

VECTORES VIRALES ADENOASOCIADOS PARA EL TRATAMIENTO DE MUCOPOLISACARIDOSIS

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a vectores útiles para la expresión de proteínas de interés y su utilización en terapia génica. La presente invención también se refiere a vectores y secuencias de ácidos nucleicos útiles para el tratamiento de mucopolisacaridosis (MPS), y en particular, para el tratamiento

10 de mucopolisacaridosis tipo II o síndrome de Hunter.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El lisosoma es un orgánulo encontrado en el citoplasma de células de animales

15 que contiene más de 50 hidrolasas que rompen biomoléculas durante el reciclaje de componentes celulares desgastados o después de la engullición de virus y bacterias. Este orgánulo contiene varios tipos de enzimas hidrolíticas, que incluyen proteasas, nucleasas, glucosidasas, lipasas, fosfolipasas, fosfatasas y sulfatasas. Todas las enzimas son hidrolasas ácidas.

20

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico (EAL) se producen por defectos genéticos que afectan a una o más enzimas lisosómicas. Estas enfermedades genéticas resultan generalmente de una deficiencia en una actividad enzimática particular presente en el lisosoma. En un menor grado,

25 estas enfermedades pueden ser debidas a deficiencias en proteínas que participan en la biogénesis lisosómica.

Las EAL son individualmente raras, aunque como grupo estos trastornos son relativamente comunes en la población general. La prevalencia combinada de

30 EAL es aproximadamente 1 por 5.000 recién nacidos vivos. Véase Meikle P, y col., JAMA 1999;281:249-254. Sin embargo, algunos grupos dentro de la población general están particularmente afectados por una alta manifestación

de EAL. Por ejemplo, la prevalencia de las enfermedades de Gaucher y Tay-Sachs en descendientes de individuos judíos de Europa central y del este (Ashkenazi) es 1 por 600 y 1 por 3.900 nacimientos, respectivamente.

- 5 La mucopolisacaridosis de tipo II (MPSII), también conocida como síndrome de Hunter y descrita por primera vez por el Dr. Charles Hunter, es una EAL crónica, progresiva y multisistémica producida por deficiencia o ausencia de actividad de la enzima iduronato-2-sulfatasa (IDS), codificada por el gen *IDS* y que participa en la degradación escalonada lisosómica de los
- 10 glucosaminoglicanos (GAG) heparán sulfato (HS) y dermatán sulfato (DS), conduciendo a su acumulación patológica. Véase Hunter, Proc R Soc Med. 1917;10(Sect Study Dis Child):104-16. Debido a la herencia recesiva ligada a X, casi todos los pacientes con Hunter son masculinos, aunque se ha informado de algunas mujeres con síndrome de Hunter en la bibliografía.
- 15 Véanse Mossman y col., Arch Dis Child. 1983;58:911-915, Gullén-Navarro y col., Orphanet J Rare Dis. 2013;25(8):92, Valstar y col., J. Inherit. Metab. Dis. 2008;31(2):240-52.

- La MPSII se caracteriza clínicamente como una neuropatía progresiva del
- 20 sistema nervioso central (SNC) que aparece en la infancia. Los niños con Hunter son normalmente normales al nacer y desarrollan síntomas antes de los 2 años de edad. Véase Schwartz y col., Acta Paediatr Suppl. 2007;96:63-70. La evolución clínica generalmente empieza con deterioro cognitivo progresivo lento, seguido de problemas del comportamiento y deterioro intelectual
 - 25 progresivo. La pérdida de locomoción se produce después. Además de los síntomas neurológicos, los pacientes con MPSII padecen alteraciones no neurológicas, que incluyen infecciones recurrentes del oído, nariz, garganta y pecho, diarrea y estreñimiento frecuentes, insuficiencia cardíaca, rasgos faciales toscos, talla baja, rigidez y degeneración articular progresiva,
 - 30 anomalías esqueléticas que afectan la movilidad, además de hepato y esplenomegalia. Véanse Neufeld y Muenzer, "The Mucopolysaccharidoses" en Scriver C, et al., Eds., "The metabolic and molecular basis of inherited disease",

McGraw-Hill Publishing Co., New York, NY, US, 2001, pp. 3421-3452. El espectro de manifestaciones clínicas de la enfermedad varía considerablemente dependiendo de los niveles residuales de actividad de IDS que el paciente tiene, que a su vez se determina por la mutación subyacente

5 del gen *IDS*, con >300 mutaciones del gen *IDS* descritas hasta la fecha (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=IDS>). En general, se han descrito dos formas clínicas de la MPSII. La forma más grave, con una aparición entre los 18 meses y los 4 años de edad, es tres veces más común que la forma leve, y, se caracteriza por rasgos faciales toscos, deformidades esqueléticas,

10 hepatoesplenomegalia y participación neurológica que conduce a retraso mental. Véase Wraith y col., Eur J Pediatr. 2008;167(3):267-277. Los pacientes normalmente mueren durante la segunda década de vida debido a enfermedad obstructiva de las vías respiratorias e insuficiencia cardíaca. Véanse Wraith y col., Eur J Pediatr. 2008;167(3):267-277, Neufeld y Muenzer, arriba. Una forma

15 más lentamente progresiva de la enfermedad, con aparición posterior, supervivencia más larga y disfunción neurológica mínima, conocida como el fenotipo atenuado, también se ha informado en un subconjunto de pacientes con MPSII. Véanse Wraith y col., Eur J Pediatr. 2008;167(3):267-277, Neufeld y Muenzer, arriba.

20

Hasta hace poco no ha habido terapias aprobadas específicas para el síndrome de MPSII y el único tratamiento disponible era sintomático usando una amplia gama de fármacos inespecíficos para la prevención y tratamiento de complicaciones de la enfermedad. En los últimos años han estado

25 disponibles dos opciones terapéuticas principales: terapia de reemplazo enzimático (ERT) y trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT). El diseño de ambas estrategias terapéuticas se basa en la posibilidad de corrección cruzada, basada en el hecho de que las células normales secretan cantidades significativas de enzimas lisosómicas solubles marcadas con

30 manosa-6-fosfato (M6P), tales como IDS, que pueden ser posteriormente captadas del compartimento extracelular por otras células mediante receptores de M6P sobre la membrana plasmática y dirigirse a los lisosomas. Véase Enns

y col., Neurosurg Focus. 2008;24(3-4):E12. Además, hay un umbral de actividad enzimática residual, generalmente muy bajo, por encima del cual la célula puede hacer frente a la entrada de sustrato y los sujetos no son afectados por la enfermedad, sugiriendo que la restauración de la actividad normal no es un requisito para modificar la evolución clínica. Véase Neufeld, 5 Annu Rev Biochem. 1991;60:257-80.

Desde su autorización por la Agencia Estadounidense del Medicamento (FDA) en 2006 y por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en 2007, la 10 iduronato-2-sulfatasa humana recombinante (idursulfasa, ELAPRASE®, Shire Pharmaceuticals) se ha indicado para el tratamiento de pacientes con MPSII. El tratamiento se administra semanalmente a una dosis de 0,5 mg/kg por infusión intravenosa, con un tiempo de infusión promedio de 1-3 horas. Véase Giugliani y col., Genet Mol Biol. 2010;33(4):589-604. ELAPRASE® fue autorizado 15 después de un estudio aleatorizado, de doble ciego y controlado por placebo de 96 pacientes con Hunter sin deterioro cognitivo en el nivel inicial y con enfermedad moderadamente avanzada. Véanse Muenzer y col., Genet Med. 2006;8(8):465-73, Muenzer y col., Genet Med. 2011;13(2):95-101. Después de un año de tratamiento, los pacientes tratados con ELAPRASE® mostraron un 20 aumento en la distancia recorrida en seis minutos (prueba de caminata de seis minutos) en comparación con pacientes en placebo. Véase Muenzer y col., Genet Med. 2011;13(2):95-101. También se ha mostrado que la ERT con ELAPRASE® mejora la amplitud de movimiento (ROM) de las articulaciones y reduce los volúmenes del hígado y el bazo. Véase Muenzer y col., Genet Med. 25 2011;13(2):95-101. Además, hay evidencia de función pulmonar mejorada cuando no están presentes anticuerpos neutralizantes contra idursulfasa; se informó del desarrollo de anticuerpos anti-IDS en el 50 % de los pacientes tratados a largo plazo. Véase Muenzer y col., Genet Med. 2011;13(2):95-101.

30 Un estudio de fase I/II en 31 pacientes con MPSII comparó la eficacia de ELAPRASE® con la de un segundo producto basado en la isoforma beta de la idursulfasa con un nombre comercial propuesto de Hunterase® (NCT01301898,

- <http://clinicaltrials.gov>). Ambas proteínas se administraron intravenosamente a una dosis de 0,5 mg/kg/semana para ELAPRASE® y 0,5 y 1,0 mg/kg/semana para Hunterase® durante 24 semanas. Los resultados del tratamiento con Hunterase® mostraron eliminación reducida de GAG en la orina y rendimiento
- 5 mejorado en la prueba de caminata de 6 minutos, pero ninguna de las dosis fue capaz de mediar una la eficacia terapéutica en la función pulmonar, función cardíaca o movilidad de las articulaciones. Véase Sohn y *col.*, Orphanet J Rare Dis. 2013;8:42. Las infusiones de Hunterase® fueron generalmente seguras y bien toleradas, aunque se informaron algunos acontecimientos adversos, tales
- 10 como urticaria y erupción cutánea. Véase Sohn y *col.*, Orphanet J Rare Dis. 2013;8:42. Recientemente se ha completado un estudio esencial PIII (<http://clinicaltrials.gov>, NCT01645189), pero los resultados no están todavía disponibles.
- 15 Debido a la hipersensibilidad a ELAPRASE®, tiene que estar disponible apoyo médico durante la administración del producto. Durante el ensayo, los acontecimientos adversos más graves descritos fueron reacciones anafilácticas que podrían aparecer en cualquier momento durante la infusión de ELAPRASE® o hasta 24 horas después de la administración del producto.
- 20 Véanse Muenzer y *col.*, Genet Med. 2006;8(8):465-73, Muenzer y *col.*, Genet Med. 2011;13(2):95-101. Estas reacciones anafilácticas, que pueden comprometer la vida del paciente, incluyen disnea, hipoxia, hipotensión, urticaria y/o angioedema de garganta o lengua (<http://elaprased.com/>) y pueden requerir intervenciones tales como resucitación o traqueotomía de urgencia, y
- 25 tratamiento con agonistas beta-adrenérgicos inhalados, epinefrina o corticosteroides intravenosos. Véase Burton y *col.*, Mol Genet Metab. 2011;103(2):113-20. Otras desventajas de ERT incluyen: 1) la dificultad de realizar infusiones intravenosas largas de 1-3 horas en pacientes pediátricos, muchos de los cuales padecen enfermedad mental (<http://elaprased.com/>), 2) el
- 30 hecho de que el 50 % de los pacientes tratados con ELAPRASE® en estudios clínicos dieran positivo para anticuerpos a la idursulfasa de significancia clínica todavía desconocida, pero que podría limitar la eficacia del producto a largo

plazo, como se sugiere por pruebas de función pulmonar. Véanse Muenzer y *col.*, *Mol Genet Metab.* 2007;90(3):329-37, Muenzer y *col.*, *Genet Med.* 2006;8(8):465-73, Muenzer y *col.*, *Genet Med.* 2011;13(2):95-101, y 3) el alto coste de la terapia, que incluye también los costes del cuidado a domicilio.

5 Véase Wyatt y *col.*, *Health Technol Asses.* 2012;16(39):1-543.

Independientemente de las cuestiones de seguridad o el coste de administración de ELAPRASE®, la incapacidad de la IDS recombinante intravenosamente administrada para alcanzar el SNC, al menos a la dosis
10 actualmente recomendada de 0,5 mg/kg por semana, probablemente limita la posible aplicabilidad de ERT al tratamiento de la grave neurodegeneración observada en pacientes con Hunter. Solo se logró un rescate parcial de la actividad cerebral de IDS por la administración intravenosa semanal de 1,2 ó 10 mg de ELAPRASE®/kg a ratones con MPSII de 2 ó 7 meses de edad,
15 respectivamente. Véase Polito y *col.*, *Hum Mol Genet.* 2010;19(24):4871-85. Además, incluso a estas altas dosis, la actividad de IDS en circulación volvió a niveles previos al tratamiento 72 horas después de la administración de la proteína. Véase Polito y *col.*, *Hum Mol Genet.* 2010;19(24):4871-85. De hecho, la ERT intravenosa dejó de corregir la acumulación de GAG en los cerebros de
20 un modelo murino de MPSII. Véase Garcia y *col.*, *Mol Genet Metab.* 2007;91(2):183-90. Por tanto, la indicación de ELAPRASE® está limitada al tratamiento de síntomas no neurológicos de la enfermedad.

Una alternativa a la administración intravenosa de ERT es la provisión de la
25 enzima exógena directamente al SNC. La administración de 20 µg de IDS humana recombinante al ventrículo lateral de ratones con MPSII de 5 meses de edad cada 3 semanas aumentó la actividad de IDS en el cerebro, cerebelo y órganos somáticos, tales como el hígado, corazón, riñón y testículo. Véase Higuchi y *col.*, *Mol Genet Metab.* 2012;107(1-2):122-8. La restauración de la
30 actividad de IDS condujo a la recuperación de la memoria a corto plazo y actividad locomotora y a una reducción en la vacuolación celular y distensión lisosómica en el cerebelo, hígado y testículo. Sin embargo, la eficacia

terapéutica fue parcial, el contenido de GAG no se normalizó completamente y algunas alteraciones del comportamiento siguieron siendo resistentes al tratamiento. Véase Higuchi y *col.*, Mol Genet Metab. 2012;107(1-2):122-8. Un estudio reciente de seguridad y de búsqueda de dosis de administración de idursulfasa al líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante un dispositivo de liberación de fármaco intratecal para tratar directamente la patología del SNC en pacientes con Hunter ha demostrado reducciones de aproximadamente el 80-90% en los niveles de GAG en LCR después de 6 meses de tratamiento. Véanse Muenzer y *col.*, Genet. Med. 2015; doi:10.1038/gim.2015.36 y www.clinicaltrials.gov (NCT00920647). Sin embargo, la implantación del dispositivo de liberación intratecal permanente que requiere la terapia está asociada a riesgos sustanciales e inconvenientes y la propia terapia tiene un coste económico muy alto por paciente/año.

Otra forma de llegar al SNC por administración sistémica es usando un caballo troyano molecular. Un ejemplo de ese enfoque es la proteína de fusión de anticuerpo para receptor de insulina-iduronato 2-sulfatasa (HIRMAb-IDS), que puede cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) mediante transporte mediado por receptor. La administración intravenosa de 3, 10 y 30 mg/kg de HIRMAb-IDS a monos Rhesus juveniles masculinos semanalmente, durante 26 semanas, produjo una captación por el cerebro de HIRMAb-IDS del 1% de la dosis total inyectada. Véase Boado y *col.*, Biotechnol Bioeng. 2014;111(11):2317-25. El estudio también demostró seguridad de la proteína de fusión, ya que no se observó reacción relacionada con la infusión o respuesta inmunitaria.

El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) usando células madre derivadas de la médula ósea (trasplante de médula ósea, TMO) ha demostrado ser eficaz en el tratamiento tanto de la patología somática como de la neurológica en pacientes con otras MPS. Véanse Peters y *col.*, Blood. 1996;87(11):4894-902, Peters y Steward, Bone Marrow Transplant. 2003;31(4):229-39 y Yamada y *col.*, Bone Marrow Transplant. 1998;21(6):629-

34. El principio subyacente a la corrección por HSCT es que monocitos de donante pueden cruzar la pared capilar, incluso en la barrera hematoencefálica, después de diferenciarse en macrófagos de tejido, microglía en el caso del SNC, y secretar la enzima deficiente para la administración a las diversas células. Véase Krivit y *col.*, *Cell Transplant.* 1995;4(4):385-92. El TMO realizado en ratones con MPSII redujo la acumulación de GAG en una variedad de tejidos somáticos, que incluyen hígado, bazo y pulmón, pero no en el SNC. Véase Akiyama y *col.*, *Mol Genet Metab.* 2014;111(2):139-46. Si se combina TMO con ERT (0,5 mg de idursulfasa/kg/semanalmente), se observó un efecto aditivo sobre los niveles de GAG en el corazón, riñón y pulmón 7 meses después del tratamiento de ratones con MPSII, pero las acumulaciones de GAG en el SNC siguieron a niveles patológicos. Véase Akiyama y *col.*, *Mol Genet Metab.* 2014;111(2):139-46. Sin embargo, la evidencia de eficacia clínica no es muy fuerte en pacientes con MPSII. El seguimiento de 10 pacientes con Hunter que recibieron TMO entre 1982 y 1991 mostró grados altamente variables de éxito. Véase Vellodi y *col.*, *J Inherit Metab Dis.* 1999;22(5):638-48. Cuatro de aquellos pacientes murieron antes de 100 días después del TMO, y 3 más antes de 7 años después del procedimiento. De los 3 pacientes que sobrevivieron durante más de 7 años después del TMO, uno de ellos no informó beneficio clínico; un segundo mostró un aumento mínimo de la actividad de IDS en plasma y el tercero dejó de normalizar el contenido de GAG a pesar de tener un ligero aumento en la actividad de IDS en plasma. Véase Vellodi y *col.*, *J Inherit Metab Dis.* 1999;22(5):638-48. La imagen por resonancia magnética (IRM) del cerebro mostró una ligera disminución en el número de lesiones quísticas 2,5 años después del TMO en un paciente con fenotipo de MPSII leve. Véase Seto y *col.*, *Ann Neurol.* 2001;50(1):79-92. Sin embargo, el mismo estudio proporcionó datos sobre otro paciente con fenotipo leve que no mostró ninguna mejora bajo IRM. Véase Seto y *col.*, *Ann Neurol.* 2001;50(1):79-92. Los resultados clínicos parecen ser altamente variables entre pacientes con Hunter, supuestamente debido a diversos factores; genotipo, edad en HSCT, estado clínico del paciente en HSCT, tal como grado de alteración neurológica, estado del donante, quimerismo del donante, fuente de

células madre y actividad enzimática han sugerido todos que influyen en el resultado a largo plazo. Véanse Giugliani y *col.*, Genet Mol Biol. 2010;33(4):589-604, Valayannopoulos y *col.*, Rheumatology. 2011;5:v49-59.

- 5 Cuando es satisfactorio, el HSCT puede contribuir a algún grado de beneficio clínico a nivel somático, disminución de los problemas de comportamiento y mejores patrones de sueño, pero sigue sin estar claro si el tratamiento puede mediar en cualquier mejora significativa del deterioro cognitivo. Véase Giugliani y *col.*, Genet Mol Biol. 2010;33(4):589-604, Valayannopoulos y *col.*,
10 Rheumatology. 2011;5:v49-59. En general, este enfoque no se recomienda para pacientes con Hunter, debido a la alta tasa de morbilidad y mortalidad y los beneficios neurocognitivos variables. Véase Giugliani y *col.*, Genet Mol Biol. 2010;33(4):589-604.
- 15 Una explicación plausible al fracaso de la HSCT es la limitada expresión de IDS en células injertadas, que conduce a una corrección cruzada de IDS insuficiente en el SNC. Se usaron vectores lentivirales que codifican el gen IDS humano para transducir células de médula ósea antes de su trasplante en ratones con MPSII. Los ratones con MPSII tratados mostraron rendimiento
20 mejorado en la prueba de memoria del laberinto en T 14 semanas después del trasplante. Véase Podetz-Pedersen y *col.*, Mol Ther. 2013;21:s1-s285.

Dadas las limitaciones de las actuales opciones terapéuticas para MPSII, se necesitan enfoques alternativos. La terapia génica *in vivo* ofrece la posibilidad
25 de un tratamiento de una vez para MPSII y otras enfermedades hereditarias, con la perspectiva de efectos beneficiosos para toda la vida. Se han probado varios enfoques de terapia génica basados en el uso de diferentes vectores virales combinados con diferentes vías de administración en modelos animales de enfermedad de MPSII.

30

La transferencia génica mediada por vectores virales adenoasociados (AAV), en particular, ha emergido rápidamente como el enfoque de elección para

muchas aplicaciones de terapia génica *in vivo*, debido a la alta eficiencia de transducción y la ausencia de patogenicidad de estos vectores. Los vectores de AAV pueden transducir células post-mitóticas y varios estudios pre-clínicos y clínicos han demostrado el potencial de la transferencia génica mediada por vector de AAV para conducir eficientemente la expresión sostenida de transgenes terapéuticos para una variedad de enfermedades. Véanse Bainbridge y col., N Engl J Med. 2008;358(21):2231-9, Hauswirth y col., Hum Gene Ther. 2008;19(10):979-90, Maguire y col., N Engl J Med. 2008;358(21):2240-8, Niemeyer y col., Blood 2009;113(4):797-806, Rivera y col., Blood 2005;105(4):1424-30, Nathawani y col., N Engl J Med. 2011;365(25):2357-65 y Buchlis y col., Blood 2012;119(13):3038-41.

La administración sistémica de vectores de AAV5-CMV-IDS humana en la vena temporal de crías de ratón con MPSII (p2) produjo un aumento en la actividad de IDS en corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo y bazo, y un aumento moderado en la actividad de IDS en el cerebro, que condujo a una reducción en tejido somático y contenido de GAG urinario hasta 18 meses después de la administración de un único vector. Véase Polito y col., Am J Hum Genet. 2009;85(2):296-301. Además, este tratamiento previno el desarrollo de la patología del SNC previniendo la neurodegeneración, y corrigiendo la astrogliosis e inflamación. La evaluación de ratones en la prueba de campo abierto 18 meses después de la inyección de AAV demostró la mejora con el tratamiento en el fenotipo motor macroscópico de ratones con MPSII. Véase Polito y col., Am J Hum Genet. 2009;85(2):296-301.

También se han usado AAVs de serotipo 8 que codifican el gen IDS humano bajo el control del promotor de TBG específico del hígado para tratar MPSII. Hasta 7 meses tras la administración intravenosa de vectores a ratones con MPSII de 2 meses de edad se observó un aumento en la actividad de IDS en suero, hígado, bazo, pulmón, corazón, riñón y músculo, produciendo corrección completa del almacenamiento de GAG en estos tejidos somáticos. Véase Cardone y col., Hum Mol Genet. 2006;15(7):1225-36. Sin embargo, se

requirieron dosis muy altas (4×10^{12} genomas virales/ratón) para lograr un ligero aumento en la actividad de IDS y eliminación parcial de la acumulación de GAG en el cerebro cuando los vectores se administraron intravenosamente. Véase Cardone *y col.*, Hum Mol Genet. 2006;15(7):1225-36. Similarmente, la

5 administración intravenosa de vectores de AAV8 en los que el gen IDS humano está bajo el control del promotor del factor 1-a de elongación (EF) ubicuo a ratones adultos con MPSII demostró un aumento en la actividad de IDS en hígado, corazón, bazo y riñón hasta 24 semanas después de la administración, con corrección completa de la acumulación de GAG en aquellos órganos.

10 Véase Jung *y col.*, Mol Cells. 2010;30(1):13-8. La actividad de IDS en el cerebro solo se aumentó en el grupo de animales sacrificados a corto plazo (6 semanas después de la inyección); sin embargo, esto no fue suficiente para normalizar el contenido de GAG en el SNC. Véase Jung *y col.*, Mol Cells. 2010;30(1):13-8.

15 Ninguno de los enfoques anteriormente mencionados ha restaurado completamente la actividad de la iduronato-2-sulfatasa, logrado la erradicación completa de las inclusiones intracitoplásmicas en el SNC y tejidos somáticos, o corregido todos los signos clínicos de MPSII. Así, existe la necesidad de

20 enfoques novedosos para el tratamiento de MPSII que tengan mejor eficacia y perfiles de seguridad.

RESUMEN DE LA INVENCION

25 La presente invención proporciona nuevas secuencias nucleotídicas para el tratamiento de mucopolisacaridosis, en particular mucopolisacaridosis tipo II (MPSII), o síndrome de Hunter.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia

30 nucleotídica aislada que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1 y que tiene entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En particular, las secuencias nucleotídicas aisladas según este

primer aspecto de la invención están seleccionadas de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8.

5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un plásmido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1, y en particular una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 2, preferiblemente que tiene entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

10

En un tercer aspecto, la invención proporciona nuevos vectores recombinantes para el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II. Dichos vectores recombinantes son en particular vectores de virus adenoasociados (AAV) que contienen una secuencia nucleotídica que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1, y en particular una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 2, preferiblemente que tiene entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En una realización preferida, los vectores virales adenoasociados son de serotipo 9 (AAV9). Los vectores AAV9 de la presente invención pueden
15
20
25
30
contener adicionalmente un promotor unido a la secuencia nucleotídica codificante con el fin de controlar la expresión de IDS. Un promotor adecuado es el promotor CAG, SEQ ID NO: 14.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la
25
30
secuencia nucleotídica o del plásmido o del vector recombinante descritos en el presente documento.

Todavía otro aspecto de la invención se refiere a las secuencias nucleotídicas de la invención o un plásmido descrito en el presente documento, o un vector recombinante descrito en el presente documento, para su uso como un medicamento, en particular para el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II.

La presente invención también proporciona un método para la producción de los plásmidos según la invención, además de un método para la producción de los vectores recombinantes según la invención.

- 5 En otro aspecto, la invención se refiere a células aisladas que comprenden la secuencia nucleotídica que codifica para IDS, y en particular una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 2, preferiblemente que tiene entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- Figura 1.** Generación de pAAV-CAG-hIDS y AAV-CAG-hIDS. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-CAG-hIDS y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector adenoasociado que contiene la secuencia codificante de hIDS.

- Figura 2.** Generación de pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y AAV-CAG-ohIDS-versión1. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector adenoasociado que contiene la secuencia codificante de ohIDS-versión1.

- Figura 3.** Generación de pAAV-CAG-ohIDS-versión2 y AAV-CAG-ohIDS-versión2. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-CAG-ohIDS-versión2 y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector adenoasociado que contiene la secuencia codificante de ohIDS-versión2.

- 30 **Figura 4.** Generación de pAAV-CAG-omIDS y AAV-CAG-omIDS. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-CAG-omIDS y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector

adenoasociado que contiene la secuencia codificante de omIDS

Figura 5. Administración hidrodinámica de pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 a ratones sanos. Los histogramas representan la actividad de la iduronato-2-sulfatasa (IDS) en hígado (A) y suero (B) medida 48 horas después de la administración de 30 μ g de los plásmidos que codifican la IDS humana pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2. La actividad de IDS de ratones WT inyectados con solución salina se fijó al 100 %. Los valores son medias $\pm$ EEM de 5 ratones por grupo. * $P < 0,05$.

Figura 6. Administración hidrodinámica de pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 a ratones con MPSII. (A, B) Los histogramas representan la actividad de la iduronato-2-sulfatasa (IDS) en hígado (A) y suero (B) medida 1 semana después de la administración de los plásmidos que codifican la IDS humana pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2. Se usaron ratones no mutantes (sanos, *wild-type-WT*) y con MPSII inyectados con solución salina como controles. La actividad de IDS de ratones WT se fijó al 100 %. (C) Cuantificación del contenido de glucosaminoglicano (GAG) en hígado, bazo, corazón, vejiga urinaria y testículo 1 semana después de la administración de los diferentes plásmidos que codifican la IDS humana. Los valores son medias $\pm$ EEM de 5 ratones por grupo. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

Figura 7. Administración intravascular de AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2 a ratones con MPSII. Los ratones con MPSII se inyectaron intravenosamente con 1×10^{10} gv de vectores AAV9 que codifican la IDS humana WT (AAV9-CAG-hIDS) o dos versiones diferentes de IDS humana optimizada (AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2). Se usaron ratones WT y con MPSII sin tratar como controles. (A, B) Los histogramas representan la actividad de la iduronato-2-sulfatasa (IDS) en hígado (A) y suero (B). La actividad de IDS de ratones WT se fijó al 100 %. (C)

Cuantificación del contenido de glucosaminoglicano (GAG) en hígado en animales administrados con los diferentes vectores que codifican la IDS humana. Los valores son medias $\pm$ EEM de 5 ratones por grupo. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ y *** $P<0,001$.

5

Figura 8. Administración intra-LCR de AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2 a ratones con MPSII. Se inyectaron ratones con MPSII de 2 meses de edad en la cisterna magna con 5×10^{10} gv de vectores AAV9 que codifican la IDS humana no mutante (wild-type) (AAV9-CAG-hIDS) o dos versiones diferentes de IDS humana optimizada (AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2). Se usaron ratones no mutados (WT), con MPSII no tratados (MPSII) y con MPSII administrados con vectores AAV9 no codificantes (Nulo) (MPSII-Nulo) como controles. (A) Se analizó la actividad de la iduronato-2-sulfatasa 1,5 meses después de la administración del vector en diferentes partes del cerebro (Secciones I-V, en la que la Sección I representa la parte más rostral del cerebro y la Sección V representa la porción más caudal). La actividad de IDS de ratones WT se estableció al 100 %. (B) Cuantificación del contenido de glucosaminoglicano (GAG) en las mismas regiones del cerebro que en (A). Los resultados se muestran como media $\pm$ EEM de 5 ratones por grupo. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ y **** $P<0,0001$.

Figura 9. Administración intra-LCR de AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2 a ratones con MPSII. Se inyectaron ratones con MPSII de 2 meses de edad en la cisterna magna con 5×10^{10} gv de vectores AAV9 que codifican la IDS humana no mutante (wild-type) (AAV-CAG-hIDS) o dos versiones diferentes de IDS humana optimizada (AAV-CAG-ohIDS-versión1 y AAV-CAG-ohIDS-versión2). Se usaron ratones no mutados (WT), con MPSII no tratados (MPSII) y con MPSII que recibieron vectores AAV9 no codificantes (Nulo) (MPSII-Nulo) como controles. (A, B) Actividad de la iduronato-2-sulfatasa, expresada como % de actividad de WT, en hígado (A) y suero (B), medida 1,5 meses después del tratamiento. (C) Cuantificación del

contenido de glucosaminoglicano (GAG) en órganos somáticos. Los resultados se muestran como media $\pm$ EEM de 5 ratones por grupo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$.

5 **Figura 10.** Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A) Actividad de la iduronato-2-sulfatasa en diferentes partes del cerebro (secciones I-V) de ratones WT (sanos), ratones con MPSII sin tratamiento y ratones con MPSII administrados en el LCR, mediante inyección intracisterna (IC), con 5×10^{10} gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o AAV9-CAG-omIDS. La actividad de IDS WT se fijó al 100 %. Los análisis se realizaron 4 meses después de la administración del vector. (B) Cuantificación de glucosaminoglicanos (GAGs) en las mismas partes del cerebro que en (A). Los resultados se muestran como medias $\pm$ EEM de 4-5 ratones por grupo. ***
10 $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ frente a MPSII-Nulo.
15

Figura 11. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A) Cuantificación de la intensidad de señal obtenida en diferentes áreas del cerebro tras la tinción para el marcador lisosómico LAMP-2, en ratones WT (sanos) y ratones con MPSII administrados en la cisterna magna con 5×10^{10} gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o 5×10^{10} gv de AAV9-CAG-omIDS. Los análisis se realizaron 4 meses después de la administración del vector. (B) Actividad de otras enzimas lisosómicas en extractos de cerebro.
20 IDUA, *iduronidasa, alfa-L-*, SGSH, *N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa*, NAGLU, *N-acetilglucosaminidasa, alfa*, HGSNAT, *heparan-alfa-glucosaminidasa N-acetiltransferasa*, GALNS, *galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa*, GUSB, *glucuronidasa, beta*, HEXB, *hexosaminidasa B*. Los valores son medias $\pm$ EEM de 4-5 ratones por grupo. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ frente a MPSII-
25 Nulo.
30

Figura 12. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la

iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). Cuantificación de la intensidad de señal obtenida en diferentes áreas tras la tinción de secciones de cerebro para el marcador lisosómico LAMP2. El análisis se realizó en ratones no mutados (WT) y compañeros de camada con MPSII 8 meses después de que los últimos recibieran una administración intra-LCR de ya sea 5×10^{10} gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o 5×10^{10} gv de AAV9-CAG-omIDS. Los resultados se muestran como media $\pm$ EEM de 2-6 ratones por grupo. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ frente a MPSII-Nulo.

Figura 13. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A, B) Los histogramas representan la intensidad de señal medida tras la inmunotinción para el marcador de astrocitos GFAP (A) y para el marcador de la microglía BSI-B4 (B) en secciones de la corteza frontal, parietal y occipital, colículo superior y tálamo de ratones WT (sanos), y ratones con MPSII administrados 4 meses antes en la cisterna magna con 5×10^{10} gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o 5×10^{10} gv de AAV9-CAG-omIDS. Los resultados se muestran como medias $\pm$ EEM de 5 ratones por grupo. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ frente a MPSII-Nulo.

20

Figura 14. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A, B) Los histogramas representan la intensidad de señal medida tras la inmunotinción para el marcador de astrocitos GFAP (A) y para el marcador de la microglía BSI-B4 (B) en secciones del encéfalo de ratones no mutados (WT) sanos y compañeros de camada con MPSII que recibieron la administración intra-LCR de ya sea 5×10^{10} gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o 5×10^{10} gv de AAV9-CAG-omIDS. El análisis se realizó 8 meses después de la administración del vector. Los resultados se muestran como media $\pm$ EEM de 2-6 ratones por grupo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$ frente a MPSII-Nulo.

30

Figura 15. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A, B) Actividad de la iduronato-2-sulfatasa, expresada como % de actividad WT, en hígado (A) y suero (B) de ratones WT (sanos), ratones con MPSII sin tratamiento y ratones con MPSII administrados en el LCR con 5×10^{10} gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o 5×10^{10} gv de vector AAV9-CAG-omIDS a los 2 meses de edad y analizados 4 meses después. La actividad de IDS del WT se fijó al 100 %. (C) Cuantificación de glucosaminoglicanos (GAGs) en órganos somáticos. Los resultados se muestran como medias $\pm$ EEM de 4-5 ratones por grupo. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ frente a MPSII-Nulo.

Figura 16. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A, B) Actividad de la iduronato-2-sulfatasa, expresada como el % de actividad de WT, en pulmón (A) y corazón (B) de ratones no mutados (WT) sanos, ratones con MPSII no tratados (MPSII) y ratones con MPSII administrados en el LCR con 5×10^{10} gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o 5×10^{10} gv de vector AAV9-CAG-omIDS a los 2 meses de edad y analizados 4 meses después. (C) Cuantificación del número de copias de genomas de vector/genoma diploide (gv/gd) en hígado, pulmón y corazón en ratones con MPSII administrados intra-LCR con AAV9-CAG-omIDS. Se usaron los tejidos obtenidos de un ratón con MPSII no tratado como controles. Los resultados se muestran como media $\pm$ EEM de 4-5 ratones por grupo en (A y B). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ MPSII-Nulo.

Figura 17. Administración intra-LCR de vectores de AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A) Peso húmedo del hígado con respecto al peso corporal completo de ratones WT (sanos), ratones con MPSII sin tratamiento y ratones con MPSII administrados en el LCR con 5×10^{10} gv de vector de control (AAV9-Nulo) o 5×10^{10} gv de vector AAV9-CAG-omIDS a los dos meses de edad y analizados 4 meses después. (B) Actividad de otras enzimas lisosómicas en extractos de hígado

obtenidos de las mismas cohortes de animales que en (A). (C) Actividad de β -hexosaminidasa (β -HEXO), expresada como el % de actividad de WT, en suero de las mismas cohortes de animales que en (A). IDUA, *iduronidasa*, *alfa-L*-, SGSH, *N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa*, NAGLU, *N-acetilglucosaminidasa*, *alfa*, HGSNAT, *heparan-alfa-glucosaminidasa*, *N-acetiltransferasa*, GALNS *galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa*, GUSB, *glucuronidasa*, *beta*, HEXB, *hexosaminidasa B*. Las actividades de enzima WT se fijaron al 100 %. Los valores son medias $\pm$ EEM de 4-5 ratones por grupo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ frente a MPSII-Nulo.

10

Figura 18. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). Evaluación de la actividad locomotora y exploratoria mediante la prueba del campo abierto en ratones WT (sanos) sin tratamiento previo, ratones con MPSII sin tratamiento y ratones con MPSII administrados en el LCR con 5×10^{10} gv de vector de control (AAV9-Nulo) o 5×10^{10} gv de vector AAV9-CAG-omIDS a los dos meses de edad y analizados 4 meses después. (A) Tiempo en el centro, (B) Tiempo en la periferia, (C) Entradas en el centro, (D) Latencia al centro, (E) Movimientos totales, (F) Líneas cruzadas. Los valores son medias $\pm$ EEM de 17-22 ratones por grupo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ frente a MPSII-Nulo.

20

Figura 19. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). Análisis de Kaplan-Meier de supervivencia en ratones no mutados (WT) sanos, ratones con MPSII no tratados (MPSII) y ratones con MPSII administrados en el LCR con 5×10^{10} gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o 5×10^{10} gv de vector AAV9-CAG-omIDS. N=24 para WT, N=22 para MPSII no tratados, N=27 para MPSII inyectados con Nulo y N=91 para ratones que recibieron vector terapéutico.

30

Figura 20. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS) a diferentes dosis

($1,58 \times 10^9$, 5×10^9 , $1,58 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} gv/ratón). (A) Actividad de la iduronato-2-sulfatasa en diferentes partes del cerebro (secciones I-V) de ratones WT (sanos), ratones con MPSII sin tratamiento y ratones con MPSII administrados en el LCR mediante inyección intracisternal (IC) con diferentes dosis de AAV9-CAG-omIDS a los 2 meses de edad y analizados 1,5 meses después. La actividad de IDS del WT se fijó al 100 %. (B) Cuantificación de glucosaminoglicanos (GAGs) en las mismas partes del cerebro que en (A). Los resultados se muestran como medias $\pm$ EEM de 5 ratones por grupo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ frente a MPSII sin tratar.

Figura 21. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS) a diferentes dosis ($1,58 \times 10^9$, 5×10^9 , $1,58 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} gv/ratón). (A, B) Actividad de la iduronato-2-sulfatasa, expresada como % de actividad WT, en hígado (A) y suero (B) de ratones WT (sanos), ratones con MPSII sin tratamiento y ratones con MPSII administrados en el LCR con diferentes dosis de vector AAV9-CAG-omIDS a los 2 meses de edad y analizados 1,5 meses después. La actividad de IDS del WT se fijó al 100 %. (C) Cuantificación de glucosaminoglicanos (GAGs) en órganos somáticos. Los resultados se muestran como medias $\pm$ EEM de 5 ratones por grupo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ frente a MPSII sin tratar.

DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

Los plásmidos pAAV-CAG-hIDS (SEQ ID NO: 3), pAAV-CAG-ohIDS-versión1 (SEQ ID NO: 6) y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 (SEQ ID NO: 9) se depositaron el 18 de diciembre de 2014, bajo el número de acceso DSM 29866, DSM 29867 y DSM 29868 en la DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Inhoffenstraße 7 B, D-38124 Braunschweig, República Federal de Alemania.

DEFINICIONES

El término “secuencia nucleotídica” o “secuencia de nucleótidos aislada” se refiere a una molécula de ácido nucleico, tanto ADN como ARN, que contiene desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, respectivamente. El ácido nucleico
5 puede ser bicatenario, monocatenario, o contener porciones tanto de secuencia bicatenaria como monocatenaria.

El término “% de identidad de secuencias” o “% de identidad” se refiere al porcentaje de nucleótidos de una secuencia candidata que son idénticos a los
10 nucleótidos en la secuencia de referencia, después de alinear las secuencias para lograr el máximo % de identidad de secuencias. El % de identidad de secuencias puede determinarse por cualquier método o algoritmo establecido en el arte, tal como los algoritmos ALIGN, BLAST y BLAST 2.0. Véase Altschul S, y col., Nuc Acids Res. 1977;25:3389-3402 y Altschul S, y col., J Mol Biol.
15 1990;215:403-410.

En el presente documento, el % de identidad de secuencias o “% de identidad” se calcula dividiendo el número de nucleótidos que son idénticos después de alinear la secuencia de referencia y la secuencia candidata entre el número
20 total de nucleótidos en la secuencia de referencia y multiplicando el resultado por 100.

Los términos “codificar” o “codificante” se refieren al código genético que determina cómo una secuencia de nucleótidos se traduce en un polipéptido o
25 una proteína. El orden de los nucleótidos en una secuencia determina el orden de los aminoácidos a lo largo de un polipéptido o una proteína.

El término “proteína” se refiere a una macromolécula compuesta de una o más cadenas lineales de aminoácidos o polipéptidos. Las proteínas pueden sufrir
30 modificaciones post-traduccionales, como la conversión de un residuo de cisteína en 3-oxoalanina, glucosilación o unión a metal. La glucosilación de una proteína es la adición de diferentes hidratos de carbono que están enlazados

covalentemente a la cadena de aminoácidos.

El término “cantidad efectiva” se refiere a una cantidad de una sustancia suficiente para lograr el fin previsto. Por ejemplo, una cantidad efectiva de un vector AAV9 para aumentar la actividad de la iduronato-2-sulfatasa (IDS) es una cantidad suficiente para reducir la acumulación de glucosaminoglicanos. Una “cantidad terapéuticamente efectiva” de un vector de expresión para tratar una enfermedad o trastorno es una cantidad del vector de expresión suficiente para reducir o erradicar los signos y síntomas de la enfermedad o trastorno. La cantidad efectiva de una sustancia dada variará con factores tales como la naturaleza de la sustancia, la vía de administración, el tamaño y especie del animal que va a recibir la sustancia y el fin de administrar la sustancia. La cantidad efectiva en cada caso individual puede determinarse empíricamente por un experto según métodos establecidos en el arte.

El término “individuo” se refiere a un mamífero, preferiblemente mamífero humano o no humano, más preferentemente ratón, rata, otros roedores, conejo, perro, gato, cerdo, vaca, caballo o primate, adicionalmente más preferiblemente un ser humano.

El término “operativamente unido” se refiere a la relación funcional y la localización de la secuencia promotora con respecto al gen de interés (por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia). Generalmente, un promotor operativamente unido está contiguo a la secuencia de interés. Sin embargo, un potenciador no tiene que ser contiguo a la secuencia de interés para controlar su expresión.

El término “tropismo” se refiere a la forma en la que diferentes virus se han desarrollado para dirigirse preferencialmente a especies de huésped específicas, o tipos específicos de células dentro de aquellas especies.

El término “terapia génica” se refiere a la transferencia de material genético (por ejemplo, ADN o ARN) de interés en una célula para tratar o prevenir una enfermedad o afección genética o adquirida. El material genético de interés codifica un producto (por ejemplo, un polipéptido de proteína, péptido o ARN funcional) cuya producción *in vivo* se desea. Por ejemplo, el material genético de interés puede codificar una enzima, hormona, receptor o polipéptido de valor terapéutico.

El término “vector viral recombinante” o “vector viral” se refiere a un agente obtenido de un virus que se produce naturalmente mediante técnicas de ingeniería genética que puede transferir material genético (por ejemplo, ADN o ARN) de interés a una célula, lo que resulta en la producción del producto codificado por dicho material genético (por ejemplo, un polipéptido de proteína, péptido o ARN funcional) en la célula diana.

El término “plásmido recombinante” o “plásmido” se refiere a una molécula de ADN pequeña, circular, bicatenaria, auto-replicante obtenida mediante técnicas de ingeniería genética que puede transferir material genético de interés a una célula, lo que resulta en la producción del producto codificado por dicho material genético (por ejemplo un polipéptido de proteína, péptido o ARN funcional) en la célula diana. Además, el término “plásmido recombinante” o “plásmido” también se refiere a una molécula de ADN pequeña, circular, bicatenaria, auto-replicante obtenida mediante técnicas de ingeniería genética usada durante la fabricación de vectores virales como vehículos del genoma del vector recombinante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nuevas secuencias nucleotídicas para el tratamiento de mucopolisacaridosis, en particular mucopolisacaridosis tipo II (MPSII), o síndrome de Hunter.

Las secuencias nucleotídicas según la presente invención codifican para la proteína iduronato-2-sulfatasa (denominada IDS) según la SEQ ID NO: 1, enzima que participa en la degradación escalonada de los glucosaminoglicanos heparán sulfato y dermatán sulfato. Los términos “IDS natural” o “IDS *wild-type* (WT)” se refieren en el contexto de la invención a una secuencia de nucleótidos obtenida o producida a partir de células huésped usando métodos conocidos para aquellos expertos en la materia, o alternativamente sintetizada químicamente usando como material de partida la secuencia codificante (CDS) para IDS de cada especie. Preferiblemente, “IDS natural” o “IDS WT” se sintetizan químicamente a partir de la CDS murina (denominada mIDS) o de la CDS de seres humanos (denominada hIDS). Más preferiblemente, la secuencia nucleotídica de hIDS se sintetiza químicamente a partir de CDS humana y se corresponde con la SEQ ID NO: 2.

Según la presente invención, la evidencia establece que las secuencias nucleotídicas modificadas, también denominadas secuencias nucleotídicas optimizadas, median en la producción de mayores cantidades de proteína de interés, probablemente debido a la eficaz transcripción de ARNm o la transcripción de un ARNm más estable, o el uso más eficiente de codones. Estas secuencias también se denominan en el presente documento “secuencias optimizadas”; omIDS y ohIDS, cuando se obtienen de CDS murinas y humanas, respectivamente. Ventajosamente, las secuencias optimizadas según la presente invención son secuencias de codones optimizados.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1 y que tiene entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En particular, la secuencia de nucleótidos aislada según la invención tiene un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 82%, 85%, 87% o un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En una realización preferida, las secuencias nucleotídicas aisladas de la presente invención están seleccionadas de ohIDS-

versión1 según la SEQ ID NO: 5 y ohIDS-versión2 según la SEQ ID NO: 8.

Según la presente invención, las secuencias aisladas descritas anteriormente en este documento pueden insertarse en un sitio de clonación múltiple (MCS) de un plásmido de esqueleto. En particular, el plásmido de esqueleto es un plásmido que contiene las ITR del virus adenoasociado (AAV), denominado pAAV en el presente documento.

Un segundo aspecto de la invención proporciona un plásmido que contiene una secuencia nucleotídica que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1 y que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 2. Ventajosamente, el plásmido según la presente invención tiene entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En particular, el plásmido según la invención contiene una secuencia nucleotídica aislada que tiene un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 82%, 85%, 87% o un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En una realización preferida, el plásmido de la presente invención contiene una secuencia nucleotídica seleccionada de hIDS según la SEQ ID NO: 2, ohIDS-versión1 según la SEQ ID NO: 5 y ohIDS-versión2 según la SEQ ID NO: 8.

20

Además de las secuencias aisladas mencionadas anteriormente, los plásmidos según la presente invención también incluyen elementos de control convencionales que pueden estar operativamente unidos a la secuencia de nucleótidos de una forma que permite su transcripción, traducción y/o expresión en una célula transfectada con los plásmidos. En particular, los plásmidos según la presente invención contienen un promotor como elemento de control operativamente unido a la secuencia de nucleótidos de interés. Se conocen en la técnica un gran número de promotores, que son nativos o quiméricos, constitutivos o inducibles, ubicuos y/o específicos de tejido. Ventajosamente, el promotor usado en el contexto de la presente invención es el promotor CAG que se refiere a la combinación que comprende el elemento potenciador temprano del citomegalovirus y el promotor de B-actina de pollo.

30

Adicionalmente incluye porciones de los intrones de B-actina de pollo y de B-globina de conejo que confieren estabilidad al ARNm derivado de la secuencia de nucleótidos de interés, Véase Alexopoulou A, y *col.*, BMC Cell Biology 2008; 9(2): 1-11. El promotor CAG incluido en los plásmidos pAAV de la presente
5 invención tiene una secuencia SEQ ID NO: 14. Este promotor CAG específico permite una expresión de larga duración de la enzima que falta en todas las áreas del cerebro y en el hígado. Como consecuencia, la acumulación lisosómica de glucosaminoglicano (GAG) se corrige, previniendo de esta forma las alteraciones neurológicas y somáticas características de la MPSII.

10

En una realización particularmente ventajosa, el plásmido según la invención es el plásmido pAAV-CAG-hIDS, según la SEQ ID NO: 3 con número de acceso DSM 29866.

15

En otra realización particularmente ventajosa, el plásmido según la invención es el plásmido pAAV-CAG-ohIDS-versión1, según la SEQ ID NO: 6 con número de acceso DSM 29867.

20

En otra realización particularmente ventajosa, el plásmido según la invención es el plásmido pAAV-CAG-ohIDS-versión2, según la SEQ ID NO: 9 con número de acceso DSM 29868.

25

Un tercer aspecto de la invención se refiere a nuevos vectores recombinantes para el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II. Debe entenderse que un
vector de la presente invención es una proteína de la cápside, además de un
genoma de vector contenido dentro, usado para la transferencia de un material
genético de interés en una célula. Aparte de dicho material genético de interés,
el genoma del vector también puede contener diferentes elementos funcionales
que incluyen elementos de control para la transcripción tales como promotores
30 u operadores, regiones de unión de factores de transcripción o potenciadores y
elementos de control para la iniciación o terminación de la traducción.

Los vectores según la invención se derivan de virus adenoasociados (AAV) y se usan para la transferencia de la secuencia de nucleótidos de interés en una célula diana. Han demostrado tener una alta eficiencia en la transducción de células post-mitóticas en una amplia variedad de tejidos. En el contexto de la presente invención, los vectores se usan para administrar la secuencia codificante de la iduronato-2-sulfatasa humana (hIDS de SEQ ID NO: 2) o una versión optimizada de la secuencia codificante de la iduronato-2-sulfatasa humana (ohIDS-versión1 de SEQ ID NO: 5 o ohIDS-versión2 de SEQ ID NO: 8). Un vector adenoasociado es un vector derivado de un virus adenoasociado de la familia de *parvoviridae*. El genoma del virus adenoasociado está construido de ácido desoxirribonucleico monocatenario (ADNmc). Estos virus infectan mamíferos, pero son no patógenos (es decir, no producen enfermedad). Pueden infectar células que se dividen o que no se dividen, y su tropismo cambia dependiendo del serotipo. El serotipo es la clasificación de los grupos de virus, dependiendo de sus antígenos de la cápside. El serotipo de los virus adenoasociados, determinado por su proteína de la cápside, define el tropismo del virus y permite su entrada en un tipo de célula específica. En el contexto de la presente invención, el AAV tiene un serotipo 1, 2, 5, 7, 8, 9 ó 10. Preferiblemente, el AAV es de serotipo 9 (AAV9), ya que muestra la mejor capacidad para administrar el material genético al cerebro, además de a órganos periféricos tras una única administración al LCR. Los vectores AAV9 de la presente invención están compuestos de la cápside viral de serotipo 9 de virus adenoasociados humanos y un genoma modificado, que contiene las repeticiones terminales invertidas (ITRs) del serotipo 2 de virus adenoasociados humanos, el promotor CAG, la secuencia codificante del gen de la iduronato-2-sulfatasa humana (hIDS) o una versión optimizada de ella (también denominada secuencia de nucleótidos según la presente invención), y el poliA del gen de beta-globina de conejo.

Así, en este aspecto la invención se refiere a un AAV recombinante que contiene una secuencia nucleotídica que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1 y que tiene al menos un 75% de

identidad con la SEQ ID NO: 2. Ventajosamente, el AAV recombinante según la invención contiene entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En particular, el AAV recombinante según la invención contiene una secuencia de nucleótidos según la invención que tiene un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 82%, 85%, 87% o un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En una realización preferida, las secuencias nucleotídicas aisladas contenidas en el AAV recombinante de la presente invención están seleccionadas de hIDS según la SEQ ID NO: 2, ohIDS-versión1 según la SEQ ID NO: 5 y ohIDS-versión2 según la SEQ ID NO: 8.

10

En una realización ventajosa de este aspecto, la presente invención se refiere a un AAV9 recombinante que contiene una secuencia nucleotídica que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa IDS según la SEQ ID NO: 1 y que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, el AAV9 recombinante de la invención contiene una secuencia nucleotídica que tiene entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En particular, el AAV9 recombinante de la invención contiene una secuencia nucleotídica según la invención que tiene un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 82%, 85%, 87% o un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En una realización preferida, el AAV9 recombinante de la invención contiene las secuencias nucleotídicas seleccionadas de hIDS según la SEQ ID NO: 2, ohIDS-versión1 según la SEQ ID NO: 5 y ohIDS-versión2 según la SEQ ID NO: 8.

15

20

25

30

Adicionalmente, se ha encontrado sorprendentemente que la asociación, en la misma entidad, de la cápside de AAV9 con una secuencia de nucleótidos que codifica la iduronato-2-sulfatasa (IDS), junto con un promotor elegido, especialmente el promotor CAG, permite una expresión de larga duración de la enzima que falta en todas las áreas del cerebro, en particular cuando la entidad se administra al líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante inyección intracisternal. Como consecuencia, la acumulación lisosómica de glucosaminoglicano (GAG) se corrige, previniendo de esta forma las alteraciones neurológicas características de la enfermedad de MSPII. Este

efecto se ha observado incluso en el bulbo olfativo, que está alejado del punto de administración de los vectores (cisterna magna). Adicionalmente, los vectores AAV9 según la invención administrados en el LCR fueron capaces de llegar a la circulación sistémica para transducirse en el hígado. La producción y secreción de la enzima por células del hígado produjeron un aumento de la actividad de la iduronato-2-sulfatasa (IDS) en suero, conduciendo por último a la reducción de la patología lisosómica en muchos tejidos somáticos. Esto representa una clara ventaja de los vectores según la invención con respecto a los enfoques existentes que solo corrigieron parcialmente los signos clínicos de la enfermedad y normalmente ejercen su efecto en el cerebro o en la circulación sistémica, pero no en ambos.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a vectores AAV9 que contienen un promotor CAG unido a una secuencia nucleotídica que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1.

En particular, los vectores AAV9 de la presente invención contienen un promotor CAG unido a una secuencia nucleotídica que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1 y que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 2. Ventajosamente, los vectores AAV9 de la invención contienen un promotor CAG unido a una secuencia nucleotídica que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1 y que tiene entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En particular, la secuencia de nucleótidos contenida en el vector AAV9 según la invención tiene un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 82%, 85%, 87% o un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

En una realización preferida, el vector recombinante de la presente invención es AAV9-CAG-hIDS (SEQ ID NO: 4) que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 operativamente unida al promotor CAG de SEQ ID NO: 14.

En otra realización preferida, el vector recombinante de la presente invención

es AAV9-CAG-ohIDS-versión1 (SEQ ID NO: 7) que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 operativamente unida al promotor CAG de SEQ ID NO: 14.

5 En otra realización preferida, el vector recombinante de la presente invención es AAV9-CAG-ohIDS-versión2 (SEQ ID NO: 10) que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 operativamente unida al promotor CAG de SEQ ID NO: 14.

10 Los vectores recombinantes de la invención como se definen anteriormente en este documento pueden obtenerse a partir de los plásmidos correspondientes también descritos anteriormente en este documento por transfección de células HEK293 usando métodos conocidos en el estado del arte.

15 Así, la presente invención proporciona además un método para la producción de los vectores virales adenoasociados AAV según la invención, y especialmente un AAV9. El proceso comprende las etapas de:

20 i) proporcionar un primer plásmido que comprende la secuencia que codifica la proteína de interés interpuesta entre una primera repetición terminal de AAV y una segunda repetición terminal de AAV, un promotor CAG operativamente unido a la secuencia que codifica la proteína de interés; un segundo vector que comprende un gen *rep* de AAV y un gen *cap* de AAV, y un tercer vector que comprende los genes de función auxiliar del adenovirus;

25

ii) co-transfección de células competentes con los vectores de la etapa i);

iii) cultivo de las células transfectadas de la etapa ii) durante un periodo de tiempo suficiente para producir partículas virales; y

30

iv) purificación de los vectores del cultivo de la etapa iii).

En una realización preferida, la primera y segunda repeticiones terminales del AAV del primer vector son ITRs del serotipo 2 de AAV. En otra realización preferida, los genes *rep* de AAV del segundo vector son del serotipo 2 de AAV. En otra realización preferida, las células competentes son células HEK293. En
5 otra realización preferida, los genes *cap* de AAV del segundo vector son del serotipo 9 de AAV.

La invención también proporciona un método para la preparación del plásmido según la invención, que comprende las etapas de:

10

i) cortar la secuencia que codifica la proteína de interés del plásmido de partida, por digestión, en particular usando MluI/EcoRI,

ii) clonar la secuencia que codifica la proteína de interés entre dos sitios de
15 restricción del plásmido de esqueleto de AAV pAAV-CAG, obteniéndose de esta forma el plásmido correspondiente que incluye la secuencia que codifica la proteína de interés.

La presente invención contempla, en un aspecto adicional, composiciones
20 farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de las secuencias nucleotídicas aisladas descritas en el presente documento, de los plásmidos como se describen en el presente documento, o de los vectores AAV, especialmente vectores AAV9, descritos en el presente documento.

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden las secuencias nucleotídicas aisladas descritas en el presente documento, los plásmidos como se describen en el presente documento, o los vectores AAV descritos en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición también puede comprender al menos una sustancia auxiliar. Las
30 sustancias auxiliares pueden seleccionarse de entre vehículos, excipientes, disolventes, diluyentes o adyuvantes. Vehículos, diluyentes o adyuvantes aceptables son no tóxicos y son preferiblemente inertes a la dosificación y

concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes; polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos; aminoácidos; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol, contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como copolímero de bloque de polietileno-polioxipropileno (Pluronic F68®) y polietilenglicol (PEG).

En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas según la invención son adecuadas para administración parenteral. Ejemplos de administración parenteral son inyecciones intravenosa, subcutánea, intracisternal e intramuscular. Preferiblemente, la composición farmacéutica según la invención es adecuada para administración intravenosa o intracisternal. Composiciones adecuadas para tal administración parenteral incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles, polvos estériles para preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones estériles. Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas según la invención se preservan de la acción contaminante de bacterias y hongos.

La dosificación para seres humanos y animales puede variar dependiendo de factores que tienen su base en las especies respectivas u otros factores, tales como edad, sexo, peso o grado de enfermedad, etc.

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere al uso terapéutico de las secuencias nucleotídicas aisladas descritas en el presente documento, los plásmidos como se describen en el presente documento, o los vectores AAV, especialmente vectores AAV9, descritos en el presente documento. Como se ha mencionado anteriormente, las secuencias aisladas de nucleótidos, los plásmidos como se describen en el presente documento, o los vectores AAV, especialmente vectores AAV9 según la invención median en la expresión de la enzima IDS que falta, corrigiendo así la acumulación lisosómica de GAGs. Esto

permite corregir todos los signos clínicos de la mucopolisacaridosis tipo II (MPSII). A este respecto, la presente invención también se refiere a las secuencias nucleotídicas aisladas descritas en el presente documento, los plásmidos como se describen en el presente documento, o los vectores AAV, especialmente vectores AAV9, descritos en el presente documento para su uso como un medicamento.

En particular, la invención se refiere a las secuencias nucleotídicas aisladas descritas en el presente documento, los plásmidos como se describen en el presente documento, o los vectores AAV, especialmente vectores AAV9, descritos en el presente documento para aumentar la actividad de la iduronato-2-sulfatasa (IDS) en el cuerpo.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere a las secuencias nucleotídicas aisladas descritas en el presente documento, los plásmidos como se describen en el presente documento, o los vectores AAV, especialmente vectores AAV9, descritos en el presente documento para su uso en el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II (MPSII).

En una realización todavía adicional, la presente invención se refiere al uso de las secuencias nucleotídicas aisladas descritas en el presente documento, los plásmidos como se describen en el presente documento, o los vectores AAV, especialmente vectores AAV9, descritos en el presente documento para la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II (MPSII).

Otra realización de la presente invención se refiere al método de tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II (MPSII), que comprende la etapa de administrar al menos una secuencia de nucleótidos aislada descrita en el presente documento, un plásmido como se describe en el presente documento, o un vector AAV, especialmente vectores AAV9, descrito en el presente documento a un sujeto en necesidad del mismo.

La presente invención proporciona además una célula aislada que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para la iduronato-2-sulfatasa de SEQ ID NO: 1. En particular, la célula según la invención comprende una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1 y que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 2., y ventajosamente entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En particular, la secuencia nucleotídica contenida en la célula aislada según la invención tiene un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 82%, 85%, 87% o un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

En una realización preferida, las células de la invención comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 que codifica para la iduronato-2-sulfatasa (IDS) de SEQ ID NO: 1.

En otra realización preferida, las células de la invención comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 que codifica para la iduronato-2-sulfatasa (IDS) de SEQ ID NO: 1.

En otra realización preferida, las células de la invención comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 que codifica para la iduronato-2-sulfatasa (IDS) de SEQ ID NO: 1.

Los siguientes ejemplos son simplemente ilustrativos de ciertas realizaciones de la invención y no pueden considerarse de ningún modo limitantes.

PROCEDIMIENTOS GENERALES

1. Vectores de AAV recombinantes

Los vectores de AAV descritos en el presente documento se obtuvieron por transfección triple. Los materiales requeridos para preparar los vectores fueron:

células HEK293 (que expresan genes E1 adenovirales), plásmido auxiliar que proporciona función de adenovirus, plásmido que proporciona genes **rep** de AAV del serotipo 2 y genes **cap** del serotipo 9 (AAV9) y, finalmente, el plásmido de esqueleto con ITRs de AAV2 y la construcción de interés.

5

Para generar vectores de AAV que expresan iduronato-2-sulfatasa, las secuencias codificantes optimizadas o no optimizadas de iduronato-2-sulfatasa humana o murina se clonaron en un plásmido de esqueleto de AAV bajo el control del promotor CAG híbrido ubicuo. La producción a gran escala de los plásmidos se hizo usando un kit EndoFree Plasmid Megaprep (Qiagen).

10

Se generaron vectores por transfección libre de virus auxiliares de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones. Véanse Matsushita T, y col., Gene Ther. 1998;5:938-945 y Wright J, y col., Mol. Ther. 2005;12:171-178.

15

Las células se cultivaron al 70% de confluencia en botellas rotatorias (RB) (Corning, Corning, NY, EE.UU.) en DMEM suplementado con 10% de FBS y luego se co-transfectaron con: 1) un plásmido que lleva el casete de expresión flanqueado por las ITRs virales del AAV de serotipo 2 (descritos anteriormente); 2) un plásmido que lleva los genes *rep2* y *cap9* de AAV; y 3) un plásmido que lleva las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes consecutivos de cloruro de cesio usando un protocolo optimizado como se ha descrito previamente. Véase Ayuso E, y col., Gene Ther. 2010;17:503-510. Los vectores se dializaron contra PBS + 0,001% de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron por qPCR y se guardaron a -80°C hasta uso.

20

25

Los vectores de la presente invención se construyeron según técnicas de biología molecular muy conocidas en la técnica.

30 2. Animales

Se compró un modelo de ratón deficiente en iduronato-2-sulfatasa (MPSII) de

Taconic (Germantown, NY 12526 USA, Suministro TF1838). Ratones afectados con MPSII y ratones control sanos (WT) se cruzaron endogámicamente a partir de fundadores machos hemicigóticos y hembras heterocigóticas. El genotipo se determinó en ADN genómico de muestras de cola cortada mediante un análisis por PCR que amplifica una secuencia que engloba la mutación elegida como diana. Las secuencias de los cebadores de sentido directo y de sentido inverso respectivas son: Cebador directo: 5'- TTT TGT GTA CTC CAA CCC CG -3' (SEQ ID NO: 15), Cebador inverso: 5'- TGT CTC CAT AAC AGC CCA GG -3' (SEQ ID NO: 16), Mutación del cebador inverso: 5'- GCC CTC ACA TTG CCA AAG GA -3' (SEQ ID NO: 17). Los ratones se alimentaron a voluntad con una dieta estándar (Harlan, Tekland) y se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (las luces se encienden a las 9:00 A.M.).

15 3. Administración hidrodinámica de plásmidos que codifican IDS a ratones

Para la administración hidrodinámica de los plásmidos pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2, animales con MPSII y WT (sanos) de 3 meses de edad recibieron mediante inyección en la vena de la cola en <5 segundos una dosis total de 30 µg de plásmido en un volumen igual al 10% del peso corporal del animal. Esta técnica resulta en la expresión de transgenes codificados por plásmido principalmente en el hígado. Véase Liu y *col.*, Gene Ther. 1990;6(7):1258-66. Como control, una cohorte de ratones recibió un volumen igual de solución salina. Los ratones se dividieron en dos cohortes, y se sacrificaron a las 48 horas o 1 semana después de la inyección hidrodinámica de los plásmidos. Se recogieron los órganos como se describe en la siguiente sección.

30 4. Administración de vector a ratones

Para la administración intra-LCR de vectores AAV9-CAG-omIDS a ratones, se inyectó una dosis total de 5×10^{10} gv a la cisterna magna de animales con MPSII de 2 meses de edad. Una cohorte similar de animales se inyectó con 5×10^{10} gv

de vector control no codificante (AAV9-Nulo). A los 6 y 10 meses de edad, es decir, 4 y 8 meses después de la administración del vector, los ratones se anestesiaron y se recogieron los tejidos.

- 5 Para la administración intravenosa a los ratones de los vectores AAV9 que contienen la hIDS WT o cualquiera de las versiones optimizadas de la secuencia codificante de IDS, se inyectó una dosis total de 1×10^{10} gv de vector en la vena de la cola de animales con MPSII de 3,5 meses de edad. Animales WT y con MPSII sin tratar sirvieron de controles. Tres semanas después de la
- 10 administración con el vector, los ratones se anestesiaron y se recogieron los tejidos.

5. Recogida de muestras

- 15 En el momento del sacrificio, los animales se anestesiaron profundamente y a continuación se perfundieron transcardíacamente con 12 ml de PBS para limpiar completamente la sangre de los tejidos. Se recogieron el cerebro entero y múltiples tejidos somáticos (incluyendo hígado, bazo, páncreas, riñón, pulmón, corazón, músculo esquelético, testículos, vejiga urinaria, intestino y
- 20 tejido adiposo) y o se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C o se sumergieron en formalina para los posteriores análisis histológicos.

6. Actividad de la iduronato-2-sulfatasa y cuantificación de glucosaminoglicanos

- 25 Se sonicaron muestras de cerebro, hígado, pulmón y corazón en agua Mili-Q. Se analizó suero sin procesar. La actividad de la iduronato-2-sulfatasa se determinó con un sustrato fluorogénico derivado de 4-metilumbeliferona (Moscerdam Substrates, Oegstgeest, NL), como se ha descrito previamente. Véase Voznyi y *col.*, J Inher Metab Diss 2001;24:675-680. Los niveles de
- 30 actividad del cerebro, hígado, pulmón y corazón se normalizaron contra la cantidad total de proteína, se cuantificaron usando el ensayo de proteína de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). La actividad en suero se normalizó

frente al volumen.

Para la cuantificación de glucosaminoglicanos (GAG), se pesaron muestras de tejido y a continuación se digirieron con proteinasa K y los extractos se clarificaron por centrifugación y filtración. Los niveles de GAG se determinaron en extractos de tejido con el kit de glucosaminoglicanos sulfatados Blyscan (Biocolor, Carrickfergus, County Antrim, GB), usando 4-sulfato de condroitina como patrón. Los niveles de GAG se normalizaron respecto al peso de tejido húmedo.

7. Actividad de otras enzimas lisosómicas

Se sonicaron muestras de cerebro y de hígado en 500 µl de agua Mili-Q y se determinaron las actividades enzimáticas en sobrenadantes usando sustratos fluorogénicos derivados de 4-metilumbeliferona. Se analizó el suero sin procesar. La actividad de IDUA se ensayó en 15 µg de proteína incubada durante 1 h a 37 °C con α-L-iduronida de 4-metilumbeliferilo (Glycosynth). Véase Bacter y *col.*, Blood 2002;99(5):1857-9. Se midió la actividad de SGSH como se ha descrito previamente. Véanse Karpova y *col.*, J Inherit Metab Dis. 1996;19(3):278–285, Haurigot y *col.*, arriba. Brevemente, se incubaron primero 30 µg de proteína con 4-MU-αGlcNS durante 17 horas a 47 °C. La segunda incubación se llevó a cabo en presencia de 10 U/ml de α-glucosidasa (Sigma-Aldrich) en 0,2% de BSA durante 24 horas a 37 °C. Para la actividad de NAGLU, se incubaron 30 µg de extracto de proteína de tejido con 4-metilumbeliferil-α-N-acetil-D-glucosaminida (Moscerdam Substrates) durante 3 h a 37 °C, como se ha descrito previamente. Véanse Marsh y *col.*, Clin Genet. 1985;27(3):258-62, Ribera y *col.*, arriba. Se determinó la actividad de HGSNAT a partir de 30 µg de extracto de proteína incubada con acetilcoenzima A y 4-metilumbeliferil-β-D-glucosamina (MU-βGlcNH₂, Moscerdam Substrates) durante 17 h a 37 °C. Véase Voznyi y *col.*, J Inh Metab Dis 1993;16:465-72. Se ensayó la actividad de GALNS por un protocolo de 2 etapas usando 10 µg de extracto de proteína y *sal sódica de β-D-galactopiranósido-6-sulfato de 4-*

metilumbeliferilo (MU- β Gal-6S) durante la primera incubación durante 17 h a 37 °C. La segunda etapa se llevó a cabo añadiendo *tampón P_i* (tampón Na₂HPO₄ 0,9 M / NaH₂PO₄ 0,9 M, pH 4,3 + 0,02 % (peso/volumen) de azida de Na) y β -galactosidasa (β -Gal-Ao, Sigma) e incubando la mezcla durante 2 h a 37 °C.

5 Véase van Diggelen y *col.*, Clin Chim Acta 1990;187:131-40. La actividad de la enzima GUSB se determinó a partir de 10 μ g de extracto de proteína incubada con 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (Sigma) a 37 °C durante 1 h. Se ensayó la actividad de HEXB por incubación de 0,1 μ g de extracto de proteína con N-acetil- β -D-glucosaminida de 4-metilumbeliferilo (Sigma) durante 1 h a 37 °C.

10 Después de detener las reacciones aumentando el pH, la fluorescencia liberada se midió con el fluorímetro FLx800 (BioTek Instruments). Todos los niveles de actividades del cerebro y del hígado se normalizaron contra la cantidad total de proteína, se cuantificaron usando el ensayo de proteínas Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

15

8. Análisis histológico

Se fijaron tejidos durante 12-24 h en formalina, se embebieron en parafina y se seccionaron. Para la detección inmunohistoquímica de LAMP2 en cerebro,

20 secciones de parafina se sometieron a recuperación de epítomos inducida por calor en tampón citrato, pH 6, y a continuación se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpo de rata anti-LAMP2 (Ab13524; Abcam, Cambridge, RU) diluido a 1:500 y posteriormente se incubaron con anticuerpo de conejo anti-rata biotinilado (Dako, Glostrup, DK) a 1:300. Para la inmunotinción de GFAP

25 en muestras de cerebro, secciones de parafina se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpo de conejo anti-GFAP (Ab6673; Abcam, Cambridge, RU) diluido a 1:1000 y posteriormente se incubaron con anticuerpo de cabra anti-conejo biotinilado (31820; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) a 1:300. Se amplificaron las señales de LAMP2 y GFAP incubando secciones

30 con el kit de tinción ABC-Peroxidase (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) a dilución 1:100 y se visualizaron usando 3,3-diaminobencidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) como cromógeno.

Para teñir células de la microglía en muestras de cerebro, secciones de parafina se incubaron durante la noche a 4 °C con lectina BSI-B4 (L5391; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) diluida a 1:100. Se visualizó la señal de BSI-B4 usando 3,3-diaminobencidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) como cromógeno. Se obtuvieron imágenes de campo brillante con un microscopio óptico (Eclipse 90i; Nikon, Tokio, JP).

Se usó el software NIS Elements Advanced Research 2.20 para cuantificar señales de LAMP2, GFAP y BSI-B4 en 3-4 imágenes de cada región del cerebro (aumentos originales, ×20) por animal, usando los mismos parámetros de umbral de señales para todos los animales. Entonces se calculó el porcentaje de área positiva, es decir, el área, en píxeles, con una señal positiva con respecto al área de tejido total en la imagen.

9. Cuantificación del número de copias de genoma de vector en tejidos

Después de una digestión de tejido durante la noche en proteinasa K (0,2 mg/ml), se aisló el ADN total con el kit de purificación MasterPureDNA (Epicenter). Se usó PCR cuantitativa con cebadores y sonda específica para la secuencia de HBB2 (contenida en el segmento de poliA) para cuantificar los números de copias de genoma de vector en 20 ng de ADN total. Cebador directo: 5'-CTT GAG CAT CTG ACT TCT GGC TAA T-3'; cebador inverso: 5'-GAT TTG CCC TCC CAT ATG TCC-3'; sonda: 5'-CCG AGT GAG AGA CAC AAA AAA TTC CAA CAC-3'. Se usó la curva patrón de referencia construida por diluciones sucesivas del plásmido linealizado que contiene la secuencia de poliA para interpolar los valores finales de gv/muestra.

10. Prueba de campo abierto

Se analizó el comportamiento de ratones de 6 meses de edad por la prueba de campo abierto realizada entre las 9:00 am y 1:00 pm. Los animales se

colocaron en la esquina izquierda inferior de una cámara brillantemente iluminada (41 x 41 x 30 cm) cruzada por 2 haces de rayos de luz (SedaCom32; Panlab) que detectaron movimientos horizontales y verticales de los ratones. La superficie del área se dividió en tres regiones concéntricas cuadradas: centro (14 x 14 cm), periferia (27 x 27 cm) y límite (41 x 41 cm). Se registraron las actividades exploratorias y motoras durante los 3 primeros minutos de la prueba usando un sistema de seguimiento por vídeo (SmartJunior, Panlab).

11. Análisis estadístico

10

Todos los resultados se expresan como media $\pm$ EEM. Se hicieron comparaciones estadísticas usando ANOVA de una vía. Para las comparaciones múltiples entre grupos de control y de tratamiento se usa la prueba posterior de Dunnett, y entre todos los grupos usando la prueba posterior de Tukey. Se consideró significación estadística si $P < 0,05$. Se usaron curvas de Kaplan-Meier para estimar la supervivencia y se usó la prueba del orden logarítmico para las comparaciones.

20

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcción de pAAV-CAG-hIDS

25

Se utilizó el CDS de la iduronato-2-sulfatasa humana como material de partida (secuencia de referencia de NCBI: NM_000202.6) y se sintetizó químicamente para este fin (GenScript Inc). La CDS se recibió clonada dentro del plásmido pUC57 (AmpR) flanqueada por sitios de restricción Swal.

30

El fragmento Swal-Swal de la CDS de la iduronato-2-sulfatasa humana se escindió del plásmido pUC57 y posteriormente se clonó entre los sitios de restricción MluI y EcoRI del plásmido de esqueleto de AAV pAAV-CAG después de convertir los nucleótidos protuberantes de 5' y 3' en romos con fragmento de Klenow (Fermentas). El plásmido resultante se llamó pAAV-CAG-

hIDS (número de acceso DSM 29866). Véase la Figura 1A y SEQ ID NO: 3.

El plásmido pAAV-CAG se había generado previamente y contenía las ITRs del genoma de AAV2, el promotor CAG y la señal de poliA de β -globina de conejo, además de un sitio de multiclonación para la clonación de las CDSs de interés. El promotor CAG es un promotor híbrido compuesto por el potenciador temprano/intermedio del CMV y el promotor de β -actina de pollo. Este promotor puede conducir a una potente expresión ubicuamente. Véanse Sawicki J y *col.*, Exper Cell Res. 1998;244:367–369, Huang J y *col.*, J Gene Med. 2003;5:900–908, Liu Y y *col.*, Exp Mol Med. 2007; 39(2):170-175.

Ejemplo 2: Construcción de pAAV-CAG-ohIDS-versión1

Se diseñaron y obtuvieron casetes de expresión que incluyen una versión optimizada de la secuencia de ADNc de la iduronato-2-sulfatasa humana (ohIDS). La optimización de la secuencia se realizó para maximizar la eficiencia de la producción de la proteína iduronato-2-sulfatasa en seres humanos mediante la eliminación de sitios de corte y empalme crípticos y elementos de secuencia desestabilizante de ARN para elevada estabilidad de ARN, adición de elementos de secuencia estabilizante de ARN, optimización de codones y adaptación del contenido de G/C, evitando estructuras de ARN secundario estable, entre otros cambios. Se usó la región CDS de la iduronato-2-sulfatasa humana (secuencia de referencia NCBI: NM_000202.6) como punto de partida para la optimización de secuencias (DNA 2.0 Inc). La CDS optimizada se recibió clonada dentro del plásmido pJ204:191476 (AmpR) flanqueada por sitios de restricción MluI y EcoRI en 5' y 3', respectivamente.

El fragmento MluI/EcoRI de la CDS de la iduronato-2-sulfatasa humana optimizada se escindió del plásmido pJ204:191476 y posteriormente se clonó entre los sitios de restricción MluI y EcoRI del plásmido de esqueleto de AAV pAAV-CAG. El plásmido resultante se llamó pAAV-CAG-ohIDS-versión1 (número de acceso DSM 29867). Véase la Figura 2A y SEQ ID NO: 6.

Ejemplo 3: Construcción de pAAV-CAG-ohIDS-versión2

La región CDS de la iduronato-2-sulfatasa humana (secuencia de referencia de NCBI: NM_000202.6) se sometió a optimización de secuencias (GeneScript Inc). La CDS optimizada se recibió clonada dentro del plásmido pUC57 (AmpR) 5
flanqueada por sitios de restricción MluI y EcoRI en 5' y 3', respectivamente.

El plásmido pUC57-ohIDS se digirió con MluI y EcoRI para cortar la región CDS de la iduronato-2-sulfatasa optimizada. Posteriormente, este fragmento se 10
clonó entre los mismos sitios de restricción del esqueleto del plásmido de pAAV-CAG para generar el plásmido pAAV-CAG-ohIDS-versión2 (número de acceso DSM 29868). Véase la Figura 3A y SEQ ID NO: 9.

Ejemplo 4: Construcción de pAAV-CAG-omIDS

15 La región CDS de la iduronato-2-sulfatasa murina (secuencia de referencia de NCBI: NM_010498.3) se sometió a optimización de secuencias (GeneArt; Life Technologies). La región CDS optimizada se recibió clonada dentro del plásmido pMA-RQ (AmpR) flanqueada por sitios de restricción MluI y EcoRI en 20
5' y 3', respectivamente.

El fragmento MluI/EcoRI de la CDS de la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (SEQ ID NO: 11) se escindió del plásmido pMA-RQ y posteriormente se clonó entre los sitios de restricción MluI y EcoRI del plásmido 25
de esqueleto de AAV pAAV-CAG. El plásmido resultante se llamó pAAV-CAG-omIDS. Véase la Figura 4A y SEQ ID NO: 12.

Ejemplo 5: Producción de AAV9-CAG-hIDS

30 Se generaron vectores AAV9-CAG-hIDS (SEQ ID NO: 4) por transfección libre de virus auxiliares de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones. Véanse Matsushita y *col.*, Gene Ther. 1998;5(7):938-45, Wright

y *col.*, Mol Ther. 2005;12(1)171-8. Las células se cultivaron al 70% de confluencia en botellas rotatorias (RB) (Corning, Corning, NY, EE.UU.) en DMEM suplementado con 10% de FBS y luego se co-transfectaron con: 1) un plásmido que lleva el casete de expresión flanqueado por las ITRs de AAV2 (pAAV-CAG-hIDS); 2) un plásmido que lleva los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV9 (pREP2CAP9); y 3) un plásmido que lleva las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes consecutivos de cloruro de cesio usando un protocolo optimizado como se ha descrito previamente. Véase Ayuso y *col.*, Gene Ther. 2010;17(4):503-10. Los vectores se dializaron contra PBS + 0,001% de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron por qPCR y se guardaron a -80°C hasta su uso. Véase la Figura 1B.

Ejemplo 6: Producción de AAV9-CAG-ohIDS-versión1

Se generaron vectores AAV9-CAG-ohIDS-versión1 (SEQ ID NO: 7) por transfección libre de virus auxiliares de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones. Véase Matsushita y *col.*, y Wright y *col.*, arriba. Las células se cultivaron al 70% de confluencia en botellas rotatorias (RB) (Corning, Corning, NY, EE.UU.) en DMEM suplementado con 10% de FBS y luego se co-transfectaron con: 1) un plásmido que lleva el casete de expresión flanqueado por ITRs de AAV2 (pAAV-CAG-ohIDS-versión1); 2) un plásmido que lleva los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV9 (pREP2CAP9); y 3) un plásmido que lleva las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes consecutivos de cloruro de cesio usando un protocolo optimizado como se ha descrito previamente. Véase Ayuso y *col.*, *supra*. Los vectores se dializaron contra PBS + 0,001% de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron por qPCR y se guardaron a -80°C hasta su uso. Véase la Figura 2B.

Ejemplo 7: Producción de AAV9-CAG-ohIDS-versión2

Se generaron vectores AAV9-CAG-ohIDS-versión2 (SEQ ID NO: 10) por transfección libre de virus auxiliares de células HEK293 usando tres plásmidos

con modificaciones. Véase Matsushita y *col.*, y Wright y *col.*, arriba. Las células se cultivaron al 70% de confluencia en botellas rotatorias (RB) (Corning, Corning, NY, EE.UU.) en DMEM suplementado con 10% de FBS y luego se co-transfectaron con: 1) un plásmido que lleva el casete de expresión flanqueado por ITRs de AAV2 (pAAV-CAG-ohIDS-versión2); 2) un plásmido que lleva los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV9 (pREP2CAP9); y 3) un plásmido que lleva las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes consecutivos de cloruro de cesio usando un protocolo optimizado como se ha descrito previamente. Véase Ayuso y *col.*, arriba. Los vectores se dializaron contra PBS + 0,001% de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron por qPCR y se guardaron a -80°C hasta su uso. Véase la Figura 3B.

Ejemplo 8: Producción de AAV9-CAG-omIDS

Se generaron vectores AAV9-CAG-omIDS (SEQ ID NO: 13) por transfección libre de virus auxiliares de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones. Véase Matsushita y *col.*, y Wright y *col.*, arriba. Las células se cultivaron al 70% de confluencia en botellas rotatorias (RB) (Corning, Corning, NY, EE.UU.) en DMEM suplementado con 10% de FBS y luego se co-transfectaron con: 1) un plásmido que lleva el casete de expresión flanqueado por ITRs de AAV2 (pAAV-CAG-omIDS); 2) un plásmido que lleva los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV9 (pREP2CAP9); y 3) un plásmido que lleva las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes consecutivos de cloruro de cesio usando un protocolo optimizado como se ha descrito previamente. Véase Ayuso y *col.*, arriba. Los vectores se dializaron contra PBS + 0,001% de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron por qPCR y se guardaron a -80°C hasta su uso. Véase la Figura 4B.

Ejemplo 9: Inyección hidrodinámica de pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 a ratones sanos

Se administró una dosis total de 30 µg de los plásmidos pAAV-CAG-hIDS,

pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 que contenían diferentes versiones del casete que expresa la iduronato-2-sulfatasa a ratones WT de 2 meses de edad mediante inyección hidrodinámica en la vena de la cola. Esta técnica dirige la expresión del plásmido administrado al hígado.

5 Véase Liu y col., Gene Ther. 1990;6(7):1258-66.

Cuarenta y ocho horas después de la administración del plásmido, se documentó un aumento considerable por encima de los niveles basales en la actividad de la iduronato-2-sulfatasa en los hígados y sueros de todos los
10 animales administrados con plásmidos que codifican la iduronato-2-sulfatasa. Tanto en hígado como en suero, los niveles de actividad alcanzados con los casetes de expresión que contienen versiones optimizadas del gen iduronato-2-sulfatasa fueron superiores a aquellos obtenidos con el gen no mutante. Además, en suero, los animales que recibieron el plásmido pAAV-CAG-ohIDS-
15 versión2 mostraron niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa que fueron estadísticamente superiores a aquellos documentados con los otros 2 plásmidos. Véanse las Figuras 5A y 5B.

20 **Ejemplo 10: Inyección hidrodinámica de pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 a ratones con MPSII**

Se administró una dosis total de 30 µg de los plásmidos pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 que contenían diferentes versiones del casete que expresa la iduronato-2-sulfatasa a ratones
25 afectados por MPSII de 3 meses de edad mediante inyección hidrodinámica en la vena de la cola.

Se recogieron los tejidos 1 semana después de la administración del plásmido. Los tres plásmidos que contenían la iduronato-2-sulfatasa dieron lugar a un
30 aumento sustancial en la actividad de la iduronato-2-sulfatasa con respecto a animales con MPSII que recibieron inyección de solución salina; las actividades oscilaron del 1200% al 2200% de los niveles de WT en hígado y del 2000% al

5700% de WT en suero. Los niveles de actividad logrados con los casetes de expresión que contenían versiones de codones optimizados del gen iduronato-2-sulfatasa fueron estadísticamente superiores a aquellos mediados por el plásmido que contiene el gen WT. Véanse las Figuras 6A y 6B.

5

De acuerdo con los altos niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa documentados en hígado y suero, el contenido de GAG se normalizó completamente en todos los tejidos analizados con todas las construcciones de plásmido. Véanse las Figuras 6C.

10

Ejemplo 11: Administración intravenosa de AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2 a ratones con MPSII

Ratones con MPSII (3,5 meses de edad) recibieron una inyección intravenosa a través de la vena de la cola de 1×10^{10} gv de vectores AAV9 que contenían las secuencias de iduronato-2-sulfatasa humana WT u optimizada. Cohortes separadas de ratones WT y con MPSII sin tratamiento de la misma edad sirvieron de control. Tres semanas después del tratamiento, los animales se sacrificaron y se recogieron muestras de sangre y de hígado y se analizaron.

20

La administración intravenosa de vectores AAV9 a una dosis de 1×10^{10} gv/ratón dirige la expresión transgénica principalmente al hígado. Véanse Wu y col., Mol. Ther. 2006; 14(3):316-27, Inagaki y col., Mol. Ther. 2006; 14(1):45-33. Cuando la actividad de la iduronato-2-sulfatasa se midió en extractos de hígado 3 semanas después de la administración del vector, se documentó un claro aumento en la actividad enzimática en machos con MPSII que recibieron cualquiera de los vectores codificantes de IDS humana. Véase la Figura 7A. El aumento fue, sin embargo, significativamente mayor en el caso de los animales con MPSII que recibieron los vectores AAV9 que contienen secuencias de iduronato-2-sulfatasa humana optimizadas (AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2). Los niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa alcanzados en los animales que recibieron vectores con la secuencia

30

WT fueron aproximadamente el doble de aquellos observados en animales WT sanos. Véase la Figura 7A. Con los vectores que contienen las secuencias de IDS humana optimizadas, los niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa fueron varias veces superiores a aquellos observados en animales sanos o en animales con MPSII tratados con vectores que contienen la secuencia de IDS WT. Véase la Figura 7A.

La iduronato-2-sulfatasa es una enzima lisosómica secretable, y como tal su expresión en el hígado es una fuente de enzima circulante. Véase Haurigot y col., arriba. Similar a las observaciones hechas en extractos de hígado, los niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa alcanzados en circulación de animales con MPSII tratados con los vectores AAV9 que contienen las secuencias de IDS humana optimizadas fueron varias veces superiores a aquellos observados en animales sanos o en animales con MPSII tratados con vectores que contienen la secuencia de IDS WT humana. Véase la Figura 7B.

De acuerdo con los altos niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa documentados en hígado y suero, el contenido de GAG se normalizó completamente en el hígado de los ratones con MPSII tratados con AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2. Sin embargo, los niveles de GAG solo se redujeron parcialmente en el hígado de animales tratados con una dosis igual de vectores AAV9 que llevan la secuencia codificante de IDS WT. Véase la Figura 7C.

Ejemplo 12: Administración intracisternal de AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión 2 a ratones con MPSII

Ratones con MPSII de dos meses de edad recibieron una inyección intracisternal de 5×10^{10} gv de vectores AAV9 que contenían o bien la secuencia de iduronato-2-sulfatasa humana no mutada (WT) o bien la optimizada en un volumen total de 5 μ l. Cohortes separadas de ratones de la misma edad WT, con MPSII no tratados y con MPSII que recibieron 5×10^{10} gv de un vector no

codificante (AAV9-CAG-Nulo) sirvieron de controles. A los 3,5 meses de edad, es decir, 1,5 meses después del tratamiento, los animales se sacrificaron y se recogieron y analizaron las muestras.

5 Cuando se midió la actividad de la iduronato-2-sulfatasa en extractos de cerebro, se documentó un claro aumento en la actividad enzimática en machos con MPSII que recibieron cualquiera de los vectores codificantes de IDS humana. Véase la Figura 8A. El aumento fue, sin embargo, varias veces mayor en el caso de los animales con MPSII que recibieron los vectores AAV9 que
10 contenían secuencias de iduronato-2-sulfatasa humana optimizadas (AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2) que en aquellos animales con MPSII tratados con vectores que contenían la secuencia de IDS no mutada (WT). Véase la Figura 8A. Los niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa alcanzados en los animales que recibieron vectores con secuencias de
15 iduronato-2-sulfatasa humana optimizadas fueron casi tan altos como aquellos de los WT, o incluso mayores; en la parte más rostral del cerebro (Sección I) la actividad de IDS derivada de vectores que contenían secuencias de iduronato-2-sulfatasa humana optimizadas casi duplicó los niveles del WT. Véase la Figura 8A.

20 De acuerdo con el aumento en la actividad de IDS en todo el cerebro, se corrigió la acumulación de sustrato que caracteriza la enfermedad en los cerebros de ratones con MPSII tratados, como se indica por la reducción significativa en el contenido de GAG. Véase la Figura 8B. Se observó una
25 normalización completa de los niveles de GAG con todas las construcciones en todas las regiones analizadas, excepto en la Sección V en la que el efecto de la expresión de IDS derivada de vectores que contienen la secuencia de IDS no mutada (WT) no fue evidente. Véase la Figura 8B.

30 Vectores AAV9 administrados al LCR se fugan a la periferia y transducen en el hígado. Véanse Haurigot et al., Clin Invest. 2013;123(8):3254-3271, Ribera et al., Hum Mol Genet. 2014;24(7):2078-2095. Por consiguiente, se documentó un

aumento en la actividad de la iduronato-2-sulfatasa en el hígado y suero de ratones con MPSII tratados con cualquiera de los vectores codificantes de IDS humana. Véanse las Figuras 9A y 9B. El aumento fue, nuevamente, significativamente más alto en el caso de los animales con MPSII que recibieron los vectores AAV9 que contenían secuencias de iduronato-2-sulfatasa humana optimizadas (AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2) que en aquellos animales con MPSII tratados con vectores que contenían la secuencia de IDS no mutada (WT). Véanse las Figuras 9A y 9B. Cuando la eficacia de la terapia se evaluó mediante cuantificación del contenido de GAG en diferentes órganos somáticos, se observó una normalización completa de los niveles de GAG en todos los tejidos de ratones con MPSII tratados con cualquiera de los vectores codificantes de IDS humana optimizada. Véase la Figura 9C. Los ratones con MPSII que recibieron la secuencia de IDS humana no mutada (WT) mostraron, sin embargo, una normalización completa del contenido de GAG en hígado, corazón, pulmón y bazo, pero solo una corrección parcial en testículo, riñón, vejiga urinaria y tejido adiposo. Véase la Figura 9C.

Ejemplo 13: Administración intracisternal de AAV9-CAG-omIDS

Se inyectó una dosis total de 5×10^{10} genomas de vector del vector AAV9-CAG-omIDS en la cisterna magna de animales con MPSII de 2 meses de edad en un volumen total de 5 μ l. Primero, los ratones se analizaron a los 6 meses de edad, es decir, 4 meses después de la administración del vector. La administración intra-LCR de vectores AAV9-CAG-omIDS condujo a la restauración de la actividad de la iduronato-2-sulfatasa en todas las áreas del cerebro analizadas, alcanzando niveles que promediaron el 40% de aquellos observados en animales sanos en las diferentes regiones. Véase la Figura 10A. Cuatro meses después de la administración del vector, la acumulación de sustrato característica de la enfermedad revirtió completamente en los cerebros de ratones con MPSII tratados, como se indica por la normalización del contenido de GAG en todas las áreas de cerebro analizadas. Véase la Figura

10B. Asimismo, el tamaño del compartimento lisosómico se normalizó completamente, como se indica por la cuantificación de la intensidad de señal para la detección inmunitaria del marcador lisosómico LAMP2. La señal de LAMP2 es proporcional al tamaño del compartimento lisosómico, que a su vez depende de la cantidad de heparán y dermatán sulfato sin degradar acumulado. Véase la Figura 11A. Además, el efecto del tratamiento sobre la distensión lisosómica siguió siendo estable 8 meses después de la administración de AAV9-CAG-omIDS, lo que indica eficacia a largo plazo de la terapia. Véase la Figura 12.

10

La rotura de la homeostasis lisosómica normal debido a la acumulación de sustrato no degradado puede alterar la actividad de otras enzimas lisosómicas diferentes de la directamente afectada por la mutación. Véase Ribera *y col.*, Hum Mol Genet. 2014;doi: 10.1093/hmg/ddu727. En los cerebros de ratones con MPSII sin tratamiento o ratones con MPSII tratados con el vector “Nulo” de control, las actividades de IDUA (iduronidasa, alfa-L-), SGSH (N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa), NAGLU (N-acetilglucosaminidasa, alfa), HGSNAT (heparan-alfa-glucosaminidasa N-acetiltransferasa), GALNS (galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa), GUSB (glucuronidasa, beta), HEXB (hexosaminidasa B) se alteraron, pero el tratamiento con AAV9-CAG-omIDS devolvió aquellas actividades a los niveles observados en animales WT sanos indicando que el vector era capaz de restaurar la homeostasis lisosómica. Véase la Figura 11B.

15

20

25

30

De acuerdo con la corrección de la patología lisosómica, todos los signos de inflamación desaparecieron de los cerebros de ratones con MPSII tratados. Cuatro meses después del tratamiento, las intensidades de señal para las tinciones usadas para detectar astrocitosis (GFAP) y microgliosis (BSI-B4) fueron similares en ratones con MPSII tratados y en animales sanos en diferentes regiones del cerebro, a diferencia de la señal documentada en ratones con MPSII administrados con el vector control AAV9 “Nulo” que mostró una clara regulación por incremento de estos marcadores de neuroinflamación.

Véanse las Figuras 13A y 13B. Además, a los 10 meses de edad, es decir, 8 meses después de la transferencia génica, persistió el beneficioso impacto del tratamiento con AAV9-CAG-omIDS sobre la neuroinflamación -evaluada mediante la tinción tanto para GFAP como para BSI-B4-, lo que indica la erradicación a largo plazo de la neuroinflamación. Véanse las Figuras 14A y 14B.

Los vectores AAV9 administrados al LCR se fugan a la periferia y transducen el hígado. Véanse Haurigot y *col.*, Clin Invest. 2013;123(8):3254-3271, Ribera y *col.*, Hum Mol Genet. 2014;doi: 10.1093/hmg/ddu727. Por consiguiente, se documentó un aumento en la actividad de la iduronato-2-sulfatasa 4 meses después de la transferencia génica en el hígado y suero de ratones con MPSII tratados con AAV9-CAG-omIDS, alcanzando niveles de aproximadamente el 1700% y el 700% de los niveles observados en animales sanos, respectivamente. Véanse las Figuras 15A y 15B. Cuando la eficacia somática de la terapia se evaluó mediante cuantificación del contenido de GAG en diferentes órganos, se observó una normalización completa en la mayoría de los tejidos, incluyendo hígado, corazón, pulmón, testículo, bazo y tejido adiposo, con la excepción de riñón y vejiga urinaria, donde se observó >50% de reducción de GAGs. Véase la Figura 15C.

Cuatro meses después del tratamiento, también aumentó la actividad de IDS en pulmón y fue particularmente alta en corazón. Véanse la Figura 16A y 16B. Estos dos órganos, pulmón y corazón, presentaron valores muy bajos del número de copias de genoma de vector/genoma diploide, indicando la falta de una transducción eficiente de estos órganos tras la administración intra-LCR de AAV9-CAG-omIDS a la dosis de 5×10^{10} gv. Véase la Figura 16C. Este hallazgo sugirió corrección cruzada de la deficiencia de IDS por captación de IDS de la circulación.

De acuerdo con los datos de contenido de GAG, el peso del hígado se normalizó en ratones con MPSII de 6 meses de edad tratados con AAV9-CAG-

omIDS a la edad de 2 meses. Véase la Figura 17A. Se proporcionó demostración adicional del potencial del tratamiento intra-LCR con AAV9-CAG-omIDS para contrarrestar la patología lisosómica en ratones con MPSII por la medición de actividad de otras enzimas lisosómicas en extractos de hígado.

5 IDUA, SGSH, NAGLU, HGSNAT, GALNS, GUSB, HEXB se alteraron considerablemente con respecto a los niveles del WT en ratones con MPSII sin tratamiento o en ratones con MPSII tratados con el vector “Nulo” de control. El tratamiento con AAV9-CAG-omIDS normalizó completamente las actividades de todas estas enzimas. Véase la Figura 17B. Además, la actividad de HEXB
10 en suero también aumenta como consecuencia de la patología lisosómica, y se normalizó completamente tras el tratamiento con aAV9-CAG-omIDS, Véase la Figura 17C, que proporciona evidencia de una corrección en el cuerpo entero de la funcionalidad lisosómica.

15 Se evaluó el impacto de la administración intra-LCR de AAV9-CAG-omIDS sobre el comportamiento a los 6 meses de edad con la prueba de campo abierto, que evalúa la actividad locomotora y exploratoria general de ratones en entornos desconocidos. Ratones con MPSII sin tratar y tratados con AAV9-nulo mostraron actividad exploratoria reducida en comparación con ratones sanos
20 en términos del tiempo gastado en el centro y en la periferia, el número de entradas en el centro y en la periferia y el número total de movimientos rápidos. La administración intracisternal de AAV9-CAG-omIDS corrigió completamente los déficits de comportamiento en ratones con MPSII. Véanse las Figuras 18A-F.

25 Finalmente, se evaluó la eficacia terapéutica del tratamiento intra-LCR con AAV9-CAG-omIDS comparando la supervivencia de ratones con MPSII no tratados y tratados. La terapia génica con AAV9-CAG-omIDS prolongó considerablemente la esperanza de vida de los ratones con MPSII. Véase la
30 Figura 19. Mientras que a los 17 meses de edad todos los ratones con MPSII no tratados o tratados con AAV9-CAG-Nulo estaban muertos, el 76% de los ratones con MPSII que recibieron tratamiento con AAV9-CAG-omIDS estaban

vivos. Además, el 65% de los animales tratados estaban todavía vivos a los 22 meses de edad. El % de animales no mutados (WT) vivos a esta edad fue del 79%. Véase la Figura 19.

5 **Ejemplo 14: Administración intracisternal de diferentes dosis de AAV9-CAG-omIDS: estudio de dosis-respuesta**

Se administraron cuatro dosis diferentes ($1,58 \times 10^9$, 5×10^9 , $1,58 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} gv/ratón) de vectores AAV9-CAG-omIDS a animales con MPSII de 2 meses de edad mediante inyección intracisternal en un volumen total de 5 μ l.

Un mes y medio meses después de la administración del vector, los animales se sacrificaron y se recogieron los tejidos. Se midió la actividad de la iduronato-2-sulfatasa en diferentes partes del cerebro (secciones I-V). La actividad aumentó con la dosis y osciló entre el 0,8 y el 53% de la actividad del WT en las diferentes regiones. Véanse las Figuras 20A. Se observó una dosis-respuesta similar cuando se analizó el efecto del tratamiento sobre el almacenamiento de GAG. Sin embargo, se documentó una corrección completa de la acumulación de GAG solo a las dos dosis mayores $1,58 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} gv/ratón. Véase la Figura 20B.

En el hígado y suero, la actividad también aumentó con la dosis, oscilando entre el 20% y el 4300% en el hígado y entre el 0,4% y el 1100% en suero. No fue detectable actividad de IDS en suero con las 2 dosis más bajas ($1,58 \times 10^9$, 5×10^9 gv/ratón). Véanse las Figuras 21A y 21B. De acuerdo con los datos de actividad, la medición del contenido de GAG en tejidos periféricos demostró una disminución de la dosis-respuesta en el contenido de GAG en hígado, corazón, pulmón, testículo, bazo, riñón, vejiga urinaria y tejido adiposo. Se logró normalización completa o casi completa de los niveles de GAG en la mayoría de los tejidos con las 2 dosis mayores ($1,58 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} gv/ratón), con las excepciones de pulmón y vejiga urinaria, donde se documentaron >70% de reducciones, y riñón, donde se observó una disminución de

aproximadamente el 50%. Véase la Figura 21C.

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia nucleotídica aislada que codifica para la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1, caracterizada porque dicha
5 secuencia nucleotídica tiene entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2.
2. La secuencia nucleotídica aislada según la reivindicación 1, donde dicha secuencia es la SEQ ID NO: 5.
10
3. La secuencia nucleotídica aislada según la reivindicación 1, donde dicha secuencia es la SEQ ID NO: 8.
4. Un plásmido que contiene una secuencia de nucleótidos que tiene al
15 menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 2.
5. El plásmido según la reivindicación 4, caracterizado porque contiene una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 6. El plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, que contiene una secuencia nucleotídica seleccionada de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8.
7. El plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que es
25 pAAV-CAG-hIDS con número de acceso DSM 29866, según la SEQ ID NO: 3.
8. El plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que es pAAV-CAG-ohIDS-versión1 con número de acceso DSM 29867, según la SEQ ID NO: 6.
30
9. El plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que es pAAV-CAG-ohIDS-versión2 con número de acceso DSM 29868, según la SEQ ID NO: 9.

10. Un vector recombinante que contiene una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 2, preferiblemente que contiene una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
11. El vector recombinante según la reivindicación 10, donde dicho vector es un vector de virus adeno-asociado de serotipo 9, AAV9.
12. El vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde la secuencia nucleotídica está unida a un promotor CAG según la SEQ ID NO: 14.
13. El vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que es AAV9-CAG-hIDS que contiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 2 unida al promotor CAG de SEQ ID NO: 14.
14. El vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que es AAV9-CAG-ohIDS-versión1 que contiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 5 unida al promotor CAG de SEQ ID NO: 14.
15. El vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que es AAV9-CAG-ohIDS-versión2 que contiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 8 unida al promotor CAG de SEQ ID NO: 14.
16. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o del plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 o del vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15.
17. La composición farmacéutica según la reivindicación 16 para administración intravenosa o intracisternal.

18. La secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 o el vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 para su uso en el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II.

5

19. La secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 o el vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 para aumentar la actividad de la iduronato-2-sulfatasa.

10

20. Un método de producción de los vectores definidos en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 que comprende las etapas de:

i) proporcionar un primer vector que comprende la secuencia que codifica para la proteína de interés interpuesta entre una primera repetición terminal de AAV y una segunda repetición terminal de AAV, un promotor CAG operativamente unido a la secuencia que codifica para la proteína de interés; un segundo vector que comprende un gen *rep* de AAV y un gen *cap* de AAV de serotipo 9; y un tercer vector que comprende el gen de función auxiliar de adenovirus;

20

ii) co-transfectar células competentes con los vectores de la etapa i);

iii) cultivar las células transfectadas de la etapa ii); y

iv) purificar los vectores de expresión del cultivo de la etapa iii).

21. Un método para la preparación del plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, que comprende las etapas de:

i) cortar la secuencia que codifica para la proteína de interés del plásmido de partida, por digestión, en particular usando MluI/EcoRI,

30

ii) clonar la secuencia que codifica para la proteína de interés entre dos sitios de restricción del plásmido de esqueleto de AAV pAAV-CAG, obteniéndose de esta forma el plásmido correspondiente que incluye la secuencia que codifica para la proteína de interés.

5

22. Una célula aislada que comprende la secuencia nucleotídica que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 2, que codifica la iduronato-2-sulfatasa, SEQ ID NO: 1, preferiblemente que comprende una secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que

10

tiene entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

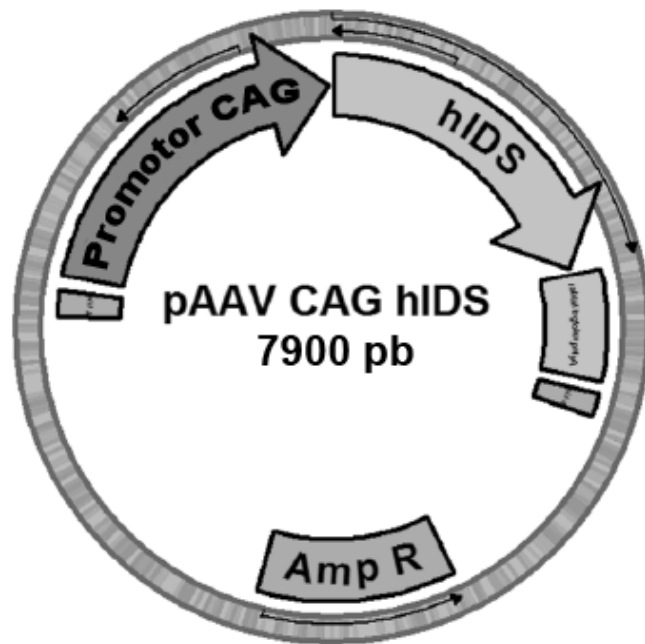
RESUMEN**VECTORES VIRALES ADENOASOCIADOS PARA EL TRATAMIENTO DE MUCOPOLISACARIDOSIS**

La presente invención proporciona nuevos vectores derivados de virus adeno-asociados y composiciones farmacéuticas que los contienen para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico y especialmente, para el tratamiento de mucopolisacaridosis Tipo II.

Figura 1

IDS humana

A



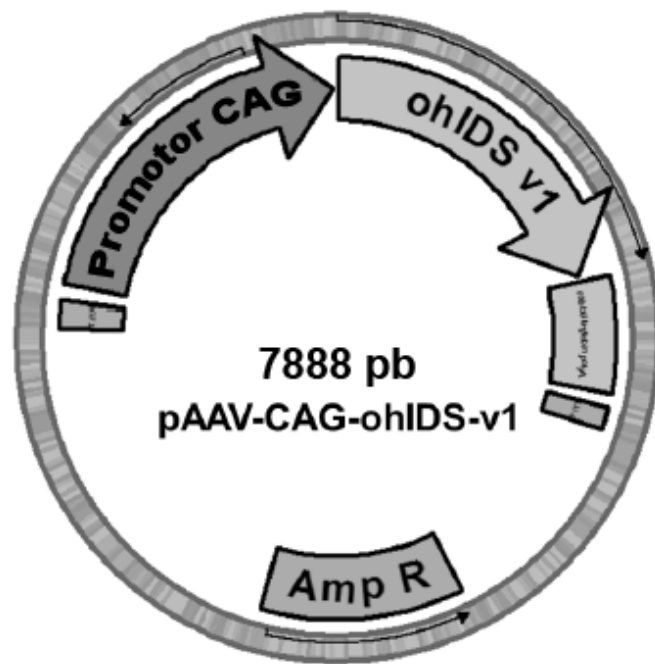
B



Figura 2

IDS humana optimizada-versión1

A



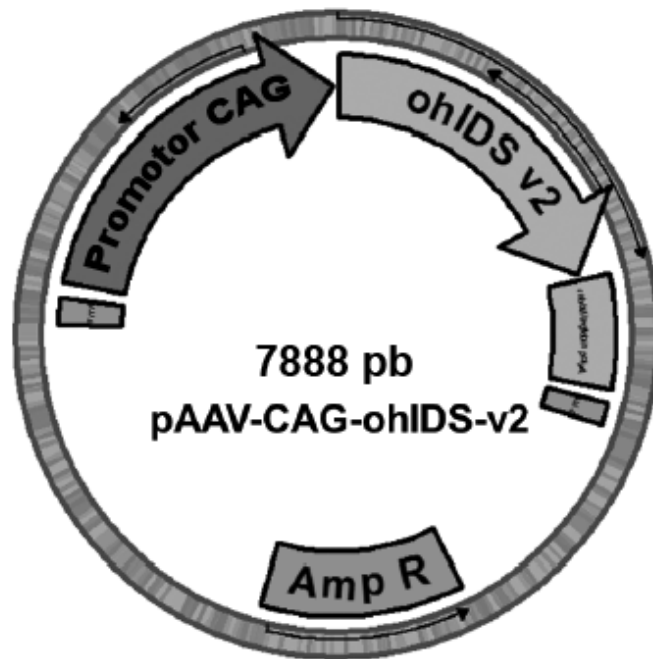
B



Figura 3

IDS humana optimizada-versión2

A



B

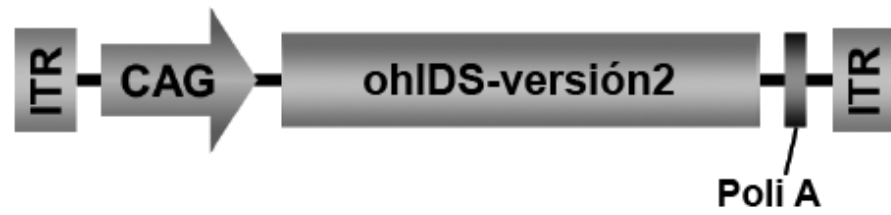
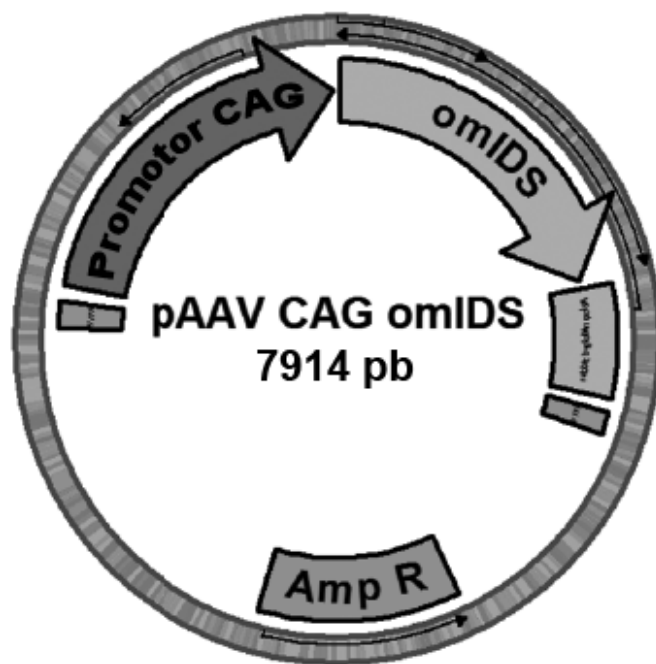


Figura 4

IDS murina optimizada

A



B

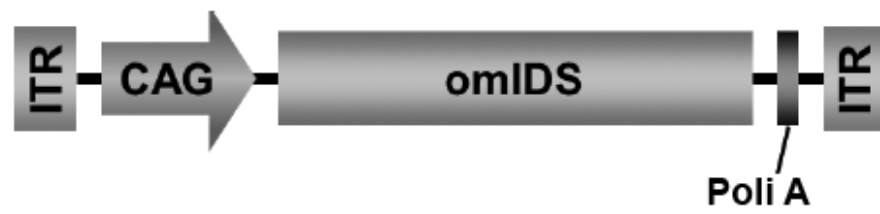


Figura 5

Inyección hidrodinámica de plásmidos pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 en ratones sanos

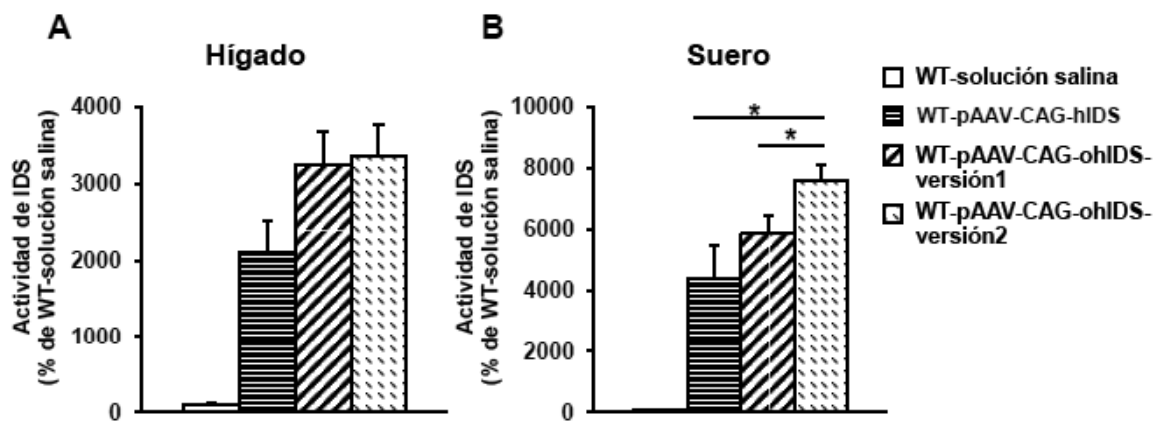


Figura 6

Inyección hidrodinámica de plásmidos pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 en ratones con MPSII

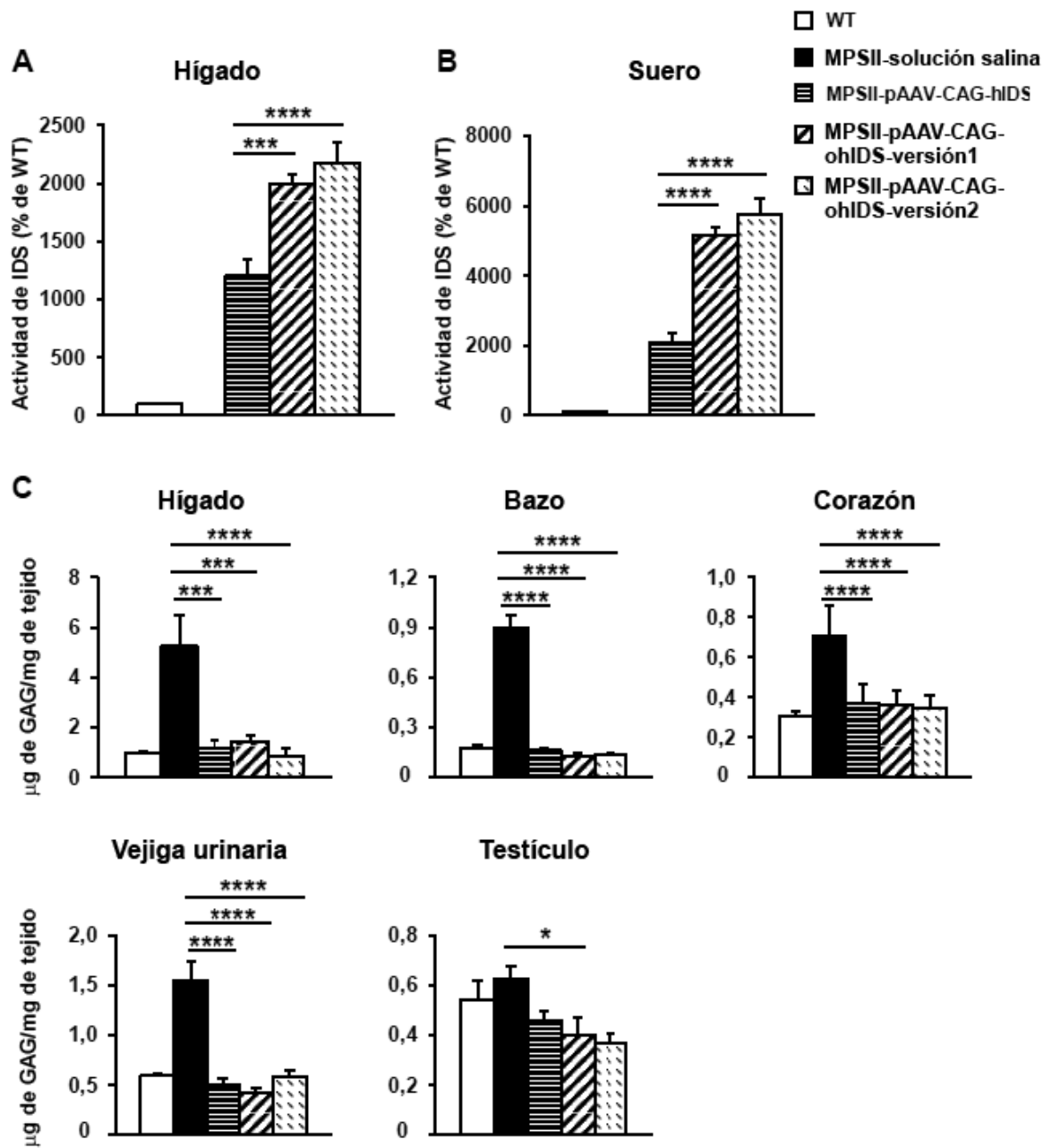


Figura 7

Inyección intravenosa de vectores AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2 en ratones con MPSII

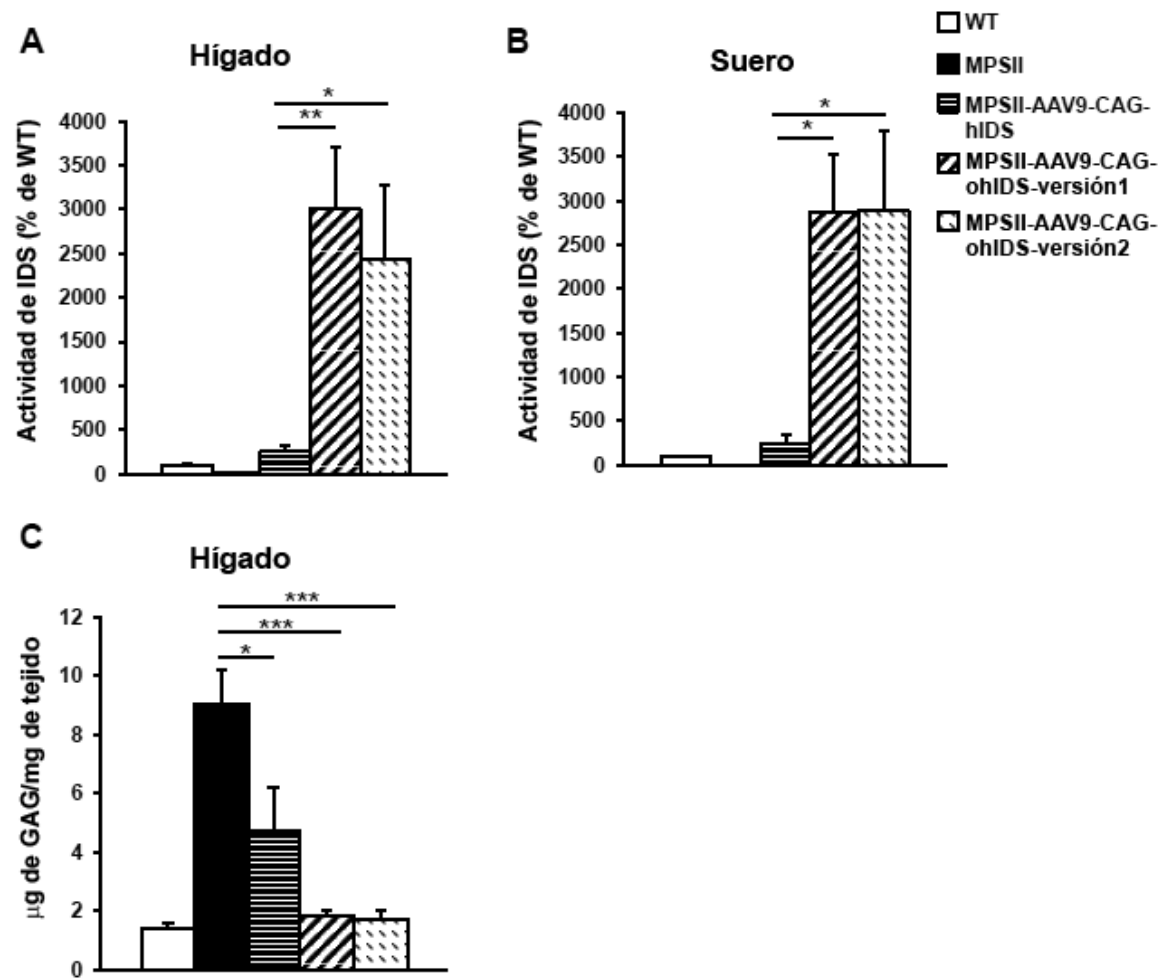


Figura 8

Figura 9

Inyección intra-LCR de AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2 en ratones con MPSII.

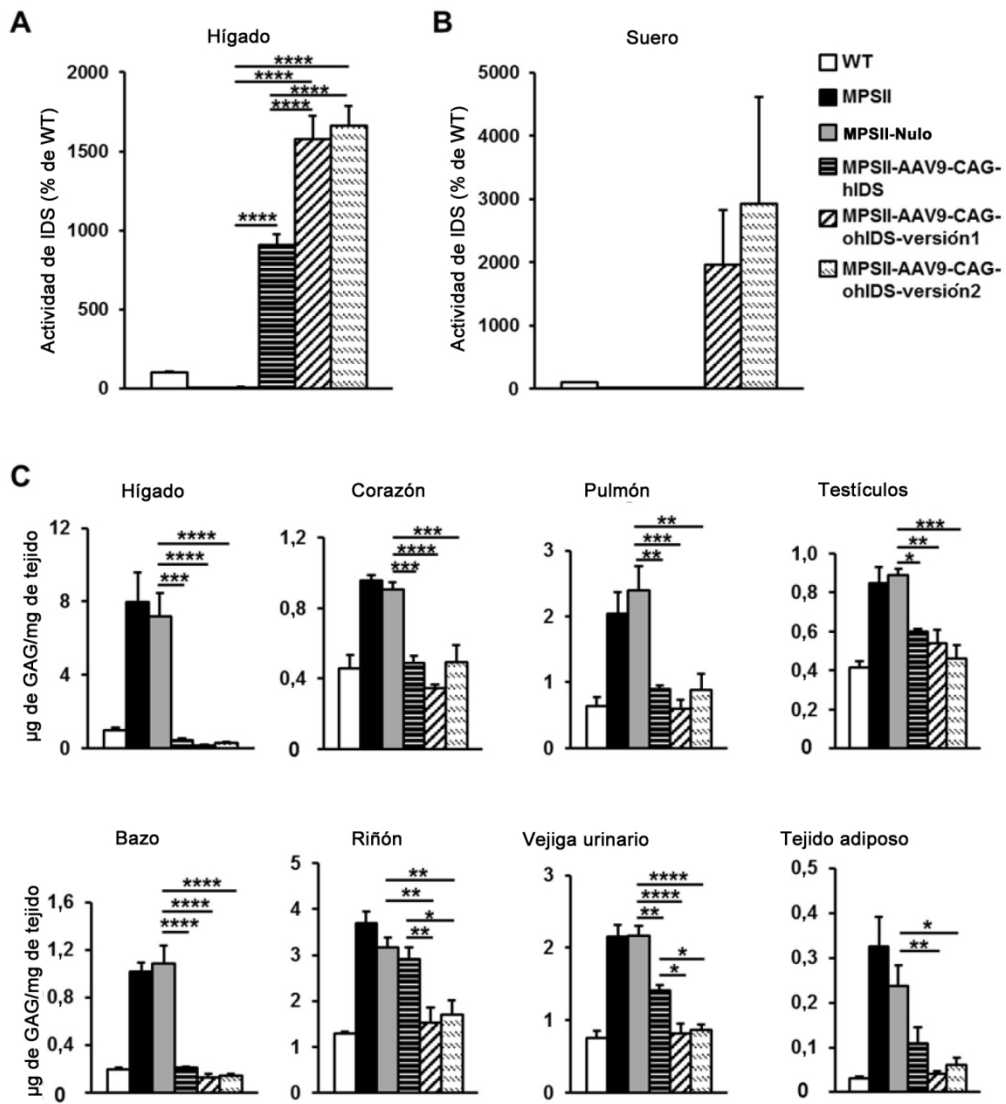


Figura 10

Intra-LCR – IDS murina optimizada

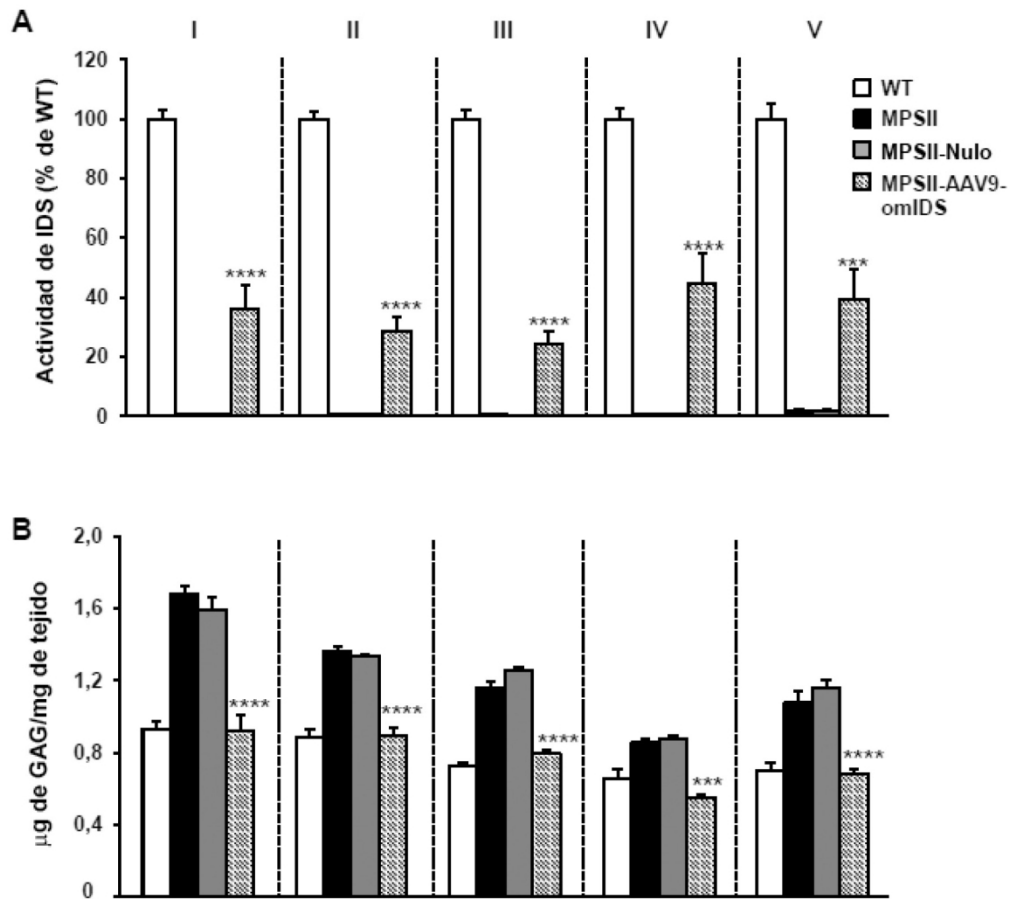


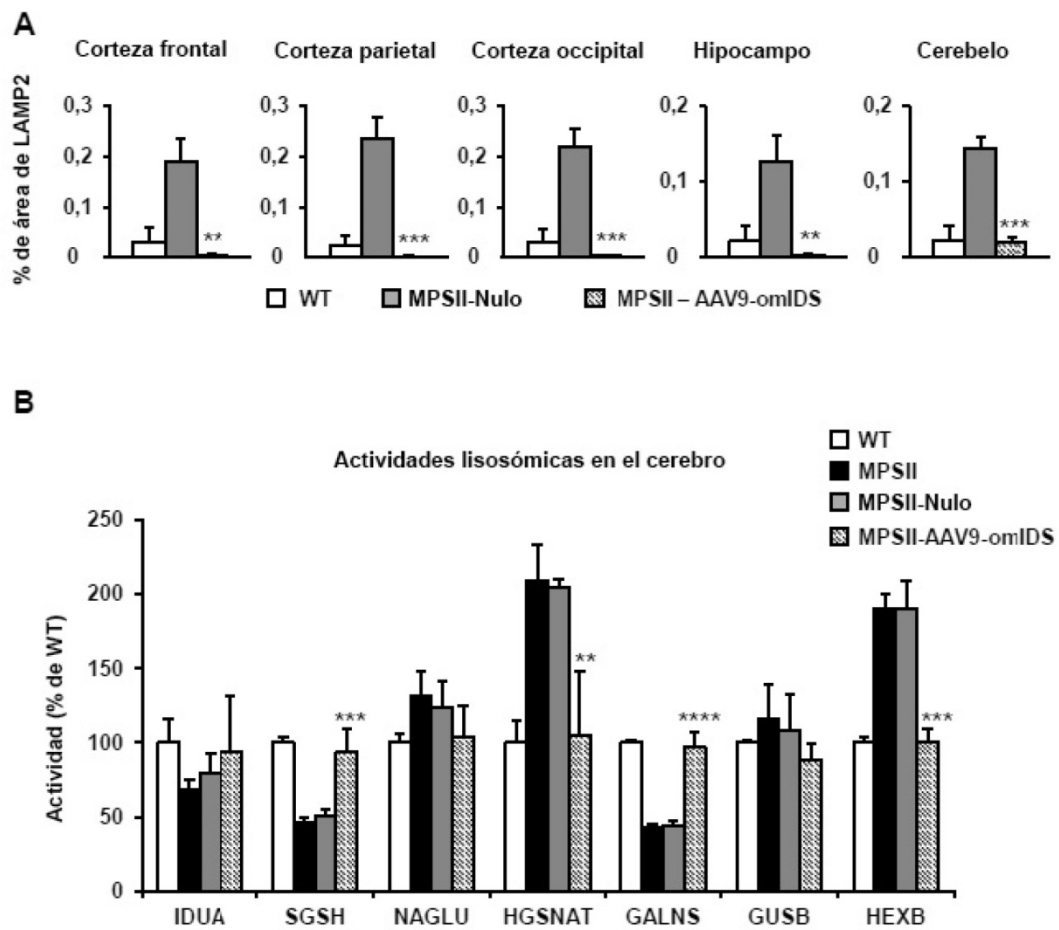
Figura 11**Intra-LCR – IDS murina optimizada**

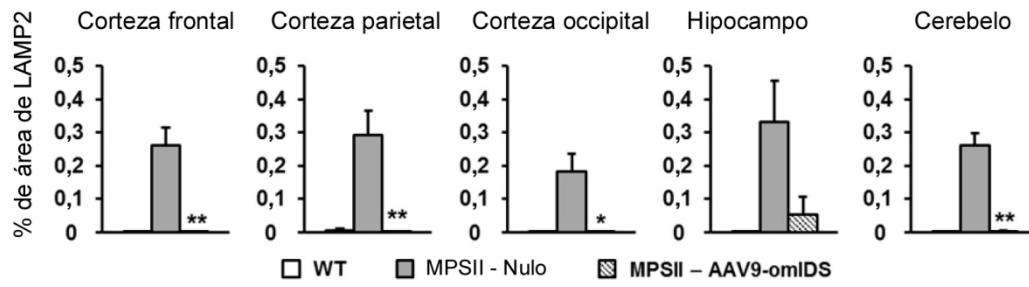
Figura 12**Intra-LCR – IDS murina optimizada (largo plazo)**

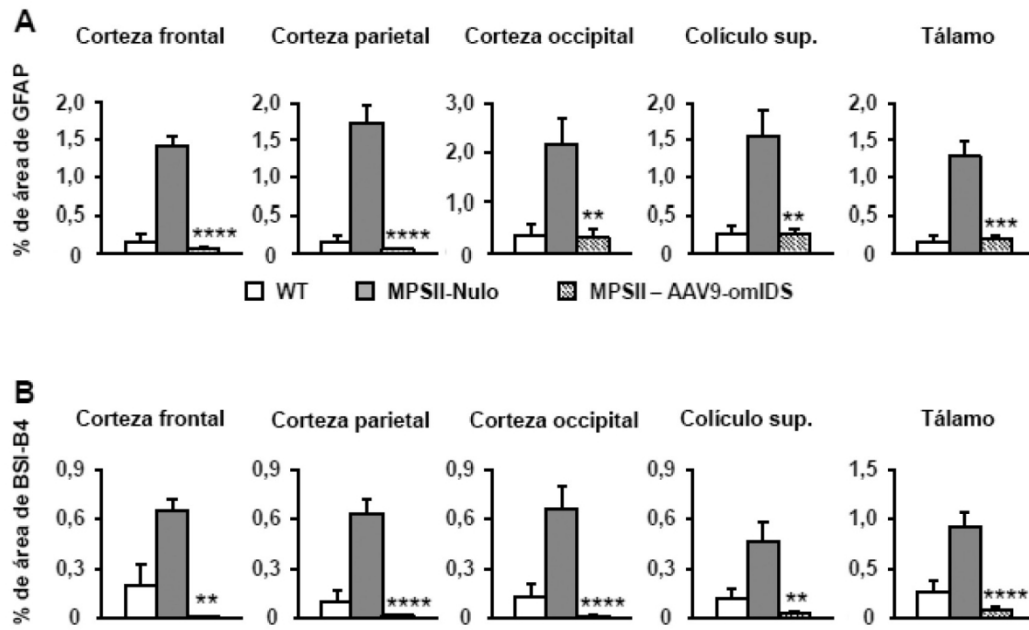
Figura 13**Intra-LCR – IDS murina optimizada**

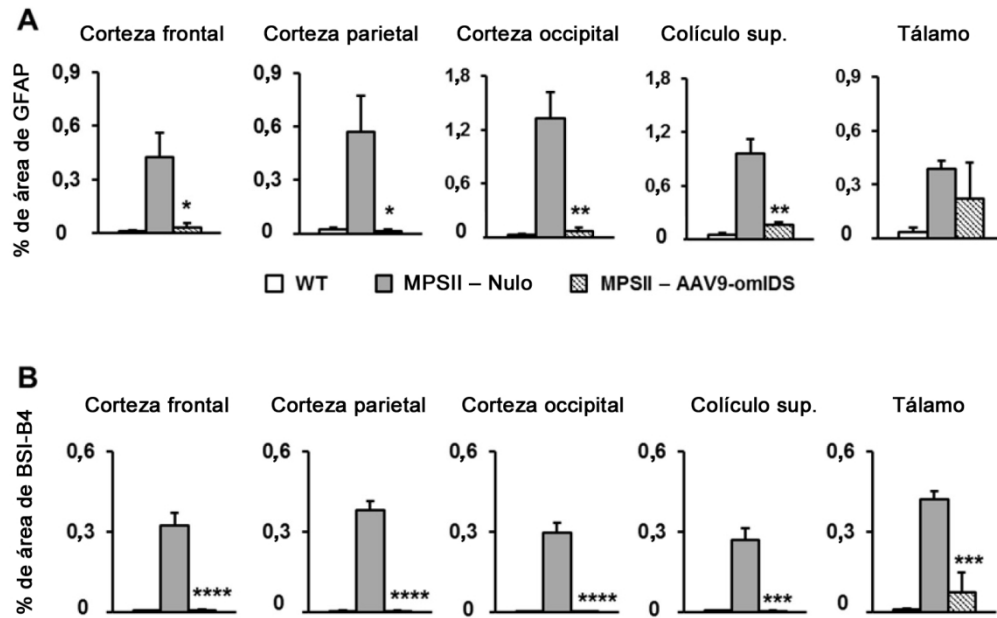
Figura 14**Intra-LCR – IDS murina optimizada (largo plazo)**

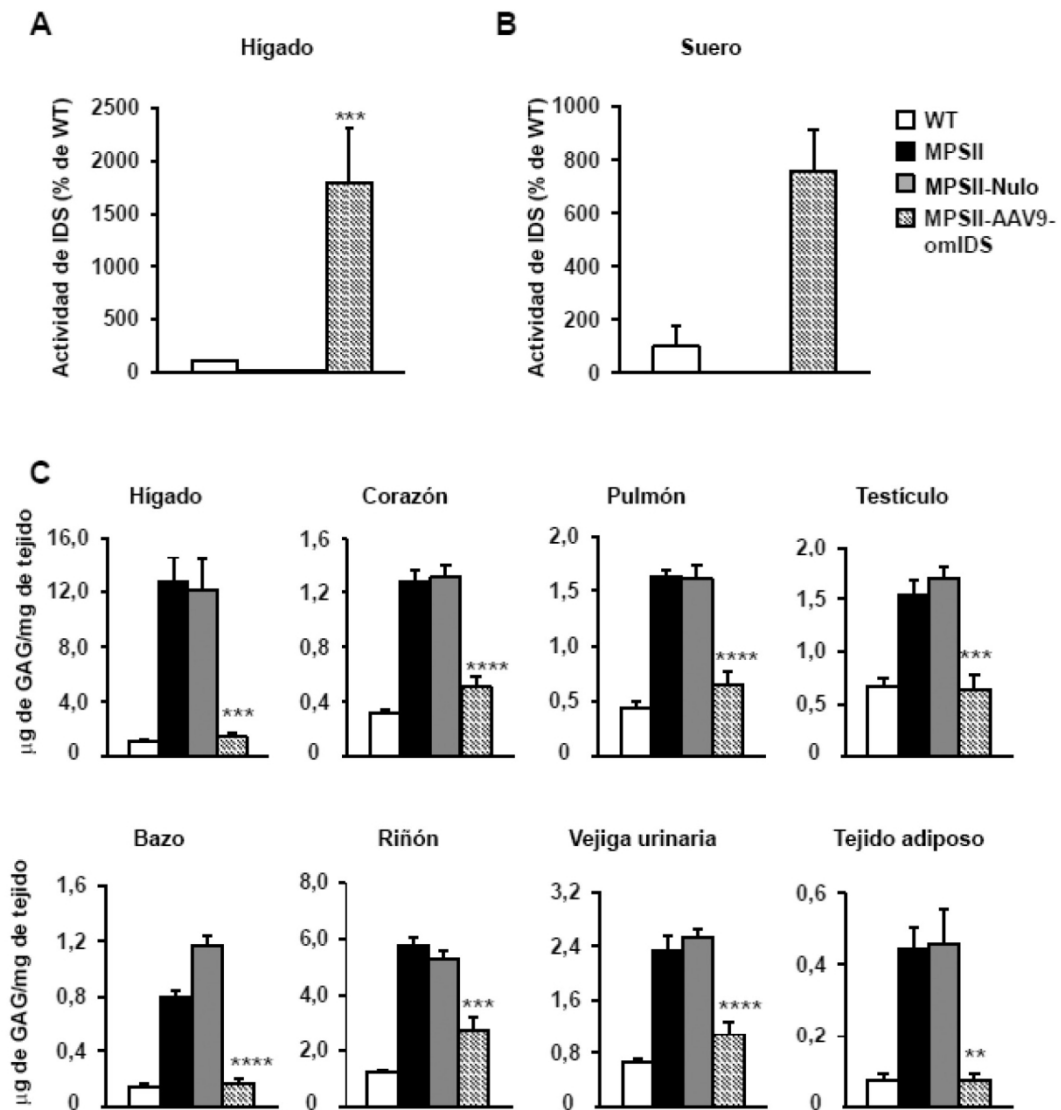
Figura 15**Intra-LCR – IDS murina optimizada**

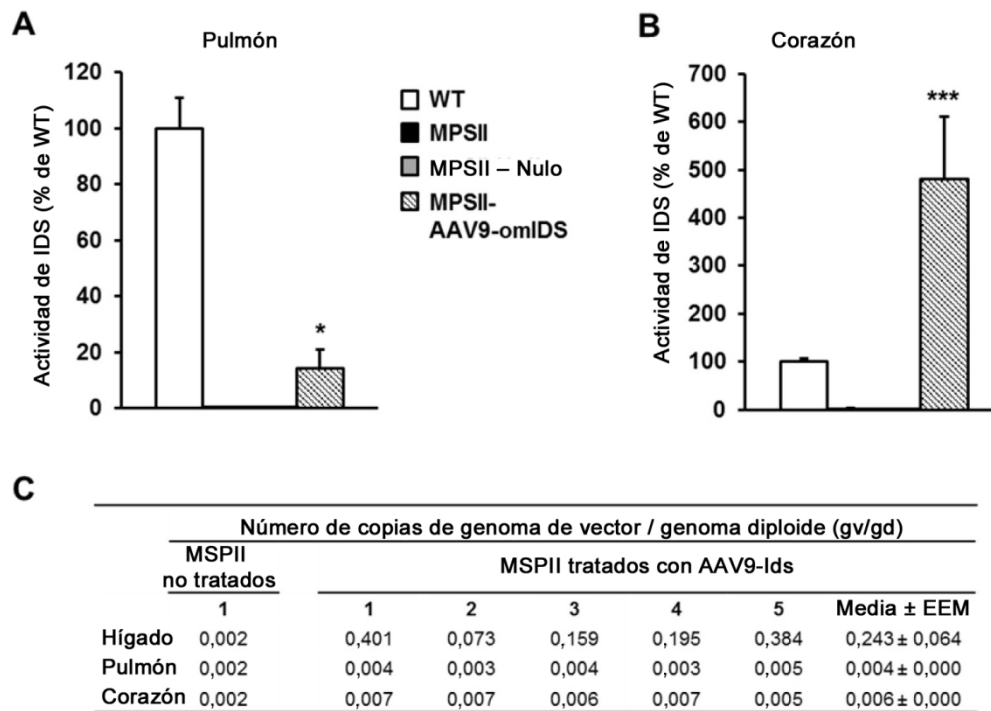
Figura 16**Intra-LCR – IDS murina optimizada**

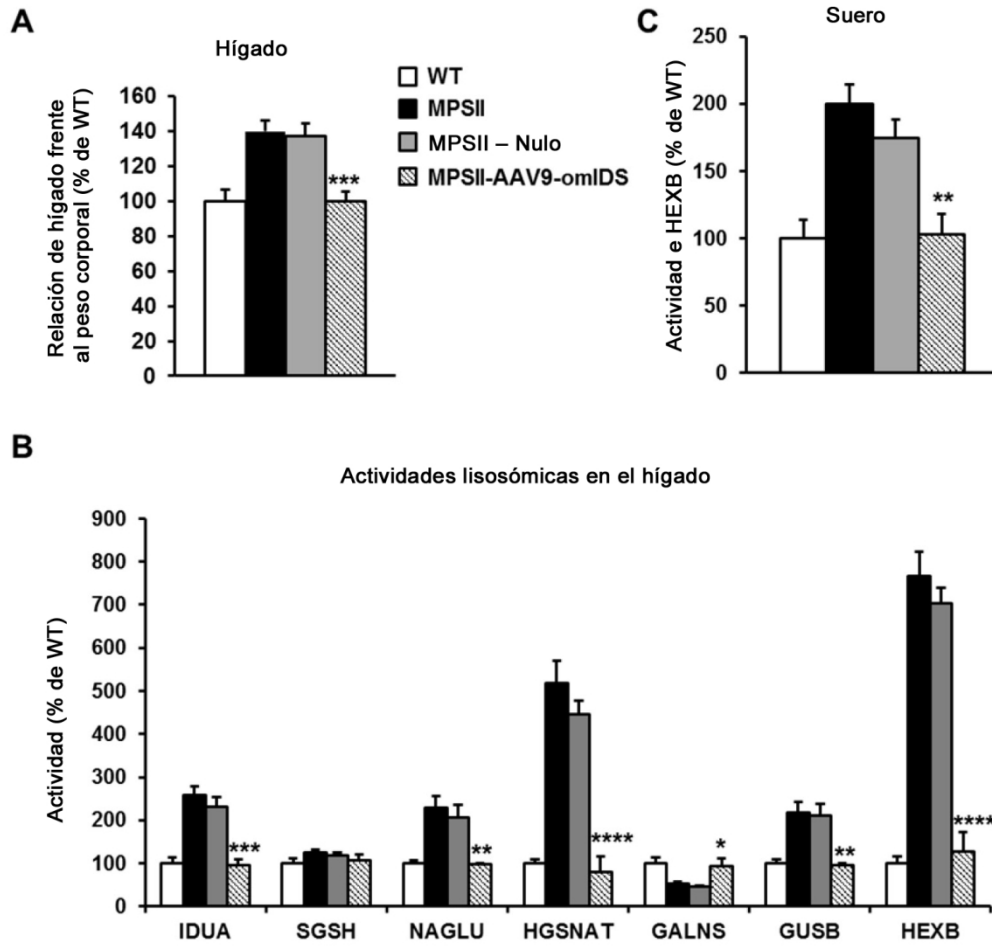
Figura 17**Intra-LCR – IDS murina optimizada**

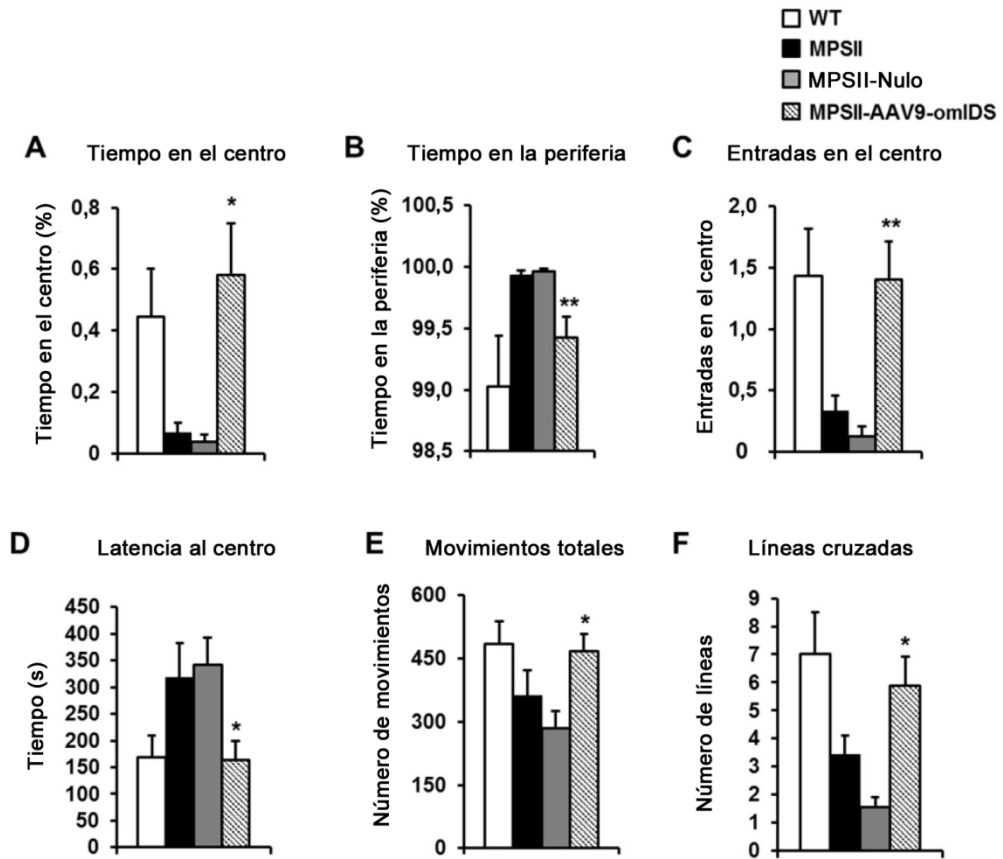
Figura 18**Intra-LCR – IDS murina optimizada**

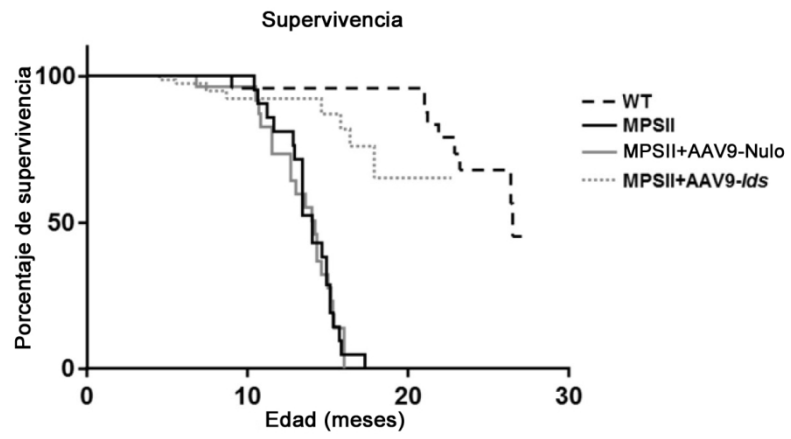
Figura 19**Intra-LCR – IDS murina optimizada**

Figura 20

Intra-LCR – Respuesta a dosis de IDS murina optimizada

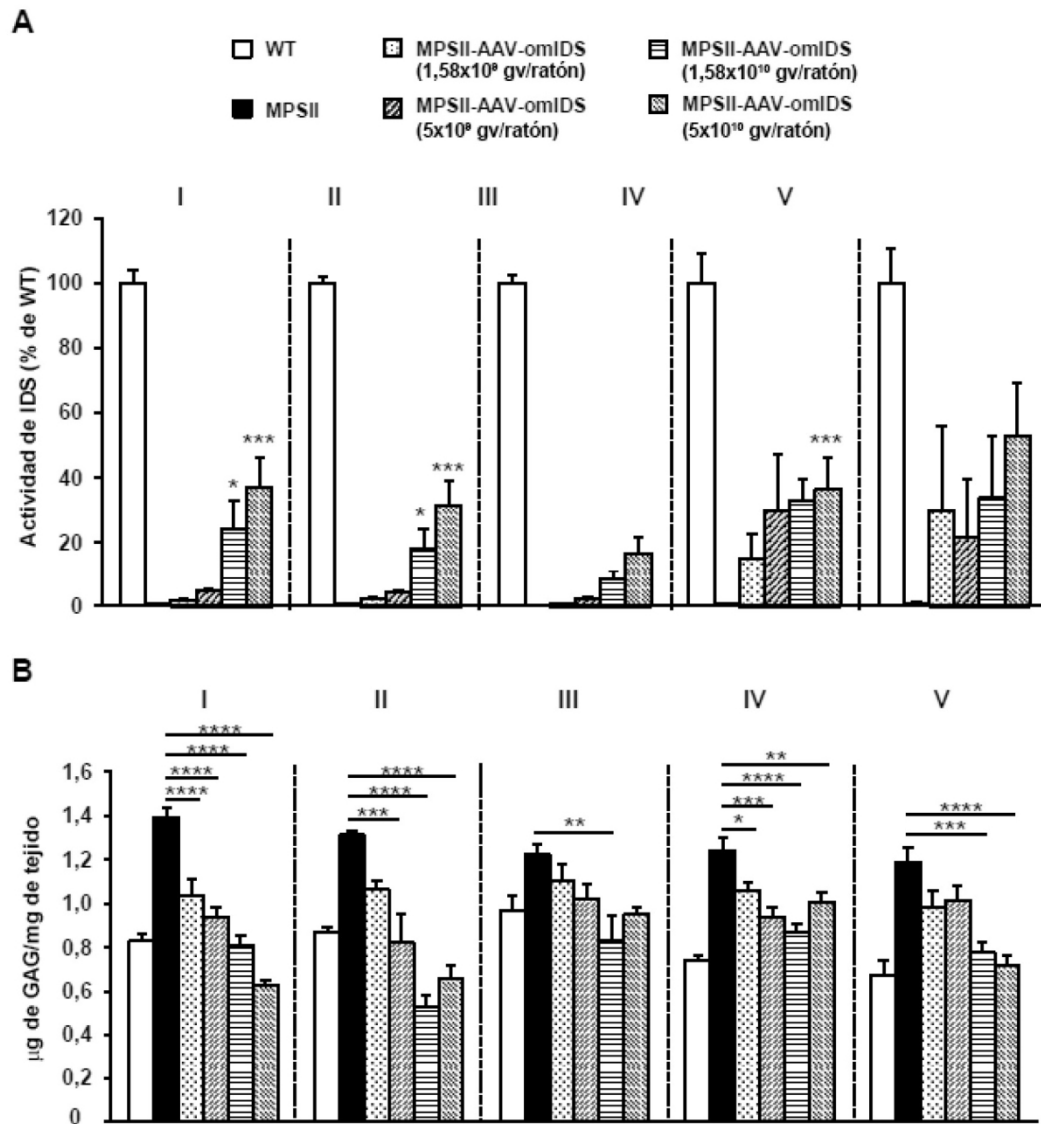


Figura 21

Intra-LCR – Respuesta a dosis de IDS murina optimizada

