

ELEMENTOS Y MÉTODOS DE REGULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS ESPECÍFICOS DE MÚSCULO Y USO DE LOS MISMOS

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a elementos reguladores de ácidos nucleicos que son capaces de potenciar la expresión de genes específicos de músculos, métodos que emplean estos elementos reguladores y su uso. Más particularmente, los elementos reguladores de ácidos nucleicos pueden potenciar la expresión genética en el músculo liso, el músculo esquelético, de corazón y el diafragma, preferentemente el músculo del diafragma, esquelético y de corazón. La invención abarca casetes de expresión, vectores y composiciones farmacéuticas que comprenden estos elementos reguladores. La presente invención es particularmente útil para aplicaciones que usan terapia génica, terapia génica dirigida al músculo y propósitos de vacunación.

Antecedentes de la Invención

Hay muchos trastornos hereditarios que se deben a un defecto genético que afecta la función del músculo liso, el músculo esquelético, el corazón y/o el diafragma (por ejemplo, enfermedad de Pompe, distrofias musculares, etc.). Este defecto genético puede resultar en última instancia en debilidad muscular severa y parálisis o insuficiencia cardiopulmonar con consecuencias potencialmente mortales. Por ejemplo, la Distrofia Muscular de la Cintura Escapular tipo 2E (LGMD2E) es uno de los trastornos LGMD más graves con una incidencia mundial de 1 en 200 000 a 350 000. Es un tipo de distrofia muscular hereditaria autosómica recesiva causada por la mutación del gen β -sarcoglicano (β -sg o β sg), lo que resulta en el agotamiento de la proteína funcional β -sarcoglicano. En consecuencia, los pacientes LGMD2E presentan atrofia muscular progresiva grave y generalizada, debilidad de la cintura pélvica y escapular, fibrosis muscular y reducción de la fuerza, miocardiopatía, enfermedades articulares y disfunción del diafragma. Los pacientes a menudo mueren por insuficiencia cardiopulmonar, ya que las modalidades clínicas estándar no proporcionan una cura para la enfermedad. Por lo tanto, desarrollar una terapia clínica eficaz para LGMD2E representa una necesidad médica urgente no cubierta.

La terapia génica brinda una oportunidad sin precedentes para tratar simultáneamente la disfunción y la degeneración del músculo liso, el músculo esquelético, el corazón y el diafragma, gracias a su capacidad para entregar genes terapéuticos a los tejidos afectados para obtener una respuesta terapéutica duradera. A pesar de su promesa, el inconveniente es que se requiere una dosis de vector de virus relativamente alta para lograr un efecto terapéutico deseable, lo que impide la posible

traducción clínica. Más particularmente, la terapia génica para el músculo liso, el músculo esquelético, el corazón y/o el diafragma, más particularmente para el músculo esquelético, el corazón y/o el diafragma, es relativamente ineficaz debido a las limitaciones en la administración y expresión de genes. Además, las respuestas
 5 inmunes específicas al producto génico terapéutico restringen la eficacia de las aplicaciones de terapia génica dirigidas al músculo liso, músculo esquelético, corazón y/o diafragma, más particularmente al músculo esquelético, corazón y/o diafragma.

Los desafíos que dificultan la traducción clínica e impiden el desarrollo de una cura eficaz para LGMD2E mediante terapia génica también se relacionan con (i) la
 10 expresión insuficiente del transgén terapéutico en los músculos esqueléticos, el corazón y el diafragma afectados; y (ii) la toxicidad potencial y las respuestas inmunitarias adversas debido a las dosis muy altas de vectores convencionales necesarios para llegar a los principales grupos musculares (es decir, músculo esquelético, corazón y diafragma) afectados por esta enfermedad potencialmente mortal para tratar de manera
 15 efectiva las diferentes manifestaciones clínicas. de estas enfermedades, incluida la debilidad/consunción del músculo esquelético, la miocardiopatía y la disfunción del diafragma.

Los esfuerzos para administrar transgenes al músculo se han centrado en vectores derivados de adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociados (AAV) y
 20 plásmidos. El vector viral asociado a adeno (AAV) es, con mucho, el vehículo de administración de genes más prometedor para la terapia génica dirigida al músculo. El tropismo natural de AAV hacia las células musculares, su expresión transgénica persistente a largo plazo, sus múltiples serotipos, así como su respuesta inmunitaria mínima han hecho que los vectores de AAV sean muy adecuados para la terapia génica
 25 dirigida al músculo. AAV9 es conocido entre los vectores más eficientes para el suministro de genes cardíacos (Pacak et al. 2006. *Circ Res.* 99(4):e3-9; VandenDriessche et al. 2007. *J Thromb Haemost.* 5(1):16-24; Inagaki et al., 2006. *Mol Ther.* 2006 14(1):45-53), y también es muy adecuado para el suministro de genes del músculo esquelético. El vector AAV puede administrarse en músculo esquelético,
 30 músculo cardíaco, músculo liso y diafragma por medio de administraciones locales, regionales y sistémicas.

Sin embargo, sigue habiendo preocupaciones con respecto a la eficacia y la seguridad de algunos acercamientos de administración de genes. Los principales factores limitantes son los niveles de expresión del transgén insuficientes y/o transitorios
 35 y la expresión inapropiada del transgén en tipos de células no deseadas. En particular, se ha demostrado que la expresión transgénica inadvertida en células presentadoras de

antígenos (APCs) aumenta el riesgo de respuestas inmunitarias adversas contra las células modificadas genéticamente y/o el producto transgénico terapéutico que, en consecuencia, reduce la expresión génica a largo plazo.

Este problema se ha abordado mediante el aumento de la expresión génica utilizando elementos reguladores cis (CREs) específicos del músculo y el diafragma (también denominados módulos reguladores cis (CRM)). Estos elementos reguladores cis humanos novedosos y robustos se obtuvieron a través de la minería de datos de todo el genoma y produjeron niveles sólidos de expresión de transgenes específicos en el músculo esquelético y de corazón y/o diafragma, al tiempo que evitaban la expresión en tejidos no objetivo (documento WO 2015/110449 A1; WO 2018/178067 A1).

Sin embargo, la simple expresión de la proteína terapéutica en el músculo, el corazón o el diafragma usando uno de estos MRC puede no ser suficiente, particularmente porque existe la necesidad de disminuir aún más las dosis del vector a niveles que no provoquen ninguna toxicidad no deseada, como la toxicidad hepática bien documentada que ocurrió en la mayoría, si no en todos, los ensayos de terapia génica que se basaron en altas dosis de vector que se administraron sistémicamente a los pacientes.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de un suministro de genes seguro y eficaz al músculo. Por ejemplo, es imperativo mejorar aún más la eficacia y la seguridad de las aplicaciones de terapia génica dirigidas a tejidos para LGMD2E, idealmente mediante el desarrollo de vectores de terapia génica más robustos que permitan una expresión específica alta y generalizada del músculo esquelético y de corazón, del diafragma y del músculo liso, preferentemente expresión específica del musculo del diafragma, esquelético y de corazón, del transgén terapéutico de β -sarcoglicano (β -SG) a dosis de vector más bajas y, por lo tanto, más seguras.

Sumario de la Invención

Los presentes inventores abordaron los desafíos con las aplicaciones actuales de terapia génica mediante el desarrollo de acercamientos para maximizar la expresión en células y tejidos musculares como el diafragma, el corazón y/o el músculo esquelético basados en combinaciones novedosas de elementos o módulos reguladores cis transcripcionales (CRE o CRM) que confieren una expresión inesperadamente alta en estas células y tejidos específicos. Con este fin, se diseñaron vectores AAV que expresan ADNc de β -sarcoglicano humano ($h\beta sg$ o $h\beta SG$) utilizando combinaciones de elementos o módulos CRE que dirigen la expresión al diafragma (también denominado en este documento Dph-CRE) o corazón y músculo esquelético (también denominado

en el presente documento CSk(-)CRE o CSk(-)SH(-)CRE o CSk(-)SH o Csk(-)CRE o Csk(-)SH(-)CRE o Csk(-) SH o CSK(-)CRE o CSK(-)SH(-)CRE o CSK(-)SH) junto con un potente promotor específico de músculo como estrategia de terapia génica para LGMD2E. Estos nuevos elementos reguladores se validaron posteriormente in vivo en ratones que produjeron una expresión génica inesperadamente alta y específica de tejido en el corazón, el músculo liso, el músculo esquelético y el diafragma, preferentemente en el corazón, el músculo esquelético y el diafragma. Por lo tanto, este acercamiento permite el uso de dosis de vector más bajas y, por lo tanto, más seguras, al tiempo que maximiza la eficacia terapéutica.

La invención, por lo tanto, proporciona los siguientes aspectos:

Aspecto 1: un elemento regulador de ácido nucleico para mejorar la expresión génica específica del músculo que comprende, esencialmente consiste de, o consiste de al menos dos elementos reguladores específicos del diafragma seleccionados de un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente consiste de o consiste de un nucleótido secuencia que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 2, preferentemente la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, Dph-CRE02), o un fragmento funcional de la misma; un elemento regulador específico del diafragma comprende, esencialmente consiste de o consistiendo de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 3, preferentemente la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, Dph -CRE04), o un fragmento funcional del mismo; y un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 4, preferentemente la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, Dph-CRE06), o un fragmento funcional del mismo; y un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que comprende, esencialmente consiste de o consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 1, preferentemente la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:1 (por ejemplo, CSk-SH5), o un fragmento funcional del mismo.

Aspecto 2: el elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con el aspecto 1 que comprende, esencialmente consiste de o consiste de un elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO :2, preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente

consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:2 (Dph-CRE02), o un fragmento funcional del mismo; un elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 3, preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste del conjunto de secuencias de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 (Dph-CRE04), o un fragmento funcional del mismo; y un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 1, preferentemente el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5), o un fragmento funcional de la misma.

Aspecto 3: el elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con el aspecto 2 que comprende, esencialmente consiste de o consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 5 (Dph-CRE02-CRE04); y el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5), o un fragmento funcional de la misma.

Aspecto 4: el elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con el aspecto 2 o 3, que comprende, esencialmente consiste de, o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 10 (Dph-CRE02 - Dph-CRE04-CSk-SH5).

Aspecto 5: el elemento regulador de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 2 a 4, que comprende además un elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO :4, preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:4 (Dph-CRE06), o un fragmento funcional del mismo.

Aspecto 6: el elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con el aspecto 1 que comprende, esencialmente consiste de o consiste de un elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO :2, preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente

consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:2 (Dph-CRE02), o un fragmento funcional del mismo; un elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 4, preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste del conjunto de secuencias de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (Dph-CRE06), o un fragmento funcional del mismo; y un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 1, preferentemente el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5), o un fragmento funcional de la misma.

Aspecto 7: el elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con el aspecto 6 que comprende, esencialmente consiste de o consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 6 (Dph-CRE02-CRE06) y el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5) o un fragmento funcional de la misma.

Aspecto 8: el elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con el aspecto 6 o 7, que comprende, esencialmente consiste de, o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 11 (Dph-CRE02 - Dph-CRE06 - CSk-SH5).

Aspecto 9: el elemento regulador de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 6 a 8, que comprende además un elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO :3, preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:3 (Dph-CRE04), o un fragmento funcional del mismo.

Aspecto 10: el elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con el aspecto 1 que comprende, esencialmente consiste de o consiste de un elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO :3, preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que

esencialmente consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:3 (Dph-CRE04), o un fragmento funcional de la misma; un elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 4, 5 preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste del conjunto de secuencias de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (Dph-CRE06), o un fragmento funcional del mismo; y un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la 10 secuencia establecida en SEQ ID NO: 1, preferentemente el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5), o un fragmento funcional de la misma.

Aspecto 11: el elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con el aspecto 15 10 que comprende, esencialmente consiste de o consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 7 (Dph-CRE04-CRE06) y el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5) o un 20 fragmento funcional de la misma.

Aspecto 12: el elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con el aspecto 10 que comprende, esencialmente consiste de o consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 8 (Dph-CRE06-CRE04) y el elemento regulador 25 específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5) o un fragmento funcional de la misma.

Aspecto 13: el elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con el aspecto 10 u 11, que comprende, esencialmente consiste de o consiste de la secuencia de 30 nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 12 (Dph-CRE04 - Dph-CRE06 - CSk-SH5).

Aspecto 14: el elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con el aspecto 10 o 12, que comprende, esencialmente consiste de o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 13 (Dph-CRE06 - Dph-CRE04 - CSk-SH5).

Aspecto 15: el elemento regulador de ácido nucleico según cualquiera de los 35 aspectos 10 a 14, que comprende además un elemento regulador específico del

diafragma que esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO :2, preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:2 (Dph-CRE02), o un fragmento funcional del mismo.

Aspecto 16: el elemento regulador de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 10, 11, 13 o 15 que comprende, esencialmente consiste de o consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:9 (Dph-CRE02-CRE04-CRE06), ; y el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5), o un fragmento funcional de la misma.

Aspecto 17: el elemento regulador de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 10, 11, 13, 15 o 16 que comprende, esencialmente consiste de o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 14 (Dph-CRE02 - Dph- CRE04 - Dph-CRE06 – CSk-SH5).

Aspecto 18: uso, preferentemente un uso *in vitro* o *ex vivo*, del elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de los aspectos 1 a 17 para mejorar la expresión génica en el músculo, en particular en el diafragma, el músculo liso, músculo esquelético y de corazón, más particularmente en el músculo del diafragma esquelético y de corazón.

Aspecto 19: un casete de expresión de ácido nucleico que comprende un elemento regulador de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 1 a 17, unido operativamente a un promotor.

Aspecto 20: el casete de expresión de ácido nucleico de acuerdo con el aspecto 19, en donde el elemento regulador de ácido nucleico está operativamente unido a un promotor y un transgén.

Aspecto 21: el casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 o 20, en donde el promotor es un promotor específico de músculo, tal como un promotor específico de músculo seleccionado del grupo que comprende o consiste de: el promotor de desmina (DES) ; el promotor SPc5-12 sintético (SPc5-12); el promotor alfa-actina1 (ACTA1); el promotor de creatina quinasa muscular (CKM); el promotor de la proteína 1 (FHL1) de cuatro dominios LIM y medio; el promotor de actinina alfa 2 (ACTN2); el promotor de filamina-C (FLNC); el promotor de ATPasa 1 de calcio del

retículo endoplásmico/sarcoplásmico (ATP2A1); el promotor de Troponina I Tipo 1 (TNNI1); el promotor de la troponina I tipo 2 (TNNI2); el promotor de la troponina T tipo 1 (TNNT1); el promotor de la troponina T tipo 3 (TNNT3); el promotor de miosina-1 (MYH1); el promotor de miosina-2 (MYH2); el promotor de sarcolipina (SLN); el promotor de la proteína de unión a miosina C1 (MYBPC1); el promotor de la enolasa (EN03); el promotor de la anhidrasa carbónica 3 (CA3); el promotor de cadena ligera de miosina de músculo esquelético rápido (MYLPF) fosforilable; el promotor de la tropomiosina 1 (TPM1); el promotor de la tropomiosina 2 (TPM2); el promotor de la tropomiosina de la cadena alfa-3 (TPM3); el promotor de la proteína 2 que contiene el dominio repetido de anquirina (ANKRD2); el promotor de la cadena pesada de miosina (MHC); el promotor de cadena pesada de alfa miosina (α MHC); el promotor de la cadena ligera de miosina (MLC); el promotor de la creatina quinasa muscular (MCK); el promotor de Miosina, Cadena Ligera 1 (MYL1); el promotor de Miosina, Cadena Ligera 2 (MYL2); el promotor de Mioglobina (MB); el promotor de la troponina T tipo 2 (TNNT2); el promotor de la troponina C tipo 2 (TNNC2); el promotor de Troponina C Tipo 1 (TNNC1); el promotor Titin-Cap (TCAP); el promotor Myosin, Heavy Chain 7 (MYH7); el promotor de la aldolasa A (ALDOA); el promotor dMCK, el promotor tMCK; el promotor MHCK7; el promotor de la cadena pesada de miosina 11 (Myh11); el promotor de transgelina (Tagln) y el promotor de músculo liso de actina alfa 2 (Acta2).

Aspecto 22: el casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 21, en donde el promotor es el promotor SPc5-12 como se establece en SEQ ID NO:15.

Aspecto 23: el casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 21, en donde el promotor es el promotor MHCK7 como se establece en SEQ ID NO:56.

Aspecto 24: el casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 21, en donde el promotor es el promotor de desmina como se establece en SEQ ID NO:57.

Aspecto 25: el casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 24, en donde el transgén codifica una proteína terapéutica.

Aspecto 26: el casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 25, en donde el transgén codifica un sarcoglicano, preferentemente β -sarcoglicano, más preferentemente β -sarcoglicano humano (por ejemplo, el transgén expuesto en SEQ ID NO:18, preferentemente el transgén con codones optimizados expuesto en SEQ ID NO:19).

Aspecto 27: el casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 25, en donde el transgén codifica α -glucosidasa ácida (GAA), preferentemente α -glucosidasa ácida humana (hGAA) (por ejemplo, el transgén expuesto en SEQ ID NO: 58, preferentemente el transgén con codones optimizados expuesto en SEQ ID NO:59).

Aspecto 28: el casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 24, en donde el transgén es un gen informador tal como un transgén de luciferasa (por ejemplo, el transgén expuesto en SEQ ID NO:20).

Aspecto 29: el casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 28, en donde el transgén tiene codones optimizados.

Aspecto 30: el casete de expresión de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de los aspectos 19 a 29, que comprende además un intrón, preferentemente el intrón Virus Diminuto del Ratón (MVM) (como se establece en SEQ ID NO: 16).

Aspecto 31: el casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 30, que comprende además una señal de poliadenilación, preferentemente una señal de poliadenilación sintética como la establecido en SEQ ID NO:17.

Aspecto 32: un vector que comprende el elemento regulador de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 1 a 17, o el casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 31.

Aspecto 33: el vector de acuerdo con el aspecto 32, que es un vector viral, preferentemente un vector viral adenoasociado (AAV), más preferentemente un vector AAV9 o un vector AAV8.

Aspecto 34: una composición farmacéutica que comprende el casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 31, o el vector según cualquiera de los aspectos 32 o 33, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Aspecto 35: el elemento regulador de ácidos nucleicos según cualquiera de los aspectos 1 a 17, el casete de expresión de ácidos nucleicos según cualquiera de los aspectos 19 a 31, el vector según cualquiera de los aspectos 32 o 33, o la composición farmacéutica según al aspecto 34 para su uso en medicina.

Aspecto 36: el elemento regulador de ácidos nucleicos según cualquiera de los aspectos 1 a 17, el casete de expresión de ácidos nucleicos según cualquiera de los aspectos 19 a 31, el vector según cualquiera de los aspectos 32 o 33, o la composición

farmacéutica según al aspecto 34 para uso en terapia génica, preferentemente terapia génica dirigida al músculo. Por ejemplo, la terapia génica puede ser para una enfermedad o trastorno seleccionado de enfermedades de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, enfermedad de Fabry) que incluyen trastornos de almacenamiento de glucógeno (por ejemplo, enfermedad de Pompe, trastorno de almacenamiento de glucógeno (GSD) tipo II, enfermedad de Danon, GSD tipo IIb, GSD III o GSD 3 (también conocida como enfermedad de Cori o enfermedad de Forbes), GSD IV o GSD4 (también conocida como enfermedad de Andersen), GSD V o GSD5 (también conocida como enfermedad de McArdle), GSD VII o GSD7 (también conocida como enfermedad de Tarui), GSD X o GSD10, GSD XII o GSD 12 (también conocida como deficiencia de aldolasa A), GSD XIII o GSD13, GSD XV o GSD15) y trastornos de mucopolisacaridosis (por ejemplo, síndrome de Hunter, síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis (MPS) I, MPS II, MPS III, MPS IIIA, MPS IIIB, MPS IIIC, MPS IV, MPS VI, MPS VII, MPS IX); trastornos mitocondriales (por ejemplo, síndrome de Barth); canalopatía (por ejemplo, síndrome de Brugada); desordenes metabólicos; miopatía miotubular (MTM); distrofia muscular (por ejemplo, distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (BMD)); distrofia miotónica; Distrofia Muscular Miotónica (DM); miopatía de Miyoshi; tipo Fukuyama congénito; disferlinopatías; enfermedad neuromuscular; enfermedades de las neuronas motoras (MND) (por ejemplo, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT)), atrofia muscular espinal (AME) o esclerosis lateral amiotrófica (ALS)); distrofia muscular de Emery-Dreifuss; distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD); distrofias musculares congénitas; miopatía congénita; distrofia muscular de cinturas (por ejemplo, distrofia muscular de cinturas tipo 2E (LGMD2E), distrofia muscular de cinturas tipo 2D (LGMD2D), distrofia muscular de cinturas tipo 2C (LGMD2C), distrofia muscular de cinturas tipo 2B (LGMD2B), distrofia muscular de cinturas tipo 2L (LGMD2L), distrofia muscular de cinturas tipo 2A (LGMD2A)); miopatías metabólicas; enfermedades inflamatorias musculares; miastenia; miopatías mitocondriales; anomalías de los canales iónicos; enfermedades de la envoltura nuclear; cardiomiopatías; hipertrofia cardíaca; insuficiencia cardíaca; miopatías distales, hemofilia (por ejemplo, hemofilia A y B); diabetes; enfermedades cardiovasculares y enfermedades del corazón.

Aspecto 37: el elemento regulador de ácidos nucleicos, el casete de expresión de ácidos nucleicos, el vector o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con el aspecto 36, donde la terapia génica es para tratar trastornos relacionados con los músculos en general, aliviando los síntomas de las miopatías en general, o restaurar la función de las células musculares en general.

Aspecto 38: el elemento regulador de ácidos nucleicos, el casete de expresión de ácidos nucleicos, el vector o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con el aspecto 36, en donde la terapia génica es para tratar enfermedades cardiovasculares. Los ejemplos no limitantes de enfermedades cardiovasculares incluyen aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad arterial coronaria, enfermedad arterial periférica, enfermedad cardíaca congénita, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca (también conocida como insuficiencia cardíaca), infarto de miocardio (también conocido como ataque al corazón), isquemia cardíaca, síndrome coronario agudo, angina inestable, angina estable, miocardiopatía, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada, miocardiopatía restrictiva, miocardiopatías primarias causadas por mutaciones genéticas como el síndrome de Brugada, enfermedad de Pompe, enfermedad de Danon y enfermedad de Fabry, amiloidosis cardíaca (también conocida como síndrome del corazón rígido), miocarditis (también conocida como miocardiopatía inflamatoria), cardiopatía valvular, estenosis valvular, insuficiencia valvular, endocarditis, cardiopatía reumática, pericarditis (es decir, una enfermedad causada por una inflamación y/o infección del pericardio), taponamiento cardíaco (también conocido como taponamiento pericárdico), extremo ocarditis, arritmia cardíaca, hipertensión, hipotensión, estenosis de vasos, estenosis de válvulas o restenosis.

Aspecto 39: un elemento regulador de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 1 a 17, un casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 26 o 29 a 31, un vector según cualquiera de los aspectos 32 o 33, o una composición farmacéutica de acuerdo con el aspecto 34 para uso en el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas, más preferentemente distrofia muscular de cinturas tipo 2E (LGMD2E).

Aspecto 40: un elemento regulador de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 1 a 17; un casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 25 o 29 a 31, en donde el transgén codifica una proteína lisosomal, preferentemente una proteína lisosomal seleccionada del grupo que consiste de α -galactosidasa ácida (GAA), alfa-galactosidasa A y LAMP2; un vector según cualquiera de los aspectos 32 o 33 que comprende dicho casete de expresión de ácido nucleico; o una composición farmacéutica de acuerdo con el aspecto 34 que comprende dicho casete de expresión de ácido nucleico o dicho vector, para usarse en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal.

Aspecto 41: un elemento regulador de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 1 a 17, un casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los

aspectos 19 a 25, 27 o 29 a 31, un vector según cualquiera de los aspectos 32 o 33, o una composición farmacéutica de acuerdo con el aspecto 34 para usarse en el tratamiento de la enfermedad de Pompe.

Aspecto 42: Un método, preferentemente un método *in vitro* o *ex vivo*, para expresar un producto transgénico en células musculares como el diafragma, el músculo liso, células del músculo esquelético y/o de corazón en particular en el diafragma, las células del músculo esquelético y/o de corazón, comprende:

- introducir el casete de expresión de ácido nucleico según cualquiera de los aspectos 19 a 31, o el vector según cualquiera de los aspectos 32 o 33 en las células musculares;
- expresar el producto transgénico en las células musculares.

Breve Descripción de las Figuras

La FIGURA 1: Elementos reguladores del ácido nucleico. (A) CSk-SH5 (SEQ ID NO: 1). (B) Dph-CRE02 (SEQ ID NO: 2). (C) Dph-CRE04 (SEQ ID NO: 3). (D) Dph-CRE06 (SEQ ID NO: 4). (E) Dph-CRE02-CRE04 (SEQ ID NO:5), que es una combinación de Dph-CRE02 y Dph-CRE04 conectados a través de una secuencia flanqueante (subrayada). (F) Dph-CRE02-CRE06 (SEQ ID NO:6), que es una combinación de Dph-CRE02 y Dph-CRE06 conectados a través de una secuencia flanqueante (subrayado). (G) Dph-CRE04-CRE06 (SEQ ID NO:7), que es una combinación de Dph-CRE04 y Dph-CRE06 conectados a través de una secuencia flanqueante (subrayado). (H) Dph-CRE06-CRE04 (SEQ ID NO: 8), que es una combinación de Dph-CRE06 y Dph-CRE04 conectados a través de una secuencia flanqueante (subrayado). (I) Dph-CRE02-CRE04-CRE06 (SEQ ID NO: 9), que es una combinación de Dph-CRE02, Dph-CRE04 y Dph-CRE06 conectados entre sí a través de una secuencia flanqueante (subrayado). (J) Dph-CRE02-CRE04-CSk-SH5 (SEQ ID NO: 10). (K) Dph-CRE02-CRE06-CSk-SH5 (SEQ ID NO: 11). (L) Dph-CRE04-CRE06-CSk-SH5 (SEQ ID NO: 12). (M) Dph-CRE06-CRE04-CSk-SH5 (SEQ ID NO: 13). (N) Dph-CRE02-CRE04-CRE06-CSk-SH5 (SEQ ID NO: 14).

La FIGURA 2: Diseño de vectores AAV. Los vectores AAV se diseñaron para expresar β -sarcoglicano humano (h β sg) o luciferasa (Luc). Los vectores contienen transgén h β sg con codones optimizados (h β sgco, SEQ ID NO:19) o sin codones optimizados (SEQ ID NO:18). Los vectores contienen un promotor muscular sintético designado como SPc5-12 (SEQ ID NO: 15). Todos los vectores contienen un intrón del virus diminuto de ratón (MVM, SEQ ID NO: 16) y un sitio de poliadenilación sintético (pA,

SEQ ID NO: 17). Los vectores están flanqueados por una repetición terminal invertida (ITR) de AAV de 5' y 3'. Los vectores contienen un CRE específico del músculo esquelético y de corazón (CSk-SH5) (**A, B, A1**), en combinación con uno o más CRE específicos del diafragma (CRE02, CRE04 o CRE06) (**C-W**), o están desprovistos de cualquier Elemento CRE (**X, Y, Z**).

La FIGURA 3: Efecto de las combinaciones de CRE sobre la expresión de luciferasa. Análisis de bioluminiscencia (BLI) de gemelos y cuádriceps de ratones CB17-SCID a los que se inyectaron vectores AAV que expresan luciferasa de un promotor muscular sintético designado como SPc5-12 (SPc). Los vectores contenían una CRE de músculo cardíaco/esquelético (CSk-SH5) sola o en combinación con una o más CRE específicas del diafragma (CRE02, CRE04 y/o CRE06) y/o una CRE de músculo cardíaco/esquelético (CSk-SH5).

La FIGURA 4: Efecto de las combinaciones de CRE sobre la expresión del gen *hβsc* con codones optimizados en gastrocnemio (A), cuádriceps (B), diafragma (C) y corazón (D). Se inyectaron vectores AAV que expresan codones optimizados (*hβsgco*) del promotor SPc5-12 en CB17-SCID. Los vectores contenían un CRE específico del músculo esquelético y de corazón (CSk-SH5), solo o en combinación con uno o dos CRE específicos del diafragma (Dph-CRE02, Dph-CRE04 y/o Dph-CRE06). La expresión del gen *hβsgco* se determinó mediante PCR de transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

La FIGURA 5: Efecto de las combinaciones de CRE sobre la expresión del gen *hβsc* con codones optimizados en gastrocnemio (A), cuádriceps (B), diafragma (C) y corazón (D). Se inyectaron vectores AAV que expresan codones optimizados (*hβsgco*) del promotor SPc5-12 en CB17-SCID. Los vectores no contenían ningún elemento CRE (SPc), un CRE específico del músculo esquelético y de corazón (CSk-SH5-SPc), una combinación de dos CRE específicos del diafragma y un CRE específico del músculo esquelético y de corazón (CRE04-CRE06-CSk-SH5), o una combinación de tres CRE específicas del diafragma y una CRE específica del corazón y del músculo esquelético (CRE02-CRE04-CRE06-CSk-SH5). La expresión del gen *hβsgco* se determinó mediante PCR de transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

La FIGURA 6: Ensayo de resistencia en cinta rodante para evaluar la corrección fenotípica de ratones sin *Sgcb* tratados con terapia génica. Tres grupos diferentes de ratones fueron sometidos a un ensayo de resistencia en cinta rodante. Ratones sin *Sgcb* inyectados con AAV-SPc5-12-MVM-*hβ*-SGco-pA, AAV-CRE02-

CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hß-SGco-pA o PBS como control negativo. Se indica la distancia media recorrida por cada grupo de ratones (n=3).

Descripción Detallada de la Invención

5 Como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen tanto los referentes en singular como en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

10 Los términos "que comprende", "comprende" y "compuesto por" tal como se utilizan en este documento son sinónimos de "incluido", "incluye" o "que contiene", "contiene" y son inclusivos o abiertos y no excluyen información adicional, miembros, elementos o pasos de método no citados. Los términos también abarcan "que consiste de" y "que consiste esencialmente de", que tienen significados bien establecidos en la terminología de patentes.

15 La recitación de rangos numéricos por puntos finales incluye todos los números y fracciones subsumidos dentro de los respectivos rangos, así como los puntos finales recitados.

20 Los términos "alrededor de" o "aproximadamente", tal como se utilizan en este documento cuando se refieren a un valor medible, como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, pretenden abarcar variaciones de y desde el valor especificado, como variaciones de +/-10% o menos, preferentemente +/-5% o menos, más preferentemente +/-1% o menos, y aún más preferentemente +/-0.1% o menos del valor especificado, en la medida en que dichas variaciones sean apropiadas realizar en la invención divulgada. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" también se divulga de manera específica y preferible.

25 Mientras que los términos "uno o más" o "al menos uno", como uno o más miembros o al menos un miembro de un grupo de miembros, es claro per se, por medio de una mayor ejemplificación, el término abarca, entre otras cosas, una referencia a cualquiera de dichos miembros, o a dos o más de dichos miembros, como, por ejemplo, cualquier ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 o ≥ 7 , etc. de dichos miembros, y hasta todos dichos miembros. En otro ejemplo, "uno o más" o "al menos uno" puede referirse a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más.

30 La discusión de los antecedentes de la presente invención se incluye para explicar el contexto de la invención. Esto no debe tomarse como una admisión de que cualquiera de los materiales a los que se hace referencia fue publicado, conocido o parte del conocimiento general común en cualquier país a partir de la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.

A lo largo de esta invención, se hace referencia a varias publicaciones, patentes y especificaciones de patentes publicadas mediante una cita de identificación. Todos los documentos citados en la presente especificación se incorporan aquí como referencia en su totalidad. En particular, las enseñanzas o secciones de tales documentos aquí
5 mencionados específicamente se incorporan por referencia.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos utilizados en la invención de la invención, incluidos los términos técnicos y científicos, tienen el significado que comúnmente entienden los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. A modo de guía adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor las
10 enseñanzas de la invención. Cuando se establecen términos específicos en relación con un aspecto particular de la invención o una modalidad particular de la invención, se pretende que dicha connotación se aplique a lo largo de esta especificación, es decir, también en el contexto de otros aspectos o modalidades de la invención, a menos que se indique lo contrario. definido.

En los siguientes pasajes, se establecen con más detalle diferentes aspectos o modalidades de la invención. Cada aspecto o modalidad así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o modalidad a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas
15 o ventajosas.
20

La referencia a lo largo de esta especificación a "una modalidad", "modalidad" significa que una característica, estructura o característica particular descrita en relación con la modalidad está incluida en al menos una modalidad de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de las frases "en una modalidad" o "en modalidad" en varios
25 lugares a lo largo de esta especificación no se refieren necesariamente a la misma modalidad, pero pueden. Además, las características, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada, como será evidente para un experto en la materia a partir de esta invención, en una o más modalidades. Además, aunque algunas modalidades descritas en este documento incluyen algunas,
30 pero no otras características incluidas en otras modalidades, las combinaciones de características de diferentes modalidades están destinadas a estar dentro del alcance de la invención y forman diferentes modalidades, como entenderán los expertos en la técnica. Por ejemplo, en las reivindicaciones adjuntas, cualquiera de las modalidades reivindicadas puede usarse en cualquier combinación.

Para métodos generales relacionados con la invención, se hace referencia, entre otros, a libros de texto bien conocidos, incluidos, por ejemplo, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th Ed." (Green y Sambrook, 2012, Cold Spring Harbor Laboratory Press), "*Current Protocols in Molecular Biology*" (Ausubel et al., 1987).

5 En un aspecto, la invención se refiere a un elemento regulador de ácido nucleico para potenciar la expresión génica específica del músculo, en particular para potenciar la expresión génica específica del diafragma, músculo liso, esquelético y de corazón, más particularmente para potenciar el diafragma, músculo cardíaco y músculo esquelético. expresión génica específica que comprende, que consta esencialmente de
10 (es decir, el elemento regulador puede, por ejemplo, comprender adicionalmente secuencias utilizadas con fines de clonación, pero las secuencias indicadas constituyen la parte esencial del elemento regulador), o que consta de al menos dos, como dos, tres o más elementos reguladores específicos del diafragma y un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón, en donde al menos dos elementos
15 reguladores específicos del diafragma se seleccionan del grupo que consiste de: un elemento regulador específico del diafragma que comprende, que esencialmente consiste de (es decir, el elemento regulador puede, por ejemplo, comprender adicionalmente secuencias utilizadas con fines de clonación, pero las secuencias indicadas constituyen la parte esencial del elemento regulador, p. no forman parte de
20 una región reguladora más grande, como un promotor), o que consisten en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 2, preferentemente la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, Dph -CRE02,) o un fragmento funcional del mismo; un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente consiste de una secuencia de
25 nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 3, preferentemente la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, Dph-CRE04), o un fragmento funcional del mismo; y un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 4,
30 preferentemente la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, Dph-CRE06) , o un fragmento funcional del mismo, y en donde el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón comprende, esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1, preferentemente la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID
35 NO: 1 (por ejemplo, CSK-SH5), o un fragmento funcional del mismo.

Un 'elemento regulador' o 'elemento regulador cis (CRE)' o 'módulo regulador cis (CRM)' o "SH" como se usa en el presente documento se refiere a un elemento de control transcripcional, en particular un control transcripcional que actúa en cis no codificante elemento, capaz de regular y/o controlar la transcripción de un gen, en la transcripción específica de tejido particular de un gen. Los elementos reguladores comprenden al menos un sitio de unión del factor de transcripción (TFBS), más en particular al menos un sitio de unión para un factor de transcripción específico de tejido. Los elementos reguladores solos normalmente no son suficientes para iniciar la transcripción, pero requieren un promotor para este fin. Típicamente, los elementos reguladores como se usan aquí aumentan o mejoran la expresión génica impulsada por el promotor en comparación con la transcripción del gen del promotor solo, sin los elementos reguladores. Por lo tanto, los elementos reguladores comprenden particularmente secuencias potenciadoras, aunque debe entenderse que los elementos reguladores que mejoran la transcripción no se limitan a secuencias potenciadoras típicas aguas arriba, sino que pueden ocurrir a cualquier distancia del gen que regulan o incluso dentro del gen o lectura abierta. marco en sí. De hecho, se sabe en la técnica que las secuencias que regulan la transcripción pueden estar situadas aguas arriba (por ejemplo, en la región promotora) o aguas abajo (por ejemplo, en la 3'UTR) del gen que regulan *in vivo*, y pueden estar ubicadas en las inmediaciones del gen o más lejos. Los elementos reguladores, tal como se describen en el presente documento, abarcan secuencias de origen natural, así como variantes de las mismas y combinaciones de dichos elementos reguladores o varias copias de dicho elemento regulador, es decir, elementos reguladores que comprenden secuencias de origen no natural. Los elementos reguladores, tal como se describen en el presente documento, pueden comprender parte de una secuencia mayor implicada en el control transcripcional, por ejemplo, parte de una secuencia promotora. Los elementos reguladores de la presente invención son secuencias que no ocurren naturalmente. Los elementos reguladores descritos en el presente documento se proporcionan como moléculas de ácido nucleico.

El término "ácido nucleico", tal como se usa en el presente documento, normalmente se refiere a un oligómero o polímero (preferentemente un polímero lineal) de cualquier longitud compuesto esencialmente por nucleótidos. Una unidad de nucleótido comúnmente incluye una base heterocíclica, un grupo de azúcar y al menos uno, p. uno, dos o tres grupos fosfato, incluidos los grupos fosfato modificados o sustituidos. Las bases heterocíclicas pueden incluir, entre otras, bases de purina y pirimidina, como adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), que están muy extendidas en los ácidos nucleicos naturales, otros ácidos nucleicos naturales. bases existentes (por ejemplo, xantina, inosina, hipoxantina) así como bases

modificadas química o bioquímicamente (por ejemplo, metiladas), no naturales o derivadas. Los grupos de azúcar pueden incluir, entre otros, grupos de pentosa (pentofuranosa), como preferentemente ribosa y/o 2-desoxirribosa común en ácidos nucleicos naturales, o grupos de azúcar arabinosa, 2-desoxiarabinosa, treosa o hexosa, así como azúcar modificado o sustituido. Los ácidos nucleicos tal como se pretende en el presente documento pueden incluir nucleótidos naturales, nucleótidos modificados o mezclas de los mismos. Un nucleótido modificado puede incluir una base heterocíclica modificada, un resto de azúcar modificado, un grupo fosfato modificado o una combinación de los mismos. Pueden introducirse modificaciones de grupos fosfato o azúcares para mejorar la estabilidad, la resistencia a la degradación enzimática o alguna otra propiedad útil. El término "ácido nucleico" incluye preferentemente moléculas híbridas de ADN, ARN y ADN/ARN, que incluyen específicamente hnARN, pre-ARNm, ARNm, ADNc, ADN genómico, productos de amplificación, oligonucleótidos y ADN sintético (por ejemplo, sintetizado químicamente). ARN o híbridos de ADN/ARN.

El ácido nucleico puede ocurrir de forma natural, por ejemplo, presente o aislado de la naturaleza; o puede ser de origen no natural, por ejemplo, recombinante, es decir, producido mediante tecnología de ADN recombinante, y/o parcial o totalmente sintetizado química o bioquímicamente. Un "ácido nucleico" puede ser bicatenario, parcialmente bicatenario o monocatenario. Cuando es monocatenario, el ácido nucleico puede ser la cadena sentido o la cadena antisentido. Además, el ácido nucleico puede ser circular o lineal.

Como se usa en el presente documento, "sitio de unión del factor de transcripción", "secuencia de unión del factor de transcripción" o "TFBS" se refiere a una secuencia de una región de ácido nucleico a la que se unen los factores de transcripción.

Los ejemplos no limitantes de TFBS incluyen sitios de unión para el factor de transcripción 3, también conocido como TCF3 o E2A; sitios de unión para el factor nuclear I, también conocido como NF1; sitios de unión para la proteína de unión al potenciador de CCAAT, también conocida como C/EBP; sitios de unión para la diferenciación miogénica, también conocidos como MyoD; sitios de unión para la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides, también conocida como SREBP; sitios de unión para el factor relacionado con la leucemia/linfoma, también conocido como LRF; sitios de unión para la proteína 53, también conocida como p53; sitios de unión para el factor nuclear de hepatocitos 3-alfa, también conocido como HNF3a; sitios de unión para el factor nuclear de hepatocitos 3-beta, también conocido como HNF3b; sitios de unión para el factor 4 nuclear de hepatocitos, también conocido como HNF4; sitios de unión para el factor potenciador 2A específico de miocitos, también conocido como MEF2A o RSRFC4; sitios de unión para el receptor gamma 1/2

activado por el proliferador de peroxisomas, también conocido como PPAR-gamma1/2; sitios de unión para el factor de respuesta sérico, también conocido como SRF; sitios de unión para la proteína 1b similar al activador de la transcripción, también conocida como Tal1_b o Tal1-beta; sitios de unión para el potenciador del homólogo 2 de zeste, también conocido como EZH2; sitios de unión para la subunidad del complejo represivo 2 de Polycom, también conocida como SUZ12; sitios de unión para la proteína de unión a TATA, también conocida como TBP; sitios de unión para el receptor de folato alfa, también conocido como FOLR2A; sitios de unión para el factor de transcripción silenciador RE-1, también conocido como REST; sitios de unión para el factor de transcripción 4 del dominio TEA, también conocido como TEAD4; sitios de unión del factor de transcripción para la proteína 5 de unión al retinoblastoma, también conocida como RBBP5; sitios de unión del factor de transcripción para Msh Homeobox 1, también conocido como Msx-1; sitios de unión del factor de transcripción para el miembro A de la familia de reguladores de transcripción SIN3, también conocido como SIN3A; sitios de unión del factor de transcripción para JunD, también conocido como JUND; sitios de unión del factor de transcripción para el dedo de zinc tipo ZZ que contiene 3, también conocido como ZZZ3; sitios de unión del factor de transcripción para Homeobox 1 de unión a E-Box con dedos de zinc, también conocido como AREB6; sitios de unión del factor de transcripción para el factor de transcripción E2F; sitios de unión del factor de transcripción para el factor de transcripción 4, también conocido como ITF2; sitios de unión del factor de transcripción para el receptor de estrógeno alfa, también conocido como ER-alfa; la proteína B relacionada con Myb, también conocida como MYBL2; caja de horquilla A1 también conocida como FOXA1; caja de horquilla A2, también conocida como FOXA2; subunidad 7 del TFIID del factor de iniciación de la transcripción, también conocida como TAF7; SIN3AK20; factor de transcripción MAX, también conocido como MAX; Dedo de zinc y proteína 7A que contiene el dominio BTB, también conocida como ZBTB7A. Los sitios de unión del factor de transcripción se pueden encontrar en bases de datos como Transfac®.

Como se usa en el presente documento, los términos "identidad" e "idéntico" y similares se refieren a la similitud de secuencia entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, dos moléculas de ADN. Los alineamientos de secuencias y la determinación de la identidad de la secuencia se pueden realizar, por ejemplo, utilizando la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) descrita originalmente por Altschul et al. 1990 (*J Mol Biol* 215: 403-10), como el algoritmo "Blast 2 secuencias" descrito por Tatusova y Madden 1999 (*FEMS Microbiol Lett* 174: 247-250). Normalmente, el porcentaje de identidad de

secuencia se calcula sobre la longitud total de la secuencia. Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente idéntico" indica al menos el 90%, preferentemente al menos el 95%, tal como el 95%, 96%, 97%, 98% o 99 % de identidad de secuencia.

5 El término "fragmento funcional", como se usa en la solicitud con respecto a los elementos reguladores de ácidos nucleicos descritos en el presente documento, se refiere a fragmentos de dichas secuencias de elementos reguladores que retienen la capacidad de regular la expresión específica del músculo, es decir, aún pueden conferir especificidad tisular y son capaces de regular la expresión de un transgén de la misma
10 manera (aunque posiblemente no en la misma medida) que la secuencia de la que se derivan. Los fragmentos funcionales pueden comprender preferentemente al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos al menos 100, al menos 120, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos
15 400 o al menos 450 nucleótidos contiguos de la secuencia de la que derivan. También preferentemente, los fragmentos funcionales pueden comprender al menos 1, más preferentemente al menos 2, al menos 3 o al menos 4, incluso más preferentemente al menos 5, al menos 10 o al menos 15 de los sitios de unión del factor de transcripción (TFBS) que están presentes en la secuencia de la que se derivan. Los fragmentos
20 funcionales como se establecen aquí tienen preferentemente al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o aproximadamente el 100% de las capacidades reguladoras de ácidos nucleicos del elemento regulador. de donde se derivan.

Un "elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón" o
25 "elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón" como se usa en el presente documento se refiere a un elemento regulador que es capaz de potenciar la expresión específica del músculo esquelético y de corazón. Ejemplos no limitantes de elementos reguladores específicos del músculo esquelético y de corazón son los elementos reguladores indicados como "CSk-SH" en el documento WO 2015/110449.
30 En particular, un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que comprende esencialmente consiste de, consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1, preferentemente la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 1, o un fragmento funcional del mismo se usa aquí. En las modalidades, el elemento regulador específico del músculo
35 esquelético y de corazón esencialmente consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1, o una secuencia que tiene al menos el 80%,

preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%. , o incluso más preferentemente al menos el 95%, tal como el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 1, también denominada en el presente documento como "CSk-SH5" o "CSkSH5" o "Csk-SH5" o "CskSH5" o "CSK-SH5" o "CSKSH5", se utilizan.

5 Como se usa en el presente documento, "expresión específica del músculo esquelético y de corazón" se refiere a la expresión preferencial o predominante de un (trans) gen en el corazón, en particular, el músculo cardíaco y el músculo esquelético. Al menos el 50%, más particularmente al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 9 %, al menos el 99% o el 100% de la expresión del transgén puede ocurrir dentro del
10 músculo esquelético y de corazón. Puede ocurrir en un órgano o tejido que no sea músculo esquelético y de corazón menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10%, menos del 5%, menos del 2% o incluso menos del 1% de la expresión génica (trans). A lo largo de la solicitud, donde se menciona específico
15 del músculo esquelético y de corazón en el contexto de expresión, expresión específica de cardiomiocitos y miocitos esqueléticos, expresión específica de mioblastos cardíacos y mioblastos esqueléticos o expresión específica de células madre/progenitoras cardíacas y musculares o células satélite son también explícitamente previsto.

Como se usa en el presente documento, los términos "músculo del corazón" o
20 "músculo cardíaco" se refieren al tipo de músculo estriado regulado autónomamente que se encuentra en el corazón.

Como se usa en el presente documento, el término "músculo esquelético" se refiere al tipo de músculo estriado controlado voluntariamente que está unido al esqueleto. Los ejemplos no limitativos de músculo esquelético incluyen el bíceps, el
25 tríceps, el cuádriceps, el tibial interior y el músculo gastrocnemio.

El término "miocito", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que se ha diferenciado de una célula progenitora/madre muscular progenitora, célula satélite o mioblasto de manera que es capaz de expresar un fenotipo específico del músculo en condiciones apropiadas. Los miocitos con diferenciación terminal se
30 fusionan entre sí para formar miotubos, un constituyente principal de las fibras musculares. El término "miocito" también se refiere a miocitos que están des-diferenciados. El término incluye células *in vivo* y células cultivadas *ex vivo* independientemente de si tales células son primarias o de pase.

Los términos "célula madre/progenitora muscular", "célula satélite" o
35 "mioblasto", tal como se usan en el presente documento, se refieren a una célula

embrionaria en el mesodermo que se diferencia para dar lugar a una célula muscular o miocito. El término incluye células *in vivo* y células cultivadas *ex vivo* independientemente de si tales células son primarias o de pase.

Un "elemento regulador específico del diafragma" como se usa en el presente documento se refiere a un elemento regulador que es capaz de potenciar la expresión específica del diafragma y del músculo esquelético. Ejemplos no limitativos de elementos reguladores específicos del diafragma son los elementos reguladores indicados como Dph-CRE01 a Dph-CRE065 en el documento WO 2018/178067. En particular, un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO:2, preferentemente la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:2, o una secuencia de nucleótidos funcional fragmento del mismo; un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, preferentemente la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:3, o un fragmento funcional de la misma; y/o un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 4, preferentemente la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 4, o una secuencia de nucleótidos funcional fragmento del mismo, se utiliza aquí. . En las modalidades, el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%, incluso más preferentemente al menos el 95%, tal como el 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, identidad con SEQ ID NO: 2, también denominada en el presente documento como "Dph-CRE02" o "CRE-02" o "CRE02 ", el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:3 o una secuencia que tiene al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 %, incluso más preferentemente al menos el 95%, como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad con SEQ ID NO: 3, también denominada en el presente documento como "Dph-CRE04" o "CRE-04" o "CRE04" , y/o el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO4 o una secuencia que tiene al menos 80 %, preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, incluso más preferentemente al menos 95%, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad con SEQ ID NO: 4, también denominada en el presente documento como "Dph-CRE06" o "CRE- 06" o "CRE06", es/son utilizados.

Tabla 1: Elementos reguladores de ácidos nucleicos

Secuencia	Nombre	Tamaño (bp)	TFBS conservado presente
SEQ ID NO: 2	Dph-CRE02	452	EZH2, SUZ12, TBP, FOLR2A, REST TEAD4, RBBP5, Msx-1, SRF, SIN3A
SEQ ID NO: 3	Dph-CRE04	509	JUND, ZZZ3, AREB6, RSRFC4, MEF2A, TBP
SEQ ID NO: 4	Dph-CRE06	400	E2F, ITF2, Tal-1beta, TBP, ER-alpha, PPAR-gamma1, PPAR-gamma-2
SEQ ID NO: 1	CSk-SH5	454	HNF4, NF1, RSRFC4, CEBP, LRF, MyoD, FOLR2A, MYBL2, HNF4G, FOXA1, HNF4A, FOXA2, MEF2A, TAF7, SIN3A, CEBPB, MAX, ZBTB7

- 5 En las modalidades, el elemento regulador específico del diafragma es una combinación de al menos 2 elementos reguladores específicos del diafragma seleccionados del grupo que consiste del elemento regulador específico del diafragma que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 o una
- 10 secuencia que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 90%, incluso más preferentemente al menos 95%, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, identidad con SEQ ID NO: 2 (Dph-CRE02), o un fragmento funcional del mismo; el elemento regulador específico del diafragma que consta de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos al
- 15 menos 90%, incluso más preferentemente al menos 95%, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, identidad con SEQ ID NO:3 (Dph-CRE04), o un fragmento funcional de la misma; y el elemento regulador específico del diafragma que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos al menos 85%, más preferentemente al menos 90%,
- 20 aún más preferentemente al menos 95%, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, identidad con SEQ ID NO: 4 (Dph-CRE06), o un fragmento funcional del mismo. Más particularmente, un elemento regulador específico del diafragma, que esencialmente consiste de, o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 5 o una secuencia que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 85%, más

preferentemente al menos el 90%, incluso más preferentemente al menos el 95%, tal como el 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, identidad con SEQ ID NO: 5 (Dph-CRE02-CRE04), un diafragma - elemento regulador específico que comprende, esencialmente consiste de, o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 6 o una secuencia que tiene al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90%, incluso más preferentemente al menos al menos 95%, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, identidad con SEQ ID NO:6 (Dph-CRE02-CRE06), un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente consiste de, o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:7 o una secuencia que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 90%, aún más preferentemente al menos 95%, tal como 95%, 96 %, 97% , 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 7 (Dph-CRE04-CRE06), un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente consiste de, o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 8 o una secuencia que tiene al menos un 80%, preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90%, incluso más preferentemente al menos un 95%, tal como un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 8 (Dph-CRE06-CRE04) o un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente consiste de, o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 9 o una secuencia que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, incluso más preferentemente al menos 95%, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad con SEQ ID NO: 9 (Dph-CRE02-CRE04-CRE06), se utiliza aquí.

"Expresión específica del músculo esquelético y del diafragma", como se usa en el presente documento, se refiere a la expresión preferencial o predominante de un (trans) gen (como ARN y/o polipéptido) en el diafragma y/o las células del músculo esquelético o el diafragma y/o el músculo esquelético. tejido, en comparación con otras células o tejidos (es decir, no del diafragma y del músculo esquelético). Al menos el 50%, más particularmente al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% de la expresión del transgén puede ocurrir dentro del diafragma y/o las células o el tejido del músculo esquelético. puede implicar que haya menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10%, menos del 5 %, menos del 2% o incluso menos del 1% de "fuga" del producto génico expresado a otros órganos o tejidos además del diafragma y el músculo esquelético, como pulmón, hígado, cerebro, riñón y/o bazo.

"Expresión específica de músculo", como se usa en el presente documento, se refiere a la expresión preferencial o predominante de un gen (trans) (como ARN y/o polipéptido) en células musculares, en comparación con otras células o tejidos (es decir, no musculares). al menos el 50%, más particularmente al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99. El % o el 100 % de la expresión del transgén puede ocurrir dentro de las células o tejidos musculares. La expresión específica del músculo puede implicar que haya menos del 50 %, menos del 40 %, menos del 30 %, menos del 20 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 2 % o incluso menos del 1 % de 'fuga' del producto génico expresado a otros órganos o tejidos distintos del músculo, como pulmón, hígado, cerebro, riñón y/o bazo.

"Expresión específica del músculo liso", tal como se usa en la solicitud, se refiere a la expresión preferencial o predominante de un gen (trans) (como ARN y/o polipéptido) en células y tejidos del músculo liso, en comparación con otros (es decir, genes no lisos). polipéptido) músculo) células o tejidos. Según modalidades particulares, al menos el 50%, más particularmente al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de la expresión del transgén ocurre dentro de las células del músculo o tejido. De acuerdo con una modalidad particular, la expresión específica del músculo liso implica que haya menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10%, menos del 5%, menos del 2%, o incluso menos del 1% de "fuga" del producto génico expresado a otros órganos o tejidos distintos del músculo liso.

Los elementos reguladores de ácidos nucleicos de la presente invención comprenden una secuencia artificial mediante la combinación de dos o más elementos reguladores específicos del diafragma descritos en el presente documento y un diafragma de elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón descrito en el presente documento. Como se muestra en la sección experimental, la combinación de dos elementos reguladores específicos del diafragma descritos en este documento y un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón como se describe en este documento condujo a una expresión transgénica robusta en el diafragma, el músculo liso, el músculo esquelético y de corazón, más particularmente en el músculo del diafragma, esquelético y de corazón. Más particularmente, los dos elementos reguladores específicos del diafragma y los elementos reguladores específicos del músculo esquelético y de corazón que actúan sinérgicamente como un nuevo elemento regulador para mejorar la expresión transgénica específica del

diafragma, músculo liso, músculo esquelético y de corazón, más particularmente para mejorar la expresión transgénica específica del músculo del diafragma, esquelético y cardíaco. Se ha demostrado además que la adición de un tercer elemento regulador específico del diafragma descrito en el presente documento a esta combinación podría
5 aumentar aún más la expresión transgénica específica del diafragma, músculo cardíaco, del músculo liso y del músculo esquelético, más particularmente de forma específica del diafragma, la expresión transgénica del músculo específico esquelético y de corazón, de una manera sinérgica.

Como se utiliza en el presente documento, "expresión específica del músculo
10 esquelético, cardíaco, del músculo liso y del diafragma" se refiere a la expresión preferencial o predominante de un gen (trans) en el tejido o las células del músculo esquelético, cardíaco y/o del diafragma, del músculo liso. De acuerdo con modalidades particulares, al menos el 50%, más particularmente al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%,
15 al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% de la expresión de transgén se produce dentro del diafragma, el músculo liso, tejido o células del músculo esquelético y de corazón. Así, según modalidades particulares, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10%, menos del 5%, menos del 2%, o incluso menos del 1% de la expresión transgénica ocurre en un órgano o tejido que no sea el
20 músculo del diafragma, el músculo liso, músculo esquelético y de corazón.

Como se usa en el presente documento, "expresión específica del diafragma, músculo esquelético y de corazón" se refiere a la expresión preferencial o predominante de un transgén en el diafragma, células del músculo de esquelético y/o de corazón. De acuerdo con modalidades particulares al menos 50%, más particularmente al menos
25 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99% o el 100 % de la expresión de transgén se produce dentro del diafragma, las células y el tejido del músculo de esquelético y/o de corazón. Por lo tanto, de acuerdo con modalidades particulares, menos del 50 %, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10%, menos del 5%, menos del
30 2% o incluso menos del 1% de la expresión del transgén ocurre en un órgano o tejido que no sea el diafragma, músculo esquelético y de corazón.

En las modalidades, la invención se refiere a un elemento regulador de ácido nucleico para mejorar la expresión génica específica del músculo, en particular la expresión génica específica del diafragma, músculo liso, músculo esquelético y de
35 corazón, más particularmente expresión génica específica del diafragma, músculo esquelético y de corazón que comprende, que esencialmente consiste de, o que

consiste de un elemento regulador específico del diafragma que comprende, que esencialmente consiste de, o que consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, Dph-CRE02), o un fragmento funcional del mismo, un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente o consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, Dph-CRE04), o un fragmento funcional del mismo, y un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que comprende, esencialmente consiste de, o consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, CSK-SH5), o un fragmento funcional de la misma. En las modalidades particulares, la invención se relaciona con un elemento regulador de ácido nucleico para mejorar la expresión génica específica del músculo, en particular expresión génica específica del diafragma, músculo liso, músculo esquelético y de corazón, más particularmente expresión génica específica del diafragma, músculo esquelético y de corazón, que comprende, esencialmente consiste de, o consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 (Dph-CRE02), o un fragmento funcional de la misma, el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 (Dph- CRE04), o un fragmento funcional del mismo, y el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:1 (CSK-SH5) o un fragmento funcional del mismo. En las modalidades adicionales, el elemento regulador de ácido nucleico comprende además un elemento regulador específico del diafragma que comprende esencialmente o consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, Dph-CRE06), o un fragmento funcional del mismo, preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (Dph- CRE06), o un fragmento funcional del mismo.

En las modalidades, la invención se refiere a un elemento regulador de ácido nucleico para mejorar la expresión génica específica del músculo, en particular la expresión génica específica del diafragma, músculo liso, esquelético y de corazón, más particularmente la expresión génica específica del diafragma, músculo esquelético y de corazón, que comprende, que esencialmente consiste de, o que consiste de un elemento regulador específico del diafragma, que esencialmente consiste de, o que

consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, Dph-CRE02), o un fragmento funcional del mismo; un elemento regulador específico del diafragma, que esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, Dph-CRE06), o un fragmento funcional del mismo; y un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que comprende, esencialmente consiste de, o consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene una g al menos 95% de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, CSk-SH5), o un fragmento funcional de la misma. En las modalidades particulares, la invención se relaciona con un elemento regulador de ácido nucleico para mejorar la expresión génica específica del músculo, en particular la expresión génica específica del músculo el del diafragma, esquelético y cardíaco y del músculo liso, más particularmente expresión génica específica del músculo del diafragma, cardíaco y esquelético, que comprende, esencialmente consiste de, o consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 (Dph-CRE02), o un fragmento funcional de la misma; el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (Dph-CRE06), o un fragmento funcional del mismo, y el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5), o un fragmento funcional del mismo. En las modalidades adicionales, el elemento regulador de ácido nucleico comprende además un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente o consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, Dph - CRE04), o un fragmento funcional del mismo, preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 (Dph-CRE04) o un fragmento funcional del mismo.

En las modalidades, la invención se refiere a un elemento regulador de ácido nucleico para mejorar la expresión génica específica del músculo, en particular la expresión génica específica del diafragma, músculo liso, musculo esquelético y de corazón, más particularmente la expresión génica específica del diafragma, músculo esquelético y de corazón, que comprende , que esencialmente consiste de, o que consiste de un elemento regulador específico del diafragma, que esencialmente consiste de, o que consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95%

de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, Dph-CRE04), o un fragmento funcional del mismo; un elemento regulador específico del diafragma, que esencialmente consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, Dph-CRE06), o un fragmento funcional del mismo; y un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que comprende, esencialmente consiste de, o consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, CSK-SH5), o un fragmento funcional de la misma. En las modalidades particulares, la invención se relaciona con un elemento regulador de ácido nucleico para mejorar la expresión génica específica del músculo, en particular expresión génica específica del diafragma, músculo liso, músculo esquelético y de corazón, más particularmente expresión génica específica del diafragma, músculo esquelético y de corazón, que comprende, esencialmente consiste de, o consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO3 (Dph-CRE04), o un fragmento funcional de la misma; el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:4 (Dph-CRE04) -CRE06), o un fragmento funcional del mismo, y el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en la SEC I. D NO:1 (CSK-SH5), o un fragmento funcional del mismo. En las modalidades adicionales, el elemento regulador de ácido nucleico comprende además un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente o consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad a la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, Dph-CRE02), o un fragmento funcional del mismo, preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 (Dph-CRE02) o un fragmento funcional del mismo.

Al menos dos elementos reguladores específicos del diafragma y los elementos reguladores específicos del músculo esquelético y de corazón se pueden combinar en cualquier orden en los elementos reguladores de ácido nucleico descritos en este documento. Los elementos pueden combinarse en tándem o los elementos reguladores pueden combinarse con uno o más nucleótidos intermedios o flanqueantes (por ejemplo, nucleótidos utilizados con fines de clonación) entre uno o más de los elementos reguladores.

En las modalidades, el elemento regulador de ácido nucleico comprende, esencialmente, o consiste de un elemento regulador específico del diafragma que comprende, que esencialmente consiste de, o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 5 (por ejemplo, Dph-CRE02-CRE04) y un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que comprende esencialmente o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, CSk-SH5) o un fragmento funcional que comprende la misma. a un elemento regulador de ácido nucleico para mejorar la expresión génica específica del músculo, en particular la expresión génica específica del músculo del diafragma, músculo liso, esquelético y de corazón, más particularmente la expresión génica específica del músculo esquelético y de corazón, que comprende, esencialmente consiste de, o que consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 5 (Dph-CRE02-CRE0 4) y el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5) o un fragmento funcional de la misma. En las modalidades adicionales, el elemento regulador de ácido nucleico comprende además un elemento regulador específico del diafragma que comprende, o esencialmente consiste de, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, Dph - CRE06), preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (Dph-CRE06), o un fragmento funcional del mismo.

En las modalidades, el elemento regulador de ácido nucleico comprende, esencialmente, o consiste de un elemento regulador específico del diafragma que comprende, que esencialmente consiste de, o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 6 (por ejemplo, Dph-CRE02-CRE06) y un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que comprende esencialmente o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, CSk-SH5) o un fragmento funcional que comprende la misma. a un elemento regulador de ácido nucleico para mejorar la expresión génica específica del músculo, en particular la expresión génica específica del diafragma, músculo liso, músculo esquelético y de corazón, más particularmente la expresión génica específica del músculo esquelético y de corazón, que comprende, esencialmente consiste de, o que consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 6 (Dph-CRE02-CRE0 6) y el elemento regulador específico del músculo esquelético y

de corazón que esencialmente consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5) o un fragmento funcional de la misma. comprende un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente o consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la

5 secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, Dph-CRE04), preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 (Dph-CRE04), o un fragmento funcional de la misma.

En las modalidades, el elemento regulador de ácido nucleico comprende,

10 esencialmente, o consiste de un elemento regulador específico del diafragma que comprende, que esencialmente consiste de, o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 7 (por ejemplo, Dph-CRE04-CRE06) y un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que comprende esencialmente o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1

15 (por ejemplo, CSk-SH5) o un fragmento funcional que comprende la misma. a un elemento regulador de ácido nucleico para potenciar la expresión génica específica del músculo, en particular la expresión génica específica del músculo del diafragma, músculo liso, esquelético y de corazón, más particularmente expresión génica específica del músculo diafragma, esquelético y de corazón que comprende,

20 esencialmente consiste de, o consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 7 (Dph-CRE04-CRE06) y el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5) o un fragmento

25 funcional de la misma. un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente o consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, Dph-CRE02), preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida

30 en SEQ ID NO: 2 (Dph-CRE02), o un fragmento funcional de la misma. elemento regulador que comprende, esencialmente consiste de, o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 9 (por ejemplo, Dph-CRE02-CRE04-CRE06) y un elemento regulador específico de músculo esquelético y de corazón que comprende, esencialmente consiste de, o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en

35 SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, CSk-SH5) o un fragmento funcional de la misma. En las modalidades particulares, la invención se refiere a un elemento regulador de ácido nucleico para mejorar la expresión génica específica del músculo, en particular la

expresión génica específica del diafragma, músculo liso, músculo esquelético y cardíaco, más particularmente expresión génica específica del músculo del diafragma, esquelético y de corazón, que comprende, que esencialmente consiste de, o que consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 9 (Dph-CRE02-CRE04-CRE06) y el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón elemento que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5) o un fragmento funcional del mismo.

En las modalidades, el elemento regulador de ácido nucleico comprende, esencialmente, o consiste de un elemento regulador específico del diafragma que comprende, que esencialmente consiste de, o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 8 (por ejemplo, Dph-CRE06-CRE04) y un elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que comprende esencialmente o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:: 1 (por ejemplo, CSk-SH5) o un fragmento funcional del mismo. En las modalidades particulares, la invención se refiere a un elemento regulador de ácido nucleico para mejorar la expresión génica específica del músculo, en particular la expresión génica específica del músculo del diafragma, liso, esquelético y de corazón, más particularmente la expresión génica específica del músculo del diafragma, esquelético y cardíaco, que comprende, esencialmente consiste de, o que consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 8 (Dph-CRE06-CRE04) y el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5) o un fragmento funcional del mismo. En las modalidades adicionales, el elemento regulador de ácido nucleico comprende además un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente consiste de, o que consiste de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:2 (por ejemplo, Dph-CRE02), preferentemente el elemento regulador específico del diafragma elemento que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:2 (Dph-CRE02), o un fragmento funcional del mismo.

En las modalidades específicas, el elemento regulador de ácido nucleico comprende, esencialmente consiste en, o consiste en la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 10 (Dph-CRE02 - Dph-CRE04 - CSk-SH5). En las

modalidades adicionales, el elemento regulador de ácido nucleico comprende además un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente consiste en, o consiste en la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, Dph-CRE06), preferentemente el elemento regulador específico del diafragma. elemento que consta de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (Dph-CRE06), o un fragmento funcional del mismo. En las modalidades específicas, el elemento regulador de ácido nucleico comprende, esencialmente consiste en, o consiste en la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 11 (Dph-CRE02 - Dph-CRE06 - CSk-SH5). En las modalidades adicionales, el elemento regulador de ácido nucleico comprende además un elemento regulador específico del diafragma que comprende, esencialmente consiste en, o consiste en la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, Dph-CRE04), preferentemente el elemento regulador específico del diafragma. elemento que consta de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:3 (Dph-CRE04), o un fragmento funcional del mismo.

En las modalidades específicas, el elemento regulador de ácido nucleico comprende, esencialmente o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 12 (Dph-CRE04 - Dph-CRE06 - CSk-SH5). El elemento regulador de ácido comprende, esencialmente o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 13 (Dph-CRE06 - Dph-CRE04 - CSk-SH5). En las modalidades adicionales, el elemento regulador de ácido nucleico comprende además un elemento regulador específico del diagrama que comprende, esencialmente consiste de, o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, Dph-CRE02), preferentemente el elemento regulador específico del diafragma que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 (Dph-CRE02), o un fragmento funcional del mismo. En las modalidades específicas, el elemento regulador de ácido nucleico comprende, esencialmente consiste de, o consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 14 (Dph-CRE02 - Dph-CRE04 - Dph-CRE06 – CSk-SH5).

Los elementos reguladores de ácidos nucleicos descritos en este documento se pueden usar en un casete de expresión de ácidos nucleicos, Por consiguiente, en un aspecto, proporciona la invención para el uso de los elementos reguladores de ácidos nucleicos como se describe en este documento en un casete de expresión de ácidos nucleicos.

En un aspecto, la invención proporciona un casete de expresión de ácido nucleico que comprende un elemento regulador de ácido nucleico como se describe en

el presente documento, unido operativamente a un promotor. En las modalidades, el casete de expresión de ácido nucleico no contiene un transgén. Dicho casete de expresión de ácido nucleico puede usarse para impulsar la expresión de un gen endógeno. En las modalidades preferidas, el casete de expresión de ácido nucleico comprende un elemento regulador de ácido nucleico como se describe en el presente documento, unido operativamente a un promotor y un transgén.

Como se usa en el presente documento, el término "casete de expresión de ácido nucleico" se refiere a moléculas de ácido nucleico que incluyen uno o más elementos de control transcripcional (tales como, entre otros, promotores, potenciadores y/o elementos reguladores, secuencias de poliadenilación e intrones) que dirigen (trans)expresión génica en uno o más tipos de células, tejidos u órganos deseados. Normalmente, también contendrán un transgén, aunque también se prevé que un casete de expresión de ácido nucleico dirija la expresión de un gen endógeno en una célula en la que el ácido nucleico se inserta el casete de ácido.

El término "unido operativamente" como se usa en el presente documento se refiere a la disposición de varios elementos de moléculas de ácido nucleico en relación con cada uno de manera que los elementos estén funcionalmente conectados y puedan interactuar entre sí. Dichos elementos pueden incluir, entre otros, un promotor, un potenciador y/o un elemento regulador, una secuencia de poliadenilación, uno o más intrones y/o exones, y una secuencia de codificación de un gen de interés para ser expresado (es decir, el transgén). Los elementos de la secuencia de ácido nucleico, cuando se orientan o vinculados operativamente, actúan juntos para modular la actividad de cada uno y, en última instancia, pueden afectar el nivel de expresión del transgén. Por modular se entiende aumentar, disminuir o mantener el nivel de actividad de un elemento en particular. La posición relativa de cada elemento a otros elementos puede expresarse en términos del término 5' y el término 3' de cada elemento, y la distancia entre cualquier elemento en particular puede estar referenciada por el número de nucleótidos que intervienen, o pares de bases, entre los elementos. Como entiende el experto en la materia, ligado operativamente implica actividad funcional y no está necesariamente relacionado con un enlace posicional natural. De hecho, cuando se usan en casetes de expresión de ácido nucleico, los elementos reguladores normalmente serán ubicado inmediatamente aguas arriba del promotor (aunque este suele ser el caso, definitivamente no debe interpretarse como una limitación o exclusión de posiciones dentro del casete de expresión de ácido nucleico), pero este no tiene por qué ser el caso *in vivo*. Por ejemplo, una secuencia de elementos reguladores que se produce naturalmente aguas abajo de un gen cuya transcripción afecta puede funcionar

de la misma manera cuando se ubica aguas arriba del promotor. Por tanto, según una modalidad específica, el efecto regulador o potenciador del elemento regulador es independiente de la posición.

Tal como se utiliza en la solicitud, el término "promotor" se refiere a las
 5 secuencias de ácido nucleico que regulan, ya sea directa o indirectamente, la transcripción de las secuencias codificantes de ácido nucleico correspondientes a las que están unidas operativamente (por ejemplo, un transgén o un gen endógeno).
 funcionan solos para regular la transcripción o pueden actuar en conjunto con una o más secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadores o silenciadores, o elementos
 10 reguladores). En el contexto de la presente solicitud, un promotor normalmente se une operativamente a un elemento regulador como se describe en este documento para regular la transcripción de un transgén. Cuando un elemento regulador como se describe en el presente documento está vinculado operativamente tanto a un promotor como a un transgén, el elemento regulador puede (1) conferir un grado significativo de
 15 músculo liso específico del músculo, en particular del diafragma expresión *in vivo* (y/o en mioblastos, miocitos o músculo -líneas celulares derivadas, en particular mioblastos esqueléticos y de corazón, miocitos esqueléticos y de corazón, o líneas celulares derivadas de músculo esquelético y de corazón *in vitro*) del transgén, y/o (2) puede aumentar el nivel de expresión del transgén en el músculo , en particular diafragma,
 20 músculo liso, músculo esquelético y de corazón, más particularmente diafragma, músculo esquelético y de corazón y/o en mioblastos, miocitos o líneas celulares derivadas de músculo, en particular mioblastos lisos, esqueléticos y de corazón, miocitos lisos, esqueléticos y de corazón, o líneas celulares derivadas de músculo liso, esquelético y de corazón *in vitro*, más particularmente mioblastos esqueléticos y
 25 cardíacos y, miocitos esqueléticos y de corazón, o líneas celulares derivadas de músculo esquelético y de corazón *in vitro*).

El promotor puede ser homólogo (es decir, de la misma especie que el animal, en un mamífero particular, a transfectar con el casete de expresión de ácido nucleico) o heterólogo (es decir, de una fuente distinta a la especie del animal, en un mamífero
 30 particular, ser transfectado con el casete de expresión). Como tal, la fuente del promotor puede ser cualquier virus (por ejemplo, CMV o citomegalovirus), cualquier organismo unicelular procariota o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, o incluso puede ser un promotor sintético (es decir, que tenga un origen no natural) siempre que el promotor sea funcional en combinación con los elementos
 35 reguladores descritos en el presente documento. En las modalidades preferidas, el promotor es un promotor de mamífero, en particular un promotor murino o humano.

El promotor puede ser un promotor inducible o constitutivo.

El enriquecimiento en TFBS específico de músculo en los elementos reguladores de ácido descritos en este documento permite en principio que los elementos reguladores dirijan la expresión específica de músculo incluso desde un promotor que en sí mismo no es específico de músculo (por ejemplo, promotor de CAG, promotor de CMV). Los elementos reguladores descritos en el presente documento se pueden usar en casetes de expresión de ácido nucleico junto con cualquier promotor, en particular, el promotor puede ser específico de tejido, por ejemplo, específico de músculo o expresado de forma ubicua. Los ejemplos no limitantes de promotores expresados de forma ubicua incluyen polimerasa II (pol II), promotores de polimerasa III (pol III) (por ejemplo, U6) y promotores quiméricos de pol III. Estos promotores pueden ser adecuados para expresar, por ejemplo, ARN no codificantes. Preferentemente, los casetes de expresión de ácido nucleico descritos en este documento comprenden un músculo -promotor específico, en particular un diafragma, músculo liso, corazón y/o músculo esquelético promotor específico, más particularmente un diafragma, corazón y/o músculo esquelético I promotor específico del músculo, con el fin de aumentar la especificidad del músculo, en particular la especificidad del diafragma, el músculo liso, el corazón y/o el músculo esquelético, más particularmente la especificidad del diafragma, el corazón y/o el músculo esquelético, y/o reducir fuga de expresión en otros tejidos.

Los ejemplos no limitativos de promotores específicos de músculo incluyen el promotor de desmina (DES); el promotor sintético SPc5-12 (SPc5-12); el promotor alfa-actina1 (ACTA1); el promotor de creatina quinasa muscular (CKM); el Four el promotor de la proteína 1 de los dominios LIM y medio (FHL1); el promotor de la actinina alfa 2 (ACTN2); el promotor de la filamina-C (FLNC); el promotor de la ATPasa 1 de calcio del retículo sarcoplásmico/endoplasmático (ATP2A1); el promotor de la troponina I tipo 1 (TNNT1); el promotor de la troponina I tipo 2 (TNNT2); el promotor de la troponina T tipo 1 (TNNT1); el promotor de la troponina T tipo 2 (TNNT2); el promotor de la troponina T tipo 3 (TNNT3); el promotor de la miosina-1 (MYH1) promotor; el promotor de miosina-2 (MYH2); el promotor de sarcolipina (SLN); el promotor de proteína de unión a miosina C1 (MYBPC1); el promotor de enolasa (ENO3); el promotor de anhidrasa carbónica 3 (CA3); el promotor de la cadena ligera de miosina del músculo esquelético rápido (MYLPF) fosforilable; el promotor de la tropomiosina 1 (TPM1); el promotor de la tropomiosina 2 (TPM2); la tropomiosina de la cadena alfa-3 n (TPM3); el promotor de la proteína 2 que contiene el dominio repetido de anquirina (ANKRD2); el promotor de la cadena pesada de miosina (MHC); el promotor de la cadena pesada de alfa miosina

(α MHC); el promotor de la cadena ligera de miosina (MLC); el promotor de creatina quinasa muscular (MCK); el promotor de miosina cadena ligera 1 (MYL1); el promotor de miosina, cadena ligera 2 (MYL2); el promotor de mioglobina (MB); el promotor de troponina C tipo 1 (TNNC1); el promotor de troponina C tipo 2 (TNNC2); el promotor de Titin-Cap (TCAP); el promotor de miosina, cadena pesada 7 (MYH7); el promotor de aldolasa A (ALDOA); el promotor de cadena pesada de miosina 11 (Myh11); el promotor de transgelina (Tagln) (también conocido como promotor SM22 α), el promotor de actina alfa 2, músculo liso (Acta2), promotores sintéticos como se describe en Li et al. (1999, *Nat Biotechnol.* 17:241-245), tales como el promotor SPc5-12, el promotor dMCK y el promotor tMCK que consisten respectivamente en un tándem doble o triple del potenciador de MCK al promotor basal de MCK como se describe en Wang et al. L. (2008, *Gene Ther.* 15:1489-1499), y el promotor MHCK7. El promotor MHCK7 es un promotor sintético específico del músculo esquelético y de corazón y se ha descrito en Salva et al. (2007. *Mol Ther* 15: 320). -9) En las modalidades preferidas, el promotor es un promotor específico de músculo seleccionado del grupo que consiste del promotor SPc5-12, el promotor DES y el promotor MHCK7.

En las modalidades particularmente preferidas, el promotor es un promotor específico de músculo de mamífero, en particular un promotor específico de músculo murino o humano.

En las modalidades, el promotor es el promotor sintético SPc5 - 12. El promotor SPc5 - 12 es un promotor sintético específico de músculo y se ha descrito en Li et al. (1999, *Nat Biotechnol.* 17:241 - 245). el promotor es el promotor SPc5-12 como se establece en SEQ ID NO: 15. En las modalidades, el promotor es el promotor MHCK7, preferentemente el promotor MHCK7 como se establece en SEQ ID NO: 56. En las modalidades, el promotor es el promotor de desmina, preferentemente, el promotor de desmina como se establece en SEQ ID NO:57.

Además, no es necesario que el promotor sea el promotor del transgén en el casete de expresión de ácido nucleico, aunque es posible que el transgén se transcriba a partir de su propio promotor.

Para minimizar la longitud del casete de expresión de ácido nucleico, los elementos reguladores pueden vincularse a promotores mínimos o versiones abreviadas de los promotores descritos en el presente documento. parte de un promotor de tamaño completo todavía capaz de impulsar la expresión, pero que carece al menos de parte de la secuencia que contribuye a regular (por ejemplo, la expresión específica de tejido). Esta definición cubre ambos promotores de los cuales se han eliminado los

elementos reguladores (específicos de tejido) - que es capaz de impulsar la expresión de un gen pero ha perdido su capacidad de expresar ese gen de una manera específica de tejido y promotores de los cuales se han eliminado elementos reguladores (específicos de tejido) que son capaces de impulsar (posiblemente disminuida) la expresión de un gen, pero no necesariamente han perdido su capacidad para expresar ese gen en una forma específica de tejido.

El término 'transgén' como se usa en este documento se refiere a secuencias de ácido nucleico particulares que codifican un polipéptido o una porción de un polipéptido que se expresará en una célula en la que se introduce la secuencia de ácido nucleico. Sin embargo, también es posible que los transgenes se expresen como ARN, típicamente para controlar (por ejemplo, reducir) la cantidad de un polipéptido particular en una célula en la que se inserta la secuencia de ácido nucleico. Estas moléculas de ARN incluyen, entre otras, moléculas que ejercen su función a través de la interferencia de ARN (shRNA, RNAi), micro -Regulación de ARN (miR) (que puede usarse para controlar la expresión de genes específicos), ARN no codificante (ncRNA), ARN largo no codificante (lncRNA), ARN guía (gRNA), ARN catalítico, ARN antisentido, ARN aptámeros, etc. La forma en que se introduce la secuencia de ácido nucleico en una célula no es esencial para la invención, puede ser, por ejemplo, a través de la integración en el genoma o como un plásmido episomal. Cabe señalar que la expresión del transgén puede estar restringida a un subconjunto de las células en donde se introduce la secuencia de ácido nucleico. El término "transgén" incluye (1) una secuencia de ácido nucleico que no se encuentra naturalmente en la célula (es decir, una secuencia de ácido nucleico heteróloga); (2) una secuencia de ácido nucleico secuencia que es una forma mutante de una secuencia de ácido nucleico que se encuentra naturalmente en la célula en la que se ha introducido; (3) una secuencia de ácido nucleico que sirve para agregar copias adicionales de la misma secuencia de ácido nucleico (es decir, homóloga) o similar de origen natural en la célula en la que se ha introducido; o (4) una secuencia de ácido nucleico homóloga o de origen natural silenciosa cuya expresión se induce en la célula en la que se ha introducido.

El transgén puede ser homólogo o heterólogo al promotor (y/o al animal, en un mamífero particular, en donde se introduce, por ejemplo, en los casos en los que el casete de expresión de ácido nucleico se usa para terapia génica).

El transgén puede ser una secuencia de ADNc o ADN genómico de longitud completa, o cualquier fragmento, subunidad o mutante del mismo que tenga al menos alguna actividad biológica. En particular, el transgén puede ser un minigen, es decir, una secuencia de genes que carece de la mayoría o de todas sus secuencias intrónicas. Por

tanto, el transgén puede contener opcionalmente secuencias de intrones. Opcionalmente, el transgén puede ser una secuencia de ácido nucleico híbrida, es decir, una construida a partir de fragmentos de ADNc y/o ADN genómico-homólogos y/o heterólogos. Por "forma mutante" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que
5 contiene uno o más nucleótidos que son diferentes de la secuencia natural o natural, es decir, la secuencia de ácido nucleico mutante contiene una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de nucleótidos. , la eliminación y/o la inserción pueden dar lugar a un producto génico (es decir, proteína o ácido nucleico) que es diferente en su secuencia de aminoácidos/ácidos nucleicos de la secuencia de aminoácidos/ácidos
10 nucleicos de tipo silvestre. La preparación de dichos mutantes es bien conocida en la técnica. En algunos casos, el transgén también puede incluir una secuencia que codifica un péptido líder o una secuencia señal de modo que el producto del transgén sea secretado por la célula.

En las modalidades particulares, el transgén es optimizado por codones. Como
15 se usa en el presente documento, los términos "optimización de codones", "codón optimizado" y similares se refieren a cambios en la composición de codones de una secuencia de ácido nucleico, en particular un transgén, sin alterar la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, para una expresión óptima en una célula huésped u organismo. Como se muestra en la sección experimental, la optimización de codones
20 del transgén puede mejorar aún más la expresión específica del músculo, en particular el diafragma, el músculo liso, el músculo esquelético y de corazón, más particularmente expresión del transgén específica del diafragma, músculo esquelético y de corazón.

El transgén que puede estar contenido en los casetes de expresión de ácido nucleico descritos en este documento codificando típicamente un producto génico tal
25 como ARN o un polipéptido (proteína). El transgén también puede incluir miembros del sistema CRISPR/Cas, tal como Cas y/o uno o más gARNs.

En las modalidades, el transgén codifica una proteína terapéutica.

La proteína terapéutica puede ser una proteína secretable o una proteína no secretada. Los ejemplos no limitantes de proteínas secretables, en particular proteínas
30 terapéuticas secretables, incluyen factores de coagulación, tales como factor VIII o factor IX, insulina, eritropoyetina, lipoproteína lipasa, anticuerpos o nanocuerpos, factores de crecimiento, factores angiogénicos, citocinas, quimiocinas, factores plasmáticos, etc. Los ejemplos no limitantes de proteínas no secretadas incluyen enzimas metabólicas (por ejemplo, tafazzin), proteínas lisosomales, proteínas
35 nucleares, etc. La proteína terapéutica también puede ser una proteína estructural. Los

ejemplos no limitantes de proteínas estructurales, en particular proteínas terapéuticas estructurales, incluyen distrofina y sarcoglicanos.

Una lista no exhaustiva y no limitativa de transgenes prevista en la solicitud incluye transgenes que codifican factores angiogénicos para la angiogénesis terapéutica (por ejemplo, VEGF, PlGF o moléculas guía como efrinas, semaforinas, Slits y netrinas o sus receptores afines); transgenes que codifican factores de coagulación (por ejemplo, factor VIII o factor IX), transgenes que codifican insulina, transgenes que codifican lipoproteína lipasa, transgenes que codifican factores plasmáticos, transgenes que codifican citocinas, quimiocinas y/o factores de crecimiento (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), interferón- α , interferón- β , interferón- γ , interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 8 (IL-8), interleucina 9 (IL-9), interleucina 10 (IL-10), interleucina 11 (IL-11), interleucina 12 (IL-12), ligando 5 de quimiocina (motivo C-X-C) (CXCL5), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de células madre (SCF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y factor de necrosis tumoral (TNF); transgenes que codifican proteínas involucradas en el manejo del calcio (p. ej. ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA), fosfolambano, calsecuestrina, intercambiador de sodio-calcio, canal de calcio tipo L, receptores de rianodina), transgenes que codifican calcineurina; transgenes que codifican microdistrofina; transgenes que codifican folistatina (FST); transgenes que codifican miotubularina 1 (MTM1); transgenes que codifican disferlina; transgenes que codifican distrofina; transgenes que codifican enzimas metabólicas: transgenes que codifican proteínas nucleares; transgenes que codifican proteínas mitocondriales (por ejemplo, tafazzin); transgenes que codifican proteínas lisosomales (por ejemplo, α -glucosidasa ácida (GAA) (en forma secretada o nativa), alfa-galactosidasa A, LAMP2); transgenes que codifican canales iónicos (por ejemplo, SCN5A); transgenes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo del glucógeno (por ejemplo, glucógeno sintasa (GYS2), enzima desramificadora de glucógeno (AGL), enzima ramificadora de glucógeno (GBE1), glucógeno fosforilasa muscular (PYGM), fosfofructoquinasa muscular (PFKM), fosfoglicerato mutasa (PGAM2), aldolasa A (ALDOA), β -enolasa (ENO3) o Glucogenina-1 (GYG1)); transgenes que codifican enzimas deficientes en mucopolisacaridosis (por ejemplo, α -L-iduronidasa, iduronato sulfatasa, heparán sulfamidasa, N-acetilglucosaminidasa, heparán- α -glucosaminidasa N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, β -galactosidasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa o hialuronidasa); transgenes que

codifican sarcoglicano (por ejemplo, alfa-sarcoglicano, beta-sarcoglicano y gamma-sarcoglicano); transgenes que codifican anoctamina 5; transgenes que codifican calpaína 3; transgenes que codifican anticuerpos, transgenes que codifican nanocuerpos, transgenes que codifican proteínas negativas dominantes antivirales; y
 5 fragmentos de transgenes, subunidades o mutantes de los mismos.

En las modalidades particulares, el transgén codifica un sarcoglicano, preferentemente β -sarcoglicano, más preferentemente β -sarcoglicano humano tal como el transgén establecido en SEQ ID NO:18. En las modalidades adicionales, el transgén que codifica el β -sarcoglicano humano tiene codones optimizados, como el transgén
 10 establecido en SEQ ID NO:19. En las modalidades particulares, el transgén codifica una proteína lisosomal, preferentemente el transgén codifica una proteína lisosomal seleccionada del grupo que consiste de α -glucosidasa ácida (GAA) (por ejemplo, GAA como una forma secretada o nativa), alfa-galactosidasa A y LAMP2. En otras modalidades particulares, el transgén codifica α -glucosidasa ácida (GAA),
 15 preferentemente GAA humana tal como el transgén establecido en SEQ ID NO: 58. Además, el transgén que codifica GAA humana tiene codones optimizados, tal como el transgén establecido en SEQ ID NO: 59. El transgén también puede ser un gen indicador, es decir, el transgén codifica un indicador como una enzima luciferasa. En las modalidades particulares, el transgén codifica una luciferasa, por ejemplo, el transgén
 20 puede tener la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 20.

El transgén también puede codificar una proteína inmunogénica. Los ejemplos no limitantes de proteínas inmunogénicas incluyen epítomos y antígenos derivados de un patógeno.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunogénico" se refiere
 25 a una sustancia o composición capaz de provocar una respuesta inmunitaria.

También se pueden incorporar otras secuencias en el casete de expresión de ácido nucleico descrito en el presente documento, normalmente para aumentar o estabilizar aún más la expresión del producto transgénico (por ejemplo, intrones y/o secuencias de poliadenilación).

Se puede utilizar cualquier intrón en los casetes de expresión descritos en este documento. El término "intrón" abarca cualquier porción de un intrón completo que sea lo suficientemente grande como para ser reconocida y empalmada por el aparato de empalme nuclear. Por lo general, las secuencias de intrones cortas y funcionales son preferido para mantener el tamaño del casete de expresión lo más pequeño posible, lo
 35 que facilita la construcción y manipulación del casete de expresión. En algunas

modalidades, el intrón se obtiene de un gen que codifica la proteína codificada por la secuencia codificante dentro del casete de expresión. El intrón se puede ubicar en 5' con respecto a la secuencia de codificación, en 3' con respecto a la secuencia de codificación o dentro de la secuencia de codificación. Una ventaja de ubicar el intrón 5' respecto a la secuencia codificante es minimizar la posibilidad de que el intrón interfiera con la función de la señal de poliadenilación. En las modalidades, el casete de expresión de ácido nucleico descrito en el presente documento comprende además un intrón. Ejemplos no limitantes de intrones adecuados son el intrón Virus Diminuto de Ratón (MVM), el intrón beta-globina (betaIVS-II), el intrón A del factor IX (FIX), el intrón t pequeño del virus simio 40 (SV40) y el intrón beta-actina. intrón MVM (SEQ ID NO: 16).

Cualquier señal de poliadenilación que dirija la síntesis de una cola de poliA es útil en los casetes de expresión descritos en el presente documento, ejemplos de los cuales son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las señales de poliadenilación de ejemplo incluyen, entre otras, secuencias de poliA derivadas de El gen tardío del virus simio 40 (SV40), la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH), el gen de β -globina de conejo mínimo (mRBG) y el sitio poliA sintético (SPA) como se describe en Levitt et al. (1989, Genes Dv 3:1019-1025).

Preferentemente, la señal de poliadenilación es la señal de poliadenilación establecida en SEQ ID NO:17.

En las modalidades particulares, la invención proporciona un casete de expresión de ácido nucleico que comprende un elemento regulador de ácido nucleico que esencialmente consiste de o que consiste del elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 (Dph- CRE04) o un fragmento funcional del mismo, el elemento regulador específico del diafragma que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (Dph-CRE06) o un fragmento funcional del mismo, y elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5) o un fragmento funcional del mismo, preferentemente un elemento regulador de ácido nucleico que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 12 (Dph-CRE04 - Dph-CRE06 - CSk-SH5), unido operativamente a un promotor, preferentemente el promotor SPc5-12, y un transgén que codifica el β -sarcoglicano humano (por ejemplo, el transgén establecido en SEQ ID NO: 18, preferentemente el transgén con codones optimizados establecido en SEQ ID NO: 19). El casete comprende además un intrón MVM. En las modalidades, el casete de expresión de ácido

nucleico comprende además una señal de poliadenilación, preferentemente una señal de poliadenilación establecido en SEQ ID NO:17.

En las modalidades particulares, la invención proporciona un casete de expresión de ácido nucleico que comprende un elemento regulador de ácido nucleico que esencialmente consiste del elemento regulador específico del diafragma que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 (Dph-CRE02) o un fragmento funcional del mismo, el elemento regulador específico del diafragma que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 (Dph-CRE04) o un fragmento funcional del mismo, el elemento regulador específico del diafragma que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 (Dph-CRE06) o un fragmento funcional del mismo, y el elemento regulador específico del músculo esquelético y de corazón que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 (CSk-SH5) o un fragmento funcional del mismo, preferentemente un elemento regulador de ácido nucleico que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 14 (Dph-CRE02 - Dph-CRE04 - Dph-CRE06 - CSk-SH5), unido operativamente a un promotor, preferentemente el promotor SPc5-12, y un transgén que codifica β -sarcoglicano humano (por ejemplo, el transgén establecido en SEQ ID NO: 18, preferentemente el transgén con codones optimizados establecido en SEQ ID NO: 19). , el transgén tiene codones optimizados.

En las modalidades, el casete de expresión de ácido nucleico comprende además un intrón MVM. En las modalidades, el casete de expresión de ácido nucleico comprende además una señal de poliadenilación, preferentemente una señal de poliadenilación establecido en SEQ ID NO:17.

El elemento regulador de ácidos nucleicos y el casete de expresión de ácidos nucleicos descritos en el presente documento se pueden usar como tales o, por lo general, pueden ser parte de un vector de ácidos nucleicos. o un casete de expresión de ácido nucleico como se describe aquí en un vector, en particular un vector de ácido nucleico.

En un aspecto, la invención también proporciona un vector que comprende un elemento regulador de ácido nucleico como se describe en este documento.

El término 'vector' como se usa en la solicitud se refiere a moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, ADN de doble cadena, que puede tener insertada otra molécula de ácido nucleico (la molécula de ácido nucleico insertada) como, entre otras, una molécula de ADNc. El vector se utiliza para transportar la molécula de ácido nucleico insertada a una célula huésped adecuada. Un vector puede contener los elementos

necesarios que permiten transcribir la molécula de ácido nucleico insertada y, opcionalmente, traducir el transcrito en un polipéptido. La molécula de ácido nucleico insertada puede derivarse de la célula huésped o puede derivarse de una célula u organismo diferente. Una vez en la célula huésped, el vector puede replicarse independientemente o coincidir con el ADN cromosómico del huésped, y varias copias del vector y su contenido nucleico insertado puede generarse una molécula de ácido. Los vectores pueden ser vectores episomales (es decir, que no se integran en el genoma de una célula huésped), o pueden ser vectores que se integran en el genoma de la célula huésped. El término "vector" también puede definirse como un vehículo de administración de genes que facilita la transferencia de genes a una célula diana. Esta definición incluye vectores virales y no virales. Los vectores no virales incluyen, entre otros, lípidos catiónicos, liposomas, nanopartículas, PEG, PEI, vectores de plásmidos (por ejemplo, vectores pUC, vectores bluescript (pBS) y pBR322 o derivados de los mismos que carecen de secuencias bacterianas (minicírculos)) vectores basados en transposones (por ejemplo, vectores PiggyBac (PB) o vectores Sleeping Beauty (SB), etc. Los vectores virales se derivan de virus e incluyen, entre otros, vectores retrovirales, lentivirales, virales adenoasociados, adenovirales, virales del herpes, virales de la hepatitis o similares. Típicamente, pero no necesariamente, los vectores virales son vectores de replicación deficiente porque han perdido la capacidad de propagarse en una célula determinada ya que los genes virales esenciales para la replicación han sido eliminados del vector viral. Sin embargo, algunos vectores virales también pueden adaptarse para replicarse específicamente en un g células biológicas, como, por ejemplo, una célula cancerosa, y se utilizan normalmente para desencadenar la (onco)lisis específica de células (cancerosas). Los virosomas son un ejemplo no limitativo de un vector que comprende elementos tanto virales como no virales, en particular , combinan liposomas con un virus inactivado del VIH o de la gripe (Yamada et al., 2003) Otro ejemplo abarca los vectores virales mezclados con lípidos catiónicos.

En las modalidades preferidas, el vector es un vector viral, tal como un vector retroviral, lentiviral, adenoviral o viral adenoasociado (AAV), más preferentemente un vector AAV. Los vectores de AAV se utilizan preferentemente como vectores de AAV de doble cadena autocomplementarios (scAAV) para superar uno de los pasos limitantes en la transducción de AAV (es decir, conversión de AAV de cadena simple a cadena doble) (McCarty, 2001, 2003; Nathwani et al, 2002, 2006, 2011; Wu et al., 2008), aunque el uso de vectores AAV monocatenarios (ssAAV) también se incluye en este documento.

En las modalidades, el vector es un vector de AAV de serotipo 9 (AAV9), más particularmente un vector de AAV9 autocomplementario (scAAV9). En las modalidades,

el vector es un vector de AAV de serotipo 8 (AAV8) tal como un vector de AAV8 autocomplementario (scAAV8) o un vector AAV8 monocatenario (ssAAV8).

El vector puede ser un vector AAV cuya cápside AAV está diseñada para dirigir el vector específicamente a las células musculares. Por ejemplo, el vector puede ser un vector AAVpo1 como se describe en Tulalamba W et al. (Tulalamba W, et al. Distinct transduction de tejido muscular en ratones después de la administración sistémica de vectores AAVpo1 *Gene Ther.* (2019) <https://doi.org/10.1038/s41434-019-0106-3>).

La producción de partículas del vector AAV se puede lograr, por ejemplo, mediante la transfección transitoria de células HEK293 de mamíferos adaptadas a la suspensión, como se describe (Chahal et al. Production of adeno-associated virus (AAV) serotypes by transient transfection of HEK293 cell suspension cultures for gene delivery, *Journal of Virological Methods.* 196: 163–173 (2014); Grieger et al., Production of recombinant adeno-associated virus vectors using suspension HEK293 cells and continua cosecha del vector de los medios de cultivo para el vector clínico GMP FIX y FLT1. *Molecular Therapy.* 24: 287–297 (2016); Blessing et al., Scalable Production of AAV Vectors in Orbitally Shaken HEK293 Cells. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development.* 13: 14–26 (2019)), o por infección de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) células de insecto utilizando el sistema de vector de expresión de baculovirus (BEVS), como se describe (Kotin et al. Manufacturing Clinical Grade Recombinant Adeno-Associated Virus Using Invertebrate Cell Lines. *Human Gene Therapy.* 28: 350–360 (2017), seguido de un paso de purificación. La purificación puede basarse en la ultracentrifugación en gradiente de densidad con cloruro de cesio (CsCl), como se describe (VandenDriessche et al., 2007), o utilizando técnicas o columnas cromatográficas o por inmunoadinidad como se conoce. en la técnica El vector también puede ser un vector no viral, preferentemente un plásmido, un minicírculo o un vector basado en un transposón, como un vector basado en un vector Sleeping Beauty (SB) o un vector basado en piggyBac (PB).

El vector también puede comprender elementos virales y no virales.

En las modalidades particulares, la invención proporciona un vector que comprende un casete de expresión de ácido nucleico, un elemento regulador de ácido nucleico que consta de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 10 (Dph-CRE02 - Dph-CRE04 - CSk-SH5), un promotor, preferentemente el promotor SPc5-12, un intrón MVM, un transgén, preferentemente un transgén que codifica β -sarcoglicano humano, y una señal de poliadenilación, preferentemente la señal de poliadenilación establecido en SEQ ID NO: 17. Preferentemente, el transgén que codifica β -

sarcoglicano humano tiene codones optimizados, como el transgén establecido en SEQ ID NO: 19. En las modalidades particulares, dicho vector tiene SEQ ID NO: 26 o 27.

En las modalidades particulares, la invención proporciona un vector que comprende un casete de expresión de ácido nucleico, un elemento regulador de ácido nucleico que consta de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 13 (Dph-CRE06 - Dph-CRE04 - CSk-SH5), un promotor, preferentemente el promotor SPc5-12, un intrón MVM, un transgén, preferentemente un transgén que codifica β -sarcoglicano humano, y una señal de poliadenilación, preferentemente la señal de poliadenilación establecido en SEQ ID NO: 17. Preferentemente, el transgén que codifica β -sarcoglicano humano tiene codones optimizados, como el transgén establecido en SEQ ID NO: 19. En las modalidades particulares, dicho vector tiene SEQ ID NO: 30 o 31.

En las modalidades particulares, la invención proporciona un vector que comprende un casete de expresión de ácido nucleico, un elemento regulador de ácido nucleico que consta de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 11 (Dph-CRE02 - Dph-CRE06 - CSk-SH5), un promotor, preferentemente el promotor SPc5-12, un intrón MVM, un transgén, preferentemente un transgén que codifica β -sarcoglicano humano, y una señal de poliadenilación, preferentemente la señal de poliadenilación establecido en SEQ ID NO: 17. Preferentemente, el transgén que codifica β -sarcoglicano humano tiene codones optimizados, como el transgén establecido en SEQ ID NO: 19. En las modalidades particulares, dicho vector tiene SEQ ID NO: 32 o 33.

En las modalidades particulares, la invención proporciona un vector que comprende un casete de expresión de ácido nucleico, un elemento regulador de ácido nucleico que consta de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 12 (Dph-CRE04 - Dph-CRE06 - CSk-SH5), un promotor, preferentemente el promotor SPc5-12, un intrón MVM, un transgén, preferentemente un transgén que codifica β -sarcoglicano humano, y una señal de poliadenilación, preferentemente la señal de poliadenilación establecido en SEQ ID NO: 17. Preferentemente, el transgén que codifica β -sarcoglicano humano tiene codones optimizados, como el transgén establecido en SEQ ID NO: 19. En las modalidades particulares, dicho vector tiene SEQ ID NO: 28 o 29.

En las modalidades particulares, la invención proporciona un vector que comprende un casete de expresión de ácido nucleico, un elemento regulador de ácido nucleico que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 14 (Dph-CRE02-Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSk-SH5) , un promotor, preferentemente el promotor SPc5-12, un intrón MVM, un transgén, preferentemente un transgén que codifica β -sarcoglicano humano, y una señal de poliadenilación, preferentemente la

señal de poliadenilación establecido en SEQ ID NO: 17. En las modalidades preferidas, el transgén β -sarcoglicano humano que codifica tiene codones optimizados, como el transgén establecido en SEQ ID NO: 19. En las modalidades particulares, dicho vector tiene SEQ ID NO: 34 o 35.

5 Los casetes de expresión de ácidos nucleicos y los vectores descritos en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, para expresar proteínas que normalmente se expresan y utilizan en el músculo (es decir, proteínas estructurales), o para expresar proteínas que se expresan en el músculo y que luego se exportan al torrente sanguíneo. para el transporte a otras partes del cuerpo (es decir, proteínas secretables). Por ejemplo, los casetes de expresión y los vectores descritos en este documento se pueden usar para expresar una cantidad terapéutica de un producto genético (como un polipéptido, en particular una proteína terapéutica o ARN) con fines terapéuticos, en particular para la terapia génica. Normalmente, el producto genético está codificado por el transgén dentro del casete o vector de expresión, aunque en principio también es posible aumentar la expresión de un gen endógeno con fines terapéuticos. En un ejemplo alternativo, los casetes de expresión y los vectores descritos en el presente documento se pueden usar para expresar una cantidad inmunológica de un producto genético (tal como un polipéptido, en particular una proteína inmunogénica, o ARN) con fines de vacunación.

20 Los casetes y vectores de expresión de ácidos nucleicos, como se enseña en el presente documento, pueden formularse en una composición farmacéutica con un excipiente farmacéuticamente aceptable, es decir, una o más sustancias portadoras y/o aditivos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, amortiguadores, portadores, excipientes, estabilizadores, etc. La composición farmacéutica se puede proporcionar en forma de kit.

El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, es consistente con la técnica y significa compatible con los otros ingredientes de la composición farmacéutica y no perjudicial para el receptor de la misma.

30 Por consiguiente, otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un casete de expresión de ácido nucleico o un vector descrito en el presente documento.

El uso de elementos reguladores de ácidos nucleicos y vectores descritos en el presente documento para la fabricación de estas composiciones farmacéuticas también se describe en el presente documento.

Por ejemplo, la composición farmacéutica puede ser una vacuna. La vacuna puede comprender además uno o más adyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria. Los adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas de superficie tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas o hidrocarbonadas, bacilos de Calmette-Guerin (BCG), *Corynebacterium parvum* y el adyuvante sintético QS- 21. Opcionalmente, la vacuna puede comprender además una o más moléculas inmunoestimuladoras. Los ejemplos de moléculas inmunoestimuladoras incluyen diversas citocinas, linfocinas y quimiocinas con actividades inmunoestimuladoras, inmunopotenciadoras y proinflamatorias, como las interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); factores de crecimiento (por ejemplo, factor estimulante de colonias (CSF) de granulocitos y macrófagos (GM)); y otras moléculas inmunoestimuladoras, como factor inflamatorio de macrófagos, ligando Flt3, B7.1; B7.2, etc.

En otro aspecto, la invención se relaciona con los elementos reguladores de ácidos nucleicos, los casetes de expresión de ácidos nucleicos, los vectores o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento para uso en medicina.

Como se usa en este documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, la prevención de un estado o trastorno clínico no deseado, la reducción de la incidencia de un trastorno, alivio de los síntomas asociados con un trastorno, disminución de la extensión de un trastorno, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de un trastorno, retraso o ralentización de la progresión de un trastorno, mejora o paliación del estado de un trastorno, remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable o combinaciones de las mismas. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

Como se usa en este documento, los términos "tratamiento terapéutico" o "terapia" y similares, se refieren a tratamientos en los que el objetivo es llevar el cuerpo de un sujeto o un elemento del mismo de un cambio o trastorno fisiológico no deseado al estado deseado, como una menos estado grave o desagradable (por ejemplo, alivio de los síntomas, mejora de la afección o paliación), o volver a su estado normal y saludable (por ejemplo, restauración de la salud, la integridad física y el bienestar físico de un sujeto), para mantener en dicho cambio o trastorno fisiológico no deseado (por

ejemplo, estabilización o no empeoramiento), o para prevenir o desacelerar la progresión a un estado más grave o peor en comparación con dicho cambio o trastorno fisiológico no deseado.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "prevención",
 5 "tratamiento preventivo" o "tratamiento profiláctico" y similares abarcan la prevención de la aparición de una enfermedad o trastorno, incluida la reducción de la gravedad de una enfermedad o trastorno o los síntomas asociados antes de la aflicción por dicha enfermedad o trastorno. Dicha prevención o reducción antes de la aflicción se refiere a la administración de los elementos reguladores de ácidos nucleicos, los casetes de
 10 expresión de ácidos nucleicos, los vectores o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento a un paciente que en el momento de la administración no está afectado por una clara síntomas de la enfermedad o trastorno "Prevenir" también incluye prevenir la recurrencia o la prevención de recaídas de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, después de un período de mejoría.

15 En las modalidades, los elementos reguladores de ácidos nucleicos, los casetes de expresión de ácidos nucleicos, los vectores o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse en terapia génica, en particular, terapia génica dirigida al músculo, en particular, terapia génica del diafragma, músculo liso, terapia génica dirigida al músculo esquelético y de corazón, más
 20 particularmente terapia génica dirigida al músculo del diafragma, esquelético y de corazón.

También se describe aquí el uso de los elementos reguladores de ácidos nucleicos, los casetes de expresión de ácidos nucleicos, los vectores o las composiciones farmacéuticas descritas aquí para la fabricación de un medicamento
 25 para terapia génica, en particular terapia génica dirigida al músculo, en particular, terapia génica dirigida al músculo del diafragma, liso, esquelético y de corazón, más particularmente terapia génica dirigida al músculo del diafragma, esquelético y de corazón.

También se describe aquí un método para terapia génica, en particular terapia
 30 génica dirigida al músculo del diafragma, liso esquelético, esquelético y de corazón, más particularmente terapia génica dirigida al músculo liso, esquelético y de corazón en un sujeto que necesita dicha terapia génica que comprende:

- introducir en el sujeto, en particular en tejido muscular o células del sujeto, en particular, células o tejido musculares de diafragma, liso, esquelético y de corazón, más
 35 particularmente en células o tejido muscular de diafragma, esquelético y de corazón o

células del sujeto, un casete de expresión de ácido nucleico, un vector o una composición farmacéutica descritos en este documento, donde el casete de expresión de ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica comprende un elemento regulador de ácido nucleico descrito en este documento, ligado operativamente a un promotor y un transgén; y

- expresar una cantidad terapéuticamente eficaz del producto transgénico en el sujeto, en particular en células musculares o tejido del sujeto, en particular en el diafragma, músculo liso, corazón y/o células o tejido del músculo esquelético, más particularmente en diafragma, corazón y/o células de músculo esquelético o tejido del sujeto.

El producto transgénico puede ser un polipéptido, en particular una proteína estructural como, por ejemplo, distrofina o un sarcoglicano, una proteína secretable como, por ejemplo, un factor de coagulación, por ejemplo, factor IX o factor VIII, una citocina, un factor de crecimiento, un anticuerpo o nanocuerpo, una quimiocina, un factor plasmático, insulina, eritropoyetina, lipoproteína lipasa o una proteína no secretada, como una proteína nuclear, una enzima metabólica o una proteína lisosomal. Además, se han divulgado ejemplos no limitantes de productos transgénicos. anteriormente en relación con el transgén e incluyen, entre otros, factores angiogénicos, citoquinas y/o factores de crecimiento, proteínas involucradas en el manejo del calcio, proteínas lisosomales, anticuerpos de canales iónicos, nanocuerpos, proteínas negativas dominantes antivirales y fragmentos, subunidades o mutantes de los mismos y enzimas (por ejemplo, enzimas involucradas en el metabolismo del glucógeno y enzimas deficientes en la mucopolisacaridosis). En las modalidades particulares, el producto transgénico es un sarcoglicano, preferentemente β -sarcoglicano. En las modalidades particulares, el producto transgénico es una proteína lisosomal, preferentemente α -glucosidasa ácida (GAA) (por ejemplo, GAA como una forma secretada o nativa), alfa-galactosidasa A o LAMP2, más preferentemente alfa-glucosidasa ácida (GAA). Alternativamente, el producto transgénico puede ser ARN, como ARNsi o ARN no codificante (ARNnc).

Ejemplos de enfermedades y trastornos que pueden beneficiarse de la terapia génica utilizando los elementos reguladores de ácidos nucleicos, los casetes de expresión de ácidos nucleicos, los vectores o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente incluyen:

- enfermedades de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, enfermedad de Fabry), incluidos los trastornos por almacenamiento de glucógeno (por ejemplo,

enfermedad de Pompe, trastorno por almacenamiento de glucógeno (GSD) tipo II, enfermedad de Danon, trastorno por almacenamiento de glucógeno (GSD) tipo IIb, GSD III o GSD 3 (también conocida como enfermedad de Cori o enfermedad de Forbes), GSD IV o GSD4 (también conocida como enfermedad de Andersen), GSD V o GSD5
 5 (también conocida como enfermedad de McArdle), GSD VII o GSD7 (también conocida como enfermedad de Tarui), GSD X o GSD10, GSD XII o GSD 12 (también conocida como deficiencia de aldolasa A), GSD XIII o GSD13, GSD XV o GSD15) y trastornos de mucopolisacaridosis (por ejemplo, síndrome de Hunter, síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis (MPS) I, MPS II, MPS III, MPS IIIA, MPS IIIB, MPS IIIC, MPS IV,
 10 MPS VI, MPS VII, MPS IX);

- trastornos mitocondriales (por ejemplo, síndrome de Barth);
- canalopatía (por ejemplo, síndrome de Brugada);
- desordenes metabólicos;
- miopatía miotubular (MTM);
- 15 - distrofia muscular (por ejemplo, distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (BMD));
- distrofia miotónica;
- Distrofia Muscular Miotónica (DM);
- miopatía de Miyoshi;
- 20 - - Congénita tipo Fukuyama;
- disferlinopatía;
- enfermedad neuromuscular;
- enfermedades de las neuronas motoras (EMN) (por ejemplo, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), atrofia muscular espinal (AME) o esclerosis lateral
 25 amiotrófica (ELA));
- distrofia muscular de Emery-Dreifuss;
- distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD);
- distrofias musculares congénitas;
- miopatías congénitas;

- distrofia muscular de cinturas (por ejemplo, distrofia muscular de cinturas tipo 2E (LGMD2E), distrofia muscular de cinturas tipo 2D (LGMD2D), distrofia muscular de cinturas tipo 2C (LGMD2C), distrofia muscular de cinturas tipo 2B (LGMD2B), distrofia muscular de cinturas distrofia muscular tipo 2L (LGMD2L), distrofia muscular de cinturas tipo 2A (LGMD2A));
- miopatías metabólicas;
- enfermedades inflamatorias musculares;
- miastenia;
- miopatías mitocondriales;
- anomalías de los canales iónicos;
- enfermedades de la envoltura nuclear;
- cardiomiopatías;
- hipertrofia cardíaca;
- insuficiencia cardíaca;
- miopatías distales;
- hemofilia (por ejemplo, hemofilia A y B);
- diabetes; y
- enfermedades cardiovasculares y enfermedades del corazón (por ejemplo, aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad coronaria, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad arterial periférica, enfermedad cardíaca congénita, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca (también conocida como insuficiencia cardíaca), infarto de miocardio (también conocido como ataque al corazón)), isquemia cardíaca, síndrome coronario agudo, angina inestable, angina estable, miocardiopatía, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada, miocardiopatía restrictiva, miocardiopatías primarias causadas por mutaciones genéticas como el síndrome de Brugada, enfermedad de Pompe, enfermedad de Danon y enfermedad de Fabry, amiloidosis cardíaca (también conocida como síndrome del corazón rígido), miocarditis (también conocida como miocardiopatía inflamatoria), cardiopatía valvular, estenosis valvular, insuficiencia valvular, endocarditis, cardiopatía reumática, pericarditis (es decir, una enfermedad causada por una inflamación y/o infección del pericardio) , taponamiento cardíaco (también conocido como taponamiento pericárdico), endoca

rditis, arritmia cardíaca, hipertensión, hipotensión, estenosis de vasos, estenosis de válvulas o restenosis).

Además, muchos trastornos neuromusculares afectan la función respiratoria debido al debilitamiento del diafragma y los músculos respiratorios (www.medscape.com/viewarticle/805299_3) Semin Respir Crit Care Med. 2002 Jun;23(3):191-200). de enfermedades del diafragma varían, pero pueden deberse a defectos genéticos que influyen directamente en la función del diafragma. En particular, existen múltiples trastornos genéticos que se deben a mutaciones en genes que afectan la función del diafragma, a menudo en combinación con anomalías en el nivel de los músculos esqueléticos y/o el corazón. Por ejemplo, la miopatía miotubular (MTM) se debe a mutaciones en el gen de la miotubularina y afecta el músculo esquelético y el diafragma. Los pacientes que sufren de MTM suelen presentar hipotonía, debilidad muscular generalizada e insuficiencia respiratoria. al nacer. La supervivencia más allá del período posnatal requiere un apoyo intensivo, que a menudo incluye alimentación por gastrostomía y ventilación mecánica. Debido a sus graves problemas respiratorios, el paciente Las personas que padecen MTM generalmente no viven más de 2 años. Para MTM, la terapia génica dirigida al músculo es actualmente la única opción clínicamente relevante. Alternativamente, la enfermedad de Pompe (también conocida como trastorno de almacenamiento de glucógeno tipo II o GSD II) afecta principalmente al músculo esquelético, diafragma y el corazón. La GSD II da como resultado una deficiencia de la enzima lisosomal ácida α -glucosidasa (GAA) que conduce a un defecto de almacenamiento lisosomal. En pacientes con GSD II, el glucógeno no se puede descomponer de manera efectiva en glucosa. La acumulación de glucógeno en Los pacientes con GSD II causan miopatía con debilidad muscular progresiva. Sin intervención médica, los pacientes que padecen la forma más grave de GSD II mueren debido a insuficiencia respiratoria durante el primer año de vida. Otras enfermedades musculares como la distrofia muscular de Duchenne (DMD) afectan aproximadamente a un en 3500 nacidos vivos masculinos La enfermedad conduce a la destrucción progresiva de los músculos esqueléticos, incluido el diafragma, los individuos más afectados mueren por fallas en la ventilación en la tercera década de la vida. Muchas otras miopatías también afectan la función pulmonar, incluidas, entre otras, polimiositis/dermatomiositis, trastornos hereditarios del canal, encefalomiopatías mitocondriales, deficiencia de maltasa ácida y miopatía congénita, atrofia por desuso. Otras enfermedades que afectan el diafragma incluyen distrofia muscular congénita (CMD), distrofia muscular congénita (CMD), Distrofia muscular (BMD), distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD), distrofia muscular de cinturas (LGMD), distrofia muscular miotónica (DM), miopatía de Miyoshi, distrofia muscular congénita tipo

Fukuyama, disferlinopatía. Además, muchos trastornos neuropáticos debilitan el diafragma y los músculos respiratorios. Esto incluye esclerosis lateral amiotrófica, poliomielitis, síndrome postpolio, síndrome de Kennedy, accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, atrofia muscular espinal,iringomielia, neuropatía neurálgica y enfermedades de las neuronas motoras. La plexitis braquial y las neuropatías frénicas unilaterales o bilaterales aisladas también pueden debilitar significativamente el diafragma. Neuropatías periféricas que afectan la respiración son principalmente trastornos agudos como el síndrome de Guillain-Barré, la porfiria y la neuropatía por enfermedad crítica, pero las enfermedades crónicas como la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP) y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) también pueden causar insuficiencia respiratoria. La transmisión neuromuscular, como el síndrome de Lambert-Eaton, y la miastenia grave a menudo afectan la respiración. Alternativamente, la disfunción del diafragma puede ser el resultado de defectos congénitos que dan lugar a anomalías anatómicas (por ejemplo, malformación de Arnold-Chiari) o defectos adquiridos, que se producen como resultado de una lesión, traumatismo, infección (por ejemplo, virus del Nilo Occidental, botulismo), exposición a organofosforados, radioterapia, desnutrición, compresión tumoral o cirugía. La cardioplejía fría utilizada en la cirugía cardíaca es otra causa común de lesión del nervio frénico. Además, la radioterapia puede afectar el nervio frénico resultando en disfunción diafragmática. Enfermedades obstructivas de las vías respiratorias que afectan los pulmones, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el asma, pueden provocar una hiperinflación significativa que da lugar a una desventaja y debilidad diafragmática. Finalmente, se sabe que el lupus y los trastornos de la tiroides también pueden contribuir a la disfunción del diafragma.

En las modalidades, los casetes de expresión de ácido nucleico, los vectores o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento de la distrofia muscular de cintura, en particular, la distrofia muscular de cintura tipo 2E (LGMD2E), el casete de expresión de ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica comprende un elemento regulador de ácido nucleico descrito en el presente documento unido operativamente a un promotor y un transgén que codifica β -sarcoglicano, preferentemente β -sarcoglicano humano (p. establecido en SEQ ID NO: 19).

También se describe en el presente documento el uso de casetes de expresión de ácido nucleico, los vectores o las composiciones farmacéuticas descritas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de la cintura escapular, en particular, la distrofia muscular de la cintura escapular tipo 2E (LGMD2E),

en la que el casete de expresión de ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica comprende un elemento regulador de ácido nucleico descrito en el presente documento unido operativamente a un promotor y un transgén que codifica β -sarcoglicano, preferentemente β -sarcoglicano humano (por ejemplo, el transgén expuesto en SEQ ID NO: 18, preferentemente el transgén con codones optimizados expuesto en SEQ ID NO: 19).

También se describe en el presente documento un método para tratar la distrofia muscular de cinturas, en particular la distrofia muscular de cinturas tipo 2E (LGMD2E), en un sujeto que comprende:

10 - introducir en el sujeto, en particular en tejido muscular o células del sujeto, preferentemente en el diafragma, músculo liso, músculo esquelético y de corazón, más preferentemente tejido o células del sujeto en el diafragma, músculo esquelético y de corazón, casetes de expresión de ácidos nucleicos, un vector o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, donde el casete de expresión de
15 ácidos nucleicos, el vector o la composición farmacéutica comprende un elemento regulador de ácidos nucleicos descrito en el presente documento unido operativamente a un promotor y un transgén que codifica β -sarcoglicano, preferentemente β -sarcoglicano humano (por ejemplo, el transgén expuesto en SEQ ID NO: 18, preferentemente el transgén con codones optimizados expuesto en SEQ ID NO: 19); y

20 - expresar una cantidad terapéuticamente eficaz de β -sarcoglicano, preferentemente β -sarcoglicano humano, en el sujeto, en particular en el tejido muscular o células del sujeto, preferentemente tejido o células del sujeto en el diafragma, músculo liso, músculo esquelético y de corazón, más preferentemente en el tejido o células del sujeto en el diafragma, músculo esquelético y de corazón.

25 En las modalidades particulares, la invención se relaciona con un casete de expresión de ácido nucleico que comprende un elemento regulador que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 12 (Dph-CRE04 - Dph-CRE06 - CSK-SH5), unido operativamente a un promotor, preferentemente un promotor seleccionado del grupo que consiste del promotor SPc5-
30 12, el promotor MHCK7 y el promotor de desmina, y un transgén que codifica β -sarcoglicano humano (por ejemplo, el transgén con codones optimizados establecido en SEQ ID NO: 19), un vector que comprende dicho casete de expresión de ácidos nucleicos, o una composición farmacéutica que comprende dicho casete de expresión de ácidos nucleicos o dicho vector, para usar en el tratamiento de la distrofia muscular
35 de la cintura escapular, preferentemente Distrofia muscular de la cintura escapular tipo

2E (LGMD2E) En las modalidades particulares, la invención proporciona un casete de expresión de ácido nucleico que comprende un elemento regulador que esencialmente consiste de o que consiste de t La secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 14 (Dph-CRE02 - Dph-CRE04 - Dph-CRE06 - CSK-SH5), unida operativamente a un

5 promotor, preferentemente un promotor seleccionado del grupo que consiste del promotor SPc5-12, el promotor MHCK7 y el promotor de desmina, y un transgén que codifica β -sarcoglicano humano (por ejemplo, el transgén establecido en SEQ ID NO: 18, preferentemente el transgén con codones optimizados establecido en SEQ ID NO: 19), un vector que comprende dicho casete de expresión de ácido nucleico, o una

10 composición farmacéutica que comprende dicho casete de expresión de ácido nucleico o dicho vector, para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas tipo 2E (LGMD2E). elemento regulador que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 11 (Dph-CRE02 - Dph-CRE06 - CSK-SH5), unido operativamente a un promotor, preferentemente un promotor

15 seleccionado del grupo que consiste de SPc5 -12 promotor , el promotor MHCK7 y el promotor de desmina, y un transgén que codifica β -sarcoglicano humano (por ejemplo, el transgén establecido en SEQ ID NO: 18, preferentemente el transgén con codones optimizados establecido en SEQ ID NO: 19), un vector que comprende dicho casete de expresión de ácido nucleico, o una composición farmacéutica que comprende dicho

20 casete de expresión de ácido nucleico o dicho vector, para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas de tipo 2E (LGMD2E). un casete de expresión de ácido nucleico un elemento regulador que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 13 (Dph-CRE06 - Dph-CRE04 - CSK-SH5), unido operativamente a un promotor, preferentemente un promotor

25 seleccionado del grupo que consiste del promotor SPc5-12, el promotor MHCK7 y el promotor de desmina, y un transgén que codifica el β -sarcoglicano humano (p. NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN: 19), un vector que comprende dicho casete de expresión de ácido nucleico, o una composición farmacéutica que comprende dicho casete de expresión de ácido nucleico o dicho vector, para su uso en el tratamiento de

30 la distrofia muscular de cinturas tipo 2E (LGMD2E). un casete de expresión de ácido nucleico que comprende un elemento regulador que esencialmente consiste de o que consiste de la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 10 (Dph-CRE02 - Dph-CRE04 - CSK-SH5), unido operativamente a un promotor, preferentemente un promotor seleccionado del grupo que consiste del promotor SPc5-12, el promotor

35 MHCK7 y el promotor de desmina, y un transgén que codifica β -sarcoglicano humano (p. SEQ ID NO: 18 ID NO: 19), un vector que comprende dicho casete de expresión de ácido nucleico, o una composición farmacéutica que comprende dicho casete de

expresión de ácido nucleico o dicho vector, para usar en el tratamiento de la distrofia muscular Limb Girdle tipo (LGMD2E) En las modalidades particulares, la invención se relaciona con un casete de expresión de ácido nucleico que comprende un elemento regulador que consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 10 (Dph-CRE02 - Dph-CRE04 - CSk-SH5), o que consiste en la misma, enlazada operativamente a un promotor, preferiblemente un promotor seleccionado del grupo que consiste en el promotor SPc5-12, el promotor MHCK7 y el promotor de desmina, y un transgén que codifica β -sarcoglicano humano (por ejemplo, transgén con codones optimizados establecido en SEQ ID NO: 19), un vector que comprende dicho casete de expresión de ácido nucleico, o una composición farmacéutica que comprende dicho casete de expresión de ácido nucleico o dicho vector, para usar en el tratamiento de la distrofia muscular de la cintura, preferiblemente Distrofia Muscular de Cinturas tipo 2E (LGMD2E)..

En las modalidades adicionales del casete de expresión de ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la distrofia muscular de cintura, preferentemente distrofia muscular de cintura tipo 2E (LGMD2E) como se describe en el presente documento, el transgén tiene codones optimizados. el casete de expresión de ácido nucleico comprende además un intrón MVM En la modalidad, el casete de expresión de ácido nucleico comprende además una señal de poliadenilación, preferentemente una señal de poliadenilación establecido en SEQ ID NO:17.

También se describe en este documento un casete de expresión de ácido nucleico, un vector o una composición farmacéutica descritos en este documento para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe, en donde el casete de expresión de ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica comprende un elemento regulador de ácido nucleico descrito en este documento unido operativamente a un promotor y un transgén que codifica la α -glucosidasa ácida (GAA), preferentemente la α -glucosidasa ácida humana (hGAA) (por ejemplo, el transgén expuesto en SEQ ID NO:58, preferentemente el transgén con codones optimizados expuesto en SEQ ID NO:59).

También se describe en este documento el uso de un casete de expresión de ácido nucleico, un vector o composiciones farmacéuticas descritas en este documento, donde el casete de expresión de ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica comprende un elemento regulador de ácido nucleico descrito en este documento unido operativamente a un promotor y un transgén que codifica la α -glucosidasa ácida (GAA), preferentemente la α -glucosidasa ácida humana (hGAA) (por ejemplo, el transgén expuesto en SEQ ID NO:58, preferentemente el transgén con codones optimizados

expuesto en SEQ ID NO:59), para la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad de Pompe.

También se describe aquí un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que comprende:

5 - introducir en el sujeto, en particular en tejido muscular o células del sujeto, preferentemente tejido o células del sujeto en el diafragma, músculo liso, músculo esquelético y de corazón, más preferentemente tejido o células del sujeto en el diafragma, músculo esquelético y de corazón, un casete de expresión de ácido nucleico, un vector o una composición farmacéutica descritos en este documento, donde el casete
10 de expresión de ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica comprende un elemento regulador de ácido nucleico descrito en este documento unido operativamente a un promotor y un transgén que codifica la α -glucosidasa ácida (GAA), preferentemente la α -glucosidasa ácida humana (hGAA) (por ejemplo, el transgén expuesto en SEQ ID NO:58, preferentemente el transgén con codones optimizados expuesto en SEQ ID
15 NO:59); y

 - expresar una cantidad terapéuticamente eficaz de GAA, preferentemente hGAA, en el sujeto, en particular en el tejido o células musculares del sujeto, preferentemente tejido o células del sujeto en el diafragma, músculo esquelético y de corazón, músculo liso y, más preferentemente tejido o células del sujeto en el diafragma,
20 músculo esquelético y cardíaco.

Los protocolos de terapia génica se han descrito ampliamente en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, inyección intramuscular de plásmido (desnudo o en liposomas), administración hidrodinámica de genes en diversos tejidos, incluido el músculo, inyección intersticial, instilación en las vías respiratorias, aplicación a el
25 endotelio, el parénquima intrahepático y la administración intravenosa o intraarterial. Se han desarrollado varios dispositivos para mejorar la disponibilidad de ADN para la célula objetivo. Un acercamiento simple es contactar físicamente la célula objetivo con catéteres o materiales implantables que contienen ADN. Otro acercamiento es utilizar dispositivos de inyección de chorro sin aguja que proyectan una columna de líquido
30 directamente en el tejido objetivo bajo alta presión. Estos paradigmas de administración también se pueden usar para administrar vectores. Otro acercamiento para la administración dirigida de genes es el uso de conjugados moleculares, que consisten en proteínas o ligandos sintéticos a los que el agente se ha unido al ADN o ácido nucleico o un para el direccionamiento específico de los ácidos nucleicos a las células
35 (Cristiano et al., 1993).

Los elementos reguladores de ácidos nucleicos, los casetes de expresión de ácidos nucleicos, los vectores o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden usarse como vacuna, más particularmente para usar como vacuna profiláctica.

5 También se describe aquí el uso de los elementos reguladores de ácidos nucleicos, los casetes de expresión de ácidos nucleicos, los vectores o las composiciones farmacéuticas descritas aquí para la fabricación de una vacuna, en particular para la fabricación de una vacuna profiláctica.

10 También se describe aquí un método de vacunación, en particular vacunación profiláctica, de un sujeto que necesita dicha vacunación que comprende:

- introducir en el sujeto, en particular en el músculo del sujeto, más particularmente en células o tejidos del músculo en el diafragma, músculo liso, esquelético y/o de corazón, incluso más particularmente en células o tejido del sujeto en el diafragma, musculo esquelético y/o de corazón, un casete de expresión de ácido nucleico, un vector o una composición farmacéutica descritos en este documento, donde el casete de expresión de ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica comprende un elemento regulador de ácido nucleico descrito en este documento unido operativamente a un promotor y un transgén; y

15

- expresar una cantidad inmunológicamente eficaz del producto transgénico en el sujeto, en particular en el músculo del sujeto, más particularmente en las células o tejido muscular del diafragma, músculo liso, esquelético y/o de corazón, incluso más particularmente en las células o tejido muscular del sujeto en el diafragma, esquelético y/o de corazón.

20

Como se usa en el presente documento, una frase como "un sujeto que necesita tratamiento" incluye sujetos que se beneficiarían del tratamiento de una enfermedad o trastorno mencionado. Dichos sujetos pueden incluir, entre otros, aquellos que han sido diagnosticados con dicha enfermedad o trastorno, aquellos propensos a contraer o desarrollar dicha enfermedad o trastorno, y/o aquellos en quienes se pretende prevenir dicha enfermedad o trastorno.

25

30 Los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en este documento y se refieren a animales, preferentemente vertebrados, más preferentemente mamíferos, e incluyen específicamente pacientes humanos y mamíferos no humanos. Los sujetos "mamíferos" incluyen, entre otros, humanos, animales domésticos, animales comerciales, animales de granja, animales de zoológico, animales de deporte, mascotas

y animales de experimentación como perros, gatos, cobayos, conejos, ratas, ratones, caballos, vacas, primates como simios, monos, orangutanes y chimpancés; cánidos como perros y lobos; félidos como gatos, leones y tigres; équidos como caballos, burros y cebras; animales de alimentación como vacas, cerdos y ovejas; ungulados como ciervos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas, etc.. Los pacientes o sujetos preferidos son sujetos humanos.

Una 'cantidad terapéutica' o 'cantidad terapéuticamente efectiva' tal como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad de producto génico eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, es decir, para obtener un efecto local o sistémico deseado. El término se refiere así a la cantidad de producto génico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal o ser humano que está siendo buscado por un investigador, veterinario, médico u otro médico. Típicamente, dicha cantidad dependerá del producto génico y de la gravedad de la enfermedad, pero puede ser decidido por la persona experta, posiblemente a través de la experimentación de rutina.

Una "cantidad inmunológicamente efectiva", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la cantidad de producto de transgén eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto frente a la exposición posterior al inmunógeno codificado por el transgén. Se pueden determinar los niveles de inmunidad inducida, por ejemplo, midiendo las cantidades de anticuerpos secretores y/o séricos neutralizantes, por ejemplo, mediante neutralización de placas, fijación del complemento, inmunoabsorción ligada a enzimas o ensayo de microneutralización.

Por lo general, la cantidad de producto transgénico expresado cuando se usa un casete o vector de expresión como se describe en el presente documento (es decir, con al menos un elemento regulador de ácido nucleico específico del músculo) es mayor que cuando se usa un casete o vector de expresión idéntico pero sin un elemento regulador de ácido nucleico en el mismo. Más particularmente, la expresión es al menos el doble de alta, al menos cinco veces más alta, al menos diez veces más alta, al menos 20 veces más alta, al menos 30 veces más alta, al menos 40 veces más alta, al menos 50 veces más alta, o incluso al menos 60 veces más alta que cuando se compara con el mismo casete de expresión de ácido nucleico o vector sin elemento regulador de ácido nucleico. Más aún, la mayor expresión sigue siendo específica células o tejidos del músculo del diafragma, músculo liso, esquelético y de corazón, más particularmente tejidos o células del músculo de diafragma, esquelético o de corazón. Además, los casetes de expresión y los vectores descritos en el presente documento dirigen la expresión de una cantidad terapéutica del producto génico durante un período

prolongado. Por lo general, se prevé que la expresión terapéutica dure al menos 20 días, al menos 50 días, al menos 100 días, al menos 200 días o al menos 300 días o más tales como al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 5 años, al menos 6 años, al menos 7 años, al menos 8 años, al menos 9 años, o incluso al menos 10 años o más. La expresión del producto génico (por ejemplo, polipéptido) se puede medir por cualquier medio reconocido en la técnica, como por ejemplo mediante ensayos basados en anticuerpos, por ejemplo, un ensayo Western Blot o ELISA, para evaluar si se logra la expresión terapéutica del producto génico. La expresión del producto génico también puede medirse en un bioensayo que detecta una actividad enzimática o biológica del producto génico.

También aquí está el uso de los elementos reguladores de ácidos nucleicos, los casetes de expresión de ácidos nucleicos, o los vectores descritos en este documento para transfectar o transducir células musculares, preferentemente células de diafragma, músculo liso, esqueléticas y/o de corazón, más preferentemente células musculares de diafragma, esqueléticas y/o de corazón.

También se describe aquí el uso de los casetes de expresión de ácido nucleico o los vectores descritos aquí para expresar un producto transgénico en células musculares, preferentemente células de músculo de diafragma, músculo liso, esqueléticas y/o de corazón, más preferentemente células de músculo de diafragma, esqueléticas y/o de corazón, en donde el casete de expresión de ácido nucleico o el vector comprende un elemento regulador de ácido nucleico descrito en el presente documento unido operativamente a un promotor y un transgén.

En el presente documento también se describe un método para expresar un producto transgénico en células musculares preferentemente células de músculo de diafragma, músculo liso, músculo esquelético y/o de corazón, más preferentemente células musculares de diafragma, esquelético y/o de corazón, que comprende:

- transfectar o transducir las células musculares con un casete de expresión de ácido nucleico o un vector descrito en este documento, en donde el casete de expresión de ácido nucleico o el vector comprende un elemento regulador de ácido nucleico descrito en este documento unido operativamente a un promotor y un transgén; y
- expresar el producto transgénico en las células musculares.

La transfección no viral o la transducción de células musculares mediada por vectores virales puede realizarse mediante procedimientos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. El acercamiento *in vitro* requiere la transfección o transducción *in vitro* de células

musculares, por ejemplo, células musculares previamente recolectadas de un sujeto, líneas de células musculares o células musculares diferenciadas de, por ejemplo, células madre pluripotentes inducidas o células embrionarias. El acercamiento *ex vivo* requiere la recolección de las células musculares de un sujeto, la transfección o transducción *in vitro* y, opcionalmente, la reintroducción del músculo transfectado 5 células en el sujeto. El acercamiento *in vivo* requiere la administración del casete de expresión de ácido nucleico o el vector descrito en el presente documento en un sujeto. En las modalidades preferidas, la transfección de las células musculares se realiza *in vitro* o *ex vivo*.

10 El experto en la materia entiende que el uso de los elementos reguladores de ácidos nucleicos, los casetes de expresión de ácidos nucleicos y los vectores descritos en el presente documento tienen implicaciones que van más allá de la terapia génica, por ejemplo, la diferenciación forzada de células madre en el diafragma, el músculo liso, el corazón y el esqueleto. células musculares, modelos transgénicos para la 15 sobreexpresión de proteínas en células o tejidos musculares tales como en el diafragma, músculo liso, corazón y/o células y/o tejidos del músculo esquelético, etc.

La invención se explica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

20 ***Ejemplo 1: Diseño y construcción de nuevos vectores AAV que contienen elementos reguladores diseñados computacionalmente (CRE) de novo***

Se diseñaron vectores AAV9 que expresan un transgén de codón optimizado que codifica β -sacoglicano humano ($h\beta$ -sgco o $h\beta$ sgco) (SEQ ID NO: 19) o el gen de tipo silvestre $h\beta$ -sg (wt) (SEQ ID NO: 18), o un gen indicador de luciferasa (Luc) (SEQ 25 ID NO: 20) de un promotor SPc5-12 sintético (SEQ ID NO: 15) combinado con (combinaciones de) elementos CRE. Se sabe que los elementos CRE individuales mediar la alta expresión transgénica en el diafragma y el músculo esquelético (denominado Dph-CRE en este documento) o en músculo esquelético y de corazón (denominado como CSk-CRE o CSk-SH en este documento). Los vectores también 30 contenían un intrón de Virus Diminuto del Ratón (MVM) (SEQ ID NO: 16) y un sitio de poliadenilación sintético (pA) (SEQ ID NO: 17).

Se construyeron vectores AAV desprovistos de cualquier elemento CRE como control (designados aquí como AAV-SPc5-12-MVM- $h\beta$ sgco-pA y AAV-SPc5-12-MVM- $h\beta$ sg-pA).

La FIGURA 2 muestra los diferentes vectores AAV que se diseñaron y construyeron. Los vectores se construyeron mediante clonación convencional.

Brevemente, el gen de beta-sarcoglicano humano de tipo silvestre (hβsg) (SEQ ID NO: 18), el gen hβsgco de codón optimizado (SEQ ID NO: 19) o un gen informador que codifica luciferasa (SEQ ID NO: : 19) :20), todos flanqueados por sitios de restricción Hind III y BstBI en los extremos 5' y 3', se clonaron aguas abajo del promotor SPc5-12, que estaba ligado operativamente al elemento regulador CSk-SH5 (SEQ ID NO : 1) El gen del beta-sarcoglicano humano (hβsg) se optimizó por codones utilizando el optimizador Gene (GeneArt, Life Technologies, Alemania).

El elemento regulador CSk-SH5 (SEQ ID NO: 1) ligado operativamente al promotor SPc5-12 (SEQ ID NO: 15), se clonó cadena arriba del intrón MVM (SEQ ID NO: 16) en el contexto de un esqueleto de vector viral adenoasociado (AAV) monocatenario. El vector también contenía un sitio de poliadenilación sintético de 49 pb (Levitt N et al, 1989) (SEQ ID NO: 17).

Los vectores representados en la FIGURA 2A (AAV-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβsgco-pA), FIGURA 2B (AAV-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβsg-pA) y La FIGURA. 2A1 (AAV-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA) sirvió como esqueleto para clonar los diferentes Dph-CRE.

Se clonaron una, dos o tres CRE de diafragma (Dph-CRE) aguas arriba de la CRE CSk-SH5 para generar construcciones que expresan el gen hβsgco (una CRE: FIGURA. 2C (AAV-CRE02-CSk-SH5-SPc5-12-MVM -hβsgco-pA), FIGURA 2D (AAV-CRE04-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβsgco-pA), FIGURA 2E (AAV-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM -hβsgco-pA); dos CREs: FIGURA 2F (AAV-CRE02-CRE04-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβsgco-pA), FIGURA 2H (AAV-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβsgco-pA), FIGURA 2J (AAV-CRE06-CRE04-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβsgco-pA), FIGURA. 2L (AAV-CRE02- CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβsgco-pA); y tres CREs: FIGURA 2N (AAV-CRE02-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβsgco-pA)).

De manera similar, dos o tres CRE de diafragma se clonaron aguas arriba de CSk-SH5 CRE para generar construcciones que expresan el gen hβsg de tipo silvestre (dos CRE: FIGURA 2G (AAV-CRE02-CRE04-CSk-SH5-SPc5-12-MVM -hβsg-pA), FIGURA 2I (AAV-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβsg-pA), FIGURA 2K (AAV-CRE06-CRE04-CSk-SH5-SPc5 -12-MVM-hβsg-pA), FIGURA 2M (AAV-CRE02-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβsg-pA) y tres CREs: FIGURA 2O (AAV-CRE02 - CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβsg-pA)).

Además, se clonaron dos o tres CRE de diafragma aguas arriba de CSk-SH5 CRE para generar construcciones que expresan el gen informador Luc (una CRE: FIGURA 2R (AAV-CRE02-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA) , FIGURA 2Q (AAV-CRE04-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA), FIGURA 2P (AAV-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA), dos CREs: FIGURA 2S (AAV-CRE06-CRE04-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA, FIGURA 2T (AAV-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA), FIGURA 2U (AAV-CRE02-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA), FIGURA 2V (AAV-CRE02-CRE04-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA); y tres CREs: FIGURA 2W (AAV-CRE02-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA)).

Por último, se generaron tres vectores de control sin CRE, a saber, AAV-SPc5-12-MVM-hβsgco-pA (FIGURA 2Y), AAV-SPc5-12-MVM-hβsg-pA (FIGURA 2X) y AAV-SPc5-12-MVM-Luc-pA (FIGURA 2Z).

Ejemplo 2: Validación in vivo de los elementos reguladores a través de un gen reportero

Para evaluar qué combinaciones de CRE eran más potentes, se inyectaron vectores AAV que expresaban el gen de la luciferasa (Luc) del promotor Spc5-12 y que contenían diferentes combinaciones de CRE en ratones CB17-SCID para un análisis comparativo. Se probaron diferentes combinaciones de CRE para determinar su capacidad para aumentar la luciferasa. expresión génica Más particularmente, se inyectaron los siguientes vectores:

AAV-SPc5-12-MVM-Luc-pA (FIGURA 2Z, SEQ ID NO: 46)

AAV-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA (FIGURA 2A1, SEQ ID NO: 47)

AAV-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA (FIGURA 2P, SEQ ID NO: 36)

AAV-CRE04-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA (FIGURA 2Q, SEQ ID NO: 37)

AAV-CRE02-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA (FIGURA 2R, SEQ ID NO: 38)

AAV-CRE06-CRE04-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA (FIGURA 2S, SEQ ID NO: 39)

AAV-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA (FIGURA 2T, SEQ ID NO: 40)

AAV-CRE02-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA (FIGURA 2U, SEQ ID NO: 41)

AAV-CRE02-CRE04-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA (FIGURA 2V, SEQ ID NO: 42)

AAV-CRE02-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-Luc-pA (FIGURA 2W, SEQ ID NO: 43)

Procedimientos experimentales

Producción y purificación de vectores AAV

Los vectores AAV9 se produjeron mediante cotransfección con fosfato de calcio (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) de células renales embrionarias humanas 293T con el plásmido pAAV de interés, un plásmido auxiliar adenoviral y una construcción de empaquetamiento quimérico que administra el gen rep AAV2 junto con el el gen cap de AAV9, como se describe en Vandendriessche y otros (2007. *J Thromb Haemost* 5:16-24), que se incorpora específicamente como referencia en el presente documento.

Brevemente, dos días después de la transfección, las células se recolectaron y las partículas del vector se purificaron utilizando métodos de centrifugación isopícnica. Las células recolectadas se lisaron mediante ciclos sucesivos de congelación/descongelación y sonicación, se trataron con benzonasa (Novagen, Madison, WI) y ácido desoxicolico (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO), y posteriormente se sometieron a 3 rondas sucesivas de ultracentrifugación en gradiente de densidad con cloruro de cesio (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA). Las fracciones que contenían el vector AAV se recogieron, se concentraron en $MgCl_2$ 1 mM en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS) (Gibco, BRL), y almacenado a $-80^{\circ}C$.

Los títulos de los vectores (en genomas virales (vg)/ml) se determinaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando la mezcla SYBR Green (que incluía colorante SYBR Green, polimerasa Taqman, ROX y dNTP, todo en uno) y cebadores específicos de luciferasa en un ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, EE. UU.) Los cebadores directo e inverso utilizados fueron 5'-CCCACCGTCGTATTCGTGAG-3' (SEQ ID NO: 48) y 5'-TCAGGGCGATGGTTTTGTCCC-3' (SEQ ID N°: 49), respectivamente.

Los números de copia conocidos (10^2 - 10^7) de los plásmidos de vector respectivos utilizados para generar los vectores AAV correspondientes, que llevan los cADNs apropiados, se utilizaron para generar las curvas estándar.

Estudios con animales

A ratones adultos CB17-SCID de 4-5 semanas de edad se les inyectó por vía intravenosa una dosis de 1011vg por ratón. La actividad de luciferasa se evaluó mediante análisis de bioluminiscencia de cuerpo entero (BLI), 7 o 10 días después de la inyección. 15 semanas después de la inyección, una se sacrificó el ratón por cohorte y se realizó BLI de órgano individual para cuantificar el nivel de expresión de luciferasa en cada órgano individual. La FIGURA 3 muestra la diferencia en veces de la expresión de luciferasa en gastrocnemio y cuádriceps de las construcciones probadas.

Resultados

El análisis de bioluminiscencia de cuerpo entero reveló que la combinación de CSk-Sh5-CRE y las combinaciones duales Dph-CRE CRE02 y CRE04, CRE04 y CRE06, en cualquier orden, y CRE02 y CRE06, o la combinación triple Dph-CRE CRE02, CRE04 y CRE06 resultó en un aumento inesperado y desproporcionado en la expresión de luciferasa, en comparación con el promotor Spc5-12 de control desprovisto de cualquier CRE (datos no mostrados). La combinación de elementos CRE aumentó la expresión del gen informador de luciferasa a un nivel más alto en comparación con los elementos CRE individuales. Además, diseccionamos el gastrocnemio y el cuádriceps de los ratones inyectados en la eutanasia y examinamos la actividad de bioluminiscencia usando BLI. Estos resultados confirmaron los resultados de BLI de todo el cuerpo al mostrar un aumento inesperado al combinar CSk-SH5-CRE con un Dph-CRE (es decir, CRE-02), dos Dph-CRE (es decir, CRE-02 + CRE-04), o tres Dph-CRE (es decir, CRE-02 + CRE-04 + CRE-06) (FIGURA 3).

Ejemplo 3: Validación in vivo de los elementos reguladores a través de un transgén terapéutico

Para determinar qué combinaciones de CRE eran más potentes, se inyectaron vectores AAV que contenían diferentes combinaciones de CRE en ratones CB17-SCID para realizar un análisis comparativo. Se evaluaron diferentes combinaciones de CRE para determinar la expresión del gen h β sg con codones optimizados. Más concretamente, se inyectaron los siguientes vectores:

AAV-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-h β -SGco-pA (FIGURA 2A, SEQ ID NO: 21)

AAV-CRE02-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-h β -SGco-pA (FIGURA 2C, SEQ ID NO: 23)

AAV-CRE04-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-h β -SGco-pA (FIGURA 2D, SEQ ID NO: 24)

AAV-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-h β -SGco-pA (FIGURA 2E, SEQ ID NO: 25)

AAV-CRE02-CRE04-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-h β -SGco-pA (FIGURA 2F, SEQ ID NO: 26)

AAV-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-h β -SGco-pA (FIGURA 2H, SEQ ID NO: 28)

AAV-CRE06-CRE04-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-h β -SGco-pA (FIGURA 2J, SEQ ID NO: 30)

AAV-CRE02-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-h β -SGco-pA (FIGURA 2L, SEQ ID NO: 32)

Procedimientos experimentales

Producción y purificación de vectores AAV

La producción y purificación del vector AAV se realizaron como se describe en el Ejemplo 2. Los cebadores directo e inverso utilizados para determinar los títulos de vector mediante PCR cuantitativa en tiempo real fueron 5'-AGGGATGGTTGGTTGGTGG-3' (SEQ ID NO: 50) y 5'-GGCAGGGTGCTCCAGGTAAT-3' (SEQ ID NO: 51), respectivamente.

estudios con animales

A ratones adultos CB17-SCID de 4-5 semanas de edad se les inyectó por vía intravenosa una dosis de 3×10^{11} vg por ratón. Se inyectaron 2-3 ratones *per cohorte*. 26 días después de la inyección, se sacrificó un ratón por cohorte y se aislaron diferentes órganos de los sacrificados. ratones (aislamiento de músculos como cuádriceps, gastrocnemio, tibial, tríceps, bíceps, diafragma, corazón, así como no musculares como hígado, riñón, cerebro, bazo). Se realizó Q-RT-PCR para cuantificar hβsgco la expresión genica.

Análisis de ARNm

El ARN total se extrajo de diferentes órganos de los ratones mediante un kit de purificación a base de membrana de sílice de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, EE. UU.), posteriormente, 200 ng de ARN total de cada muestra se sometieron a transcripción inversa. (RT) utilizando un kit de síntesis de ADNc (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, EE. UU.) A continuación, se amplificó una cantidad de ADNc correspondiente a 10 ng de ARN total mediante PCR cuantitativa (q) en un ABI 7700 (Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.). CA, EE. UU.), usando 5'-CATCACAAGTGACATCGGCA-3' (SEQ ID NO: 52) como cebador directo y 5'-TGGCAGCCCATGTTCTGGC-3' (SEQ ID NO: 53) como cebador inverso (amplicón de 217 pb). Los niveles de ARNm de hβsgco se normalizaron a los niveles de ARNm del gen endógeno de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa murina (mGAPDH), usando 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' (SEQ ID NO:54) como cebador de reenvío y 5'-GCCTGCTTACACCTTCTTGA-3' (SEQ ID NO: 55) como cebador inverso (amplicón de 82 pb). Las muestras de ARN se amplificaron con y sin transcripción inversa para excluir la amplificación de ADN. El tamaño de los fragmentos de PCR amplificados se verificó en un gel de agarosa al 1.8%.

Resultados

La combinación del CSk-SH5-CRE con las combinaciones duales Dph-CRE CRE02 y CRE04, CRE04 y CRE06, en cualquier orden, y CRE02 y CRE06, o la combinación callos Dph-CRE CRE02, CRE04 y CRE06 resultó en un inesperado y

aumento desproporcionado en la expresión del gen hβsgco, en comparación con CSk-SH5-CRE solo, o la combinación de CSk-SH5-CRE con un solo Dph-CRE (FIGURA 4) Ciertas combinaciones de CRE son más potentes que otras para mejorar expresión del gen hβsgco.

5 **Ejemplo 4: Validación in vivo de los elementos reguladores a través de un transgén terapéutico**

Para determinar qué combinaciones de CRE eran más potentes, se inyectaron vectores AAV que contenían diferentes combinaciones de CRE en ratones CB17-SCID para realizar un análisis comparativo de la expresión del gen hβsgco. Se inyectaron los
10 siguientes vectores:

-AAV-SPc5-12-MVM-hβ-SGco-pA (FIGURA 2Y, SEQ ID NO: 45) (SPc5-12)

-AAV-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβ-SGco-pA (FIGURA 2A, SEQ ID NO: 21) (CSkSH5-SPc5-12)

-AAV-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβ-SGco-pA (FIGURA 2H, SEQ ID NO: 28) (Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSkSH5-SpC5-12)

15 -AAV-CRE02-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-hβ-SGco-pA (FIGURA 2N, SEQ ID NO:34) (Dph-CRE02-Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSkSH5- SpC5-12)

Procedimientos experimentales

Los procedimientos experimentales son los mismos que los descritos en el Ejemplo 3 con algunas modificaciones en el diseño del estudio con animales.

20 Brevemente, se inyectó por vía intravenosa a ratones CB17-SCID adultos de 4-5 semanas de edad una dosis de 3×10^{11} vg por ratón. Se inyectaron 4-5 ratones por dos meses después de la inyección, se sacrificó un ratón por cohorte y se aislaron diferentes órganos de los ratones sacrificados (aislamiento de músculos como cuádriceps, gastrocnemio, tibial, tríceps, bíceps, diafragma, corazón, así como músculos no
25 musculares como como hígado, riñón, cerebro, bazo) Q-RT-PCR se realizó para cuantificar la expresión del gen hβsgco.

Resultados

Las tablas 2 a 4 muestran la expresión de hβSGco en gastrocnemio, cuádriceps y corazón de los vectores probados entre sí. La expresión relativa de hβSGco se muestra
30 como diferencia de veces.

Tabla 2: Expresión relativa de hβSGco en gastrocnemio.

	SPc5-12	CSkSH5-SPc5-12	Dph-CRE04-Dph-CRE06-	Dph-CRE02-Dph-CRE04-
--	---------	----------------	----------------------	----------------------

			CSkSH5-SpC5-12	Dph-CRE06-CSkSH5-SpC5-12
SPc5-12	1.0	-	-	-
CSkSH5-SPc5-12	9.1	1.0	-	-
Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSkSH5-SpC5-12	33.3	3.7	1.0	-
Dph-CRE02-Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSkSH5-SpC5-12	105.6	11.6	3.2	1.0

Tabla 3: Expresión relativa de hβSGco en cuádriceps.

	SPc5-12	CSkSH5-SPc5-12	Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSkSH5-SpC5-12	Dph-CRE02-Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSkSH5-SpC5-12
SPc5-12	1.0	-	-	-
CSkSH5-SPc5-12	3.4	1.0	-	-
Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSkSH5-SpC5-12	9.8	2.9	1.0	-
Dph-CRE02-Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSkSH5-SpC5-12	58.2	17.0	5.9	1.0

Tabla 4: Expresión relativa de hβSGco en el corazón.

	SPc5-12	CSkSH5-SPc5-12	Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSkSH5-SpC5-12	Dph-CRE02-Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSkSH5-SpC5-12
SPc5-12	1.0	-	-	-
CSkSH5-SPc5-12	7.4	1.0	-	-
Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSkSH5-SpC5-12	16.0	2.2	1.0	-
Dph-CRE02-Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSkSH5-SpC5-12	30.7	4.2	1.9	1.0

Los resultados que se muestran en la FIGURA 5 y las Tablas 2-4 muestran un aumento significativo en la expresión del ARNm específico del corazón o del músculo esquelético del gen *hβsgco*, siempre que los vectores contenían un CRE en comparación con el vector de control (sin CRE, denominado como SPc5-12 en la FIGURA 5 y las Tablas 1-3). Lo que es más importante, la combinación de CSk-SH5-CRE y la combinación dual Dph-CRE CRE04 y CRE06 o la combinación triple Dph-CRE CRE02, CRE04 y CRE06 resultó en un aumento inesperado y desproporcionado en los niveles de expresión del ARNm de *hβsgco*, hasta aproximadamente 100 o 30 veces en el músculo esquelético y el corazón, respectivamente, en comparación con el promotor Spc5-12 de control sin CRE.

Ejemplo 5: Evaluación in vivo del efecto de la optimización de codones del transgén

Para determinar si la optimización de codones del gen *hβsg* puede aumentar aún más los niveles de proteína *hβsg* en comparación con el gen no optimizado por codones, se utilizan tres pares de vectores AAV que contienen el gen *hβsg* optimizado por codones o de tipo silvestre. comparados uno al lado del otro Los tres pares de vectores son:

i) pAAV-SPc5-12-MVM-*hβ*-SGwt-SynthpA (FIGURA 2X, SEQ ID NO: 44) versus pAAV-SPc5-12-MVM-*hβ*-SGco-SynthpA (FIGURA 2Y; SEQ ID NO :44) :45)

ii) pAAV-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-*hβ*-SGwt-SynthpA (FIGURA 2B, SEQ ID NO: 22) frente a pAAV-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-*hβ*-SGco-SynthpA (FIGURA 2A, SEC ID N°: 21)

iii) pAAV-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-*hβ*-SGwt-SynthpA (FIGURA 2H, SEQ ID NO: 28) versus pAAV-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12 - MVM-*hβ*-SGco-SynthpA (FIGURA 2I, SEQ ID NO: 29)

Los vectores AAV se producen, valoran e inyectan en ratones CB17 macho de 4-5 semanas de edad como se describe en el Ejemplo 3. A cada ratón se le inyecta una dosis de 3x10¹¹vg, se inyectan de 4 a 5 ratones por cohorte. Dos meses después de la inyección, se sacrifican los ratones y se aíslan diferentes órganos de los ratones sacrificados (aislamiento de músculos como cuádriceps, gastrocnemio, tibial, tríceps, bíceps, diafragma, corazón, así como tejidos no musculares como hígado, riñón, cerebro, bazo). Se realiza un Western blot en los diferentes tejidos aislados de ratones inyectados con vectores AAV que codifican el gen *hβsg* optimizado por codón o wt.

Ejemplo 6: Evaluación in vivo de los elementos reguladores en ratones nulos SGCB

La eficacia terapéutica de la combinación CRE Dph-CRE02-Dph-CRE04-Dph-CRE06-CSkSH5 (SEQ ID NO: 14) se evaluó en sarcoglicano homocigoto, beta (glucoproteína asociada a distrofina) (Sgcb) dirigido a ratones mutantes mediante terapia génica usando un vector que comprende el transgén que codifica β -sarcoglicano. Los ratones Sgcb-null, con β -sarcoglicano inactivado, desarrollan distrofia muscular grave como en la distrofia muscular de cinturas humana tipo 2E.

A ratones machos Sgcb-null neonatales de 2-3 días de edad se les inyectó el vector experimental AAV-CRE02-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-h β -SGco-pA (FIGURA 2N, SEQ ID NO: 34) o el vector de control AAV-SPc5-12-MVM-h β -SGco-pA desprovisto de CRE (FIGURA 2Y, SEQ ID NO: 45) a una dosis de vector de 1×10^{11} vg con 3 ratones por cohorte.

Los ratones se sometieron a un ensayo de resistencia en cinta rodante para monitorear el rendimiento muscular 6 meses después de la inyección del vector. Se usaron ratones sin Sgcb inyectados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) como controles que no fueron tratados con terapia génica. La distancia de carrera se determinó usando una cinta de correr Bioseb (Francia) utilizando el SOFTWARE TREAD. Los resultados se muestran en la FIGURA 6.

Los ratones inyectados con el vector experimental AAV-CRE02-CRE04-CRE06-CSk-SH5-SPc5-12-MVM-h β -SGco-pA corren una distancia más larga (distancia promedio de 364 metros) en comparación con los ratones inyectados con el vector de control sin de CRE (designadas como AAV-SPc5-12-MVM-h β -SGco-pA) (distancia promedio de 148 metros). Los ratones a los que se les inyectó el vector experimental también corrieron una distancia 5 veces más larga que los ratones de control a los que se les inyectó PBS (distancia promedio de 71 metros).

Estos resultados muestran que la terapia génica fue eficaz en ratones sin Sgcb y que la combinación CRE aumentó la eficacia terapéutica.