV es menos crítica. AAV puede incluso ser liofilizado. Finalmente, las células

infectadas con AAV no son resistentes a la sobreinfección.

Múltiples estudios han demostrado la expresión de proteína mediada por AAV recombinante a largo plazo (> 1.5 años) en el músculo. Véase, Clark *et al.*, *Hum Gene Ther*, 8: 659-669 (1997); Kessler *et al.*, *Proc Nat. Acad Sc. USA*, 93: 14082-14087 (1996); and Xiao *et al.*, *J Virol*, 70: 8098-8108 (1996). Véase también, Chao *et al.*, *Mol Ther*, 2:619-623 (2000) and Chao *et al.*, *Mol Ther*, 4:217-222 (2001). Además, debido a que el músculo está altamente vascularizado, la transducción de AAV recombinante ha dado como resultado la aparición de productos transgénicos en la circulación sistémica después de la inyección intramuscular como se describe en Herzog *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 5804-5809 (1997) y Murphy *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13921-13926 (1997). Además, Lewis *et al.*, *J Virol*, 76: 8769-8775 (2002) demostraron que las miofibras esqueléticas poseen los factores celulares necesarios para la correcta glucosilación, plegamiento y secreción del anticuerpo, lo que indica que el músculo es capaz de expresión estable de agentes terapéuticos proteicos secretados.

Como se muestra aquí, la alteración del gen *Ano5* en ratones produce varias características histopatógenas musculares distróficas, intolerancia al ejercicio, disfunción en la reparación sarcolemal y defectos de fusión de mioblastos. Además, los datos proporcionados demuestran que

estos defectos están relacionados con cambios en la membrana subcelular y/o la membrana y/o la dinámica de la membrana sarcolemal mediada por ANO5. La presente invención se refiere al uso de vectores de AAV que expresan el gen *Ano5* en métodos
5 para inducir la reparación muscular y/o tratar MD.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a vectores de AAV
10 que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína ANO5 o un fragmento funcionalmente activo de la misma. Los experimentos descritos en los Ejemplos 1-4 demuestran un papel esencial para *Ano5* en la regeneración y reparación muscular. La pérdida de ANO5 causa un fenotipo
15 distrófico en ratones, que recuerda a los pacientes con LGMD2L, con una histopatología leve que varía entre los músculos, la intolerancia al ejercicio, la regeneración alterada y los niveles elevados de creatina quinasa. Se observaron anomalías mitocondriales en ratones *Ano5*^{-/-} jóvenes
20 y ancianos. Además del defecto estructural de las mitocondrias mostrado a través de imágenes microscópicas electrónicas, los ensayos de cuantificación de citrato sintasa también demostraron que las mitocondrias tienen un déficit funcional. El análisis cuantitativo de enzimas de
25 citrato sintasa sugiere la presencia de mitocondrias dañadas.

Estos resultados sugieren que las anomalías mitocondriales pueden ser un efecto secundario causado por la pérdida de la proteína Anoctamina 5. Los experimentos descritos aquí demuestran una atenuación de la reparación del parche sarcolemal en fibras *Ano5*^{-/-} que se rescata mediante la expresión viral de ANO5 humano y encuentran que la alteración de *Ano5* perturba la calidad fusogénica de los mioblastos primarios.

En una modalidad, la invención proporciona un vector de AAV recombinante que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico de ANO5. La secuencia de ácido nucleico de ANO5 se establece como el número de acceso de Genbank NM_213599.2 (SEQ ID NO: 13). Una secuencia de ácido nucleico ejemplar que codifica la proteína ANO5 en un vector de AAV se expone como SEQ ID NO: 1. Los vectores recombinantes de la presente invención comprenden una secuencia de polinucleótidos que es al menos un 85% idéntica a los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 13 o comprenden un nucleótido que se hibrida en condiciones restrictivas con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 13 o comprende un fragmento de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 13 que codifica una proteína que exhibe actividad ANO5. En un aspecto, los vectores AAV recombinantes de la invención son AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 o AAV

rh.74.

Los vectores de AAV recombinantes de la invención comprenden un fragmento de SEQ ID NO: 1 que codifica una proteína que comprende un dominio que está implicado en la actividad de PLS y dicha proteína retiene la actividad de PLS. En otra modalidad, el vector de AAV comprende un fragmento de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 13 que codifica una proteína que conserva la actividad de ANO5.

Los vectores de AAV recombinantes de la invención comprenden una secuencia de polinucleótidos que es, por ejemplo, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% o 89%, más típicamente al menos 90%, 91%, 92%, 93% o 94% e incluso más típicamente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 13, en donde el polinucleótido codifica una proteína que retiene la actividad de ANO5.

Los vectores de AAV recombinantes de la invención comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína ANO5 que es, por ejemplo, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% o 89%, más típicamente al menos 90%, 91%, 92%, 93% o 94% e incluso más típicamente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, en donde el polinucleótido codifica una proteína que conserva la

actividad de ANO5.

Los vectores de AAV recombinantes de la invención comprenden una secuencia de polinucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NOS: 1 o SEQ ID NO: 13, o complementos de los mismos, cuyo fragmento es mayor de aproximadamente 5 nucleótidos, preferiblemente 7 nucleótidos, más preferiblemente más de 9 nucleótidos y más preferiblemente más de 17 nucleótidos. Se contemplan fragmentos de, por ejemplo, 15, 17 o 20 nucleótidos o más que son selectivos (es decir, hibridan específicamente con uno cualquiera de los polinucleótidos de la invención) y estos fragmentos retienen la actividad de ANO5. Las sondas capaces de hibridarse específicamente con un polinucleótido pueden diferenciar las secuencias de polinucleótidos NTHi de la invención de otras secuencias de polinucleótidos en la misma familia de genes o pueden diferenciar genes NTHi de otros genes bacterianos, y se basan preferiblemente en secuencias de nucleótidos únicas.

El término "riguroso" se usa para referirse a condiciones que se entienden comúnmente en la técnica como rigurosas. La rigurosidad de la hibridación se determina principalmente por la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturalizantes tales como la formamida. Ejemplos de condiciones rigurosas para la hibridación y el lavado son cloruro de sodio 0.015 M, citrato

de sodio 0.0015 M a 65-68°C o cloruro de sodio 0.015 M, citrato de sodio 0.0015 M y formamida al 50% a 42°C. Véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 5 1989). También se pueden usar condiciones más estrictas (tales como mayor temperatura, menor fuerza iónica, formamida más alta u otro agente desnaturalizante), sin embargo, la tasa de hibridación se verá afectada. En casos en donde se refiere a la hibridación de desoxioligonucleótidos, las 10 condiciones de hibridación rigurosas ejemplares adicionales incluyen lavado en 6x SSC, pirofosfato de sodio al 0.05% a 37°C (para oligos de 14 bases), 48°C (para oligos de 17 bases), 55°C (para oligos de 20 bases) y 60°C (para oligos de 23 bases).

15 Se pueden incluir otros agentes en los reguladores de pH de hibridación y lavado con el fin de reducir la hibridación no específica y/o de fondo. Ejemplos son 0.1% de albúmina de suero bovino, 0.1% de polivinil-pirrolidona, 0.1% de pirofosfato de sodio, 0.1% de dodecilsulfato de sodio, 20 NaDodSO₄, (SDS), ficoll, solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (u otro ADN no complementario) y sulfato de dextrano, aunque también se pueden usar otros agentes adecuados. La concentración y los tipos de estos aditivos se pueden cambiar sin afectar sustancialmente la rigurosidad de 25 las condiciones de hibridación. Los experimentos de

hibridación se llevan a cabo normalmente a pH 6.8-7.4, sin embargo, en condiciones de fuerza iónica típicas, la velocidad de hibridación es casi independiente del pH. Véase Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical
5 Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, Inglaterra). Los especialistas en la técnica pueden ajustar las condiciones de hibridación con el fin de acomodar estas variables y permitir que los ADN de diferente relación de secuencia formen híbridos.

10 En otro aspecto, los vectores de AAV recombinantes de la invención se pueden unir operativamente a un elemento de control específico del músculo. Por ejemplo, el elemento de control específico del músculo es el elemento del gen de actina esquelética humana, elemento del gen de actina
15 cardíaca, factor de unión del potenciador específico de miocito MEF, elemento potenciador de creatina quinasa murina (MCK), copias triples del MCK (tMCK), elemento del gen de troponina C esquelética de contracción rápida, elemento del gen de troponina C cardíaca de contracción lenta, el elemento
20 del gen de troponina I de contracción lenta, factores nucleares inducibles por hipoxia, elemento inducible por esteroides o elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE).

 En otra modalidad, la invención proporciona métodos para producir una partícula de vector de AAV recombinante que
25 comprende cultivar una célula que ha sido transfectada con

cualquier vector de AAV recombinante de la invención y recuperar partículas de AAV recombinante del sobrenadante de las células transfectadas. La invención también proporciona partículas virales que comprenden cualquiera de los vectores
5 de AAV recombinantes de la invención.

En otra modalidad, la invención proporciona métodos para tratar la distrofia muscular que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquier vector de AAV recombinante de la invención a un sujeto que lo necesite.
10 En un aspecto, el sujeto que lo necesita tiene una mutación recesiva en el gen ANO5. Los métodos pueden tratar la distrofia muscular asociada a la disferlina, la distrofia muscular de cintura y extremidades tipo 2L, la miopatía Miyoshi tipo 3, la miopatía de Bethlem, la calpainopatía, la
15 miopatía desmina, la disferlinopatía, la miopatía miofibrilar, la sarcoglucanopatía o la miopatía relacionada con ZASP. Además, cualquiera de los métodos anteriores para tratar la distrofia muscular comprende además la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una
20 composición antioxidante a un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, la composición antioxidante comprende al menos una de una coenzima Q10, ácido lipoico, vitamina, carotenoide, cofactor de la vitamina, mineral, polifenol o flavonoide. En particular, la composición antioxidante comprende la coenzima
25 Q10, ácido lipoico y vitamina E.

En una modalidad adicional, la invención proporciona métodos de regeneración muscular en un sujeto necesitado que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquier vector de AAV recombinate de la invención a un sujeto que lo necesite. En un aspecto, el sujeto que lo necesita tiene una mutación recesiva en el gen ANO5. En otro aspecto, el sujeto en necesidad padece distrofia muscular tal como distrofia muscular asociada a disferlina, distrofia muscular de cintura y extremidades tipo 2L, miopatía de Miyoshi tipo 3, miopatía de Bethlem, calpainopatía, desmina miopatía, disferlinopatía, miopatía miofibrilar, sarcoglucanopatía o miopatía relacionada con ZASP. Además, cualquiera de los métodos anteriores para regenerar el músculo comprende además la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición antioxidante a un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, la composición antioxidante comprende al menos una de una coenzima Q10, ácido lipoico, vitamina, carotenoide, cofactor de la vitamina, mineral, polifenol o flavonoide. En particular, la composición antioxidante comprende la coenzima Q10, ácido lipoico y vitamina E.

En otra modalidad, la invención proporciona métodos para tratar el desgaste muscular crónico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los vectores de AAV recombinate de la

invención a un sujeto que lo necesite. En un aspecto, el sujeto que lo necesita tiene una mutación recesiva en el gen ANO5. En otro aspecto, el sujeto en necesidad padece distrofia muscular tal como distrofia muscular asociada con 5 disferlina, distrofia muscular de cintura y extremidades tipo 2L o miopatía de Miyoshi tipo 3, miopatía de Bethlem, calpainopatía, miopatía desmina, disferlinopatía, miopatía miofibrilar, sarcoglucanopatía o miopatía relacionada con ZASP. Además, cualquiera de los métodos anteriores para 10 tratar el desgaste muscular crónico comprende adicionalmente la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición antioxidante a un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, la composición antioxidante comprende al menos uno de una coenzima Q10, ácido lipoico, vitamina, 15 carotenoide, cofactor de la vitamina, mineral, polifenol o flavonoide. En particular, la composición antioxidante comprende la coenzima Q10, ácido lipoico y vitamina E.

La invención también proporciona una composición que comprende cualquier vector de AAV recombinante de la 20 invención para el tratamiento de la distrofia muscular o el síndrome de desgaste muscular crónico en un sujeto que lo necesite. La invención también proporciona una composición que comprende cualquier vector de AAV recombinante de la invención para la regeneración de músculo en un sujeto que lo 25 necesite. En un aspecto, la composición de la invención se

administra a un sujeto que tiene una mutación recesiva en el gen ANO5. En otro aspecto, la composición de la invención se administra a un sujeto que padece distrofia muscular tal como distrofia muscular asociada con disferlina, distrofia muscular de cintura y extremidades tipo 2L, miopatía de Miyoshi tipo 3, miopatía de Bethlem, calpainopatía, miopatía desmina, disferlinopatía, miopatía miofibrilar, sarcoglicanopatía o miopatía relacionada con ZASP. Cualquiera de las composiciones de la invención se formula para inyección intramuscular o intravenosa. Cualquiera de las composiciones de la invención comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición antioxidante. Por ejemplo, la composición antioxidante comprende al menos una de una coenzima Q10, ácido lipoico, vitamina, carotenoide, cofactor de la vitamina, mineral, polifenol o flavonoide. En particular, la composición antioxidante comprende la coenzima Q10, ácido lipoico y vitamina E.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de cualquier vector de AAV recombinante de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular o el síndrome de desgaste muscular crónico en un sujeto que lo necesite. Además, la invención proporciona el uso de cualquiera de los vectores de AAV recombinantes de la invención para la preparación de un medicamento para regenerar el músculo según la necesidad del

sujeto. En un aspecto, el medicamento se administra a un sujeto que tiene una mutación recesiva en el gen ANO5. En otro aspecto, el medicamento de la invención se administra a un sujeto que padece distrofia muscular tal como distrofia muscular asociada con disferlina, distrofia muscular de cintura y extremidades tipo 2L, miopatía de Miyoshi tipo 3, miopatía de Bethlem, calpainopatía, miopatía desmina, disferlinopatía, miopatía miofibrilar, sarcoglicanopatía o miopatía relacionada con ZASP. Cualquiera de los medicamentos de la invención se formula para inyección intramuscular o intravenosa. Cualquiera de los medicamentos de la invención comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición antioxidante. Por ejemplo, la composición antioxidante comprende al menos una de una coenzima Q10, ácido lipoico, vitamina, carotenoide, cofactor de la vitamina, mineral, polifenol o flavonoide. En particular, la composición antioxidante comprende la coenzima Q10, ácido lipoico y vitamina E.

En otra modalidad, la invención proporciona métodos para tratar la distrofia muscular o el desgaste muscular crónico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de composición antioxidante a un sujeto que lo necesite. La composición antioxidante comprende al menos uno de una coenzima Q10, ácido lipoico, vitamina, carotenoide, vitamina cofactor, mineral, polifenol, o

flavonoides. En algunos aspectos, la composición antioxidante comprende la coenzima Q10, el ácido lipoico y la vitamina E. En un aspecto, el sujeto que lo necesita tiene una mutación recesiva en el gen ANO5. En otro aspecto, el estrés oxidativo se reduce en el músculo esquelético del sujeto. En otro aspecto, se mejora la función del músculo esquelético del sujeto. En otro aspecto, el sujeto padece distrofia muscular asociada con disferlina, distrofia muscular de cintura y extremidades tipo 2L, miopatía de Miyoshi tipo 3, miopatía de Bethlem, calpainopatía, miopatía desmina, disferlinopatía, miopatía miofibrilar, sarcoglicanopatía o miopatía relacionada con ZASP.

La invención también proporciona métodos para ralentizar la progresión de la distrofia muscular o el desgaste muscular crónico que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición antioxidante a un sujeto que lo necesita. La composición antioxidante comprende al menos una de una coenzima Q10, ácido lipoico, vitamina, carotenoide, cofactor de la vitamina, mineral, polifenol o flavonoide. En algunos aspectos, la composición antioxidante comprende la coenzima Q10, el ácido lipoico y la vitamina E. En un aspecto, el sujeto que lo necesita tiene una mutación recesiva en el gen ANO5. En otro aspecto, el estrés oxidativo se reduce en el músculo esquelético del sujeto. En otro aspecto, se mejora la

función del músculo esquelético del sujeto. En otro aspecto, el sujeto padece distrofia muscular asociada con disferlina, distrofia muscular de cintura y extremidades tipo 2L, miopatía de Miyoshi tipo 3, miopatía de Bethlem, calpainopatía, miopatía desmina, disferlinopatía, miopatía miofibrilar, sarcoglicanopatía o miopatía relacionada con ZASP.

En cualquiera de los métodos de la invención, la composición antioxidante se administra por vía oral. En cualquiera de los métodos de la invención, los antioxidantes se administran en la misma composición o los antioxidantes se administran en composiciones separadas. Si los antioxidantes se administran por separado, pero al mismo tiempo. Además, en cualquiera de los métodos de la invención, los antioxidantes se administran en tiempos separados o consecutivamente. En cualquiera de los métodos de la invención, la composición antioxidante se administra una vez al día, una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes o una vez cada dos meses.

La invención también proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición antioxidante. La composición antioxidante comprende al menos uno de una coenzima Q10, ácido lipoico, vitamina, carotenoide, cofactor vitamínico, mineral,

polifenol o flavonoide para el tratamiento de la distrofia muscular o el síndrome de desgaste muscular crónico en un sujeto que lo necesita.

La invención también proporciona una composición
5 que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición antioxidante. Las composiciones antioxidantes comprenden al menos uno de una coenzima Q10, ácido lipoico, vitamina, carotenoide, cofactor vitamínico, mineral, polifenol o flavonoide para ralentizar la progresión de la
10 distrofia muscular o el desgaste muscular crónico en un sujeto que lo necesita. En algunos aspectos, la composición antioxidante comprende la coenzima Q10, el ácido lipoico y la vitamina E.

En un aspecto, cualquiera de las composiciones de
15 la invención se administra a un sujeto que tiene una mutación recesiva en el gen ANO5. En otro aspecto, el estrés oxidativo se reduce en el músculo esquelético del sujeto después de la administración de la composición. En otro aspecto, la función del músculo esquelético del sujeto mejora después de la
20 administración de la composición. En otro aspecto, cualquiera de las composiciones de la invención se administra a un sujeto que padece distrofia muscular tal como distrofia muscular asociada con disferlina, distrofia muscular de cintura y extremidades tipo 2L, miopatía de Miyoshi tipo 3,
25 miopatía de Bethlem, calpainopatía, miopatía desmina,

disferlinopatía, miopatía miofibrilar, sarcoglicanopatía o miopatía relacionada con ZASP. Cualquiera de las composiciones de la invención se formula para inyección intramuscular o intravenosa.

5 En otra modalidad, la invención proporciona el uso de una composición antioxidante para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular o el síndrome de desgaste muscular crónico en un sujeto que lo necesite. La composición antioxidante en cualquiera de los
10 medicamentos de la invención comprende al menos una de una coenzima Q10, ácido lipoico, vitamina, carotenoide, cofactor vitamínico, mineral, polifenol o flavonoide.

 Además, la invención proporciona el uso de una composición antioxidante para la preparación de un
15 medicamento para regenerar músculo en un sujeto que lo necesite. La composición antioxidante en cualquiera de los medicamentos de la invención comprende al menos uno de una coenzima Q10, ácido lipoico, vitamina, carotenoide, cofactor vitamínico, mineral, polifenol o flavonoide. En algunos
20 aspectos, la composición antioxidante comprende la coenzima Q10, el ácido lipoico y la vitamina E.

 Además, la invención proporciona el uso de una composición antioxidante para la preparación de un medicamento para ralentizar la progresión de la distrofia
25 muscular o el síndrome de desgaste muscular en un sujeto que

lo necesite. La composición antioxidante en cualquiera de los medicamentos para la invención comprende al menos una de una coenzima Q10, ácido lipoico, vitamina, carotenoide, cofactor de la vitamina, mineral, polifenol o flavonoide. En algunos
5 aspectos, la composición antioxidante comprende la coenzima Q10, el ácido lipoico y la vitamina E.

Cualquiera de los medicamentos de la invención se administra a un sujeto que tiene una mutación recesiva en el gen ANO5. En otro aspecto, el estrés oxidativo se reduce en
10 el músculo esquelético del sujeto. En otro aspecto, se mejora la función del músculo esquelético del sujeto. En otro aspecto, cualquiera de los medicamentos de la invención se administra a un sujeto que padece distrofia muscular tal como distrofia muscular asociada con disferlina, distrofia
15 muscular de cintura y extremidades tipo 2L, miopatía de Miyoshi tipo 3, miopatía de Bethlem, calpainopatía, miopatía desmina, disferlinopatía, miopatía miofibrilar, sarcoglicanopatía o miopatía relacionada con ZASP. Además, cualquiera de los medicamentos de la invención se formula
20 para inyección intramuscular o intravenosa.

En algunas modalidades, la composición antioxidante se administra por vía oral. En algunos aspectos, los antioxidantes están en la misma composición. En otros aspectos, los antioxidantes están en composiciones separadas.
25 En algunos aspectos, los antioxidantes de la composición

antioxidante se administran concurrentemente. En algunos aspectos, los antioxidantes de la composición antioxidante se administran en tiempos separados o consecutivamente. En algunas modalidades, la composición antioxidante se administra una vez al día, una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes o una vez cada dos meses.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10

La Figura 1A-1D ilustra la generación del modelo de ratón $Ano5^{-/-}$. **El panel (a)** muestra un vector de dirección de $Ano5$ que comprende un intrón exógeno y un exón de codificación de lacZ con una señal de terminación de poliadenilación. El ARNm resultante termina en el exón 8. **El panel (b)** muestra el ADN genómico aislado de recortes de cola de compañeros de camada. Carril 1- ratón tipo silvestre (WT), Carriles 2 ratón $Ano5^{+/-}$, Carril 3 ratón $Ano5^{-/-}$, fragmento pb WTallele-300, alelo $Ano5$ - fragmento200 pb. **El panel (c)** muestra productos de RT-PCR que no muestran evidencia de la transcripción de $Ano5$ en el tejido muscular $Ano5^{-/-}$ usando dos conjuntos de iniciadores dirigidos a $Ano5$. Carril 1: control *GAPDH*; carril 2 iniciadores e10-14 que abarcan los exones 10-14; carril 3 iniciadores e17-20 que abarcan los exones 17-20. **El panel (d)** demuestra > 99% de reducción de expresión

relativa de ANO5 en el nivel de ARN se confirmó mediante qRT-PCR en el cuádriceps (QD), gastrocnemio (GAS) y músculo tibial anterior (TA) extraído del ratón *Ano5*^{-/-} ($P < 0.001$).

La Figura 2A-2F ilustra la caracterización de ratones deficientes en *Ano5*^{-/-}. El panel (a) demuestra que la creatina quinasa sérica está significativamente elevada en ratones *Ano5*^{-/-} a los 9 meses ($P < 0.05$, prueba t). El panel (b) demuestra la fuerza específica de contracción de las tiras de diafragma a partir de los 9 meses de edad. Los ratones *Ano5*^{-/-} disminuyeron significativamente en comparación con los controles ($P < 0.01$, prueba t). El panel (c) demuestra que la fuerza específica de contracción de los músculos EDL y tibiales anteriores (TA) de los ratones *Ano5*^{-/-} de 9 meses no fue significativamente diferente que los controles ($P > 0.05$, prueba t). El panel (d) muestra secciones de tejido teñidas con hematoxilina y eosina que demuestran una patología distrófica leve que incluye núcleos centrales, variabilidad del tamaño de fibra y áreas de necrosis en el TA y el GAS del ratón *Ano5*^{-/-} en comparación con los controles WT. Barra de escala = 50µm. El panel (e) proporciona mediciones del diámetro de la fibra muscular que muestran una reducción en el tamaño del diámetro de la fibra en comparación con el WT, especialmente en el músculo GAS ($P < 0.0001$, prueba t). El panel (f) muestra que los ratones *Ano5*^{-/-} demostraron pausas frecuentes cuando se realizaron estudios de agotamiento en

cinta rodante.

La Figura 3A-3E proporciona una caracterización fisiológica de ratones *Ano5^{-/-}*. **Panel (a)** Los niveles de ácido láctico se redujeron ligeramente en ratones *Ano5^{-/-}* en comparación con los controles WT después del funcionamiento en cinta rodante ($P = 0.15$). **Panel (b)** Características electrofisiológicas del músculo. La amplitud CMAP no fue significativamente diferente entre *Ano5^{-/-}* (45.1 ± 2.2 mV) y WT (40.8 ± 2.4 mV) ($p = 0.22$). Ningún animal *Ano5^{-/-}* o WT demostró potenciales de fibrilación. Paneles (c-e) Características de impedancia del músculo a 50 kHz (fase, reactancia, resistencia, respectivamente). No hubo diferencias entre *Ano5^{-/-}* (31.0 ± 2.7 ; $248.1 \pm 37.8 \Omega$; $411.4 \pm 34.6 \Omega$) y fibras WT (31.7 ± 3.9 ; $269.0 \pm 83.9 \Omega$; $424.3 \pm 73.9 \Omega$) (fase: $p = 0.59$; reactancia: $p = 0.44$; resistencia: $p = 0.59$). No se observaron diferencias a 100 kHz entre *Ano5^{-/-}* (36.5 ± 2.4 ; $216.2 \pm 27.3 \Omega$; $290.7 \pm 22.0 \Omega$) y fibras WT (37.0 ± 4.8 ; $228.4 \pm 63.9 \Omega$; $295.8 \pm 36.1 \Omega$) (fase: $p = 0.77$; reactancia: $p = 0.55$; resistencia: $p = 0.68$).

La Figura 4A-4G proporciona histopatología subcelular en el músculo *Ano5^{-/-}*. **El panel (a)** proporciona la tinción con Tricrómico Gomori de 10 mo *Ano5^{-/-}* y los músculos WT TA. El músculo *Ano5^{-/-}* contiene agregados de membrana (flechas). Barra de escala = $20\mu\text{m}$. **El panel (b)** proporciona la cuantificación del número de fibras que contienen

agregados en los músculos TA y GAS del *Ano5^{-/-}* en comparación con WT ($p < 0.0001$, ANOVA de una vía). **Los paneles (c, d)** proporcionan imágenes microscópicas electrónicas que demuestran la presencia de agregados de membrana en el

5 músculo *Ano5^{-/-}*. Los agregados se empaquetaron de forma suelta, interconectando formaciones tubulares con túbulos internos difusos (flechas blancas) o acumulaciones densas de membranas vesiculares o tubulares (flechas negras). Barras de escala = 500nm. **El panel (e)** muestra acumulaciones

10 subescalolemales de mitocondrias (flechas) y mitocondrias degenerativas (asterisco) con frecuencia se identificaron mediante microscopía electrónica en el músculo *Ano5^{-/-}*. Barras de escala = 500nm (izquierda) y 2µm (derecha). **El panel (f)** proporciona la tinción con succinato deshidrogenasa de 10 mo

15 de músculo TA *Ano5^{-/-}* que mostraba engrosamiento sarcolemal y fibras tapadas que no estaban presentes en WT. Barras de escala = 10µm. **El panel (g)** proporciona criosecciones del músculo TA a partir de 10 mo ratones *Ano5^{-/-}* se tiñeron para succinato deshidrogenasa (SDH). Las flechas indican agregados

20 que no se tiñen para SDH (izquierda). Las secciones en serie de 10 mo de ratones *Ano5^{-/-}* demuestran que muchos agregados de membrana (flechas blancas) observadas con tinción de tricrómico son positivos para SERCA1 (derecha) lo que sugiere que se derivan del retículo sarcoplásmico. Barra de escala =

25 40µm.

La Figura 5A-4E demuestra que la reparación de la membrana es defectuosa en ratones *Ano5^{-/-}*. **El panel (a)** proporciona imágenes de las fibras musculares *Ano5^{-/-}* y WT dañadas por un pulso de láser que se muestra 5 segundos y 190 segundos después de la lesión. Las flechas rojas indican el sitio del daño con el colorante FM1-43 que se acumula rápidamente en el músculo *Ano5^{-/-}* en comparación con el WT. Barra de escala = 50µm. **El panel (b)** proporciona la medición de la intensidad de fluorescencia después de una lesión inducida por láser. El músculo *Ano5^{-/-}* es estadísticamente diferente de las fibras WT y AAV.ANO5 en todo momento > 100 segundos después de la lesión (ANOVA de 2 vías, $P < 0.001$). **El panel (c)** exhibe expresión de ANO5-FLAG en músculos *Ano5^{-/-}* inyectados con 5×10^{10} vg de vector AAV.ANO5.FLAG. La inmunofluorescencia con anticuerpo anti-FLAG demostró expresión de ANO5-FLAG en la superficie celular en el músculo tratado (arriba) que estaba ausente en el músculo *Ano5^{-/-}* no tratado (parte inferior). Barra de escala = 40 µm. **El panel (d)** demuestra la recuperación del daño muscular inducido por cardiotoxina. Secciones de tejido teñidas con hematoxilina y eosina de los músculos WT y *Ano5^{-/-}* TA a 1, 3, 7, 14, 30 y 90 días después de la inyección de cardiotoxina (se muestran d 3, 7, 14 y 30). El músculo *Ano5^{-/-}* sufrió más daño y mostró un deterioro en la regeneración en comparación con WT. **El panel (e)** demuestra que el tamaño de miofibra permanece

estadísticamente menor en el músculo *Ano5^{-/-}* en comparación con el WT a los 30 d (Cardiotoxina D30) y 90 d (Cardiotoxina D90) después de la inyección de cardiotoxina ($P < 0.05$, prueba t).

5 **La Figura 6** demuestra la actividad voluntaria para ratones *Ano5^{-/-}* tratados con terapia antioxidante o dieta de placebo. El gráfico muestra la actividad voluntaria (cantidad de veces que los ratones rompieron rayos láser horizontales y/o verticales en un período de 45 minutos) para ratones *Ano5^{-/-}*
10 ^{-/-} que recibieron dieta antioxidante o control con placebo durante 12 y 16 semanas. Los ratones *Ano5^{-/-}* tratados con triple terapia antioxidante ha aumentado significativamente la actividad en comparación con el placebo tratado a las 16 semanas.

15 **La Figura 7** muestra medidas de fuerza específicas en el diafragma de *Ano5^{-/-}*, ya sea una terapia de triple antioxidante o una dieta de placebo y ratones de control WT con dieta de placebo. Los ratones *Ano5^{-/-}* tratados con terapia de triple antioxidante exhibieron una fuerza específica del
20 diafragma significativamente aumentada en comparación con el placebo tratado a las 16 semanas.

La Figura 8A-8B demuestra el efecto de biogénesis y función mitocondrial de la terapia de triple antioxidante. El tejido muscular gastrocnemio masculino se usó para medir el
25 marcador de biogénesis mitocondrial, la biogénesis

mitocondrial, la expresión de *PGC-1a* y la actividad citrato sintasa en ratones alimentados con triple antioxidante. **El panel (a)** muestra la expresión de *PGC-1a* para ratones a los que se les administró una terapia de triple antioxidante o una dieta con placebo. **El panel (b)** muestra la actividad citrato sintasa (CS) para ratones *Ano5^{-/-}* y WT machos y hembras a los que se les administró una terapia triple antioxidante o una dieta con placebo.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

El ANO5 juega un papel esencial en la reparación muscular y la invención proporciona vectores de AAV que comprenden el gen ANO5 para el tratamiento de MD. La alteración de ANO5 estrechamente fenocopia la pérdida de la expresión de disferlina en modelos murinos, y las mutaciones de disferlina causan MDs similares a miopatías ANO5 (distrofia muscular de cintura y extremidades 2B (LGMD2B) y distrofia de miopatía Miyoshi 1 (MMD1) vs distrofia muscular de cintura y extremidades 2L (LGMD2L) y Distrofia de miopatía Miyoshi 3 (MMD3)).

El ratón *Ano5^{-/-}* representa un modelo importante para el estudio de ANO5-miopatía, reparación sarcolemal y fusión celular miogénica. Las pruebas experimentales proporcionadas en los ejemplos a continuación apoyan los

métodos para la terapia de reemplazo génico como una estrategia de tratamiento para ANO5-miopatía rescatando parcialmente el fenotipo de reparación de la membrana a través del tratamiento AAV.ANO5-FLAG de ratones *Ano5*^{-/-}.

5

AAV

Como se usa aquí, el término "AAV" es una abreviatura estándar para virus adenoasociado. El virus adenoasociado es un parvovirus de ADN de cadena sencilla que
10 crece solo en células en las que ciertas funciones son proporcionadas por un virus auxiliar coinfectante. Actualmente hay trece serotipos de AAV que se han caracterizado, como se muestra a continuación en el cuadro 1. Se pueden encontrar información general y revisiones de AAV
15 en, por ejemplo, Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, vol. 1, pp. 169-228, y Berns, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (Nueva York). Sin embargo, se espera que estos mismos principios sean aplicables a los serotipos de AAV adicionales, ya que es bien sabido que los diversos serotipos
20 están estrechamente relacionados, tanto estructural como funcionalmente, incluso a nivel genético. (Véase, por ejemplo, Blacklowe, 1988, págs. 165-174 de Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed., y Rose, Comprehensive Virology 3: 1-61 (1974)). Por ejemplo, todos los serotipos de
25 AAV aparentemente exhiben propiedades de replicación muy

similares mediadas por genes rep homólogos; y todos portan tres proteínas de cápsida relacionadas tales como las expresadas en AAV2. El grado de relación se sugiere adicionalmente mediante el análisis de heterodúplex que
5 revela una extensa hibridación cruzada entre serotipos a lo largo del genoma; y la presencia de segmentos de autoanclaje análogos en los extremos que corresponden a "secuencias repetidas terminales invertidas" (ITR). Los patrones de infectividad similares también sugieren que las funciones de
10 replicación en cada serotipo están bajo un control regulatorio similar.

Un "vector de AAV" como se usa aquí se refiere a un vector que comprende uno o más polinucleótidos de interés (o transgenes) que están flanqueados por secuencias de
15 repetición terminal de AAV (ITR). Dichos vectores de AAV pueden replicarse y empaquetarse en partículas virales infecciosas cuando están presentes en una célula hospedera que ha sido transfectada con un vector que codifica y expresa productos de genes rep y cap.

20 Un "virión de AAV" o "partícula viral de AAV" o "partícula de vector de AAV" se refiere a una partícula viral compuesta de al menos una proteína de cápsida de AAV y un vector de AAV polinucleotídico encapsidado. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un
25 polinucleótido diferente de un genoma de AAV de tipo

silvestre tal como un transgén para administrarse a una célula de mamífero), típicamente se denomina una "partícula de vector de AAV" o simplemente un "vector de AAV". De este modo, la producción de partícula de vector de AAV incluye
5 necesariamente la producción de vector de AAV, ya que dicho vector está contenido dentro de una partícula de vector de AAV.

Un vector de AAV puede ser o bien un ácido nucleico de cadena sencilla o de doble cadena, que tiene una secuencia
10 de repetición terminal invertida AAV 5' (ITR) y un ITR AAV 3' que flanquean una secuencia de codificación de proteína unido operativamente a elementos reguladores de la transcripción, es decir, uno o más promotores y/o potenciadores, y una secuencia de poliadenilación, y, opcionalmente, uno o más
15 intrones insertados entre exones de la secuencia que codifica la proteína. Un vector de AAV de cadena sencilla se refiere a ácidos nucleicos que están presentes en el genoma de una partícula de virus de AAV, y puede ser la cadena con sentido o la cadena antisentido de las secuencias de ácido nucleico
20 descritas aquí. El tamaño de dichos ácidos nucleicos de cadena sencillas se proporciona en bases. Un vector de AAV de doble cadena se refiere a ácidos nucleicos que están presentes en el ADN de plásmidos, por ejemplo, pUC19, o genoma de un virus de doble cadena, por ejemplo, baculovirus,
25 usado para expresar o transferir los ácidos nucleicos del

vector AAV. El tamaño de dichos ácidos nucleicos de doble cadena se proporciona en pares de bases (pb).

El término "repetición terminal invertida (ITR)" como se usa aquí se refiere a las regiones reconocidas en la técnica encontradas en los extremos 5' y 3' del genoma de AAV que funcionan en cis como orígenes de la replicación del ADN y como señales de empaquetamiento para el genoma viral. Las ITR de AAV, junto con la región de codificación de rep de AAV, proporcionan una escisión eficaz y un rescate de, y una integración de una secuencia de nucleótidos interpuesta entre dos ITR de flanco en el genoma de una célula hospedera. Secuencias de ciertos ITR asociados con AAV están descritos por Yan et al., J. Virol. 79(1):364-379 (2005) que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Un "elemento de control de transcripción" se refiere a secuencias de nucleótidos de un gen implicado en la regulación de la transcripción genética que incluye un promotor, más elementos de respuesta, secuencias activadoras y potenciadoras de la unión de factores de transcripción para ayudar a la unión de polimerasa de ARN y promover la expresión, y secuencias operadoras o silenciadoras a las que las proteínas represoras se unen para bloquear la unión de polimerasa de ARN y prevenir la expresión.

Los genes "rep" y "cap" de AAV son genes que codifican proteínas de replicación y encapsidación,

respectivamente. Se han encontrado genes rep y cap de AAV en todos los serotipos de AAV examinados hasta la fecha, y se describen aquí y en las referencias citadas. En AAV de tipo silvestre, los genes rep y cap generalmente se encuentran
5 adyacentes entre sí en el genoma viral (es decir, están "acoplados" juntos como unidades de transcripción contiguas o superpuestas), y generalmente se conservan entre los serotipos de AAV. Los genes AAV rep y cap también se denominan individual y colectivamente como "genes de
10 empaquetamiento de AAV". El gen cap de AAV de acuerdo con la presente invención codifica una proteína Cap que es capaz de empaquetar vectores de AAV en presencia de la función auxiliar rep y adeno y es capaz de unirse a los receptores celulares objetivo. En algunas modalidades, el gen cap de AAV
15 codifica una proteína de cápsida que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de un serotipo de AAV particular, por ejemplo los serotipos mostrados en el cuadro 1 y AAV rh.74 (véase la Patente de Estados Unidos No. 9,434,928). También se contemplan otros tipos de variantes de rAAV, por ejemplo
20 rAAV con mutaciones de la cápsida. Véase, por ejemplo, Marsic *et al.*, Mol Ther, 22(11): 1900-1909 (2014).

CUADRO 1**Serotipos de AAV**

	Serotipo AAV	No. de acceso Genbank
	AAV-1	NC_002077.1
5	AAV-2	NC_001401.2
	AAV-3	NC_001729.1
	AAV-3B	AF028705.1
	AAV-4	NC_001829.1
	AAV-5	NC_006152.1
	AAV-6	AF028704.1
	AAV-7	NC_006260.1
	AAV-8	NC_006261.1
	AAV-9	AX753250.1
10	AAV-10	AY631965.1
	AAV-11	AY631966.1
	AAV-12	DQ813647.1
	AAV-13	EU285562.1

Las secuencias de AAV empleadas para la producción de AAV pueden derivarse del genoma de cualquier serotipo de AAV. Generalmente, los serotipos de AAV tienen secuencias genómicas de homología significativa en los niveles de aminoácidos y ácidos nucleicos, proporcionan un conjunto similar de funciones genéticas, producen viriones que son esencialmente equivalentes física y funcionalmente, y se replican y ensamblan mediante mecanismos prácticamente idénticos. Para la secuencia genómica de los serotipos de AAV y una discusión de las similitudes genómicas, véase, por ejemplo, el número de acceso de GenBank U89790; Número de acceso de GenBank J01901; Número de acceso GenBank AF043303; Número de acceso GenBank AF085716; Chlorini *et al.*, J. Vir.

71: 6823-33(1997); Srivastava *et al.*, J. Vir. 45:555-64 (1983); Chlorini *et al.*, J. Vir. 73:1309-1319 (1999); Rutledge *et al.*, J. Vir. 72:309-319 (1998); y Wu *et al.*, J. Vir. 74: 8635-47 (2000).

5 La organización genómica de todos los serotipos de AAV conocidos es muy similar. El genoma de AAV es una molécula de ADN lineal de cadena sencilla que tiene menos de aproximadamente 5,000 nucleótidos (nt) de longitud. Las repeticiones terminales invertidas (ITR) flanquean las
10 secuencias de nucleótidos de codificación únicas para las proteínas de replicación no estructural (Rep) y las proteínas estructurales (VP). Las proteínas VP forman la cápsida. Las terminales 145 nt son autocomplementarias y están organizadas de modo que se puede formar un dúplex intramolecular
15 energéticamente estable que forma una horquilla en forma de T. Estas estructuras en horquilla funcionan como un origen para la replicación del ADN viral, que sirve como iniciadores para el complejo de polimerasa de ADN celular. Los genes Rep codifican las proteínas Rep, Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40.
20 Rep78 y Rep68 se transcriben desde el promotor p5, y Rep52 y Rep40 se transcriben desde el promotor p19. Los genes cap codifican las proteínas VP, VP1, VP2 y VP3. Los genes cap se transcriben a partir del promotor p40.

 En algunas modalidades, una secuencia de ácido
25 nucleico que codifica una proteína de cápsida de AAV se une

operativamente a secuencias de control de la expresión para la expresión en un tipo de célula específica, tal como células Sf9 o HEK. Las técnicas conocidas por los expertos en la técnica para expresar genes extraños en células hospederas de insecto o células hospederas de mamífero pueden usarse para practicar la invención. La metodología para la ingeniería molecular y la expresión de polipéptidos en células de insectos se describe, por ejemplo, en Summers and Smith. 1986. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bull. No. 7555, College Station, Tex.; Luckow. 1991. In Prokop *et al.*, Cloning and Expression of Heterologous Genes in Insect Cells with Baculovirus Vectors' Recombinant DNA Technology and Applications, 97-152; King, L. A. and R. D. Possee, 1992, The baculovirus expression system, Chapman and Hall, United Kingdom; O'Reilly, D. R., L. K. Miller, V. A. Luckow, 1992, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, New York; W.H. Freeman and Richardson, C. D., 1995, Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology, volume 39; U.S. Pat. No. 4,745,051; US2003148506; y WO 03/074714. Un promotor particularmente adecuado para la transcripción de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápsida de AAV es, por ejemplo, el promotor poliedro. Sin embargo, otros promotores que son activos en células de insectos son conocidos en la técnica,

por ejemplo, los promotores p10, p35 o IE-1 y otros promotores descritos en las referencias anteriores también se contemplan.

El uso de células de insecto para la expresión de proteínas heterólogas está bien documentado, así como métodos para introducir ácidos nucleicos, tales como vectores, por ejemplo, vectores compatibles con células de insecto, en tales células y métodos para mantener tales células en cultivo. Véase, por ejemplo, METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, ed. Richard, Humana Press, NJ (1995); O'Reilly et al., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS, A LABORATORY MANUAL, Oxford Univ. Press (1994); Samulski et al., J. Vir. 63:3822-8 (1989); Kajigaya et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 88: 4646-50 (1991); Ruffing et al., J. Vir. 66:6922-30 (1992); Kirnbauer et al., Vir. 219:37-44 (1996); Zhao et al., Vir. 272:382-93 (2000); and Samulski et al., U.S. Pat. No. 6,204,059. En algunas modalidades, el constructo de ácido nucleico que codifica AAV en células de insecto es un vector compatible con células de insecto. Un "vector compatible con células de insecto" o "vector" como se usa aquí se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transformación o transfección productiva de una célula de insecto o insecto. Los ejemplos de vectores biológicos incluyen plásmidos, moléculas de ácidos nucleicos lineales y virus recombinantes. Se puede emplear cualquier vector siempre que sea compatible

con células de insectos. El vector puede integrarse en el genoma de las células de insecto, pero la presencia del vector en la célula de insecto no necesita ser permanente y los vectores episómicos transitorios también están incluidos.

5 Los vectores se pueden introducir por cualquier medio conocido, por ejemplo, por tratamiento químico de las células, electroporación o infección. En algunas modalidades, el vector es un baculovirus, un vector viral o un plásmido. En una modalidad más preferida, el vector es un baculovirus,

10 es decir, el constructo es un vector baculoviral. Los vectores baculovirales y los métodos para su uso se describen en las referencias citadas anteriormente sobre ingeniería molecular de células de insectos.

Los baculovirus son virus de ADN con envoltura de

15 artrópodos, dos miembros de los cuales son vectores de expresión bien conocidos para producir proteínas recombinantes en cultivos celulares. Los baculovirus tienen genomas de doble cadena circulares (80-200 kbp) que pueden diseñarse para permitir el suministro de un gran contenido

20 genómico a células específicas. Los virus utilizados como vector son generalmente nucleopolihedrovirus multicapsid de *Autographa californica* (AcMNPV) o NPV de *Bombyx mori* (Bm) (Kato et al., 2010).

Los baculovirus se usan comúnmente para la

25 infección de células de insectos para la expresión de

proteínas recombinantes. En particular, la expresión de genes heterólogos en insectos se puede lograr como se describe, por ejemplo, en la patente de E.U.A. No. 4,745,051; Friesen et al (1986); EP 127,839; EP 155,476; Vlak et al (1988); Miller et al (1988); Carbonell et al (1988); Maeda et al (1985); Lebacq-Verheyden et al (1988); Smith et al (1985); Miyajima et al (1987); and Martin et al (1988). Numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células hospederas de insectos permisivas que pueden usarse para la producción de proteínas se describen en Luckow et al (1988), Miller et al (1986); Maeda et al (1985) y McKenna (1989).

En un aspecto, la invención proporciona genomas de rAAV. Los genomas de rAAV comprenden uno o más ITR de AAV que flanquean una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína ANO5. Si el polinucleótido codifica la proteína ANO5, el polinucleótido se une operativamente a ADN de control de la transcripción, específicamente ADN de promotor y ADN de secuencia de señal de poliadenilación que son funcionales en células objetivo, por ejemplo, células musculares, para formar un casete génico. El casete génico también puede incluir secuencias de intrón para facilitar el procesamiento del transcrito de ARN cuando se expresa en células de mamífero. Por ejemplo, el genoma de AAV comprende uno o más ITR de AAV que flanquean más exones del gen ANO5, como el exón 8 y el exón 9 del gen ANO5. El genoma de AAV

también puede comprender uno o más de los siguientes: un intrón, un gen reportero tal como Lac-Z β -galactosidasa o gen de resistencia a neomicina, sitios de recombinación CRE-Lox tales como Lox P, y un sitio interno de entrada al ribosoma (IRE S).

Métodos para producir AAV recombinantes

La presente descripción proporciona materiales y métodos para producir AAV recombinantes en células de insectos o mamíferos. En algunas modalidades, el constructo viral comprende además un promotor y un sitio de restricción corriente abajo del promotor para permitir la inserción de un polinucleótido que codifica una o más proteínas de interés, en donde el promotor y el sitio de restricción están situados corriente abajo del 5' AAV ITR y corriente arriba del 3' AAV ITR. En algunas modalidades, el constructo viral comprende además un elemento regulador postranscripcional corriente abajo del sitio de restricción y corriente arriba del 3' AAV ITR. En algunas modalidades, el constructo viral comprende además un polinucleótido insertado en el sitio de restricción y unido operativamente con el promotor, donde el polinucleótido comprende la región de codificación de una proteína de interés. Como apreciará un experto en la materia, cualquiera de los vectores de AAV descritos en la presente solicitud puede usarse en el método como el constructo viral

para producir el AAV recombinante. Los plásmidos de ADN se transfieren a células permisibles para infección con un virus auxiliar de AAV (por ejemplo, adenovirus, adenovirus eliminado con E1 o herpesvirus) para el montaje del genoma de rAAV en partículas virales infecciosas. Las técnicas para producir partículas de rAAV, en las que se suministran genomas de AAV, genes de rep y cap empaquetados y funciones de virus auxiliares a una célula son estándar en la técnica. La producción de rAAV requiere que los siguientes componentes estén presentes dentro de una única célula (denominada aquí como célula de empaquetamiento): un genoma de rAAV, genes rep y cap de AAV separados de (es decir, no en) el genoma de rAAV y funciones de virus auxiliares.

En algunas modalidades, las funciones auxiliares se proporcionan mediante uno o más plásmidos auxiliares o virus auxiliares que comprenden genes auxiliares adenovirales o baculovirales. Los ejemplos no limitantes de los genes auxiliares adenovirales o baculovirales incluyen, pero no se limitan a, E1A, E1B, E2A, E4 y VA, que pueden proporcionar funciones auxiliares para el empaquetamiento de AAV.

Los virus auxiliares de AAV son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, virus de la familia *Adenoviridae* y de la familia *Herpesviridae*. Los ejemplos de virus auxiliares de AAV incluyen, pero no se limitan a, virus auxiliar SAdV-13 y virus auxiliar similar a SAdV-13 descritos

en la publicación de E.U.A. No. 20110201088 (la descripción de la cual se incorpora aquí como referencia), vectores auxiliares pHELP (Applied Viromics). Un experto en la técnica apreciará que cualquier virus auxiliar o plásmido auxiliar de AAV que pueda proporcionar una función auxiliar adecuada para AAV puede usarse aquí.

En algunas modalidades, los genes cap de AAV están presentes en un plásmido. El plásmido puede comprender además un gen rep de AAV. Los genes cap y/o rep de cualquier serotipo AAV (que incluyen, pero no se limitan a AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV rh.74 y cualquier otro variantes de los mismos) se pueden usar aquí para producir el AAV recombinante. En algunas modalidades, los genes cap AAV codifican una cápsida del serotipo 1, serotipo 2, serotipo 4, serotipo 5, serotipo 6, serotipo 7, serotipo 8, serotipo 9, serotipo 10, serotipo 11, serotipo 12, serotipo 13 o una variante del mismo.

En algunas modalidades, la célula de insecto o de mamífero puede transfectarse con el plásmido auxiliar o virus auxiliar, el constructo viral y el plásmido que codifica los genes cap de AAV; y el virus AAV recombinante puede recogerse en diversos momentos después de la co-transfección. Por ejemplo, el virus AAV recombinante puede recogerse a aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas,

aproximadamente 72 horas, aproximadamente 96 horas, aproximadamente 120 horas, o un tiempo entre cualquiera de estos dos puntos de tiempo después la co-transfección.

El AAV recombinante también se puede producir
5 usando cualquier método convencional conocido en la técnica adecuado para producir AAV recombinante infeccioso. En algunos casos, se puede producir un AAV recombinante usando una célula de insecto o de mamífero que expresa de forma estable algunos de los componentes necesarios para la
10 producción de partículas de AAV. Por ejemplo, un plásmido (o plásmidos múltiples) que comprenden genes rep y cap de AAV, y un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a neomicina, se pueden integrar en el genoma de la célula. La célula de insecto o de mamífero puede co-infectarse con un
15 virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus o baculovirus que proporcionan las funciones auxiliares) y el vector viral que comprende la AAV ITR 5' y 3' (y la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína heteróloga, si se desea). Las ventajas de este método son que las células son
20 seleccionables y son adecuadas para la producción a gran escala del AAV recombinante. Como otro ejemplo no limitante, se pueden usar adenovirus o baculovirus en lugar de plásmidos para introducir genes rep y cap en células de empaquetamiento. Como otro ejemplo no limitante, tanto el
25 vector viral que contiene los AAV LTR 5' y 3' y los genes de

rep-cap pueden integrarse de manera estable en el ADN de las células productoras, y las funciones de ayuda pueden ser proporcionadas por un adenovirus de tipo silvestre para producir el AAV recombinante.

5 Un método para generar una célula de empaquetamiento es crear una línea celular que exprese establemente todos los componentes necesarios para la producción de partículas de AAV. Por ejemplo, un plásmido (o plásmidos múltiples) que comprende un genoma de rAAV que
10 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 de una célula. Los genomas de AAV se han introducido en plásmidos bacterianos mediante procedimientos tales como
15 prolongación GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. S6. USA, 79: 2077-2081), adición de enlazadores sintéticos que contienen sitios de escisión por endonucleasas de restricción (Laughlin et al., 1983, Gene, 23: 65-73) o por ligamiento directo de extremos romos (Senapathy y Carter, 1984, J. Biol.
20 Chem., 259: 4661-4666). La línea celular de empaquetamiento se infecta luego con un virus auxiliar tal como adenovirus. Las ventajas de este método es que las células son seleccionables y son adecuadas para la producción a gran escala de rAAV. Otros ejemplos de métodos adecuados emplean
25 adenovirus o baculovirus en lugar de plásmidos para

introducir genomas de rAAV y/o genes rep y cap en células de empaquetamiento.

Los principios generales de la producción de rAAV se revisan en, por ejemplo, Carter, 1992, *Current Opinions in Biotechnology*, 1533-539; and Muzyczka, 1992, *Curr. Topics in Microbial. and Immunol.*, 158:97-129). Se describen diversos enfoques en Ratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072 (1984); Hermonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466 (1984); Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3251 (1985); McLaughlin et al., *J. Virol.*, 62:1963 (1988); and Lebkowski et al., 1988 *Mol. Cell. Biol.*, 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, *J. Virol.*, 63:3822-3828); Patente de los Estados Unidos No. 5,173,414; WO 95/13365 y la correspondiente Patente de Estados Unidos No. 5,658,776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al. (1995) *Vaccine* 13: 1244-1250; Paul et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4: 609-615; Clark et al. (1996) *Gene Therapy* 3: 1124-1132; Patente de los Estados Unidos. No. 5,786,211; Patente de los Estados Unidos No. 5,871,982; y la patente de Estados Unidos No. 6,258,595. Los documentos anteriores se incorporan aquí como referencia en su totalidad en este documento, con particular énfasis en aquellas secciones de los documentos relacionados con la producción de rAAV.

La invención proporciona así células de empaquetamiento que producen rAAV infeccioso. En una modalidad, las células de empaquetamiento pueden transformarse de manera estable en células cancerosas tales como células HeLa, células 293 y células PerC.6 (una línea 5 293 afín). En otra modalidad, las células de empaquetamiento son células que no son células cancerosas transformadas tales como células 293 de bajo pase (células de riñón fetal humano transformadas con E1 de adenovirus), células MRC-5 10 (fibroblastos fetales humanos), células WI-38 (fibroblastos fetales humanos), Células Vero (células de riñón de mono) y células FRhL-2 (células pulmonares fetales rhesus).

El rAAV puede purificarse mediante métodos estándar en la técnica, tales como mediante cromatografía en columna o 15 gradientes de cloruro de cesio. Los métodos para purificar vectores de rAAV a partir de virus auxiliares son conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos en, por ejemplo, Clark *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, *Methods Mol. Med.*, 69 427-443 (2002); 20 Patente de Estados Unidos No. 6,566,118 y WO 98/09657.

Tipos de células utilizadas en la producción de AAV

Las partículas virales que comprenden los vectores de AAV de la invención pueden introducirse usando cualquier 25 tipo de célula de invertebrado que permita la producción de

AAV o productos biológicos y que pueda mantenerse en cultivo. Por ejemplo, la línea celular de insecto utilizada puede ser de *Spodoptera frugiperda*, tal como SF9, SF21, SF900+, líneas celulares de drosophila, líneas celulares de mosquito, por ejemplo, líneas celulares derivadas de *Aedes albopictus*, líneas celulares domésticas de gusanos de seda, por ejemplo, líneas celulares de *Bombyxmori*, líneas celulares de *Trichoplusia ni* tales como células High Five o líneas celulares de Lepidóptera tales como líneas celulares de *Ascalapha odorata*. Las células de insecto preferidas son células de las especies de insectos que son susceptibles a la infección por baculovirus, incluidos High Five, Sf9, Se301, SeIZD2109, SeUCR1, Sf9, Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1, Tn368, HzAm1, BM-N, Ha2302, Hz2E5 y Ao38.

Los baculovirus son virus de ADN con envoltura de artrópodos, dos miembros de los cuales son vectores de expresión bien conocidos para producir proteínas recombinantes en cultivos celulares. Los baculovirus tienen genomas de doble cadena circulares (80-200 kbp) que pueden diseñarse para permitir el suministro de un gran contenido genómico a células específicas. Los virus utilizados como vector son generalmente nucleopolihedrovirus multicapsid de *Autographa californica* (AcMNPV) o *Bombyx mori* (Bm NPV) (Kato et al., 2010).

Los baculovirus se usan comúnmente para la

infección de células de insecto para la expresión de proteínas recombinantes. En particular, la expresión de genes heterólogos en insectos se puede lograr como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 4,745,051; 5 Friesen et al (1986); EP 127,839; EP 155,476; Vlak et al (1988); Miller et al (1988); Carbonell et al (1988); Maeda et al (1985); Lebacq-Verheyden et al (1988); Smith et al (1985); Miyajima et al (1987); y Martin et al (1988). Numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células 10 hospederas de insectos permisivas que pueden usarse para la producción de proteínas se describen en Luckow et al. (1988), Miller et al (1986); Maeda et al (1985) y McKenna (1989).

En otro aspecto de la invención, los métodos de la invención también se llevan a cabo con cualquier tipo de 15 célula de mamífero que permita la replicación de AAV o la producción de productos biológicos, y que pueda mantenerse en cultivo. Las células de mamífero preferidas utilizadas pueden ser células HEK293, HeLa, CHO, NS0, SP2/0, PER.C6, Vero, RD, BHK, HT 1080, A549, Cos-7, ARPE-19 y MRC-5.

20

Composiciones

En otra modalidad, la invención contempla composiciones que comprenden rAAV y/o antioxidantes de la presente invención. Estas composiciones se pueden usar para 25 regenerar, mejorar o reparar el músculo y/o mejorar la

función muscular.

Las composiciones de la invención comprenden rAAV en un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también pueden comprender otros ingredientes tales como
5 diluyentes y adyuvantes. Los portadores, diluyentes y adyuvantes aceptables no son tóxicos para los receptores y son preferiblemente inertes a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen reguladores de pH tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos;
10 antioxidantes; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos,
15 disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o agente tensioactivos no iónicos tales como Tween, plurónicos o
20 polietilenglicol (PEG).

Los métodos para transducir una célula objetivo con rAAV, *in vivo* o *in vitro*, están contemplados por la invención. Los métodos *in vivo* comprenden la etapa de administrar una dosis efectiva, o dosis múltiples efectivas,
25 de una composición que comprende un rAAV de la invención a un

animal (que incluye un paciente humano) que lo necesita. Una dosis efectiva, o dosis múltiples efectivas, de una combinación de composiciones que comprenden un VAAr de la descripción a un sujeto) es una dosis que previene, ralentiza
5 la progresión de, o mejora (elimina o reduce) la patología muscular asociada con la enfermedad que se está tratando. Se puede demostrar un efecto sobre la patología muscular mediante una mejora en uno o más patrones estándar en la técnica, tales como: fuerza específica muscular absoluta;
10 disminución de la fuerza durante las contracciones musculares excéntricas; nivel de CK en suero; nivel de troponina cardíaca en suero; nivel de MMP9 en suero; la fuerza de prensión; torsión de la extremidad; movilidad o flexibilidad de las extremidades; ambulación; prueba de 6 minutos a pie;
15 fuerza flexora o extensora de la rodilla; máxima contracción muscular isométrica voluntaria; Evaluación Ambulatoria de North Star; masa muscular, reducción de grasa o edema mediante medidas de MRI ponderadas en T2 en extremidad; contracturas musculares; ángulo de la articulación de la
20 extremidad; función cardíaca (frecuencia cardíaca, gasto cardíaco, porcentaje de acortamiento fraccional, volumen sistólico); respiración (que incluye la frecuencia respiratoria, la oxigenación de la sangre, la necesidad de oxígeno suplementario); necrosis muscular; regeneración
25 muscular; pérdida muscular; inflamación muscular;

calcificación muscular; nucleación central muscular; tamaño del músculo o tamaño de miofibra; esperanza de vida; y la expresión de la proteína sustituta de distrofina o laminina alfa 2 (utrofina, plectina 1, laminina alfa 5, agrina). Véase, por ejemplo, Forbes *et al.*, *Radiology*, 269 (1): 198-207 (2013); Govoni *et al.*, *Cell Mol. Life Sci.*, 70 (23): 4585-4602 (2013); y Chandrasekharan y Martin, *Methods Enzymol.*, 479: 291-322 (2010). Si se administra una dosis antes del desarrollo de una enfermedad, la administración es profiláctica. Si se administra una dosis después del desarrollo de una enfermedad, la administración es terapéutica. El tratamiento del sujeto por los métodos descritos aquí se contempla por lo tanto para prevenir, ralentizar o prevenir la progresión de, disminuir la extensión de, resulta en la remisión (parcial o total) y/o prolongar la supervivencia de la enfermedad que se está tratando.

Las terapias de combinación también se contemplan en la invención. La combinación como se usa aquí incluye tratamiento simultáneo o tratamientos secuenciales. Las combinaciones de métodos de la invención con tratamientos médicos estándar (por ejemplo, corticosteroides para distrofias musculares) se contemplan específicamente, al igual que las combinaciones con nuevas terapias. A este respecto, puede ser concebible inducir la expresión de ANO5

para reducir o inhibir la lesión muscular, mejorar el músculo o inducir la reparación muscular, y luego proporcionar el tratamiento secundario. Dichos tratamientos secundarios para la Distrofia Muscular pueden incluir el uso de antioxidantes
5 (por ejemplo, ácido lipoico, coenzima Q10 y α -tocoferol), IGF-1, enfoques de ARN interferente, omisión de exón, inhibición de calpaína, sobre-regulación de distrofina y expresión de distroglicano. Además, puede haber adiciones a la expresión de ANO5 para potenciar los efectos potenciadores
10 de los músculos. Por ejemplo, se podría realizar la adición de IGF-1 u otros factores tróficos o inyecciones de precursores musculares.

La dosis de rAAV que debe administrarse en los métodos descritos aquí variará dependiendo, por ejemplo, de
15 la rAAV particular, el modo de administración, la meta del tratamiento, el individuo y el(los) tipo(s) de célula que se está tratando, y puede ser determinado por métodos estándar en la técnica. Los títulos de cada AAVr administrado pueden variar de aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 ,
20 aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} , aproximadamente 1×10^{14} , o aproximadamente 1×10^{15} o más partículas resistentes a DNasa (DRP) por ml. Las dosificaciones también se pueden expresar
25 en unidades de genomas virales (vg) (es decir, 1×10^7 vg, 1×10^8

vg, 1×10^9 vg, 1×10^{10} vg, 1×10^{11} vg, 1×10^{12} vg, 1×10^{13} vg, 1×10^{14} vg, 1×10^{15} , respectivamente). Los métodos para titular AAV se describen en Clark et al., *Hum. Gene Ther.*, 10: 1031-1039 (1999).

5 La administración de una dosis efectiva de las composiciones puede ser por rutas estándar en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, intramuscular, parenteral, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, intracraneal, intraósea, intraocular, rectal o vaginal. La(s) ruta(s) de
10 administración y serotipo(s) de los componentes de AAV de la rAAV (en particular, la AAV ITR y la proteína de la cápsida) de la invención pueden elegirse y/o equipararse por los expertos en la técnica teniendo en cuenta el estado de la enfermedad tratadas y las células/tejido objetivo que deben
15 expresar la proteína ANO5. En algunas modalidades, la ruta es una o más inyecciones intramusculares en los cuádriceps del paciente. En algunas modalidades, la ruta es una o más inyecciones intramusculares en cada uno de los tres principales grupos musculares de los cuádriceps del paciente.

20 En particular, la administración real de rAAV de la presente invención se puede llevar a cabo usando cualquier método físico que transporte el vector recombinante de rAAV en el tejido objetivo de un animal. La administración de acuerdo con la invención incluye, pero no se limita a,
25 inyección en el músculo, el torrente sanguíneo y/o

directamente en el hígado. Simplemente se ha demostrado que la resuspensión de un VAAr en solución salina regulada de pH con fosfato es suficiente para proporcionar un vehículo útil para la expresión del tejido muscular, y no existen

5 restricciones conocidas sobre los portadores u otros componentes que puedan co-administrarse con rAAV (aunque las composiciones que degradan ADN debe evitarse de la manera normal con rAAV). Las proteínas de cápsida de un rAAV se pueden modificar de modo que el rAAV se dirija a un tejido

10 objetivo particular de interés tal como el músculo. Véase, por ejemplo, WO 02/053703, cuya descripción se incorpora aquí como referencia. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar como formulaciones inyectables o como formulaciones tópicas para administrar a los músculos mediante transporte

15 transdérmico. Numerosas formulaciones para inyección intramuscular y transporte transdérmico se han desarrollado previamente y pueden usarse en la práctica de la invención. El rAAV se puede usar con cualquier portador farmacéuticamente aceptable para facilitar su administración

20 y manejo.

Para propósitos de inyección intramuscular, pueden emplearse soluciones en un adyuvante tal como aceite de sésamo o de cacahuete o en propilenglicol acuoso, así como soluciones acuosas estériles. Tales soluciones acuosas se

25 pueden regular con pH, si se desea, y el diluyente líquido se

hace primero isotónico con solución salina o glucosa. Las soluciones de rAAV como un ácido libre (el ADN contiene grupos de fosfato ácidos) o una sal farmacológicamente aceptable se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada
5 con un agente tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También se puede preparar una dispersión de rAAV en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el
10 crecimiento de microorganismos. A este respecto, los medios acuosos estériles empleados se pueden obtener fácilmente mediante técnicas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso
15 inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones 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
20 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 contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares),
25

mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de agentes tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede producirse 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 conseguirse mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando rAAV en la cantidad requerida en el solvente apropiado con diversos otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el ingrediente activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la técnica

de secado por congelamiento que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de la solución previamente filtrada estéril del mismo.

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

Se conocen en la técnica métodos adecuados para la transducción y reintroducción de células transducidas en un sujeto. En una modalidad, las células pueden transducirse *in*
15 *vitro* combinando rAAV con células musculares, por ejemplo, en medios apropiados, y clasificando aquellas células que albergan el ADN de interés usando técnicas convencionales tales como Southern blots y/o PCR, o usando marcadores seleccionables. Las células transducidas pueden luego
20 formularse en composiciones farmacéuticas, y la composición introducirse en el sujeto mediante diversas técnicas, tales como inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal, o mediante inyección en músculo liso y cardíaco, usando, por ejemplo, un catéter.

25 La transducción de células con rAAV de la invención

resulta en la expresión sostenida de la proteína ANO5. La presente invención proporciona así métodos de administración/suministro de rAAV que expresan ANO5 a un animal, preferiblemente un ser humano. Estos métodos incluyen

5 transducir tejidos (que incluyen, pero no se limitan a, tejidos tales como músculos, órganos tales como hígado y cerebro, y glándulas tales como glándulas salivales) con uno o más rAAV de la presente invención. La transducción puede llevarse a cabo con casetes génicos que comprenden elementos

10 de control específicos de tejido. Por ejemplo, una modalidad de la invención proporciona métodos de transducción de células musculares y tejidos musculares dirigidos por elementos de control específicos de músculo, que incluyen, pero no se limitan a, los derivados de las familias de genes

15 de actina y miosina, tales como de la familia de genes myoD [Véase Weintraub *et al.*, *Science*, 251: 761-766 (1991)], el factor de unión al potenciador específico de miocitos MEF-2 [Cserjesi and Olson, *Mol Cell Biol* 11: 4854-4862 (1991)], elementos de control derivados del gen humano de la actina

20 esquelética [Muscat *et al.*, *Mol Cell Biol*, 7: 4089-4099 (1987)], el gen de la actina cardíaca, elementos de la secuencia de la creatina quinasa muscular [Véase Johnson *et al.*, *Mol Cell Biol*, 9: 3393-3399 (1989)] y el elemento potenciador de la creatina quinasa de murina (mCK) tal como

25 MCK7 o tMCK que son copias triples del mCK de ratón,

elementos de control derivados del gen esquelético de troponina C de contracción rápida, el gen de troponina C cardiaca de contracción lenta y el gen de troponina I de contracción lenta: factores nucleares inducibles por hipoxia
5 (*Semenza et al., Proc Natl Acad Sci USA, 88: 5680-5684 (1991)*), elementos inducibles por esteroides y promotores que incluyen el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) [véase Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5603-5607 (1993)*] y otros elementos de control.

10 El tejido muscular es un objetivo atractivo para el suministro génico *in vivo* y la terapia génica, porque no es un órgano vital y es de fácil acceso. La invención contempla la expresión sostenida de proteínas ANO5 biológicamente activas a partir de miofibras transducidas.

15 Por "célula muscular" o "tejido muscular" se entiende una célula o grupo de células derivadas de cualquier tipo de músculo (por ejemplo, músculo esquelético y músculo liso, por ejemplo, del tracto digestivo, la vejiga urinaria, los vasos sanguíneos o tejido cardíaco). Dichas células
20 musculares pueden ser diferenciadas o indiferenciadas, tales como mioblastos, miocitos, miotubos, cardiomiocitos y cardiomioblastos. Dado que el tejido muscular es fácilmente accesible al sistema circulatorio, una proteína producida y secretada por las células musculares y el tejido *in vivo*
25 lógicamente ingresará al torrente sanguíneo para el

suministro sistémico, proporcionando de ese modo niveles terapéuticos sostenidos de secreción de proteína del músculo.

El término "transducción" se usa para referirse a la administración/suministro de ADN de ANO5 a una célula receptora *in vivo* o *in vitro*, a través de un VAAr deficiente en replicación de la invención que resulta en la expresión de una proteína ANO5 funcional por parte de la célula receptora.

Composiciones antioxidantes

La producción de especies reactivas de oxígeno durante la contracción del músculo esquelético está bien establecida. Durante el ejercicio prolongado, cantidades elevadas de estos oxidantes causan daño a proteínas y lípidos, y conducen a la activación de múltiples vías de señalización de respuesta al estrés (Powers *et al.*, *Free Radic Biol Med* 51: 942-50 (2011)). En consecuencia, varios estudios han investigado el uso de suplementos de antioxidantes a largo plazo como un medio para aliviar el estrés oxidativo en el músculo esquelético. Un estudio reciente informó que una formulación de tres antioxidantes (vitamina E, ácido α -lipoico y coenzima Q10) complementada en la dieta de ratones hembra mejoró el rendimiento de carrera, así como marcadores de función mitocondrial (Abadi *et al.*, *PLoS One*. 8:e60722 (2013)). Sin embargo, otros han informado que una dieta modificada de manera similar (vitamina E +

ácido α -lipoico) redujo la biogénesis mitocondrial en ratas (Strobel *et al.*, *Med Sci Sports Exerc.*, 43:1017-24 (2011)). Actualmente, no existe consenso en la técnica sobre el efecto de suplementación de antioxidantes a largo plazo sobre la salud del músculo esquelético, y se ha prestado muy poca atención a los músculos debilitados por la enfermedad. Sin embargo, la invención proporciona evidencia de que una dieta antioxidante proporciona efectos beneficiosos sobre el músculo esquelético de ratones *Ano5^{-/-}*.

10

Antioxidantes

La invención proporciona la administración de una composición antioxidante para mejorar la fisiología muscular y la función en sujetos que padecen distrofia muscular. La composición antioxidante descrita aquí utiliza al menos un antioxidante. Además, la invención proporciona composiciones antioxidantes que comprenden por lo menos dos o por lo menos tres antioxidantes, y en estas composiciones los antioxidantes tendrán diferentes funciones celulares. Los antioxidantes preferidos son aquellos que se ha demostrado que revierten específicamente el daño mitocondrial como producto del envejecimiento. Por ejemplo, la invención proporciona composiciones antioxidantes que comprenden al menos uno de co-enzima Q10, ácido α -lipoico, carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, licopeno, luteína, astaxantina,

25

cantaxantina y zeaxantina), vitaminas tales como vitamina A (retinol, 3,4-didehidroretinol y 3-hidroxi-retinol), vitamina C (ácido ascórbico) y vitamina E (α -tocoferol), cofactores vitamínicos, polifenoles y flavonoides (resveratrol, gingerol, curcumina) o Minerales (Hierro, Magnesio, Selenio, Cobre, Zinc, Manganeso, Yoduro). En modalidades preferidas, estos antioxidantes son la coenzima Q10, vitamina E, ácido α -lipoico.

La coenzima Q10, también conocida como Q10, vitamina Q10, ubiquinona, ubidecarenona o coenzima Q, es una sustancia soluble en grasa. La coenzima Q10 es un compuesto de transporte de electrones que es crítico para la cadena de transporte de electrones (ETC). El ETC impulsa la síntesis de ATP que es una fuente vital de energía para la célula. La vitamina E, también conocida como α -tocoferol, es un componente importante de las membranas (que incluyen las membranas mitocondriales) y funciona para eliminar los radicales libres de lípidos.

El ácido α -lipoico, también conocido como ácido tióctico es un compuesto organosulfurado derivado del ácido octanoico que es un cofactor esencial para las deshidrogenasas mitocondriales tales como la piruvato deshidrogenasa para la función apropiada del ciclo de Krebs que finalmente da como resultado la producción de ATP. El ácido α -lipoico también tiene efectos directos en el músculo

esquelético mediante la activación de AMPK, un sensor de energía en la célula que regula la biogénesis mitocondrial a través de PGC1 α .

Los polifenoles incluyen ácido fenólico y
5 flavonoides. Por ejemplo, los ácidos fenólicos incluyen ácido protocatecúico, ácido gálico, ácido hidroxibenzoico, ácido hidroxicinámico tal como ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido cumarico, ácido ferúlico, ácido sinapico, antocianinas tales como cianidina, pelargonidina, peonidina, delphinidina y
10 malvidina. Los flavonoides ejemplares incluyen flavonoles tales como quercetina, kaempferol, miricetina, flavonas tales como apigenina y luteolina, glavaononas tales como hesperidina, naringenina y eriodictileol, isoflavonas tales como daidzeína, genisteína y gliciteína, y flavonoles
15 monoméricos tales como catequina y epicatequina.

Administración y dosificación

La presente descripción proporciona materiales y métodos para el tratamiento de la distrofia muscular y el
20 desgaste muscular crónico utilizando al menos un antioxidante. Las composiciones ejemplares y los métodos para tratar la distrofia muscular comprenden administrar al menos un antioxidante, o administrar al menos dos antioxidantes o administrar al menos tres antioxidantes. Por ejemplo, la
25 invención proporciona composiciones antioxidantes que

comprenden ácido α -lipoico, coenzima Q10 y α -tocoferol (también conocido como vitamina E). En algunas modalidades, la composición antioxidante descrita aquí puede administrarse sola o en combinación con vectores de AAV que comprenden una
5 secuencia de nucleótidos que codifica la proteína ANO5 o un fragmento funcionalmente activo de la misma.

Los métodos de la presente descripción se realizan usando cualquier medio médicamente aceptado para administrar los agentes directa o indirectamente a un sujeto mamífero,
10 que incluye, pero no se limita a, inyecciones, ingestión oral, administración intranasal, tópica, transdérmica, parenteral, aerosol de inhalación, vaginal, o rectal. El término parenteral, tal como se usa aquí, incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares e intracisternas,
15 así como técnicas de catéter o infusión. También se contempla la administración por inyección intradérmica, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y/o implantación quirúrgica en un sitio particular.

En una modalidad, la administración se realiza en
20 el tejido afectado (por ejemplo, músculo) que necesita tratamiento mediante inyección directa en el sitio o mediante un mecanismo de suministro sostenido o de liberación sostenida, que puede suministrar la formulación internamente. Por ejemplo, pueden incluirse microesferas o cápsulas
25 biodegradables u otras configuraciones de polímeros

biodegradables capaces de suministrar sostenidamente una composición (por ejemplo, un polipéptido, anticuerpo o molécula pequeña soluble) en las formulaciones de la descripción implantada cerca o en el tejido afectado.

5 En algunas modalidades, la administración simultánea de antioxidantes y vectores de AAV que comprenden ANO5 no requiere que los agentes se administren al mismo tiempo o por la misma ruta, siempre que exista una superposición en el período de tiempo durante el cual los
10 agentes son ejerciendo su efecto terapéutico. Se contempla la administración simultánea o secuencial, así como la administración en días o semanas diferentes.

 En algunas modalidades, los antioxidantes y/o las composiciones de vectores de AAV también pueden suministrarse
15 al paciente en sitios múltiples. Las administraciones múltiples pueden administrarse simultáneamente o pueden administrarse durante un período de tiempo. En ciertos casos, es beneficioso proporcionar un flujo continuo de la composición terapéutica. Se puede administrar terapia
20 adicional por períodos, por ejemplo, cada hora, diariamente, cada dos días, dos veces a la semana, tres veces a la semana, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas, mensualmente o a intervalos más largos.

 Se contempla que los agentes de la presente
25 descripción pueden administrarse simultáneamente, en la misma

formulación. Se contempla además que los agentes se administren en una formulación separada y se administren simultáneamente, con referencia simultánea a agentes administrados en 30 minutos entre sí.

5 Por tanto, la invención proporciona métodos para administrar una dosis efectiva (o dosis, administradas esencialmente de forma simultánea o dosis administradas a intervalos) de VAAR que codifica, por ejemplo, ANO5 y/o antioxidantes para un paciente que lo necesite.

10 Las cantidades de composiciones antioxidantes en una dosificación dada pueden variar de acuerdo con el tamaño del individuo al que se administra la terapia, así como las características del trastorno que se está tratando. En tratamientos ejemplares, puede ser necesario administrar una
15 dieta antioxidante que comprende aproximadamente 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1.0% de ácido lipoico, aproximadamente 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1.0% de coenzima Q10 y aproximadamente 10,
100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000,
20 3000, 4000, 5000 UI de α -tocoferol o vitamina E. Estas concentraciones se pueden administrar como una forma de dosificación única o como dosis múltiples. Los estudios estándar de respuesta a la dosis, primero en modelos animales y luego en ensayos clínicos, revelan las dosis óptimas para
25 estados de enfermedad particulares y poblaciones de

pacientes.

También será evidente que la dosificación puede modificarse si se administran terapéuticos tradicionales en combinación con terapéuticos de la descripción.

5

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Aislamiento y generación de un modelo de ratón *Ano5*^{-/-}

10

Se generó un modelo knock-out de *Ano5* usando un vector dirigido a *Ano5* del exón 8 al exón 9 para producir un transcrito truncado como se muestra en la Figura 1A. El constructo de direccionamiento se diseñó como un constructo listo condicional "primero knock-out" para que se genere un alelo nulo a través del empalme a un elemento de atrapamiento *lacZ* como se describe en Tesla et al. (*Génesis* 38, 151-158 (2004). Este alelo mutante etiquetado con *lacZ Ano5*: el vector dirigido de *tmla* (KOMP)Wtsi se obtuvo del repositorio UC Davis KOMP (PG00097_Z_1_G0; Karnes. *Nature* 474, 337-342 (2011). Se insertó el casete de dirección después del exón 8 con los sitios flanqueantes FRT y loxP presentes para generar un alelo condicional si se observaba letalidad embrionaria.

Después del direccionamiento y transferencia de células madre embrionarias, los genotipos se verificaron

25

mediante PCR genómica (figura 1b). Los clones se clasificaron mediante RT-PCR utilizando los siguientes conjuntos de iniciadores que abarcaban los exones 1-6 (e1-6) o los exones 17-20 (e17-20), que producían un amplicón de 300 pb del locus *Ano5* endógeno y un amplicón de 200 pb del locus de inserción de casete *Ano5*, como se muestra en la figura 1c:

Genotipado F 5'-AGTCCTTTTCAGCACAGTCTTTG-3' (SEQ ID NO: 3)

Genotipado R 5'-TGAGGCAGTGTGGAGTGAGTA-3' (SEQ ID NO: 4)

DF38700 5'-GCCAATCATATGGTCTCAGT-3' (SEQ ID NO: 5)

10 LR-loxp R 5'-ACTGATGGCGAGCTCAGACC-3' (SEQ ID NO: 6)

Posteriormente, se inyectaron células ES dirigidas con éxito en blastocistos de ratones C57BL/6 y se transfirieron embriones para generar quimeras para la transmisión de la línea germinal. Los heterocigotos transgénicos se verificaron mediante genotipificación y se retrocruzaron cuatro veces hasta C57BL/6 de tipo salvaje, antes de cruzar a la tendencia homocigótica. Las muestras de *Ano5*^{-/-} y C57BL/6mice se criaron y mantuvieron como animales homocigotos en condiciones estandarizadas en el Vivarium en el RINCH. Se mantuvieron en la dieta de Roedor global Tekland (3.8% de fibra, 18.8% de proteína, 5% de grasa de comida) con un 12:12 h de oscuridad: ciclo de luz.

Se realizó una PCR cuantitativa y se analizó en un sistema de PCR rápida en tiempo real (Thermo Fisher Scientific). Las reacciones se realizaron con cocteles de

sonda de iniciador FAM de Applied Biosystems para *Ano5* (Mm00624629_m1, Mm01335981_m1), *Ano6* (Mm00614693_m1) y *Gapdh* (Mm99999915_g1), por triplicado para cada muestra. El método $\Delta\Delta C_t$ se usó para calcular las reducciones de cambio de pliegue normalizadas del ARNm de *Ano5* y *Ano6* en músculos *Ano5*^{-/-} en comparación con el tipo salvaje. El ARN total se aisló a partir de virutas de músculo fresco congelado usando Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. A continuación, el ARN se purificó en columna usando el método RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) y se cuantificó por espectrofotometría usando un NanoDropLite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). El ADNc se generó con el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Thermo Fisher Scientific), usando cantidades equivalentes de ARN de muestra por reacción (200–500 ng). Para la PCR semi-cuantitativa, volúmenes iguales de ADNc se sometieron a 30 ciclos de PCR, seguido de electroforesis en gel de agarosa. Los iniciadores usados fueron:

	m β Act-rt-5'	CCTGGCCGTCAGGCAGAT (SEQ ID NO: 7)
20	m β Act-rt-3'	GACATGGAGAAGATCTGGCACC (SEQ ID NO: 8)
	mAno5-rt-F1	CCAACAGAATGAGAACCT (SEQ ID NO: 9)
	mAno5-rt-R1	GACAGGGGTGGGTACTTTGG (SEQ ID NO: 10)
	mAno5-rt-F3	CGTTGGCAGCAAGATCAT (SEQ ID NO: 11)
	mAno5-rt-R3	GGGTACCTATAATCTCTGTACCTGC (SEQ ID NO: 12)

25 La RT-PCR cuantitativa demostró una reducción del

80% en el transcrito de pre-casete y una reducción del >99% del transcrito de ANO5 posterior al casete en todos los músculos ensayados (**figura 1d**). No se observó letalidad embrionaria o dificultad para la reproducción. Como *Ano5* comparte una homología de secuencia significativa con *Ano6*, y se sabe que *Ano6* se expresa en el músculo esquelético en algunas condiciones, se realizó RT-PCR para medir la expresión relativa de ADNc de ANO6 de los músculos de ratón *Ano5*^{-/-}. RT-PCR cuantitativa demuestra una elevación modesta, pero estadísticamente insignificante de la transcripción de *Ano6* en músculos deficientes *Ano5*.

Ejemplo 2

Evaluación clínica e histopatológica del ratón *Ano5*^{-/-}

El ratón *Ano5*^{-/-} exhibió muchas características de la miopatía ANO5 humana, que incluyen niveles aumentados de creatina quinasa en suero, debilidad variable entre músculos, diámetro de fibra muscular alterado e intolerancia al ejercicio. La creatina quinasa en suero se eleva aproximadamente 2 veces en ratones *Ano5*^{-/-} (**Figura 2a**).

Las mediciones de la fuerza tetánica se obtuvieron a partir de extensor digitorum longus (EDL) de ratones de 10 meses de edad (n=6 ratones por cepa), tibial anterior (TA) de ratones de 4 meses de edad (n=5 ratones por cepa), y músculos

de diafragma de 10 meses de edad, ratones *Ano5^{-/-}* y WT (n=4 ratones por cepa). Las EDL se disecaron en los tendones y se sometieron a un protocolo de fisiología para evaluar la función como se describió previamente por Rodino-Klapac et al. (J. Transl. Med.5: 45, 2007) y Liu et al. (Mol. Ther. 11: 245-256, 2005) con modificaciones. Durante el protocolo de contracción excéntrica, se realizó un procedimiento de estiramiento-re-alargamiento del 5% ejecutado entre 500 y 700 ms (estiramiento del 5% durante 100 ms, seguido del retorno a la longitud óptima en 100 ms). Después del protocolo de contracción tetánica y excéntrica, los ratones se sacrificaron y el músculo se separó, se pesó en húmedo, se montó en un portabrocas utilizando goma tragacanto y luego se congeló en metil-butano enfriado en nitrógeno líquido. Las mediciones de fuerza en TA se realizaron como describen Hakim et al. (J. Appl. Physiol. 110: 1656-1663, 2011) y Wein et al. (Nat. Med. 20:992-1000, 2014).

Para las mediciones de la fuerza del diafragma, los ratones se sacrificaron y el diafragma se diseccionó con las inserciones de costillas y el tendón central intactos, y se colocaron en regulador de pH de Krebs-Henselet (K-H) como se describió previamente por Beastrom et al. (Am. J. Pathol. 179: 2464-2474, 2011), Rafeal-Fortney et al. Circ. 124: 582-588, 2011) y Grose et al. (Ann. Clin. Trans. Neurol. 1: 34-44, 2014). Se aisló una sección de diafragma de 2-4 mm de

ancho. Las tiras de diafragma se ataron firmemente con seda quirúrgica trenzada (6/0; Surgical Specialties, Reading, PA) en el tendón central, y se suturaron a través de una porción de costilla fijada al extremo distal de la tira. Cada músculo se transfirió a un baño de agua lleno de solución de K-H oxigenada que se mantuvo a 37°C. Los músculos se alinearon horizontalmente y se unieron directamente entre un pasador fijo y un transductor-servomotor de fuerza de modo dual (305C; Aurora Scientific, Aurora, Ontario, Canadá). Dos electrodos de placa de platino se colocaron en el baño de órganos para flanquear la longitud del músculo. El músculo se estiró hasta una tensión óptima de 1 g, y luego se dejó reposar durante 10 minutos antes del inicio del protocolo tetánico. Una vez que el músculo se estabilizó, el músculo se sometió a un calentamiento que consiste de tres tirones de 1 Hz cada 30 segundos seguidos de tres tirones de 150 Hz por minuto. Después de un período de descanso de 3 minutos, el diafragma se estimuló a 20, 50, 80, 120, 150, 180 Hz, permitiendo un período de descanso de 2 minutos entre cada estímulo, cada uno con una duración de 250 ms para determinar la fuerza tetánica máxima. Se midió la longitud y el peso muscular. La fuerza se normalizó para el peso y la longitud del músculo ($CSA: \text{masa muscular (mg)} / \{L_f \text{ (mm)} \times \text{densidad muscular (1.06mg/mm}^3)\}$). La significancia estadística se evaluó usando una prueba T de Student no emparejada para

fuerza específica y ANOVA de 2 vías con medidas repetidas para la resistencia al protocolo de contracción excéntrica.

La fuerza específica de la contracción muscular disminuyó significativamente ~15% en el diafragma **(figura 2b)**, pero esencialmente no se vio afectada en los músculos extensor largo de los dedos (EDL) y tibial anterior (TA) **(figura 2c)** de ratones *Ano5^{-/-}*. Esta variabilidad entre los músculos es característica de las miopatías *ANO5* y también se observó en el análisis histológico de diferentes músculos. En relación con el tipo silvestre (WT), el diámetro medio de la fibra muscular fue significativamente menor en el músculo gastrocnemio (GAS) de ratones *Ano5^{-/-}* (*Ano5^{-/-}* $35.8 \pm 8.3 \mu\text{m}$, WT: $41.8 \pm 11.0 \mu\text{m}$, $P < 0.001$), y en menor medida en el músculo TA (*Ano5^{-/-}* $38.1 \pm 11.8 \mu\text{m}$, WT: $44.3 \pm 12.2 \mu\text{m}$, $P < 0.001$) **(Figura 2d, e)**. Los músculos *Ano5^{-/-}* exhibieron una histopatología leve que incluye núcleos centrales y fibras necróticas ocasionales **(Figura 2d, e)**.

Para evaluar la tolerancia al ejercicio, los ratones *Ano5^{-/-}* y WT de 7.5 meses de edad coincidentes fueron sometidos a regímenes de ejercicio semanalmente durante 1 hora durante 2 meses. Cada ratón se ejecutó una vez a la semana a una disminución de -10° con una velocidad de 15 m/min y se incrementó en 1 m cada minuto hasta que se alcanzó el agotamiento ($n = 3$ ratones por cepa). Cada prueba individual se detuvo cuando el ratón permaneció en la placa

de choque (Columbus Instruments) con un estímulo eléctrico ajustado a 20V durante más de 10 segundos sin intentar realizar ejercicio. Los descansos se definieron como los momentos en los que los ratones dejaban de funcionar y
5 descansaban mientras el cinturón de la caminadora regresaba a la placa de choque. Mientras que los ratones de control WT corrían a una velocidad constante sin interrupciones, los ratones *Ano5^{-/-}* eran propensos a pausas frecuentes en la cinta (14 pausas/min) donde dejaron de correr hasta que la banda de
10 correr regresó a la placa de choque (**Figura 2f**).

Se realizó electrofisiología en 6-8 meses de *Ano5^{-/-}* y músculos de control usando métodos similares a los descritos en Arnold et al. (*Ann. Clin. Trans. Neurol.* 1: 34-44, 2014). Los ratones se anestesiaron utilizando isoflurano
15 inhalado y se colocaron en posición prona con las extremidades posteriores extendidas a 45° de distancia del cuerpo del animal. Las amplitudes del potencial de acción del músculo compuesto (CMAP) se midieron a partir de músculos bilaterales del tríceps sural después de la estimulación
20 supramáxima del nervio ciático en ratones mutantes (n = 6 animales, 12 extremidades posteriores) y control (n = 7 animales, 14 extremidades posteriores). La electromiografía con aguja se realizó en el músculo GAS derecho para evaluar la presencia o ausencia de potenciales de fibrilación. Se
25 realizaron medidas de impedancia localizada, o miografía de

impedancia eléctrica (EIM) en músculos GAS bilaterales a frecuencias de 1000 Hz-10 MHz usando un sistema Skulpt Inc EIM1103 (San Francisco, CA) utilizando métodos similares a los reportados previamente en modelos de ratón con esclerosis lateral amiotrófica y distrofia muscular (Li et al. *PLoS One* 8:e65976, 2013; Li et al. *Muscle & Nerve* 49: 829-835, 2014). Se utilizó un arreglo de electrodos fijo con cuatro electrodos de aguja de electromiografía aislados de calibre 26 (Natus, Middleton, WI) espaciados a 1 mm de distancia en lugar de los electrodos de superficie. El arreglo de electrodos se insertó en el vientre de los músculos gastrocnemios bilaterales en una configuración longitudinal con respecto a la dirección de la fibra muscular, y se obtuvieron dos ensayos de medidas de impedancia en cada músculo y se promediaron para un único valor en cada extremidad (n = 6 animales, 12 extremidades posteriores para cada grupo). Utilizando la convención de estudios EIM publicados previamente y por simplicidad, la reactancia, la resistencia y la fase se analizaron en dos frecuencias actuales, 50 kHz y 100 kHz. Las amplitudes CMAP y las características de impedancia se compararon usando una prueba t de dos colas. La electromiografía de aguja, los registros del potencial de acción muscular compuesto evocado y la miografía de impedancia eléctrica se realizaron en las patas traseras de los ratones *Ano5^{-/-}* y WT, pero no mostraron

cambios significativos, similares a la enfermedad humana (Figura 3).

Otra característica de la miopatía ANO5 humana es la presencia de un número excesivo de fibras musculares con depósitos intramusculares. Los diámetros de fibra transversales musculares se determinaron a partir de los músculos TA y gastrocnemio (GAS) de los ratones control de la cepa *Ano5^{-/-}* y WT de 6 meses ($n = 3$ ratones por cepa). Los músculos se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E). Se tomaron 4 imágenes aleatorias de 20x por sección por animal con una cámara Zeiss AxioCam MRC5. Los diámetros de fibra se determinaron midiendo la distancia más corta a través de la fibra muscular usando el software Zeiss Axiovision LE4. Los histogramas de diámetro de fibra se generaron a partir de un promedio de 500-600 fibras por TA y 600-700 fibras por GAS. Se usó una prueba t no aparejada para probar diferencias significativas entre los tamaños de fibra *Ano5^{-/-}* y WT (**** $p < 0.0001$).

Se cuantificaron los agregados dentro de los músculos. Las secciones musculares de los músculos TA y GAS de los ratones *Ano5^{-/-}* y WT de 10 meses de edad ($n = 3$ ratones por tejido y cepa) se tiñeron con Tricromo de Gomori. Se tomaron cuatro imágenes de 20X y se contó el número de fibras con uno o más agregados utilizando el software Image J y se expresó como un porcentaje del número total de fibras. Usando

GraphPad Prism, se utilizó un ANOVA de una vía para evaluar la significancia entre las fibras *Ano5^{-/-}* y WT (****p <0.0001).

Además, se realizó tinción con succinato
5 deshidrogenasa (*SDH*) sobre los agregados y el músculo: los músculos Tibialis anterior (TA) y cuádriceps se seccionaron a 18 μ m y se tiñeron con solución SDH que consistía en 0.2% de azul nitro tetrazolio (NBT) disuelto en ácido succínico 0.1 M y regulador de pH de fosfato 0.1 M pH 7.4 y se incubaron a
10 37°C durante 3 horas. Después de la incubación, los portaobjetos se enjuagaron con agua y se deshidrataron en alcoholes en serie, luego se aclararon con xileno. Se tomaron imágenes de las diapositivas en la cámara Zeiss AxioCam MRC5.

Se retiraron segmentos de músculo TA de ratones
15 *Ano5^{-/-}* y de control de 4 y 10 meses de edad, se estiraron a su longitud *in situ* a través de un depresor lingual de madera y se sumergieron en glutaraldehído al 3% en regulador de pH de fosfato 0.1 M pH 7.0 durante 4 horas. El músculo se diseccionó en bloques de tejido de 2 mm de longitud, se
20 almacenó en regulador de pH de fosfato 0.1 M a pH 7.4 durante la noche, seguido de fijación posterior en tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas y deshidratación en soluciones graduales de etanol antes de la incrustación plástica. Se tiñeron secciones transversales de 1 μ m de espesor con azul
25 de toluidina, se examinaron mediante microscopía óptica y se

examinaron secciones de tejido de bloques seleccionados bajo un microscopio electrónico Hitachi H-7650 TEM utilizando una cámara y software Advanced Microscopy Techniques.

En el músculo de ratón *Ano5^{-/-}* del ratón, estas
5 estructuras aparecen como áreas bien definidas, de contorno irregular que se tiñen de rojo con una tinción tricrómica modificada como descrita en Pavlocicova *et al.* (*Gen. Physiol. Biophysics* 22: 425-440, 2003). Los agregados citoplasmáticos fueron aparentes a partir de los 9 meses de edad y aumentaron
10 con el tiempo (**Figura 4a**). Debido a que se han observado agregados de apariencia similar en ratones de edad normal, se cuantificó la ocurrencia de agregados. Aproximadamente el 25% de las fibras de *Ano5^{-/-}* mostraron áreas rojas con contornos irregulares con la tinción de tricromo, mientras que <0.02%
15 de las fibras de control tienen estos agregados (**Figura 4b**). La microscopía electrónica (EM) reveló que estos agregados estaban compuestos de material membranoso. Muchas fibras musculares de *Ano5^{-/-}* exhibieron acumulaciones densamente empaquetadas de membranas vesiculares o tubulares o
20 formaciones tubulares de interconexión desordenadas y poco ordenadas con túbulos internos difusos que correspondían a los agregados observados en microscopía óptica (**figura 4c, d**). Los ratones *ANO5^{-/-}* mostraron hallazgos de patología similares a los de los pacientes diagnosticados con *ANO5*. La
25 microscopía electrónica del músculo del paciente con

compuesto heterocigoto para dos mutaciones [c.155A > G (p.Asn52Ser)] + [c.191dupA (p.Asn64Lysfs*15)] en la región codificante del gen ANO5 reveló numerosos agregados y múltiples sitios mostrando áreas de degeneración

5 mitocondrial. Los agregados en el músculo *Ano5^{-/-}* tiñeron positivo para SERCA1 pero no para la actividad de succinato deshidrogenasa (SDH), lo que sugiere que se derivan del retículo sarcoplásmico y no de la mitocondria **(Figura 4g)**. Sin embargo, los ratones *Ano5^{-/-}* exhibieron mitocondrias

10 degenerativas y acumulación mitocondrial subescolalémica además de estos agregados de membrana **(Figura 4e)**. La acumulación sub-sarcolemal de mitocondrias se confirmó mediante tinción de secciones congeladas para SDH, que se localizó en parches densos cerca de la superficie de las

15 fibras musculares **(Figura 4f)**. Para identificar si la degeneración mitocondrial observada tenía importancia funcional, se cuantificó la actividad citrato sintasa como una medida de mitocondrias intactas y se demostró que hubo una disminución significativa en los extractos musculares de

20 *Ano5^{-/-}* en comparación con los controles WT.

EJEMPLO 3**Ano5 facilita la reparación de la membrana**

En individuos sanos, el ejercicio normal da como
5 resultado pequeñas lesiones en la membrana plasmática que se
cicatrizan mediante dos procesos: (i) se vuelven a cerrar las
lágrimas mediante el montaje de una nueva membrana plasmática
y (ii) se reparan sitios de interrupción más severa por
células satélite que se diferencian en células similares a
10 mioblastos y se fusionan para regenerar fibras musculares
multinucleadas. Para probar el efecto de la pérdida de la
expresión de ANO5 en la reparación de la membrana, se examinó
el efecto del daño de la membrana producido por un pulso de
láser intenso administrado a fibras musculares del flexor
15 corto de los dedos (FDB). Se colocaron criosecciones de 12 µm
en portaobjetos de microscopio Fisher Superfrost y se
bloquearon con suero de cabra al 10% y Tween-20 al 0.1% en
PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los portaobjetos
se incubaron en anticuerpo primario durante 1 hora a
20 temperatura ambiente (Anti-FLAG F7425 Sigma-Aldrich, 1:175),
Sercal CaF2-5D2 (Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:50).
Los portaobjetos se enjuagaron luego 3 veces con PBS durante
1 hora a temperatura ambiente, seguido de un bloque de 30
minutos. Anticuerpos secundarios de Cabra-anti-ratón
25 conjugado a Alexa Fluor 594 (A21125, Life Technologies) o

cabra-anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 568 (A11011, Life Technologies) se diluyeron a 1:250 en solución de bloqueo y se incubaron durante 45 min seguido por 3 enjuagues PBS durante 1 hora. Las secciones se montaron con medios de montaje Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA) y se analizaron con un microscopio Zeiss Axioskop 2 utilizando un filtro Cy5 (excitación, 578 nm-590 nm, emisión 603 nm-671 nm) (Zeiss, Thornwood, NY). El tiempo de exposición de la imagen se estandarizó usando el control positivo para cada anticuerpo, cada día. Las imágenes se tomaron usando el software Axiovision 4.5.

El daño a la membrana se evaluó mediante la acumulación de FM1-43, un colorante catiónico de estirilo impermeante a la membrana que no es fluorescente en solución acuosa pero presenta fluorescencia intensa en un entorno lipídico y se ha usado ampliamente para estudiar la reparación de la membrana. Se detectó un área pequeña de fluorescencia en el sitio del daño en las fibras WT y *Ano5*^{-/-} inmediatamente después de la lesión con láser (**Figura 5a**). El aumento en la fluorescencia fue mayor y se produjo a una velocidad inicial ~2 veces más rápida en fibras musculares de *Ano5*^{-/-} que en las fibras WT. Mientras que la fluorescencia parecía estar nivelando a 190 segundos en WT, la fluorescencia continuó aumentando en fibras *Ano5*^{-/-} durante la duración del experimento (**Figura 5b**).

Para probar si el defecto en la reparación de la membrana estaba directamente relacionado con la expresión de ANO5, el ADNc de ANO5 humano se expresó usando virus adenoasociado (AAV) en los músculos *Ano5^{-/-}* (Figura 4b, c). El

5 ADNc de ANO5 humano (SEQ ID NO: 1) se clonó en un plásmido de ATR2 ITR usando sitios de restricción NotI entre el promotor MHCK7 y la señal de poliadenilación. Los vectores de VAAr se produjeron mediante un enfoque de empaquetamiento cruzado modificado mediante el cual los ITR de tipo 2 de AAV se

10 pueden empaquetar en múltiples serotipos de cápsida de AAV como se describe en Rabinowitz et al. (*J. Virol.* 76: 791-801, 200). La producción se llevó a cabo usando un método estándar de precipitación de CaPO_4 de ADN de 3 plásmidos usando células HEK293. Las células HEK293 se mantuvieron en DMEM

15 suplementado con suero de ternera cósmica al 10% (CCS, Hyclone). Los plásmidos de producción fueron: (i) pAAV.MHCK7.ANO5, (ii) plásmidos auxiliares AAV rep2-cap8 modificados que codifican el serotipo cap 8 tipo aislado rh.74, y (iii) un plásmido auxiliar de adenovirus tipo 5

20 (pAdhelper) que expresa adenovirus Genes de ARN E2A, E4 ORF6 y VA I/II. Los vectores se purificaron a partir de lisados de células HEK293 clarificados mediante purificación en gradiente de iodixanol secuencial y cromatografía en columna de intercambio aniónico usando un gradiente de sal de NaCl

25 lineal como se describió previamente en Clark et al. (*Human*

Gene Ther. 10: 1031-10398, 1999). Se usó un método de titulación basado en PCR cuantitativa para determinar un título de genoma de vector encapsidado (vg) que utiliza un sistema detector Taqman Prism 7500 (PE Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

El suministro del vector de AAV a través de inyección intramuscular al músculo de ratón. Se trataron ratones *Ano5^{-/-}* de cuatro y cinco semanas de edad mediante inyección intramuscular de 1×10^{11} vg de rAAVrh.74.MHCK7.huANO5.FLAG en músculos TA (n = 4) o FDB (n = 4). Los músculos TA se recogieron 4 semanas después de la inyección y se procesaron para el examen histológico e inmunofluorescente.

Se recogieron fibras musculares de flexor corto de dedos (FDB) 10 semanas después del tratamiento y se sometieron a una lesión inducida por láser. Se realizó un ensayo de reparación de membrana en los músculos FDB izquierdo y derecho de *Ano5^{-/-}* (n = 4) y ratones C57BL6 de la misma edad (n = 4) según lo descrito por Sondergaard et al. (Ann. Clin. Trans. Neurol. 2:256-270, 2015). Brevemente, las fibras de FDB se aislaron usando una solución que contenía 2% p/v de collagenasa tipo I suspendida en DMEM. Después de la disociación del músculo, las fibras se colocaron en una placa de fondo de vidrio que contenía 2.5 μ M de colorante FM1-43 en PBS de Dulbecco (sin Ca/Mg) suplementado con Ca²⁺ 1.5 mM. Las

fibras se sometieron a una lesión por láser con un microscopio de escaneo láser confocal FluoView® FV1000 de dos fotones (Olympus). Las fibras se dañaron con una mancha guiada por láser de 850 nm de 4.479 mm con una potencia del 20% y se obtuvieron imágenes cada 5 segundos durante 190 s para visualizar la captación de tinta de FM1-43. Se obtuvo una imagen de 7-10 fibras por músculo por ratón (total 31 WT, 39 *Ano5^{-/-}* y 30 AAV-ANO5 rescataron las fibras *Ano5^{-/-}*). La intensidad de fluorescencia de la infiltración del colorante que rodea el sitio de daño en la membrana se analizó con el software Image J midiendo la densidad integrada de la intensidad del píxel dentro del área definida. Para hacerlo, con un ajuste de zoom 2X en ImageJ, se dibuja un cuadro rectangular que mide 0.75 píxeles por 1.00 píxeles y se usa para medir la intensidad de tinta en esa región. En el análisis, la intensidad de fluorescencia medida en un punto de tiempo individual se normalizó a la intensidad inicial medida en t=-5s (pre-lesión). Cuando se analizó la intensidad de fluorescencia, se promediaron los valores de todas las fibras de cada cepa. Se realizó un ANOVA de 2 vías para determinar la significación estadística entre las fibras tratadas y las no tratadas en cada punto de tiempo ($p < 0.001$). Para cuantificar el cambio en la fluorescencia, los puntos de datos se ajustaron a la ecuación de Hill utilizando Origin Pro 9.1. Todas las curvas se ajustaron con R2 ajustado

> 0.998. Las fibras *Ano5^{-/-}*, las fibras WT y las fibras *Ano5^{-/-}* tratadas con AAV.ANO5 fueron significativamente diferentes a partir de los 100 segundos posteriores a la lesión. AAV.ANO5 restaura parcialmente la membrana en musculo *Ano5^{-/-}* (**Figura 5a, b, c**).

EJEMPLO 4

Regeneración deteriorada en ratones Ao5 KO

La investigación de si la regeneración muscular también era defectuosa en ratones *Ano5^{-/-}* se llevó a cabo examinando la capacidad del músculo para recuperarse de la lesión producida por la inyección de cardiotoxina (**Figura 5d**). Los ratones se anestesiaron con isoflurano inhalado y se les inyectó cardiotoxina (diluida a 10 μ M con solución salina estéril) cada dos semanas, para un total de 3 rondas. Se inyectaron 30 μ L y 50 μ L de cardiotoxina en el TA izquierdo y dejaron los músculos del GAS, respectivamente, de los controles *Ano5^{-/-}* y de edad madura de 8 semanas de edad. Se inyectó solución salina estéril en el músculo contralateral como control simulado. Se sacrificaron grupos de ratones y se recogieron sus músculos a los 1, 3, 7 y 14, 30 y 90 días después de la inyección final de cardiotoxina (n = 3 ratones por cepa por punto de tiempo). Se tomaron imágenes de cuatro imágenes 20X por TA y se midió el diámetro de la fibra en las

criosecciones teñidas con H&E 1 y 3 meses después de la inyección final de cardiotoxina usando Axio Vision 4.8. Se midió un promedio de 500-600 fibras musculares y se realizó una prueba t no apareada (GraphPad Prism) para determinar la significancia estadística entre el tamaño de la fibra muscular de ratones *Ano5^{-/-}* lesionados y ratones de control lesionados (****p<0.0001).

Para rastrear cambios temporales de necrosis y regeneración, los músculos TA y GAS de ratones de 8 semanas de edad se inyectaron con cardiotoxina 3 veces espaciadas con 2 semanas de diferencia. Los tejidos se recogieron 1, 3, 7, 14, 30 y 90 días después de la inyección final (**Figura 5d**). El lado contralateral se usó como control solo de solución salina. El músculo WT se regeneró después del tratamiento con cardiotoxina, de modo que en un mes el músculo parecía en gran parte normal, con la excepción de los núcleos centrales en las fibras recién regeneradas. Sin embargo, en ratones *Ano5^{-/-}*, hubo un extenso retraso en la regeneración y necrosis de larga data. Después de 3 meses, el diámetro medio de la fibra del músculo *Ano5^{-/-}* permaneció significativamente reducido en comparación con el WT y muchas fibras exhibieron núcleos centrales (**Figura 5d, e**).

EJEMPLO 5**Evaluar el efecto de la terapia antioxidante**

Para examinar los beneficios potenciales de una
5 dieta triple antioxidante en el músculo esquelético de
ratones deficientes en Anoctamina 5 (*Ano5^{-/-}*), se alimentaron
cohortes de ratones BL6 de tipo silvestre (WT) de 2 meses de
edad y ratones *Ano5^{-/-}* se alimentaron con alimento para
ratones normal o una dieta suplementada con una composición
10 de triple antioxidante que comprende 1000 IU de vitamina E,
0.1% de ácido α -lipoico y 0.25% de coenzima Q10 (en forma de
ubiquinol reducido). Los ratones se agotaron durante 3 días
consecutivos cada 4 semanas durante un período de 16 semanas
y se sacrificaron para examinar las medidas de resultado
15 funcionales asociadas con la salud muscular (actividad y
fuerza del diafragma) y el estrés oxidativo (actividad
citrato sintasa y expresión de *pgc1 α*).

**Monitoreo láser de la actividad de la jaula de
20 campo abierto**

Se usó una cámara de actividad de campo abierto
para determinar la actividad global de ratones experimentales
siguiendo un protocolo previamente descrito (Kobayashi et
al., *Nature* 456: 511-5 (2008); Beastron et al., *Am J Pathol*
25 179: 2464-74 (2011)) con varias modificaciones. Todos los

ratones fueron evaluados a la misma hora del día temprano en la mañana cerca del final del ciclo nocturno cuando los ratones están más activos. Todos los ratones fueron probados en una habitación aislada, con poca luz y con el mismo controlador cada vez. Además, como se hizo en los informes anteriores para reducir la ansiedad y mantener al mínimo las variables de comportamiento, lo que podría afectar la actividad normal de los ratones y, en consecuencia, los resultados del ensayo, probamos ratones que no estaban alojados individualmente (Voikar *et al.*, *Genes Brain Behav* 4: 240-52(2005)). Se monitoreó la actividad de los ratones usando el sistema de actividad Photobeam (San Diego Instruments, San Diego, CA). Este sistema usa una rejilla de haces de luz infrarroja invisibles que atraviesan el frente de la cámara animal hacia atrás y de izquierda a derecha para monitorear la posición y el movimiento del mouse dentro de un plano X-Y-Z. La actividad se registró durante ciclos de 1 hora a intervalos de 5 minutos. Los ratones se aclimataron a la sala de pruebas de actividad durante una sesión inicial de 1 hora varios días antes de comenzar la adquisición de datos. Los ratones se probaron en cámaras individuales en grupos de 4. El equipo de prueba se limpió entre cada uso para reducir las variables de comportamiento reaccionario del ratón que podrían alterar nuestros resultados. Los datos recopilados se convirtieron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel y

todos los cálculos se realizaron dentro del programa Excel. Las rupturas individuales del haz para el movimiento en los planos X e Y se suman para cada ratón para representar la deambulación total, y los cortes del haz en el plano Z se suman para obtener actividad vertical dentro del intervalo de tiempo de 1 hora.

Al final de las semanas 12 y 16, se colocaron dos ratones de cada grupo en una jaula de actividad para monitorear la actividad voluntaria. La actividad total del ratón se midió como la cantidad de veces que los ratones rompieron haces de láser horizontal y/o vertical en un período de 45 minutos después del agotamiento en la cinta **(Figura 6)**. Se encontró que los ratones *Ano5^{-/-}* que recibían la dieta antioxidante eran más activos que aquellos con una dieta estándar (placebo) a las 16 semanas, lo que sugiere que los antioxidantes tuvieron un efecto positivo sobre la actividad voluntaria después del agotamiento.

Contracción tetánica del diafragma para evaluación funcional

Mientras que los ensayos conductuales fueron sugestivos de algún efecto del tratamiento, estas medidas de resultado están sujetas a varias variables independientes de la dieta. Para examinar el impacto de la suplementación con antioxidantes en la función del músculo esquelético, se

realizaron mediciones de fuerza en el diafragma de los ratones *Ano5^{-/-}* y WT (**Figura 7**). El diafragma se eligió porque se había demostrado previamente que los ratones *Ano5^{-/-}* tenían un déficit en la fuerza del diafragma, pero no en los músculos de las extremidades (Griffin et al., *Hum Mol Genet* 25: 1900-1911 (2016)).

Los ratones se sacrificaron y el diafragma se diseccionó con las inserciones de costillas y el tendón central intactos, y se colocaron en regulador de pH K-H como se describió previamente (Beastrom et al., *Am J Pathol* 179: 2464-74 (2011); Rafael-Fortney et al., *Circulation* 124: 582-8 (2011); Moorwood et al., *Journal of Visualized Experiments* 71: e50036 (2013)). Se aisló una sección de diafragma de 2-4 mm de ancho. Las tiras de diafragma se ataron firmemente con seda quirúrgica trenzada (6/0; Surgical Specialties, Reading, PA) en el tendón central, y se suturaron a través de una porción de costilla fijada al extremo distal de la tira. Cada músculo se transfirió a un baño de agua lleno de solución de K-H oxigenada que se mantuvo a 37°C. Los músculos se alinearon horizontalmente y se unieron directamente entre un pasador fijo y un servomotor transductor de fuerza de modo dual (305C; Aurora Scientific, Aurora, Ontario, Canadá). Dos electrodos de placa de platino se colocaron en el baño de órganos para flanquear la longitud del músculo. El músculo se estiró a una longitud óptima para la medición de las

contracciones de contracción y luego se dejó reposar durante 10 minutos antes del inicio del protocolo tetánico. Una vez que el músculo se estabilizó, el músculo se ajustó a una longitud óptima de l_g y se sometió a un calentamiento que consta de tres tirones de 1Hz cada 30 segundos seguidos de tres tirones de 150Hz por minuto. Después de un período de descanso de 3 minutos, el diafragma se estimuló a 20, 50, 80, 120, 150, 180Hz, permitiendo un período de descanso de 2 minutos entre cada estímulo, cada uno con una duración de 250 ms para determinar la fuerza tetánica máxima. Se midió la longitud y el peso muscular. La fuerza se normalizó para el peso y la longitud del músculo. Se observó una mejora significativa en la fuerza específica del diafragma en ratones *ano5^{-/-}* tratados con triple antioxidante en comparación con ratones *ano5^{-/-}* tratados con placebo (**Figura 7**).

Biogénesis mitocondrial

Habiendo establecido una conexión con la terapia de triple antioxidante y el contenido de fibra oxidativa, se analizó la biogénesis y la función mitocondrial. Estudios previos han demostrado que el ejercicio estimula las vías que conducen a la biogénesis mitocondrial, mientras que la terapia con antioxidantes disminuye esta señalización. Los resultados en el tejido muscular gastrocnemio masculino

confirmaron que el tratamiento antioxidante redujo la expresión del regulador clave de la biogénesis mitocondrial PGC-1 α (**Figura 8a**). Curiosamente, se encontró que la actividad citrato sintasa era mayor en ratones alimentados con antioxidantes entre todas las combinaciones genotipo-género (**Figura 8b**). Una explicación simple para esto es que la mayor proporción de fibras oxidativas, que son altas en contenido mitocondrial, enmascara cualquier disminución en la biogénesis mitocondrial por fibra.

En resumen, se encontró que la terapia de triple antioxidante tiene un impacto significativo en algunas medidas de la fisiología y función muscular, que incluyen actividad voluntaria, fuerza del diafragma, tamaño de fibra, composición del tipo de fibra y actividad de la enzima mitocondrial. Se encontró que estos resultados son, en ciertos casos, específicos de género. LGMD2L es específico de género con los hombres más severamente afectados.