

CASETES DE EXPRESIÓN DE α -GLUCOSIDASA DE ÁCIDO OPTIMIZADO CON CODÓN Y MÉTODOS DE USO DEL MISMO

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional Estadounidense No. 62/672,419, presentada el 16 de mayo de 2018, y la Solicitud de Patente Provisional Estadounidense No. 62/734,454, presentada el 21 de septiembre de 2018. Todo el contenido de las solicitudes anteriores se incorpora aquí como referencia, incluido todo el texto, tablas, listas de secuencias y dibujos.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II, también llamada enfermedad de Pompe, es un trastorno autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen que codifica la enzima lisosomal α -glucosidasa ácida (GAA), que cataliza la degradación del glucógeno. La deficiencia enzimática resultante conduce a la acumulación patológica de glucógeno y alteraciones lisosomales en todos los tejidos del cuerpo, lo que resulta en una disfunción del músculo cardíaco, respiratorio y esquelético (van der Ploeg & Reuser, 2008 Lancet, 372: 1342-1353). Tradicionalmente, la enfermedad de Pompe se ha dividido en dos fenotipos principales: enfermedad de Pompe de inicio infantil (IOPD) (también conocida como enfermedad de Pompe infantil (IPD) o enfermedad de Pompe de inicio temprano) y enfermedad de Pompe de inicio tardío (LOPD), según actividad residual de la enzima GAA, edad de inicio, afectación de órganos (es decir, presencia de miocardiopatía), gravedad y velocidad de progresión. La terapia de reemplazo enzimático (ERT) está disponible para la enfermedad de Pompe; sin embargo, tiene varias limitaciones (es decir, biodistribución limitada y alta inmunogenicidad) que conducen al fracaso del tratamiento y a una eficacia limitada a largo plazo (van der Ploeg y Reuser, 2008).

RESUMEN

En el presente documento se describen casetes optimizados para la expresión dirigida al hígado de una versión secretable de GAA humana. Estas optimizaciones de los casetes conducen a un aumento en la secreción de GAA del hígado y permiten la transferencia de genes hepáticos

para lograr niveles circulantes de GAA suficientes para corregir de forma cruzada la deficiencia de GAA sistémicamente en sujetos. Estos casetes logran una mayor expresión transgénica, mejores características de seguridad y una inmunogenicidad potencialmente reducida. Estos casetes serán útiles como tratamiento de terapia génica de sujetos con enfermedad de Pompe y otras enfermedades y trastornos tratables con GAA.

Se emprendió la optimización de codones del casete de expresión de GAA para mejorar la expresión de GAA. En una modalidad, las secuencias de ácido nucleico que codifican GAA se modificaron para eliminar los dinucleótidos CpG. En total, se crearon 20 nuevas secuencias transgénicas optimizadas de codones (GAA1-GAA20). Basándose en la comparación *in vitro* de la actividad de GAA, se seleccionaron 5 secuencias optimizadas de codones (GAA 2, 5, 7, 8 y 13) para una optimización adicional. La secuencia de GAA13 se utilizó para analizar las diferencias en la expresión de GAA después de la adición de una secuencia de polinucleótidos de 29 pares de bases a la región no traducida 5' (UTR). También se evaluaron dos secuencias de poliadenilación diferentes derivadas de la hormona del crecimiento bovino (bGH o BGH) (de tipo natural y reducida en CpG) para GAA7, 8 y 13. Los 9 casetes de expresión resultantes (Tabla 1) se empaquetaron dentro de la cápside de SEC ID NOs: 30-32; uno también fue empaquetado en cápside AAV6.

De acuerdo con la invención, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una α -glucosidasa ácida (GAA), casetes de expresión que comprenden los ácidos nucleicos que codifican una α -glucosidasa ácida (GAA) y vectores virales que comprenden los ácidos nucleicos que codifican una α -glucosidasa ácida (GAA).

En una modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 86% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 1-5. En aspectos adicionales, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 87% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 1-5.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 87% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 6-15. En aspectos particulares, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 88% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 6-15. En

aspectos particulares adicionales, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 89% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 6-15. En aspectos particulares adicionales, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 90% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 6-15. En incluso aspectos particulares adicionales, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 91% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 6-15.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 91% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 16-24.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 92% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 1-24.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 93% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 1-24.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 94% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 1-24.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 95% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 1-24.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 96% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 1-24.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 97% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 1-24.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 98% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 1-24.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 99% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 1-24.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia superior al 99.5% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 1-24.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA tiene una identidad de secuencia del 100% con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 1-24.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene menos de 127 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene menos de 126 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene de aproximadamente 126 a 120 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene de aproximadamente 120 a 110 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene de aproximadamente 110 a 100 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene de aproximadamente 100 a 90 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene de aproximadamente 90 a 80 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene de aproximadamente 80 a 70 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene de aproximadamente 70 a 60 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene de aproximadamente 60 a 50 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene de aproximadamente 50 a 40 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene de aproximadamente 40 a 30 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene de aproximadamente 30 a 20 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene menos de 20 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene de aproximadamente 20 a 10 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene menos de 10 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene de aproximadamente 10 a 5 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene 5 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene 4 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene 3 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene 2 dinucleótidos CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene 1 dinucleótido CpG.

En otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una GAA contiene 0 dinucleótidos CpG.

La invención también proporciona casetes de expresión que comprenden los ácidos nucleicos que codifican GAA como se establece en el presente documento, unidos operativamente a un elemento de control de la expresión.

En una modalidad, un casete de expresión comprende un ácido nucleico que codifica una GAA con más del 86% de identidad de secuencia (por ejemplo, 87% -100% de identidad) con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 1-5.

En otra modalidad, un casete de expresión comprende un ácido nucleico que codifica una GAA con más del 87% de identidad de secuencia (por ejemplo, 88% -100% de identidad) con cualquiera de las secuencias expuestas como SEC ID NOs: 6-15.

En otra modalidad, un casete de expresión comprende un ácido nucleico que codifica una GAA con menos de 127 dinucleótidos CpG, menos de 126 dinucleótidos CpG, menos de 125 dinucleótidos CpG, menos de 124 dinucleótidos CpG, menos de 123 dinucleótidos CpG, menos de 122 dinucleótidos CpG, menos de 121 dinucleótidos CpG, menos de 120 dinucleótidos CpG, menos de 119 dinucleótidos CpG, menos de 118 dinucleótidos CpG, menos de 117 dinucleótidos CpG, menos de 116 dinucleótidos CpG, menos de 115 dinucleótidos CpG, menos de 114 dinucleótidos CpG, menos de 113 dinucleótidos CpG, menos de 112 dinucleótidos CpG, menos de 111 dinucleótidos CpG, menos de 110 dinucleótidos CpG, menos de 109 dinucleótidos CpG, menos de 108 dinucleótidos CpG, menos de 107 dinucleótidos CpG, menos de 106 dinucleótidos CpG, menos de 105 dinucleótidos CpG, menos de 104 dinucleótidos CpG, menos de 103 dinucleótidos CpG, menos de 102 CpG dinucleótidos, menos de 101 dinucleótidos CpG, menos de 100 dinucleótidos CpG, y así sucesivamente hasta cero (0) dinucleótidos CpG.

En una modalidad, un elemento de control de expresión se coloca en 5' de un ácido nucleico que codifica una GAA.

En otra modalidad, un casete de expresión incluye una secuencia de poliadenilación (poliA) posicionada 3' de un ácido nucleico que codifica una GAA.

En otra modalidad, un elemento de control de expresión o secuencia de poliadenilación tiene CpG reducida en comparación con el elemento de control de expresión de tipo natural o secuencia de poliadenilación.

En otra modalidad, un elemento de control de expresión comprende una secuencia potenciadora / promotora de ApoE/hAAT.

En otra modalidad, una secuencia de poliadenilación comprende una secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (bGH).

En otra modalidad, una secuencia potenciadora / promotora de ApoE/hAAT o secuencia de poliadenilación de bGH es CpG reducida en comparación con la secuencia potenciadora / promotora de ApoE/hAAT de tipo natural o secuencia de poliadenilación de bGH.

En un aspecto, una secuencia de poliadenilación de bGH de tipo natural comprende la secuencia de SEC ID NO: 27.

En otro aspecto, una secuencia potenciadora / promotora de ApoE/hAAT de tipo natural comprende la secuencia de SEC ID NO: 28 o 29.

En otro aspecto, una secuencia de poliadenilación de bGH reducida con CpG comprende la secuencia de SEC ID NO: 26.

En otra modalidad, un casete de expresión comprende además un intrón posicionado entre el extremo 3' del elemento de control de expresión y el extremo 5' del ácido nucleico que codifica una GAA.

En otra modalidad, una GAA comprende o consiste en la secuencia establecida como SEC ID NO: 25.

La invención proporciona además vectores virales tales como vectores de virus asociados a adenovirus (AAV) que comprenden los ácidos nucleicos que codifican una GAA como se expone en el presente documento.

En una modalidad, un vector viral tal como un vector de virus asociado a adenovirus (AAV) comprende cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican una GAA como se expone en este documento unido operativamente a un elemento de control de expresión.

En otra modalidad, un vector viral tal como un vector de virus asociado a adenovirus (AAV) comprende cualquiera de los casetes de expresión que comprenden los ácidos nucleicos que codifican una GAA como se expone en el presente documento.

En otra modalidad, un vector de AAV comprende: una o más de una cápside de AAV; y una o más repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV, en las que las ITR(s) de AAV flanquean el extremo 5' o 3' del ácido nucleico o el casete de expresión.

En modalidades adicionales, un vector de AAV comprende además un intrón posicionado en 5' o 3' de uno o más ITRs.

En modalidades adicionales, un vector de AAV que comprende por lo menos una o más ITRs o un intrón tiene una o más ITRs o intrón modificado para tener CpG reducida.

En modalidades adicionales, un vector de AAV tiene un serotipo de cápside que comprende una cápside de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV modificada o variante que tiene un 90% o más de identidad de secuencia con AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74, AAV3B, AAV-2i8 o SEC ID NO: 30, 31 o 32 secuencias de VP1, VP2 y/o VP3, o una cápside que tiene 95% o más de identidad de secuencia con AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74, AAV3B, AAV-2i8 o SEC ID NO: 30, 31 o 32 secuencias de VP1, VP2 y/o VP3, o una cápside que tiene una identidad de secuencia del 100% con AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74, AAV3B, AAV-2i8 o SEC ID NO: 30, 31 o 32 VP1, secuencias de VP2 y/o VP3.

En modalidades adicionales, un vector AAV que comprende uno o más ITRs como uno o más ITRs de cualquiera de: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV3B AAV serotipos, o una combinación de los mismos.

La invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican GAA, casetes de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican GAA o vectores virales tales como vectores AAV que comprenden ácidos nucleicos que codifican GAA o casetes de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican GAA como se expone en este documento.

En una modalidad, una composición farmacéutica comprende una pluralidad de vectores de AAV como se expone en el presente documento en un vehículo o excipiente biológicamente compatible.

En otra modalidad, una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los vectores de AAV como se establece en este documento, comprende además cápsidas de AAV vacías.

En modalidades particulares, en una composición farmacéutica que comprende vectores de AAV y cápsidas de AAV vacías, la relación de las cápsidas de AAV vacías al vector de AAV está dentro o entre aproximadamente 100:1-50:1, de aproximadamente 50:1-25:1, de aproximadamente 25:1-10:1, de aproximadamente 10:1-1:1, de aproximadamente 1:1-1:10, de aproximadamente 1:10-1:25, de aproximadamente 1:25-1:50, o de aproximadamente 1:50-1:100.

En aspectos particulares, en una composición farmacéutica que comprende vectores de AAV y cápsidas de AAV vacías, la relación de las cápsidas de AAV vacías al vector de AAV es aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o 10:1.

En otra modalidad, una composición farmacéutica incluye un tensioactivo.

La invención también proporciona métodos para tratar a un ser humano que necesita α -glucosidasa ácida (GAA) mediante la administración o entrega de cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican GAA, casetes de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican GAA o vectores virales tales como vectores de AAV que comprenden los ácidos nucleico que codifican GAA o casetes de expresión que comprenden los ácidos nucleicos que codifican GAA para el ser humano.

En una modalidad, un método para tratar a un ser humano que necesita α -glucosidasa ácida (GAA) incluye: (a) proporcionar un ácido nucleico, casete de expresión o vector viral como el vector de AAV como se establece en este documento, o cualquier composición farmacéutica como se establece en este documento; y (b) administrar una cantidad del ácido nucleico, casete de expresión, vector viral (por ejemplo, AAV) o composición farmacéutica para rehacer humano, donde GAA se expresa en el humano.

En modalidades particulares, un ser humano tiene la enfermedad de Pompe, tal como la enfermedad de Pompe de aparición infantil o la enfermedad de Pompe de aparición tardía.

En otra modalidad, un ser humano tiene una enfermedad por almacenamiento de glucógeno (GSD).

En aspectos particulares, una GSD es cualquiera de: GSD tipo I (enfermedad de von Gierke), GSD tipo III (enfermedad de Forbes-Cori), GSD tipo IV (enfermedad de Anderson, amilopectinosis), GSD tipo V (enfermedad de McArdle), GSD tipo VI (Enfermedad de Hers), GSD tipo VII (enfermedad de Tarui) o una GSD congénita del corazón (por ejemplo, GSD congénita letal del corazón).

En modalidades particulares, un ácido nucleico que codifica una GAA, un casete de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una GAA o un vector AAV se administra a un ser humano por vía intravenosa, intraarterial, intra-cavidad, intracavitaria, intramucosal o mediante catéter.

En modalidades particulares, en un método, GAA se expresa a niveles incrementados, opcionalmente mayores del 1% de los niveles de GAA encontrados en un ser humano que no necesita GAA.

En modalidades particulares, se administra un vector de AAV en un intervalo de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{14} genomas del vector por kilogramo (vg/kg) de peso del ser humano.

En modalidades particulares, un método reduce, disminuye o inhibe uno o más síntomas de la necesidad de GAA o la enfermedad; o previene o reduce la progresión o el empeoramiento de uno o más síntomas de la necesidad de GAA o de la enfermedad; o estabiliza uno o más síntomas de la necesidad de GAA o la enfermedad; o mejora uno o más síntomas de la necesidad de GAA o de la enfermedad.

En aspectos particulares, un síntoma tratable de acuerdo con la invención puede ser uno o más de los siguientes: dificultad para comer y/o no ganar peso; control deficiente de la cabeza y/o el cuello; problemas respiratorios y/o infecciones pulmonares; corazón agrandado y/o engrosado; defectos cardíacos; lengua agrandada; dificultad para tragar; hígado agrandado; poca fuerza muscular; tono muscular débil; debilidad en las piernas, cintura y/o brazos; dificultad para respirar; dificultad para hacer ejercicio; dificultad para respirar mientras duerme; curvatura de la columna vertebral; y/o rigidez en las articulaciones.

La invención también proporciona adicionalmente células que comprenden ácidos nucleicos que codifican GAA, células que comprenden casetes de expresión que comprenden los ácidos nucleicos que codifican GAA y células que comprenden vectores virales tales como vectores AAV que comprenden ácidos nucleicos que codifican GAA o casetes de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican GAA.

En una modalidad, una célula produce un vector viral.

En otra modalidad, una célula produce un vector de AAV como se expone en el presente documento.

Aún más, la invención también proporciona métodos para producir vectores virales tales como vectores de AAV como se expone en este documento.

En una modalidad, un método para producir vectores de AAV incluye: introducir un genoma de vector de AAV que comprende un ácido nucleico que codifica GAA o un casete de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica GAA como se expone en este documento en una célula auxiliar de empaquetamiento; y cultivar la célula auxiliar en condiciones para producir los vectores de AAV.

En otra modalidad, un método para producir errores de vector de AAV incluye: introducir un ácido nucleico que codifica GAA o un casete de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica GAA como se expone en el presente documento en una célula auxiliar de empaquetamiento; y cultivar las células auxiliares en condiciones para producir el vector de AAV.

En modalidades adicionales, las células son células de mamífero.

En modalidades adicionales, las células para la producción de vectores proporcionan funciones auxiliares, tales como funciones auxiliares de AAV, que empaquetan el vector en una partícula viral. En un aspecto particular, las funciones auxiliares son las proteínas Rep y/o Cap para el empaquetamiento del vector de AAV.

En modalidades adicionales, las células para la producción de vectores pueden transfectarse de manera estable o transitoria con polinucleótido(s) que codifica(n) la(s) secuencia(s) de la proteína Rep y/o Cap.

En modalidades adicionales, las células para la producción de vectores proporcionan proteínas Rep78 y/o Rep68. En estas células, las células pueden transfectarse de forma estable o transitoria con la(s) secuencia(s) que codifica(n) el polinucleótido de las proteínas Rep78 y/o Rep68.

En modalidades particulares, las células para la producción de vectores son células renales embrionarias humanas. En un aspecto particular, las células para la producción de vectores son células HEK-293.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra un esquema de pAAV-ApoE/hAAT.fixUTR.GAA13.BGH (SEC ID NO: 16).

La Figura 2 muestra un esquema de pAAV-ApoE/hAAT.GAA13.BGH (SEC ID NO: 17).

La Figura 3 muestra un esquema de pAAV-ApoE/hAAT.GAA7.BGH (SEC ID NO: 18).

La Figura 4 muestra un esquema de pAAV-ApoE/hAAT.GAA8.BGH (SEC ID NO: 19).

La Figura 5 muestra un esquema de pAAV-ApoE/hAAT.GAA2.wtBGH (SEC ID NO: 20).

La Figura 6 muestra un esquema de pAAV-ApoE/hAAT.GAA5.wtBGH (SEC ID NO: 21).

La Figura 7 muestra un esquema de pAAV-ApoE/hAAT.GAA7.wtBGH (SEC ID NO: 22).

La Figura 8 muestra un esquema de pAAV-ApoE/hAAT.GAA8.wtBGH (SEC ID NO: 23).

La Figura 9 muestra un esquema de pAAV-ApoE/hAAT.GAA13.wtBGH. (SEC ID NO: 24)

La Figura 10 muestra la evaluación de los niveles de actividad de GAA en sobrenadantes de células Huh7 mediante un ensayo de actividad de GAA.

La Figura 11 muestra la evaluación de los niveles de actividad de GAA en plasma de ratón mediante un ensayo de actividad de GAA.

La Figura 12 muestra la evaluación de los niveles de GAA en plasma de ratón mediante Western blot de GAA.

La Figura 13 muestra la evaluación de los niveles de actividad de GAA en plasma de ratón mediante un ensayo de actividad de GAA.

La Figura 14 muestra la evaluación de los niveles de GAA en plasma de ratón mediante Western blot de GAA.

La Figura 15 muestra la evaluación de los niveles de actividad de GAA en plasma de ratón mediante un ensayo de actividad de GAA.

La Figura 16 muestra la evaluación de los niveles de actividad de GAA en plasma de rata y ratón mediante el ensayo de actividad de GAA.

La Figura 17 muestra la evaluación de los niveles de actividad de GAA en plasma de primates no humanos (macaco rhesus macho) mediante un ensayo de actividad de GAA.

La Figura 18 muestra la evaluación de los niveles de actividad de GAA en plasma de primates no humanos (mono verde africano) mediante un ensayo de actividad de GAA. El eje X son los días posteriores a la inyección.

La Figura 19 muestra la evaluación de los niveles de GAA en plasma de primates no humanos (mono verde africano) mediante Western blot, con presentación gráfica de ciertos datos.

La Figura 20 muestra la evaluación de la actividad GAA en sobrenadantes de células Huh7 transducidas con SPK-AAV-01, SPK-AAV-02 o un control negativo (rAAV con transgén que no GAA empaquetado en el vector AAV SEC ID NO: 30-32).

La Figura 21 muestra la evaluación de la actividad GAA en plasma de macacos rhesus después de una única administración intravenosa de SPK-AAV-02 a dosis de 2×10^{12} , 6×10^{12} , 2×10^{13} vg/kg.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención proporciona ácidos nucleicos modificados que codifican GAA, casetes de expresión que comprenden ácidos nucleicos modificados que codifican GAA, genomas de vector de AAV que comprenden ácidos nucleicos modificados que codifican GAA y vectores y partículas de AAV recombinantes que comprenden los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA. Los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA de la invención, los casetes de expresión que comprenden ácidos nucleicos modificados que codifican GAA, los genomas del vector de AAV que comprenden ácidos nucleicos modificados que codifican GAA y los vectores y partículas de AAV recombinantes son útiles para tratar la enfermedad de Pompe así como otras enfermedades por almacenamiento de glucógeno (GSDs).

Como se usa en este documento, los términos "modificar" y variaciones gramaticales de los mismos, significan que un ácido nucleico o proteína se desvía de una secuencia de referencia o parental. Se ha alterado un ácido nucleico modificado que codifica GAA en comparación con el ácido nucleico de referencia (por ejemplo, de tipo natural) o parental. Por tanto, los ácidos nucleicos modificados pueden tener sustancialmente la misma, mayor o menor actividad o función que un ácido nucleico de referencia o parental, pero por lo menos conservan la actividad, función o identidad de secuencia parcial con respecto al ácido nucleico de referencia o parental. El ácido nucleico modificado puede modificarse genéticamente para codificar una GAA modificada o variante.

Un "ácido nucleico modificado que codifica GAA" significa que el ácido nucleico GAA tiene una alteración en comparación con el ácido nucleico no modificado parental que codifica GAA. Un ejemplo particular de una modificación es una sustitución de nucleótidos. Los términos "modificación" en este documento no necesitan aparecer en cada caso de una referencia hecha a un ácido nucleico que codifica GAA.

En modalidades particulares, para un ácido nucleico modificado que codifica GAA, la proteína GAA retiene por lo menos parte de una función o actividad de la proteína GAA de tipo natural. La función o actividad de la proteína GAA incluye actividad alfa glucosidasa ácida, una hidrolasa lisosomal que degrada el glucógeno, maltosa e isomaltosa. Por consiguiente, los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA incluyen formas modificadas siempre que el GAA codificado retenga algún grado o aspecto de la actividad hidrolasa lisosómica de GAA.

Como se establece en el presente documento, los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA pueden presentar diferentes rasgos o características en comparación con un ácido nucleico de referencia o parental. Por ejemplo, los ácidos nucleicos modificados incluyen secuencias con 100% de identidad con un ácido nucleico de referencia que codifica GAA como se establece en este documento, así como secuencias con menos del 100% de identidad con un ácido nucleico de referencia que codifica GAA.

El término "identidad", "homología" y variaciones gramaticales de los mismos, significan que dos o más entidades referenciadas son iguales, cuando son secuencias "alineadas". Así, a modo de ejemplo, cuando dos ácidos nucleicos son idénticos, tienen la misma secuencia, por lo menos

dentro de la región o porción referenciada. La identidad puede estar en un área definida (región o dominio) de la secuencia.

Un "área" o "región" de identidad se refiere a una porción de dos o más entidades referenciadas que son iguales. Por tanto, cuando dos secuencias de proteínas o ácidos nucleicos son idénticas en una o más áreas o regiones de secuencia, comparten identidad dentro de esa región. Una secuencia "alineada" se refiere a múltiples secuencias de proteínas (aminoácidos) o ácidos nucleicos, que a menudo contienen correcciones para bases o aminoácidos (huecos) faltantes o adicionales en comparación con una secuencia de referencia.

La identidad puede extenderse por toda la longitud o una porción de la secuencia. En ciertas modalidades, la longitud de la secuencia que comparte el porcentaje de identidad es 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos o ácidos nucleicos contiguos, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc. ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos. En modalidades adicionales, la longitud de la identidad que comparte la secuencia es 21 o más aminoácidos o ácidos nucleicos contiguos, por ejemplo, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, etc. aminoácidos o ácidos nucleicos contiguos. En modalidades adicionales, la longitud de la secuencia que comparte la identidad es 41 o más aminoácidos o ácidos nucleicos contiguos, por ejemplo, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, etc., aminoácidos ácidos nucleicos contiguos. En otras modalidades más, la longitud de la secuencia que comparte la identidad es 50 o más aminoácidos o ácidos nucleicos contiguos, por ejemplo, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-75, 75-80, 80-85, 85-90, 90-95, 95-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-500, 500-1.000, etc. aminoácidos o ácidos nucleicos contiguos.

Como se establece en el presente documento, los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA pueden ser distintos o mostrar 100% de identidad o menos de 100% de identidad con un ácido nucleico de referencia que codifica GAA.

En modalidades particulares, los ácidos nucleicos de la invención que codifican GAA pueden ser más del 86% idénticos a cualquier ácido nucleico establecido en las SEC ID NOs: 1-5.

En modalidades particulares, los ácidos nucleicos de la invención que codifican GAA pueden ser más del 87% idénticos a cualquier ácido nucleico establecido en las SEC ID NOs: 6-14.

En modalidades particulares, los ácidos nucleicos de la invención que codifican GAA pueden ser más del 91% idénticos a cualquier ácido nucleico establecido en las SEC ID NOs: 16-24.

Dichos ácidos nucleicos modificados que codifican GAA pueden incluso exhibir una mayor identidad, por ejemplo, más del 87% idénticos; más del 88% idéntico, más del 89% idéntico, más del 90% idéntico, más del 91% idéntico, más del 92% idéntico, más del 93% idéntico, más del 94% idéntico, más del 95% idéntico, más del 96% idéntico, más del 97%, más del 98% idéntico, más del 99% idéntico o 100% idéntico a cualquiera de las SEC ID NOs: 1-24.

El grado de identidad (homología) o "porcentaje de identidad" entre dos secuencias se puede determinar usando un programa informático y/o un algoritmo matemático. Para los propósitos de esta invención, las comparaciones de secuencias de ácido nucleico se realizan usando GCG Wisconsin Package versión 9.1, disponible de Genetics Computer Group en Madison, Wisconsin. Por conveniencia, los parámetros predeterminados (penalización por creación de huecos = 12, penalización por extensión de huecos = 4) especificados por ese programa están pensados para su uso aquí para comparar la identidad de secuencia. Alternativamente, el programa Blastn 2.0 proporcionado por el National Center for Biotechnology Information (que se encuentra en la red mundial en ncbi.nlm.nih.gov/blast/; Altschul *et al.*, 1990, *J Mol Biol* 215:403-410) que utiliza una alineación con huecos con parámetros predeterminados para determinar el nivel de identidad y similitud entre las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos. Para las comparaciones de secuencias de polipéptidos, se suele utilizar un algoritmo BLASTP en combinación con una matriz de puntuación, como PAM100, PAM 250, BLOSUM 62 o BLOSUM 50. Los programas de comparación de secuencias FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) y SSEARCH también se utilizan para cuantificar la extensión de identidad (Pearson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988); Pearson, *Methods Mol Biol.* 132:185 (2000); y Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 147:195 (1981)). También se han desarrollado programas para cuantificar la similitud estructural de proteínas usando mapeo topológico basado en Delaunay (Bostick *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 304:320 (2003)).

Los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA que presentan rasgos o características diferentes en comparación con un ácido nucleico de referencia o parental incluyen sustituciones

de nucleótidos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA incluyen ácidos nucleicos con un número reducido de dinucleótidos CpG en comparación con un ácido nucleico de referencia que codifica GAA.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 127 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 126 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 125 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 124 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 123 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 122 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 121 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 120 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 119 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 118 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 117 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 116 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 115 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 114 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 113 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 112 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 111 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 110 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 109 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 108 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 107 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 106 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 105 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 104 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 103 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 102 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 101 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 100 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 99 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 98 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 97 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 96 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 95 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 94 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 93 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 92 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 91 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 90 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 89 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 88 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 87 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 86 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 85 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 84 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 83 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 82 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 81 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 80 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 79 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 78 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 77 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 76 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 75 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 74 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 73 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 72 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 71 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 70 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 69 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 68 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 67 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 66 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 65 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 64 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 63 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 62 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 61 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 60 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 59 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 58 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 57 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 56 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 55 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 54 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 53 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 52 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 51 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 50 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 49 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 48 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 47 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 46 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 45 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 44 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 43 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 42 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 41 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 40 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 39 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 38 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 37 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 36 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 35 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 34 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 33 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 32 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 31 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 30 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 29 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 28 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 27 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 26 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 25 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 24 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 23 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 22 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 21 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 20 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 19 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 18 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 17 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 16 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 15 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 14 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 13 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 12 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 11 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 10 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 9 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 8 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 7 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 6 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 5 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 4 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 3 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 2 dinucleótidos CpG.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico que codifica GAA contiene menos de 1 dinucleótidos CpG.

El término "vector" se refiere a una pequeña molécula de ácido nucleico portadora, un plásmido, virus (por ejemplo, vector de AAV) u otro vehículo que puede manipularse mediante la inserción o incorporación de un ácido nucleico. Dichos vectores pueden usarse para manipulación genética (es decir, "vectores de clonación"), para introducir / transferir polinucleótidos a células y para transcribir o traducir el polinucleótido insertado en células. Un "vector de expresión" es un vector especializado que contiene un gen o secuencia de ácido nucleico con las regiones reguladoras necesarias para la expresión en una célula huésped.

Una secuencia de ácido nucleico de vector generalmente contiene por lo menos un origen de replicación para la propagación en una célula y, opcionalmente, elementos adicionales, como una secuencia de polinucleótidos heteróloga, un elemento de control de expresión (por ejemplo,

un promotor, potenciador), un intrón, una repetición terminal invertida (ITR), marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos), señal de poliadenilación.

Un vector viral se deriva o se basa en uno o más elementos de ácido nucleico que comprenden un genoma viral. Los vectores virales particulares incluyen vectores de virus lentivirales y adenoasociados (AAV).

El término "recombinante", como modificador de vector, como el vector de AAV recombinante (rAAV), así como un modificador de secuencias como polinucleótidos y polipéptidos recombinantes, significa que las composiciones han sido manipuladas (es decir, diseñadas) de una manera que generalmente no ocurre en la naturaleza. Un ejemplo particular de un vector de AAV recombinante sería cuando una secuencia de ácido clic que normalmente no está presente en el genoma de AAV de tipo natural se inserta dentro del genoma de AAV. Aunque el término "recombinante" no siempre se usa en este documento con referencia a vectores de AAV, así como secuencias tales como polinucleótidos, las formas recombinantes que incluyen polinucleótidos, se incluyen expresamente a pesar de cualquier omisión de este tipo.

Un "vector de AAV recombinante" o "rAAV" se deriva del genoma de tipo natural de AAV mediante el uso de métodos moleculares para eliminar el genoma de tipo natural del genoma de AAV y reemplazándolo por una secuencia de ácido nucleico no nativa, denominada ácido nucleico heterólogo. Normalmente, para AAV una o ambas secuencias de repetición de terminal invertida (ITR) del genoma de AAV se retienen en el vector de AAV. El rAAV se distingue de un genoma de AAV, ya que todo o una parte del genoma de AAV se ha reemplazado por una secuencia no nativa con respecto al ácido nucleico genómico de AAV. Por lo tanto, la incorporación de una secuencia no nativa define el vector de AAV como un vector "recombinante", que puede denominarse "vector de rAAV".

Una secuencia de rAAV puede empaquetarse - denominada en el presente documento una "partícula" - para la posterior infección (transducción) de una célula, *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. Cuando una secuencia de vector de AAV recombinante está encapsidada o empaquetada en una partícula de AAV, la partícula también puede denominarse "vector de rAAV" o "partícula de rAAV". Estas partículas de rAAV incluyen proteínas que encapsidan o empaquetan el genoma del vector y, en el caso de AAV, se denominan proteínas de la cápside.

Un "genoma" de vector se refiere a la porción de la secuencia del plásmido recombinante que finalmente se empaqueta o encapsida para formar una partícula viral (por ejemplo, rAAV). En los casos en los que se utilizan plásmidos recombinantes para construir o fabricar vectores recombinantes, el genoma del vector no incluye la porción del "plásmido" que no corresponde a la secuencia del genoma del vector del plásmido recombinante. Esta porción del genoma no vector del plásmido recombinante puede denominarse "esqueleto del plásmido", que es importante para la clonación y amplificación del plásmido, un proceso que es necesario para la propagación y la producción de virus recombinantes, pero que no se empaqueta ni encapsula por sí mismo en partículas de virus (por ejemplo, AAV). Por tanto, un "genoma" de vector se refiere al ácido nucleico que está empaquetado o encapsidado por virus (por ejemplo, AAV).

Las células huésped para producir partículas de AAV recombinantes incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, células de levadura, células de insectos y células de mamíferos que pueden ser, o se han utilizado, como receptores de vectores de rAAV heterólogos. Se pueden usar células de la línea celular humana estable, HEK293 (fácilmente disponible a través de, por ejemplo, la American Type Culture Collection con el Número de Acceso ATCC CRL1573). En ciertas modalidades, se usa una línea celular de riñón embrionario humano modificado (por ejemplo, HEK293), que se transforma con fragmentos de ADN de adenovirus tipo 5, y expresa los genes adenovirales E1a y E1b para generar partículas de AAV recombinantes. La línea celular HEK293 modificada se transfecta fácilmente y proporciona una plataforma particularmente conveniente en la que se produce partículas de rAAV. En la solicitud internacional PCT/2017/024951 se describen otras líneas de células huésped apropiadas para la producción de AAV recombinantes.

En ciertas modalidades, las funciones auxiliares de AAV se introducen en la célula huésped transfectando la célula huésped con una construcción auxiliar de AAV antes o al mismo tiempo que la transfección de un vector de expresión de AAV. Una célula huésped que tiene funciones auxiliares de AAV puede denominarse "célula auxiliar" o "célula auxiliar de empaquetamiento". Por tanto, los constructos auxiliares de AAV se utilizan a veces para proporcionar por lo menos una expresión transitoria de los genes rep y/o cap de AAV para complementar las funciones de AAV faltantes necesarias para la transducción productiva de AAV. Los constructos auxiliares de AAV a menudo carecen de ITRs de AAV y no pueden

replicarse ni empaquetarse por sí mismos. Estos constructos pueden estar en forma de plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito varios constructos auxiliares de AAV, tales como los plásmidos pAAV/Ad y pIM29 + 45 de uso común que codifican productos de expresión tanto Rep como Cap. Se conocen varios otros vectores que codifican productos de expresión Rep y/o Cap.

Se conocen en la técnica métodos para generar partículas de AAV recombinantes capaces de transducir células de mamíferos. Por ejemplo, se pueden producir partículas de AAV recombinantes como se describe en la Patente Estadounidense 9,408,904; y las Solicitudes Internacionales PCT/US2017 / 025396 y PCT/US2016 / 064414.

Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a todas las formas de ácido nucleico, oligonucleótidos, incluido el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos incluyen ADN genómico, ADNc y ADN antisentido, y ARNm empalmado o sin empalmar, ARNr ARNt y ADN o ARN inhibidor (ARNi, por ejemplo, (sh)ARN de horquilla pequeña o corta, microARN (miARN), (si)ARN de interferencia pequeña o corta, ARN trans-empalme o ARN antisentido). Los ácidos nucleicos incluyen polinucleótidos de origen natural, sintéticos e intencionalmente modificados o alterados (por ejemplo, variante de ácido nucleico). Los ácidos nucleicos tales como ADNc, ADN genómico, ARN y fragmentos de los mismos que pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

Los polinucleótidos pueden ser simples, dobles o triples, lineales o circulares y pueden tener cualquier longitud. Al hablar de polinucleótidos, se puede describir aquí una secuencia o estructura de un polinucleótido particular de acuerdo con la convención de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'.

Un "transgén" se usa en el presente documento para referirse convenientemente a un ácido nucleico heterólogo que se pretende o se ha introducido en una célula u organismo. Los transgenes incluyen cualquier ácido nucleico heterólogo, tal como un ácido nucleico modificado que codifica GAA.

El término "transducir" y las variaciones gramaticales del mismo se refieren a la introducción de una molécula tal como un vector de rAAV en una célula u organismo huésped. El ácido nucleico / transgén heterólogo puede integrarse o no en el ácido nucleico genómico de la célula receptora. El ácido nucleico heterólogo introducido también puede existir en la célula receptora o en el organismo huésped de forma extracromosómica o solo de forma transitoria.

Una "célula transducida" es una célula en la que se ha introducido el transgén. En consecuencia, una célula "transducida" (por ejemplo, en un mamífero, tal como una célula o célula de tejido u órgano), significa un cambio genético en una célula después de la incorporación, por ejemplo, de un ácido nucleico (por ejemplo, un transgén) en la célula. Por lo tanto, una célula "transducida" es una célula en la que, o una progenie de la misma, en la que se ha introducido un ácido nucleico exógeno. La(s) célula(s) se pueden propagar y la proteína introducida se puede expresar. Para usos y métodos de terapia génica, una célula transducida puede estar en un sujeto.

Un "elemento de control de la expresión" se refiere a la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que influyen en la expresión de un ácido nucleico unido operativamente. Los elementos de control de la expresión como se establecen en este documento incluyen promotores y potenciadores. Las secuencias de vectores que incluyen vectores de AAV pueden incluir uno o más "elementos de control de expresión". Normalmente, dichos elementos se incluyen para facilitar la transcripción adecuada de polinucleótidos heterólogos y, según corresponda, la traslación (por ejemplo, un promotor, potenciador, señal de empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traslación en marco del ARNm y codones de parada etc.). Dichos elementos actúan típicamente en cis, denominado elemento "que actúa en cis", pero también pueden actuar en trans.

El control de expresión se puede efectuar a nivel de transcripción, traslación, empalme, estabilidad del mensaje, etc. Normalmente, un elemento de control de expresión que modula la transcripción se yuxtapone cerca del extremo 5' (es decir, "corriente arriba") de un ácido nucleico transcrito. Los elementos de control de expresión también se pueden ubicar en el extremo 3' (es decir, "corriente abajo") de la secuencia transcrita o dentro de la transcripción (por ejemplo, en un intrón). Los elementos de control de expresión se pueden ubicar adyacentes a o a una distancia de la secuencia transcrita (por ejemplo, 1-10, 10-25, 25-50, 50-100, 100 a

500, o más nucleótidos del polinucleótido), incluso en distancias considerables. Sin embargo, debido a las limitaciones de longitud de los vectores de AAV, los elementos de control de expresión estarán típicamente entre 1 y 1000 nucleótidos desde el sitio de inicio de la transcripción del ácido nucleico heterólogo.

Funcionalmente, la expresión del ácido nucleico unido operativamente es por lo menos en parte controlable por el elemento (por ejemplo, promotor) de manera que el elemento modula la transcripción del ácido nucleico y, según sea apropiado, la traslación del transcrito. Un ejemplo específico de un elemento de control de expresión es un promotor, que normalmente se encuentra en 5' de la secuencia de ácido nucleico transcrita. Un promotor aumenta típicamente una cantidad expresada a partir de un ácido nucleico unido operativamente en comparación con una cantidad expresada cuando no existe ningún promotor.

Un "potenciador", como se usa en este documento, puede referirse a una secuencia que está ubicada adyacente al ácido nucleico heterólogo. Los elementos potenciadores se localizan típicamente corriente arriba de un elemento promotor pero también funcionan y pueden localizarse corriente abajo o dentro de una secuencia. Por tanto, un elemento potenciador puede ubicarse de 10 a 50 pares de bases, de 50 a 100 pares de bases, de 100 a 200 pares de bases o de 200 a 300 pares de bases, o más pares de bases corriente arriba o corriente abajo de una secuencia de ácido nucleico heteróloga. Los elementos potenciadores aumentan típicamente la expresión de un ácido nucleico enlazado operativamente por encima de la expresión proporcionada por un elemento promotor.

Un constructo de expresión puede comprender elementos reguladores que sirven para impulsar la expresión en un tipo de tejido o célula particular. Los elementos de control de la expresión (por ejemplo, promotores) incluyen aquellos activos en un tejido o tipo de célula particular, denominados en el presente documento como "elementos / promotores de control de expresión específicos de tejido". Los elementos de control de expresión específicos de tejido son típicamente activos en células o tejidos específicos (por ejemplo, hígado). Los elementos de control de la expresión son típicamente activos en células, tejidos u órganos particulares porque son reconocidos por proteínas activadoras de la transcripción, u otros reguladores de la transcripción, que son exclusivos de un tipo específico de célula, tejido u órgano. Dichos

elementos reguladores son conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) y Ausubel *et al.* (1992)).

La incorporación de elementos reguladores específicos de tejido en los constructos de expresión proporciona por lo menos un tropismo tisular parcial para la expresión de un ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína o ARN inhibidor. Ejemplos de promotores que son activos en el hígado son el promotor del gen de transtiretina (TTR); promotor de alfa 1-antitripsina humana (hAAT); albúmina, Miyatake *et al.*, *J. Virol.*, 71:5124-32 (1997); promotor del núcleo del virus de la hepatitis B, Sandig, *et al.*, *Gene Ther.* 3:1002-9 (1996); alfa-fetoproteína (AFP), Arbuthnot, *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14 (1996), entre otros. Un ejemplo de un potenciador activo en el hígado es la apolipoproteína E(apoE) HCR-1 y HCR-2 (Allan *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272: 29113-19 (1997)).

Los elementos de control de la expresión también incluyen promotores / potenciadores ubicuos o promiscuos que son capaces de impulsar la expresión de un polinucleótido en muchos tipos de células diferentes. Estos elementos incluyen, pero no se limitan a, las secuencias promotoras / potenciadoras tempranas inmediatas del citomegalovirus (CMV), las secuencias promotoras / potenciadoras del virus del sarcoma de Rous (RSV) y los otros promotores / potenciadores virales activos en una variedad de tipos de células de mamíferos, o elementos sintéticos que no están presentes en la naturaleza (ver, por ejemplo, Boshart *et al.*, *Cell*, 41:521-530 (1985)), el promotor SV40, el promotor de dihidrofolato reductasa, el promotor de β -actina citoplasmática y el promotor de fosfoglicerol quinasa (PGK).

Los elementos de control de la expresión también pueden conferir expresión de una manera que sea regulable, es decir, una señal o estímulo aumenta o disminuye la expresión del polinucleótido heterólogo operativamente unido. Un elemento regulable que aumenta la expresión del polinucleótido unido operativamente en respuesta a una señal o estímulos también se denomina "elemento inducible" (es decir, es inducido por una señal). Los ejemplos particulares incluyen, pero no se limitan a, un promotor inducible por hormonas (por ejemplo, esteroides). Normalmente, la cantidad de aumento o disminución conferida por tales elementos es proporcional a la cantidad de señal o estímulos presentes; cuanto mayor sea la cantidad de señal o estímulos, mayor será el aumento o la disminución de la expresión. Ejemplos particulares no limitantes incluyen el promotor de metalotionina (MT) de oveja inducible por

zinc; el promotor del virus del tumor mamario de ratón inducible por hormonas esteroides (MMTV); el sistema promotor de la polimerasa T7 (WO 98/10088); el sistema reprimible por tetraciclina (Gossen, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)); el sistema inducible por tetraciclina (Gossen, *et al.*, *Science*, 268:1766-1769 (1995); ver también Harvey, *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:512-518 (1998)); el sistema inducible por RU486 (Wang, *et al.*, *Nat. Biotech.* 15:239-243 (1997) y Wang, *et al.*, *Gene Ther.* 4:432-441 (1997); y el sistema inducible por rapamicina (Magari, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 100:2865-2872 (1997); Rivera, *et al.*, *Nat. Medicine*, 2:1028-1032 (1996)). Otros elementos de control regulables que pueden ser útiles en este contexto son aquellos que están regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, temperatura, fase aguda, desarrollo.

Los elementos de control de la expresión también incluyen el (los) elemento (s) nativo (s) para el polinucleótido heterólogo. Puede usarse un elemento de control nativo (por ejemplo, promotor) cuando se desee que la expresión del polinucleótido heterólogo mimetice la expresión nativa. El elemento nativo puede usarse cuando la expresión del polinucleótido heterólogo se va a regular temporal o en el desarrollo, o de una manera específica de tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. También pueden usarse otros elementos de control de la expresión nativos, tales como intrones, sitios de poliadenilación o secuencias consenso de Kozak.

El término "unido operativamente" significa que las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de una secuencia de ácido nucleico se colocan en las posiciones apropiadas con respecto a la secuencia para efectuar la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Esta misma definición se aplica a veces a la disposición de secuencias de ácido nucleico y elementos de control de la transcripción (por ejemplo, Promotores, potenciadores y elementos de terminación) en un vector de expresión, por ejemplo, vector de rAAV.

En el ejemplo de un elemento de control de la expresión en enlace operable con un ácido nucleico, la relación es tal que el elemento de control modula la expresión del ácido nucleico. Más específicamente, por ejemplo, dos secuencias de ADN unidas operativamente significa que los dos ADN están dispuestos (cis o trans) en una relación tal que por lo menos una de las secuencias de ADN puede ejercer un efecto fisiológico sobre la otra secuencia.

En consecuencia, los elementos adicionales para los vectores incluyen, sin limitación, un elemento de control de expresión (por ejemplo, promotor / potenciador), una señal de terminación de la transcripción o un codón de parada, regiones no traducidas 5' o 3' (por ejemplo, secuencias de poliadenilación (poliA)) que flanquean una secuencia, como una o más copias de una secuencia ITR de AAV, o un intrón.

Otros elementos incluyen, por ejemplo, secuencias de polinucleótidos de llenado o relleno, por ejemplo para mejorar el empaquetamiento y reducir la presencia de ácido nucleico contaminante. Los vectores de AAV aceptan típicamente insertos de ADN que tienen un intervalo de tamaño que generalmente es de aproximadamente 4 kb a aproximadamente 5.2 kb, o un poco más. Por tanto, para secuencias más cortas, la inclusión de un llenado o relleno para ajustar la longitud a un tamaño cercano o normal de la secuencia genómica del virus aceptable para el empaquetamiento del vector AAV en la partícula del virus. En diversas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de llenado / relleno es un segmento de ácido nucleico no traducido (que no codifica proteínas). Para una secuencia de ácido nucleico de menos de 4.7 kb, la secuencia de polinucleótidos de llenado o de relleno tiene una longitud que cuando se combina (por ejemplo, se inserta en un vector) con la secuencia tiene una longitud total entre aproximadamente 3.0-5.5 kb, o entre aproximadamente 4.0-5.0 kb, o entre aproximadamente 4.3-4.8 kb.

El término "aislado", cuando se usa como modificador de una composición, significa que las composiciones están hechas por la mano del hombre o están separadas, completa o por lo menos en parte, de su entorno natural *in vivo*. Generalmente, las composiciones aisladas están sustancialmente libres de uno o más materiales con los que normalmente se asocian en la naturaleza, por ejemplo, una o más proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, membranas celulares.

El término "aislado" no excluye las combinaciones producidas por la mano del hombre, por ejemplo, una secuencia de rAAV o una partícula de rAAV que empaqueta o encapsida un genoma de vector de AAV y una formulación farmacéutica. El término "aislado" tampoco excluye formas físicas alternativas de la composición, como híbridos / quimeras, multímeros / oligómeros, modificaciones (por ejemplo, Fosforilación, glicosilación, lipidación) o formas derivadas, o formas expresadas en células huésped producidas por la mano del hombre.

El término "sustancialmente puro" se refiere a una preparación que comprende por lo menos 50-60% en peso del compuesto de interés (por ejemplo, ácido nucleico, oligonucleótido, proteína, etc.). La preparación puede comprender por lo menos 75% en peso, o por lo menos 85% en peso, o aproximadamente 90-99% en peso, del compuesto de interés. La pureza se mide mediante métodos apropiados para el compuesto de interés (por ejemplo, métodos cromatográficos, electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, análisis por HPLC y similares).

La frase "que consiste esencialmente en" cuando se refiere a una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos particular significa una secuencia que tiene las propiedades de una SEC ID NO dada. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a una secuencia de aminoácidos, la frase incluye la secuencia per se y modificaciones moleculares que no afectarían las características básicas y novedosas de la secuencia.

Pueden prepararse ácidos nucleicos, vectores de expresión (por ejemplo, genomas de vector de AAV), plásmidos, incluidos los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA de la invención utilizando métodos de tecnología de ADN recombinante. La disponibilidad de información de la secuencia de nucleótidos permite la preparación de moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención mediante una variedad de medios. Los ácidos nucleicos que codifican GAA se pueden preparar usando diversas técnicas de clonación estándar, tecnología de ADN recombinante, mediante expresión celular o traducción *in vitro* y técnicas de síntesis química. La pureza de los polinucleótidos se puede determinar mediante secuenciación, electroforesis en gel y similares. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden aislarse usando hibridación o técnicas de cribado de bases de datos basadas en computadora. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a: (1) hibridación de bibliotecas de ADN o ADNc genómico con sondas para detectar secuencias de nucleótidos homólogas; (2) cribado de anticuerpos para detectar polipéptidos que tienen características estructurales compartidas, por ejemplo, usando una biblioteca de expresión; (3) reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en ADN genómico o ADNc usando cebadores capaces de hibridar con una secuencia de ácido nucleico de interés; (4) búsquedas informáticas de bases de datos de secuencias para secuencias relacionadas; y (5) cribado diferencial de una biblioteca de ácido nucleico sustraída.

Los ácidos nucleicos se pueden mantener como ADN en cualquier vector de clonación conveniente. En una modalidad, los clones se mantienen en un vector de expresión / clonación de plásmido, tal como pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), que se propaga en una célula huésped de *E. coli* adecuada. Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden mantenerse en un vector adecuado para la expresión en células de mamífero, por ejemplo, un vector de AAV. En los casos en que la modificación pos-traslación afecta la función de la proteína, la molécula de ácido nucleico se puede expresar en células de mamífero.

Como se describe en el presente documento, los vectores rAAV pueden comprender opcionalmente elementos reguladores necesarios para la expresión del ácido nucleico heterólogo en una célula posicionada de tal manera que permita la expresión de la proteína codificada en la célula huésped. Dichos elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias potenciadoras y secuencias de iniciación de la transcripción como se establece en el presente documento y es conocido por el experto en la materia.

Los métodos y usos de la invención incluyen administrar (transducir) ácido nucleico (transgén) en células huésped, incluidas células en división y/o no división. Los ácidos nucleicos, el vector de rAAV, los métodos, los usos y las formulaciones farmacéuticas de la invención son además útiles en un método de entrega, administración o suministro de una secuencia codificada por un ácido nucleico heterólogo a un sujeto que lo necesite, como método de tratamiento. De esta manera, se transcribe el ácido nucleico y se produce una proteína *in vivo* en un sujeto. El sujeto puede beneficiarse o necesitar la proteína porque el sujeto tiene una deficiencia de la proteína, o porque la producción de la proteína en el sujeto puede impartir algún efecto terapéutico, como método de tratamiento o de otro modo.

La invención es útil en animales, incluidas aplicaciones médicas humanas y veterinarias. Por tanto, los sujetos adecuados incluyen mamíferos, tales como seres humanos, así como mamíferos no humanos. El término "sujeto" se refiere a un animal, típicamente un mamífero, como humanos, primates no humanos (simios, gibones, gorilas, chimpancés, orangutanes, macacos), un animal doméstico (perros y gatos), un animal de granja (aves de corral). como pollos y patos, caballos, vacas, cabras, ovejas, cerdos) y animales de experimentación (ratón, rata, conejo, conejillo de indias). Los sujetos humanos incluyen sujetos fetales, neonatales,

infantiles, juveniles y adultos. Los sujetos incluyen modelos de enfermedades animales, por ejemplo, ratones y otros modelos animales de deficiencias de proteínas / enzimas tales como enfermedad de Pompe y enfermedades por almacenamiento de glucógeno (GSDs) y otras conocidas por los expertos en la técnica.

Los sujetos apropiados para el tratamiento de acuerdo con la invención incluyen aquellos que tienen o están en riesgo de producir una cantidad insuficiente de GAA, o producen una GAA aberrante, parcialmente funcional o no funcional. Los sujetos pueden probarse para determinar la actividad de GAA para determinar si dichos sujetos son apropiados para el tratamiento de acuerdo con un método de la invención. Los sujetos apropiados para el tratamiento de acuerdo con la invención también incluyen aquellos sujetos que se beneficiarían de GAA. Dichos sujetos que pueden beneficiarse de GAA incluyen aquellos que tienen una enfermedad por almacenamiento de glucógeno (GSD). Los sujetos tratados pueden controlarse periódicamente después del tratamiento, por ejemplo, cada 1 a 4 semanas, 1 a 6 meses, 6 a 12 meses o 1, 2, 3, 4, 5 o más años.

Los sujetos pueden someterse a pruebas para determinar una respuesta inmune, por ejemplo, anticuerpos contra AAV. Por lo tanto, los sujetos candidatos pueden ser explorados antes del tratamiento de acuerdo con un método de la invención. Los sujetos también pueden analizarse en busca de anticuerpos contra AAV después del tratamiento y, opcionalmente, monitorearse durante un período de tiempo después del tratamiento. Los sujetos que tienen anticuerpos de AAV preexistentes o en desarrollo pueden tratarse con un agente inmunosupresor u otro régimen como se establece en el presente documento.

Los sujetos apropiados para el tratamiento de acuerdo con la invención también incluyen aquellos que tienen o están en riesgo de producir anticuerpos contra AAV. Los vectores de rAAV pueden administrarse o entregarse a tales sujetos usando varias técnicas. Por ejemplo, la cápside vacía de AAV (es decir, AAV que carece de un ácido nucleico modificado que codifica GAA) puede administrarse para unirse a los anticuerpos de AAV en el sujeto, permitiendo así que el vector de rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo transduzca las células del sujeto.

Los ácidos nucleicos modificados, los casetes de expresión y los vectores de rAAV de la invención pueden usarse para el tratamiento de una deficiencia de GAA. Por consiguiente, en diversas modalidades, los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA, los casetes de expresión que comprenden ácidos nucleicos modificados que codifican los vectores de GAA y rAAV de la invención se pueden usar como agente terapéutico y/o profiláctico.

En modalidades particulares, los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA, los casetes de expresión que comprenden ácidos nucleicos modificados que codifican los vectores de GAA y rAAV de la invención se pueden utilizar para el tratamiento de la enfermedad de Pompe así como otras enfermedades por almacenamiento de glucógeno. La administración de ácidos nucleicos modificados que codifican GAA, casetes de expresión que comprenden ácidos nucleicos modificados que codifican vectores de GAA y rAAV de la invención a un paciente con enfermedad de Pompe u otra por almacenamiento de glucógeno conduce a la expresión de la proteína GAA que sirve para suprimir, inhibir o reducir la acumulación de glucógeno, previene la acumulación de glucógeno o degrada el glucógeno, lo que a su vez puede reducir o disminuir uno o más efectos adversos o síntomas de la enfermedad de Pompe.

Los sujetos, animales o pacientes a los que se administraron los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA, los casetes de expresión que comprenden ácidos nucleicos modificados que codifican los vectores de GAA y rAAV de la invención pueden evaluarse mediante una variedad de pruebas, ensayos y evaluaciones funcionales para demostrar, medir y/o evaluar la eficacia de los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA, casetes de expresión que comprenden ácidos nucleicos modificados que codifican los vectores de GAA y rAAV de la invención como agentes terapéuticos y/o profilácticos. Tales pruebas y ensayos incluyen, pero no se limitan a, la medición de la actividad de GAA (por ejemplo, mediante el uso de ensayos de actividad de GAA estándar) y/o la cantidad de GAA (por ejemplo, mediante Western blot con anticuerpo anti-GAA) en una muestra biológica como sangre o plasma; medición del contenido de glucógeno en tejidos, tal como muestras de músculos; evaluación histológica del músculo (como el músculo del tríceps braquial, cuádriceps femoral, diafragma y corazón), médula espinal (incluido el examen y recuento de neuronas motoras positivas para ChAT en el asta ventral de los segmentos de la médula espinal torácica cervical y lumbar, y evaluación de reacción astrogliar y activación microglial); evaluación de la función respiratoria durante la respiración tranquila; prueba de suspensión de alambre de las extremidades anteriores;

medición de la fuerza de agarre; prueba de la coordinación motora con varilla giratoria (por ejemplo, mediante el protocolo de varilla giratoria); radiografía de tórax que puede mostrar cardiomegalia; electrocardiograma (ECG) para examinar la función cardíaca; electromiograma (EMG) que puede mostrar miopatía; medición de la actividad GAA en fibroblastos cutáneos; ensayos de actividad GAA en muestras de sangre seca; análisis de sangre / suero para la creatina quinasa sérica, que cuando está elevada es un marcador inespecífico de la enfermedad de Pompe; análisis de sangre / suero para aminotransferasa, alanina aminotransferasa o lactato deshidrogenasa, que pueden estar elevados como indicador de liberación del músculo en la enfermedad de Pompe; prueba de glucosa tetrasacárido en orina (un marcador sensible e inespecífico para la enfermedad de Pompe; análisis de los niveles de enzima GAA derivada del vector en estado estable y pico evaluados por la proteína GAA total y la actividad en plasma; prueba de la función pulmonar; prueba de la función muscular; biopsia muscular y tinción para detectar la presencia de glucógeno en las vacuolas celulares; biomarcadores de la salud del hígado; examen de la salud lisosomal; prueba de las respuestas inmunes contra la cápside de AAV; prueba de las respuestas inmunes contra el producto de proteína transgénica GAA; prueba de caminata de seis minutos (6MWT); prueba forzada de capacidad vital; niveles de enzimas GAA derivadas del vector AAV pico y en estado estable (evaluados por la proteína GAA total y la actividad medida en plasma; prueba de marcha, escaleras, gowers y silla (GSGC); prueba de fuerza muscular usando la escala de calificación del Medical Research Council (MRC) construida por Rasch; actividad vital / participación social informada por el paciente; medidas cuantitativas de sueño y respiración durante el sueño a partir de polisomnografía (PSG); medidas informadas por el paciente de fatiga, somnolencia diurna y calidad del sueño; puntuación de Walton y Gardner - Medwin (WGM); pruebas de función respiratoria, que incluyen, entre otras, la presión inspiratoria nasal de olfateo (SNIP) y las presiones inspiratoria y espiratoria máxima (MIP y MEP, respectivamente); biomarcadores hepáticos; prueba de β hexosaminidasa (β Hexo); mediciones de resultados de salud, que incluyen, entre otros, una encuesta de salud breve del formulario 36 (SF-36); escala de actividad específica de Pompe construida por Rasch (R-PAct); puntuación de gravedad de la fatiga (FSS); y bancos de elementos del sistema de información de medición de resultados reportados por el paciente (PROMIS).

Adicionalmente, los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA, los casetes de expresión que comprenden ácidos nucleicos modificados que codifican los vectores GAA y rAAV de la

inversión se pueden usar para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento de glucógeno (GSD). Las enfermedades por almacenamiento de glucógeno incluyen, por ejemplo, GSD tipo I (enfermedad de von Gierke), GSD tipo II (enfermedad de Pompe), GSD tipo III (enfermedad de Forbes-Cori), GSD tipo IV (enfermedad de Anderson, amilopectinosis), GSD tipo V (enfermedad de McArdle), GSD tipo VI (enfermedad de Hers), GSD tipo VII (enfermedad de Tarui) o una enfermedad congénita letal por almacenamiento de glucógeno del corazón.

Como se establece en el presente documento, los rAAV son útiles como vectores de terapia génica, ya que pueden penetrar en las células e introducir ácido nucleico / material genético en las células. Debido a que los AAV no están asociados con enfermedades patógenas en humanos, los vectores de rAAV son capaces de administrar secuencias polinucleótídicas heterólogas (por ejemplo, proteínas y agentes terapéuticos) a pacientes humanos sin causar una patogénesis o enfermedad sustancial de AAV.

Los vectores rAAV poseen una serie de características deseables para tales aplicaciones, incluido el tropismo para células en división y que no se dividen. La experiencia clínica temprana con estos vectores tampoco demostró toxicidad sostenida y las respuestas inmunes son típicamente mínimas o indetectables. Se sabe que los AAV infectan una amplia variedad de tipos de células *in vivo* por endocitosis mediada por receptores o por transcitosis. Estos sistemas de vectores se han probado en humanos dirigidos a muchos tejidos, como el epitelio retiniano, el hígado, el músculo esquelético, las vías respiratorias, el cerebro, las articulaciones y las células madre hematopoyéticas.

Puede ser deseable introducir un vector de rAAV que pueda proporcionar, por ejemplo, múltiples copias de GAA y, por tanto, mayores cantidades de proteína GAA. Se han descrito en detalle vectores de rAAV mejorados y métodos para producir estos vectores en una serie de referencias, patentes y solicitudes de patente, que incluyen: Wright J.F. (Hum. Gene Ther., 20: 698-706, 2009).

El suministro directo de vectores de rAAV o la transducción *ex vivo* de células humanas seguida de la infusión en el cuerpo dará como resultado la expresión del ácido nucleico heterólogo ejerciendo de ese modo un efecto terapéutico beneficioso sobre la hemostasia. En

el contexto de los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA, la administración suprime, inhibe o reduce la cantidad o acumulación de glucógeno, evita la acumulación de glucógeno o degrada el glucógeno. Esto, a su vez, puede suprimir, inhibir, reducir o disminuir uno o más efectos adversos de la enfermedad de Pompe, como promover o mejorar el tono muscular y/o la fuerza muscular y/o reducir o disminuir el agrandamiento del hígado.

El vector AAV recombinante, así como los métodos y usos del mismo, incluyen cualquier cepa o serotipo viral. Como ejemplo no limitativo, un vector de AAV recombinante puede basarse en cualquier genoma de AAV, como AAV (SEC ID NOs: 30-32), LK03 (SEC ID NO: 33), AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74, AAV3B o AAV-2i8, por ejemplo. Dichos vectores pueden basarse en la misma cepa o serotipo (o subgrupo o variante), o ser diferentes entre sí. Como ejemplo no limitante, un vector AAV recombinante basado en un genoma de serotipo particular puede ser idéntico al serotipo de las proteínas de la cápside que empaquetan el vector. Además, un genoma de vector de AAV recombinante puede basarse en un genoma de serotipo de AAV distinto del serotipo de las proteínas de la cápside de AAV que empaquetan el vector. Por ejemplo, el genoma del vector AAV puede basarse en AAV2, mientras que por lo menos una de las tres proteínas de la cápside podría ser un AAV (SEC ID NOs: 30-32), LK03 (SEC ID NO: 33), AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74, AAV3B o AAV-2i8 o una variante de los mismos, por ejemplo.

En modalidades particulares, los vectores de virus adenoasociados (AAV) incluyen AAV (SEC ID NOs: 30-32), LK03 (SEC ID NO: 33), AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74, AAV3B y AAV-2i8, así como variantes (por ejemplo, variantes de cápside, tales como inserciones, adiciones, sustituciones y supresiones de aminoácidos) de los mismos, por ejemplo, como se establece en WO 2013/158879 (Solicitud internacional PCT/US2013/037170), WO 2015/013313 (Solicitud internacional PCT/US2014/047670) y US 2013/0059732 (Patente Estadounidense No. 9,169,299, describe LK01, LK02, LK03, etc.).

Como se usa en este documento, el término "serotipo" es una distinción que se usa para referirse a un AAV que tiene una cápside que es serológicamente distinta de otros serotipos de AAV. El carácter distintivo serológico se determina sobre la base de la falta de reactividad cruzada

entre los anticuerpos de un AAV en comparación con otro AAV. Estas diferencias de reactividad cruzada suelen deberse a diferencias en las secuencias de la proteína de la cápside / determinantes antigénicos (por ejemplo, debido a diferencias en las secuencias de VP1, VP2 y/o VP3 de los serotipos de AAV). A pesar de la posibilidad de que las variantes de AAV, incluidas las variantes de cápside, no sean serológicamente distintas de un AAV de referencia u otro serotipo de AAV, difieren en por lo menos un residuo de nucleótido o aminoácido en comparación con la referencia u otro serotipo de AAV.

Según la definición tradicional, un serotipo significa que el virus de interés se ha probado contra suero específico para todos los serotipos existentes y caracterizados para determinar la actividad neutralizante y no se han encontrado anticuerpos que neutralicen el virus de interés. A medida que se descubren más aislados de virus de origen natural y/o se generan mutantes de la cápside, puede haber o no diferencias serológicas con cualquiera de los serotipos existentes actualmente. Por tanto, en los casos en los que el nuevo virus (por ejemplo, AAV) no tenga diferencias serológicas, este nuevo virus (por ejemplo, AAV) sería un subgrupo o variante del serotipo correspondiente. En muchos casos, las pruebas serológicas para la actividad neutralizante aún no se han realizado en virus mutantes con modificaciones en la secuencia de la cápside para determinar si son de otro serotipo de acuerdo con la definición tradicional de serotipo. En consecuencia, por conveniencia y para evitar la repetición, el término "serotipo" se refiere ampliamente tanto a virus serológicamente distintos (por ejemplo, AAV) como a virus (por ejemplo, AAV) que no son serológicamente distintos que pueden estar dentro de un subgrupo o una variante de un serotipo dado.

Como se establece en el presente documento, las proteínas de la cápside de AAV pueden exhibir menos del 100% de identidad de secuencia con un serotipo de AAV de referencia o parental como AAV (SEC ID NOs: 30-32), LK03 (SEC ID NO: 33), AAV1, AAV2, AAV3 , AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74, AAV3B o AAV-2i8, pero son distintos y no idénticos a los genes o proteínas de AAV conocidos, como AAV1, AAV2, AAV3 , AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74, AAV3B o AAV-2i8. En una modalidad, una proteína de la cápside de AAV modificada / variante incluye o consta de una secuencia de por lo menos 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc., hasta un 99.9% idéntico a una proteína de la cápside

de AAV de referencia o parental, como como AAV (SEC ID NOs: 30-32), LK03 (SEC ID NO: 33), AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74, AAV3B o AAV-2i8.

Los vectores de rAAV pueden administrarse a un paciente mediante infusión en un vehículo biológicamente compatible, por ejemplo, mediante inyección intravenosa. Los vectores de rAAV se pueden administrar solos o en combinación con otras moléculas. Por consiguiente, los vectores de rAAV y otras composiciones, agentes, fármacos, biológicos (proteínas) pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas. Tales composiciones farmacéuticas son útiles, entre otras cosas, para la administración y el suministro a un sujeto *in vivo* o *ex vivo*.

En modalidades particulares, las composiciones farmacéuticas también contienen un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo una respuesta inmune perjudicial para el individuo que recibe la composición y que pueda administrarse sin una toxicidad indebida.

Como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" y "fisiológicamente aceptable" significa una formulación biológicamente aceptable, gaseosa, líquida o sólida, o una mezcla de las mismas, que es adecuada para una o más vías de administración, suministro *in vivo* o contacto. Una composición "farmacéuticamente aceptable" o "fisiológicamente aceptable" es un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, por ejemplo, el material puede administrarse a un sujeto sin causar efectos biológicos indeseables sustanciales. Por tanto, dicha composición farmacéutica se puede utilizar, por ejemplo, para administrar un ácido nucleico, vector, partícula viral o proteína a un sujeto.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como agua, solución salina, glicerol, azúcares y etanol. También se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Los excipientes también incluyen proteínas como la albúmina. Además, en tales vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares.

La composición farmacéutica se puede proporcionar como una sal y se puede formar con muchos ácidos, incluidos, entre otros, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros disolventes protónicos que las correspondientes formas de base libre. En otros casos, una preparación puede ser un polvo liofilizado que puede contener cualquiera o todos los siguientes: histidina 1-50 mM, sacarosa 0.1% -2% y manitol 2-7%, en un rango de pH de 4.5 a 5.5, que se combina con tampón antes de su uso.

Las composiciones farmacéuticas incluyen disolventes (acuosos o no acuosos), soluciones (acuosas o no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua o agua en aceite), suspensiones, jarabes, elixires, medios de dispersión y suspensión, recubrimientos, isotónicos y agentes retardadores o promotores de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica o el contacto o la entrega *in vivo*. Los disolventes, soluciones y suspensiones acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen comprimidos (recubiertos o no recubiertos), cápsulas (duras o blandas), micropelotas, polvo, gránulos y cristales. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos suplementarios (por ejemplo, conservantes, agentes antibacterianos, antivirales y antifúngicos).

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para que sean compatibles con una ruta particular de administración o suministro, como se establece en el presente documento o es conocido por un experto en la técnica. Por tanto, las composiciones farmacéuticas incluyen vehículos, diluyentes o excipientes adecuados para la administración por diversas vías.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas y no acuosas del compuesto activo, preparaciones que son típicamente estériles y pueden ser isotónicas con la sangre del receptor pretendido. Los ejemplos ilustrativos no limitantes incluyen agua, solución salina tamponada, solución de Hanks, solución de Ringer, dextrosa, fructosa, etanol, aceites animales, vegetales o sintéticos. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano.

Además, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones de inyección de aceite apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Pueden añadirse codisolventes y adyuvantes a la formulación. Los ejemplos no limitantes de codisolventes contienen grupos hidroxilo u otros grupos polares, por ejemplo, alcoholes, tales como alcohol isopropílico; glicoles, tales como propilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, éter de glicol; glicerol; alcoholes de polioxietileno y ésteres de ácidos grasos de polioxietileno. Los adyuvantes incluyen, por ejemplo, tensioactivos tales como lecitina de soja y ácido oleico; ésteres de sorbitán tales como trioleato de sorbitán; y polivinilpirrolidona.

Una vez preparadas las composiciones farmacéuticas, pueden colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para su tratamiento. Dicho etiquetado podría incluir cantidad, frecuencia y método de administración.

Las composiciones farmacéuticas y los sistemas de administración apropiados para las composiciones, métodos y usos de la invención son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12a ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel y Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001) 11a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; y Poznansky *et al.*, Drug Delivery Systems (1980), R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y., pp. 253-315).

Una "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" se refiere a una cantidad que proporciona, en dosis únicas o múltiples, solo o en combinación, con una o más de otras composiciones (agentes terapéuticos o inmunosupresores como un fármaco), tratamientos, protocolos o agentes de regímenes terapéuticos, una respuesta detectable de cualquier duración de tiempo (a largo o corto plazo), un resultado esperado o deseado en o un beneficio para un sujeto de cualquier

grado medible o detectable o por cualquier duración de tiempo (por ejemplo, durante minutos, horas, días, meses, años o curado).

Las dosis pueden variar y depender del tipo, inicio, progresión, gravedad, frecuencia, duración o probabilidad de la enfermedad a la que se dirige el tratamiento, el criterio de valoración clínico deseado, tratamientos previos o simultáneos, salud general, edad, sexo, raza o competencia inmunológica del sujeto y otros factores que apreciará el experto en la materia. La cantidad, el número, la frecuencia o la duración de la dosis pueden aumentarse o reducirse proporcionalmente, según indiquen los efectos secundarios adversos, las complicaciones u otros factores de riesgo del tratamiento o terapia y el estado del sujeto. El experto en la materia apreciará los factores que pueden influir en la dosis y el momento necesarios para proporcionar una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico o profiláctico.

La dosis para lograr un efecto terapéutico, por ejemplo, La dosis en genomas de vector / por kilogramo de peso corporal (vg/kg), variará en función de varios factores que incluyen, entre otros: vía de administración, nivel de expresión de polinucleótidos heterólogos necesaria para lograr un efecto terapéutico, la enfermedad específica tratada, cualquier respuesta inmune del huésped al vector viral, una respuesta inmune del huésped al polinucleótido heterólogo o producto de expresión (proteína), y la estabilidad de la proteína expresada. Un experto en la técnica puede determinar un intervalo de dosis de genoma de vector / rAAV para tratar a un paciente que tiene una enfermedad o trastorno particular basándose en los factores antes mencionados, así como en otros factores.

Generalmente, las dosis oscilarán entre por lo menos 1×10^8 genomas del vector por kilogramo (vg/kg) del peso del sujeto, o más, por ejemplo, 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} o 1×10^{14} , o más, genomas de vector por kilogramo (vg/kg) de peso del sujeto, para lograr un efecto terapéutico. Una dosis de rAAV en el rango de 1×10^{10} - 1×10^{11} vg/kg en ratones y 1×10^{12} - 1×10^{13} vg/kg en perros ha sido eficaz. Las dosis pueden ser menores, por ejemplo, una dosis de menos de 6×10^{12} vg/kg. Más particularmente, una dosis de 5×10^{11} vg/kg o 1×10^{12} vg/kg.

Las dosis del vector de rAAV pueden estar en un nivel, típicamente en el extremo inferior del espectro de dosis, de modo que no haya una respuesta inmune sustancial contra la secuencia de ácido nucleico heteróloga, la proteína codificada o el ácido nucleico inhibidor, o el vector

de rAAV. Más particularmente, una dosis de hasta pero menos de 6×10^{12} vg/kg, tal como aproximadamente 5×10^{11} a aproximadamente 5×10^{12} vg/kg, o más particularmente, aproximadamente 5×10^{11} vg / kg o aproximadamente 1×10^{12} vg/kg.

Una "forma de dosificación unitaria" como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada opcionalmente en asociación con un portador farmacéutico (excipiente, diluyente, vehículo o agente de relleno) que, cuando se administra en una o más dosis, se calcula para producir un efecto deseado (por ejemplo, efecto profiláctico o terapéutico). Las formas de dosificación unitaria pueden estar dentro, por ejemplo, de ampollas y viales, que pueden incluir una composición líquida o una composición en un estado secado en frío o liofilizado; se puede añadir un vehículo líquido estéril, por ejemplo, antes de la administración o el suministro *in vivo*. Se pueden incluir formas de dosificación unitarias individuales en kits o recipientes multidosis. Las partículas de rAAV y sus composiciones farmacéuticas pueden envasarse en forma de dosificación unitaria única o múltiple para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación.

Las dosis de una "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" para el tratamiento (por ejemplo, Para mejorar o proporcionar un beneficio o mejora terapéutica) suelen ser eficaces para proporcionar una respuesta a uno, múltiples o todos los síntomas, consecuencias o complicaciones adversos de la enfermedad, uno o más síntomas, trastornos, enfermedades, patologías o complicaciones adversos, por ejemplo, causadas por o asociadas con la enfermedad, en un grado mensurable, aunque disminuyendo, reduciendo, inhibiendo, suprimiendo, limitando o controlando la progresión o empeoramiento de la la enfermedad es un resultado satisfactorio.

Una cantidad eficaz o una cantidad suficiente puede, pero no necesita, ser proporcionada en una sola administración, puede requerir múltiples administraciones y, puede pero no necesita ser, administrada sola o en combinación con otra composición (por ejemplo, agente), tratamiento, protocolo o régimen terapéutico. Por ejemplo, la cantidad puede aumentarse proporcionalmente según se indique por la necesidad del sujeto, el tipo, el estado y la gravedad de la enfermedad tratada o los efectos secundarios (si los hay) del tratamiento. Además, una cantidad eficaz o una cantidad suficiente no necesita ser eficaz o suficiente si se administra en

dosis únicas o múltiples sin una segunda composición (por ejemplo, otro fármaco o agente), tratamiento, protocolo o régimen terapéutico, ya que se pueden incluir dosis, cantidades o duración adicionales por encima y más allá de dichas dosis, o composiciones adicionales (por ejemplo, fármacos o agentes), tratamientos, protocolos o regímenes terapéuticos para que se consideren eficaces o suficientes en un sujeto dado. Las cantidades consideradas eficaces también incluyen cantidades que dan como resultado una reducción del uso de otro tratamiento, régimen terapéutico o protocolo, como la administración de ácido nucleico modificado que codifica GAA para el tratamiento de una deficiencia de GAA (por ejemplo, enfermedad de Pompe) u otra enfermedad por almacenamiento de glucógeno.

Por consiguiente, los métodos y usos de la invención también incluyen, entre otras cosas, métodos y usos que dan como resultado una necesidad o uso reducido de otro compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, proceso o remedio. Por ejemplo, para la deficiencia de GAA, un método o uso de la invención tiene un beneficio terapéutico si en un sujeto dado se administra una dosis o eliminación menos frecuente o reducida de una GAA recombinante para complementar la GAA deficiente o defectuosa en el sujeto. Por tanto, de acuerdo con la invención, se proporcionan métodos y usos para reducir la necesidad o el uso de otro tratamiento o terapia.

No es necesario que una cantidad eficaz o una cantidad suficiente sea eficaz en todos y cada uno de los sujetos tratados, ni en la mayoría de los sujetos tratados en un grupo o población determinados. Una cantidad eficaz o una cantidad suficiente significa eficacia o suficiencia en un tema en particular, no un grupo o la población en general. Como es típico para tales métodos, algunos sujetos mostrarán una respuesta mayor, o una respuesta menor o nula a un método o uso de tratamiento dado.

La administración o el suministro *in vivo* a un sujeto se puede realizar antes del desarrollo de un síntoma, afección, complicación, etc., adversos, causados por o asociados con la enfermedad. Por ejemplo, se puede usar un cribado (por ejemplo, genético) para identificar a tales sujetos como candidatos para composiciones, métodos y usos de la invención. Por lo tanto, tales sujetos incluyen aquellos que se han cribado como positivos por una cantidad insuficiente o una deficiencia en un producto génico funcional (por ejemplo, GAA o una deficiencia

proteica que conduce a una GSD), o que producen un producto génico aberrante, parcialmente funcional o no funcional (por ejemplo, GAA o una proteína implicada en una GSD).

La administración o suministro *in vivo* a un sujeto de acuerdo con los métodos y usos de la invención como se describe en este documento se puede practicar dentro de 1 - 2, 2 - 4, 4 - 12, 12 - 24 o 24 - 72 horas después de que un sujeto que ha sido identificado que tiene la enfermedad objetivo para el tratamiento, tiene uno o más síntomas de la enfermedad, o ha sido examinado y se identifica como positivo como se establece en este documento, aunque el sujeto no tiene uno o más síntomas de la enfermedad. Naturalmente, los métodos y usos de la invención se pueden practicar 1 - 7, 7 - 14, 14 - 24, 24 - 48, 48 - 64 o más días, meses o años después de que se ha identificado que un sujeto que tiene la enfermedad a la que se dirige el tratamiento, tiene uno o más síntomas de la enfermedad, o se ha examinado y se identifica como positivo como se establece en este documento.

El término "mejorar" significa una mejora detectable o mensurable en la enfermedad de un sujeto o síntoma de la misma, o una respuesta celular subyacente. Una mejora detectable o mensurable incluye una disminución, reducción, inhibición, supresión, límite o control subjetivo u objetivo en la aparición, frecuencia, gravedad, progresión o duración de la enfermedad, o complicación causada por o asociada con la enfermedad, o una mejora en un síntoma o una causa subyacente o una consecuencia de la enfermedad, o una reversión de la enfermedad.

Para la enfermedad de Pompe, una cantidad eficaz sería una cantidad que inhibe o reduce la producción o acumulación de glucógeno, mejora o aumenta la degradación o eliminación de glucógeno, por ejemplo. Una cantidad eficaz también sería una cantidad que alivia o mejora la dificultad para comer y/o no ganar peso; control deficiente de la cabeza y/o el cuello; problemas respiratorios y/o infecciones pulmonares; corazón agrandado y/o engrosado; defectos cardíacos; lengua agrandada; dificultad para tragar; hígado agrandado; poca fuerza muscular; tono muscular débil; debilidad en las piernas, cintura y/o brazos; dificultad para respirar; dificultad para hacer ejercicio; dificultad para respirar mientras duerme; curvatura de la columna vertebral; y/o articulaciones rígidas; tono muscular débil y/o falta de fuerza muscular. Una cantidad eficaz también sería una cantidad que disminuye o inhibe uno o más síntomas, o previene o reduce la progresión o empeoramiento de uno o más síntomas, o estabiliza uno o

más síntomas, o mejora uno o más síntomas en un paciente o sujeto que necesita GAA o tiene la enfermedad de Pompe.

Las dosis terapéuticas dependerán de, entre otros factores, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la enfermedad o trastorno. Una cantidad terapéuticamente eficaz en seres humanos estará en un intervalo relativamente amplio que puede determinar un médico basándose en la respuesta de un paciente individual.

Pueden administrarse a un sujeto composiciones tales como composiciones farmacéuticas para permitir la producción de la proteína codificada. En una modalidad particular, las composiciones farmacéuticas comprenden suficiente material genético para permitir que un receptor produzca una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína en el sujeto.

Las composiciones se pueden formular y/o administrar en cualquier vehículo farmacéutico biocompatible estéril, incluyendo, pero sin limitarse a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Las composiciones pueden formularse y/o administrarse a un paciente solas o en combinación con otros agentes (por ejemplo, cofactores) que influyen en la hemostasia.

Los métodos y usos de la invención incluyen el suministro y la administración sistémica, regional o local, o por cualquier vía, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La administración de las composiciones farmacéuticas *in vivo* generalmente se puede lograr mediante inyección usando una jeringa convencional, aunque se prevén otros métodos de administración tales como administración mejorada por convección (ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5,720,720). Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse por vía subcutánea, epidérmica, intradérmica, intratecal, intraorbital, intramucosal, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, intrapleural, intraarterial, intracavitaria, oral, intrahepática, a través de la vena porta o intramuscularmente. Otros modos de administración incluyen administración oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas. Un médico especializado en el tratamiento de pacientes con Pompe u otras enfermedades por almacenamiento de glucógeno puede determinar la ruta óptima para la administración de los vectores asociados a adenovirus en función de una serie de criterios, que incluyen, entre otros:

la condición del paciente y el propósito del tratamiento (por ejemplo, niveles de GAA mejorados o reducidos).

Las composiciones se pueden administrar solas. En ciertas modalidades, una partícula de rAAV proporciona un efecto terapéutico sin un agente inmunosupresor. El efecto terapéutico opcionalmente se mantiene durante un período de tiempo, por ejemplo, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10, 10-14, 14-20, 20-25, 25-30 o 30-50. días o más, por ejemplo, 50-75, 75-100, 100-150, 150-200 días o más sin administrar un agente inmunosupresor. En consecuencia, se proporciona un efecto terapéutico durante un período de tiempo.

Los vectores, métodos y usos de rAAV de la invención pueden combinarse con cualquier compuesto, agente, fármaco, tratamiento u otro régimen o protocolo terapéutico que tenga una actividad o efecto terapéutico, beneficioso, aditivo, sinérgico o complementario deseado. Las composiciones y tratamientos de combinación ejemplares incluyen segundos principios activos, tales como productos biológicos (proteínas), agentes (por ejemplo, agentes inmunosupresores) y fármacos. Dichos productos biológicos (proteínas), agentes, fármacos, tratamientos y terapias se pueden administrar o realizar antes, sustancialmente al mismo tiempo o después de cualquier otro método o uso de la invención.

El compuesto, agente, fármaco, tratamiento u otro régimen o protocolo terapéutico puede administrarse como una composición de combinación, o administrarse por separado, tal como simultáneamente o en serie o secuencialmente (antes o después) de la entrega o administración de un ácido nucleico, vector, o partícula de rAAV. Por lo tanto, la invención proporciona combinaciones en las que un método o uso de la invención está en combinación con cualquier compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, proceso, remedio o composición, establecido en este documento o conocido por un experto en la técnica. El compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, proceso, remedio o composición puede administrarse o realizarse antes, sustancialmente al mismo tiempo o después de la administración de un ácido nucleico, vector o partícula de rAAV de la invención, a un sujeto.

En ciertas modalidades, el ácido nucleico, vector o partícula de rAAV de la invención se administra a un paciente en combinación con un agente o régimen inmunosupresor donde el

paciente tiene o está en riesgo de desarrollar una respuesta inmune contra la partícula de rAAV y/o proteína GAA. Dicho agente o régimen inmunosupresor se puede administrar antes, sustancialmente al mismo tiempo o después de administrar un ácido nucleico, vector o vector de rAAV de la invención.

En algunas modalidades, un sujeto o paciente, como un paciente humano, con enfermedad de Pompe ha desarrollado inhibidores de la proteína GAA (incluidos anticuerpos anti-GAA y/o células T anti-GAA), que pueden ocurrir después del tratamiento con terapia tradicional de reemplazo de enzima (por ejemplo, después de la administración de proteína GAA producida de manera recombinante). El desarrollo de tales inhibidores de GAA puede ocurrir en pacientes que reciben terapia de reemplazo de enzima, particularmente cuando el paciente tiene niveles indetectables de GAA (como puede ser el caso de la enfermedad de Pompe infantil), lo que lleva al sistema inmunológico del paciente a considerar la proteína GAA de reemplazo como “extraña”. En ciertas modalidades, a un paciente de Pompe que tiene inhibidores de GAA se le administra uno o más regímenes destinados a lograr tolerancia inmune o mitigar la respuesta inmune a la proteína GAA en el paciente, antes, sustancialmente al mismo tiempo o después de administrar un vector de rAAV de la invención. Dichos regímenes para lograr la tolerancia inmune o mitigar la respuesta inmune a la proteína GAA pueden incluir la administración de uno o más agentes inmunosupresores, incluidos, entre otros, metotrexato, rituximab, gammaglobulina intravenosa (IVIG), omalizumab y partículas de vacuna sintética (SVPTM)-rapamicina (rapamicina encapsulada en una nanopartícula biodegradable) y/o administración de uno o más protocolos o procedimientos inmunosupresores, tales como agotamiento de células B, inmunoadsorción y plasmaféresis.

En ciertas modalidades, el vector de rAAV se administra junto con uno o más agentes inmunosupresores antes, sustancialmente al mismo tiempo o después de administrar un vector de rAAV. En ciertas modalidades, por ejemplo, 1-12, 12-24 o 24-48 horas, o 2-4, 4-6, 6-8, 8-10, 10-14, 14-20, 20-25, 25-30, 30-50 o más de 50 días después de la administración del vector de rAAV. Dicha administración de agentes inmunosupresores después de un período de tiempo después de la administración del vector de rAAV si hay una disminución en la proteína codificada o ácido nucleico inhibidor después de los niveles de expresión iniciales durante un período de tiempo, por ejemplo, 20-25, 25-30, 30-50, 50-75, 75-100, 100-150, 150-200 o más de 200 días después del vector de rAAV.

En ciertas modalidades, un agente inmunosupresor es un agente antiinflamatorio. En ciertas modalidades, un agente inmunosupresor es un esteroide, por ejemplo, un corticosteroide. En ciertas modalidades, un agente inmunosupresor es prednisona, prednisolona, ciclosporina (por ejemplo, ciclosporina A), micofenolato, un anticuerpo dirigido a células B, por ejemplo, rituximab; un inhibidor del proteasoma, por ejemplo, bortezomib; un inhibidor de la diana de la rapamicina (mTOR) de mamífero, por ejemplo, rapamicina; un inhibidor de tirosina quinasa, por ejemplo, ibrutinib; un inhibidor del factor de activación de células B (BAFF); o un inhibidor de un ligando inductor de proliferación (APRIL) o un derivado del mismo. En ciertas modalidades, el agente inmunosupresor es un agente anti-IL-1 β (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β canakinumab (Ilaris®)) o un agente anti-IL-6 (por ejemplo, anticuerpo anti-IL-6 sirukumab o anticuerpo anti-receptor de IL-6 tocilizumab (Actemra®)), o una combinación de los mismos.

Los protocolos de inmunosupresión, que incluyen el uso de rapamicina, sola o en combinación con IL-10, se pueden utilizar para disminuir, reducir, inhibir, prevenir o bloquear las respuestas inmunitarias humorales y celulares a la proteína GAA. La transferencia de genes hepáticos con los vectores de AAV de la invención puede usarse para inducir tolerancia inmunitaria a la proteína GAA mediante la inducción de células T reguladoras (Tregs) y otros mecanismos. Las estrategias para reducir (superar) o evitar la inmunidad humoral al AAV en la transferencia genética sistémica incluyen la administración de dosis altas de vector, el uso de cápsidas vacías de AAV como señuelos para adsorber anticuerpos anti-AAV, la administración de fármacos inmunosupresores para disminuir, reducir, inhibir, prevenir o erradicar la respuesta inmune humoral a AAV, cambiar el serotipo de la cápside de AAV o modificar la cápside de AAV para que sea menos susceptible a los anticuerpos neutralizantes, uso de ciclos de intercambio de plasma para adsorber inmunoglobulinas anti-AAV, reduciendo así el título de anticuerpos anti-AAV, y uso de técnicas de administración como catéteres con balón seguidos de enjuague con solución salina. Tales estrategias se describen en Mingozi *et al.*, 2013, *Blood*, 122:23-36. Los procedimientos y enfoques para inducir tolerancia a GAA en pacientes de Pompe con el fin de mejorar el tratamiento terapéutico se revisan en Doerfler *et al.*, 2016, *Mol. Ther.*, 3:15053.

La proporción de cápsidas vacías de AAV al vector de rAAV puede estar dentro o entre aproximadamente 100:1-50:1, desde aproximadamente 50:1-25:1, desde aproximadamente 25:1-10:1, desde aproximadamente 10:1-1:1, de aproximadamente 1:1-1:10, de aproximadamente 1:10-1:25, de aproximadamente 1:25-1:50, o de aproximadamente 1:50-1:100. Las proporciones también pueden ser de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o 10:1.

Las cantidades de cápsidas vacías de AAV para administrar pueden calibrarse basándose en la cantidad (título) de anticuerpos de AAV producidos en un sujeto particular. Las cápsidas vacías de AAV pueden ser de cualquier serotipo, por ejemplo, AAV (SEC ID NO: 30-32), LK03 (SEC ID NO: 33), AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74, AAV3B o AAV-2i8.

Alternativamente, o además de, el vector de rAAV puede administrarse mediante inyección intramuscular directa (por ejemplo, una o más fibras de contracción lenta de un músculo). En otra alternativa, se puede usar un catéter introducido en la arteria femoral para administrar vectores de rAAV al hígado a través de la arteria hepática. También se pueden emplear medios no quirúrgicos, tales como colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE), para administrar vectores de rAAV directamente al hígado, evitando así el torrente sanguíneo y los anticuerpos AAV. Otros sistemas ductales, tales como los conductos de la glándula submandibular, también pueden usarse como portales para administrar vectores de rAAV a un sujeto que desarrolla o tiene anticuerpos anti-AAV preexistentes.

Las estrategias adicionales para reducir la inmunidad humoral al AAV incluyen métodos para eliminar, agotar, capturar y/o inactivar los anticuerpos del AAV, comúnmente denominados aféresis y, más particularmente, plasmaféresis donde están involucrados productos sanguíneos. La aféresis o plasmaféresis, es un proceso en el que el plasma de un sujeto humano se hace circular *ex vivo* (extracorporal) a través de un dispositivo que modifica el plasma mediante la adición, eliminación y/o sustitución de componentes antes de devolverlo al paciente. La plasmaféresis se puede usar para eliminar inmunoglobulinas humanas (por ejemplo, IgG, IgE, IgA, IgD) de un producto sanguíneo (por ejemplo, plasma). Este procedimiento agota, captura, inactiva, reduce o elimina las inmunoglobulinas (anticuerpos) que se unen a AAV, reduciendo así el título de anticuerpos de AAV en el sujeto tratado que pueden contribuir a la neutralización

del vector de AAV. Un ejemplo es un dispositivo compuesto por una columna de matriz de afinidad de cápside de AAV. El paso de productos sanguíneos (por ejemplo, plasma) a través de una matriz de afinidad de la cápside de AAV daría como resultado la unión solo de anticuerpos de AAV y de todos los isotipos (incluidas IgG, IgM, etc.).

Se predice que una cantidad suficiente de plasmaféresis usando una matriz de afinidad de la cápside de AAV eliminará sustancialmente los anticuerpos de la cápside de AAV y reducirá el título (carga) de anticuerpos de la cápside de AAV en el ser humano. En ciertas modalidades, el título en un sujeto tratado se reduce sustancialmente a niveles bajos (a $<1:5$, o menos, como $<1:4$, o $<1:3$, o $<1:2$, o $<1:1$). Una reducción en el título de anticuerpos será temporal porque se esperaría que los linfocitos B que producen los anticuerpos de la cápside de AAV causen gradualmente que el título de anticuerpos de la cápside de AAV rebote al nivel de estado estacionario antes de la plasmaféresis.

En el caso en el que un título de anticuerpos de AAV preexistente se redujo de 1:100 a 1:1, el título de anticuerpos de AAV rebota de aproximadamente 0.15% (correspondiente a un título de 1:1.2) 0.43% (1:1.4), 0.9% (1:1.9), 1.7% (1:2.7) y 3.4% (1:4.4), ocurren 1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas, respectivamente, después de completar el método de plasmaféresis. La eliminación temporal de anticuerpos de AAV de tal sujeto correspondería a una ventana de tiempo (por ejemplo, de aproximadamente 24 horas o menos, como 12 horas o menos, o 6 horas o menos, o 3 horas o menos, o 2 horas o menos, o 1 hora o menos) durante el cual se podría administrar un vector de AAV al sujeto y predecir que transduciría eficazmente tejidos diana sin una neutralización sustancial del vector de AAV con los anticuerpos de AAV.

En el caso en el que un título de anticuerpos de AAV preexistente se redujo de 1:1000 a 1:1, el título de anticuerpos de AAV rebota de aproximadamente 0.15% (correspondiente a un título de 1:2.5) 0.4% (1:5.3), 0.9% (1:9.7), 1.7% (1:18) y 3.4% (1:35), ocurren 1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas, respectivamente, después de completar el método de plasmaféresis. Por tanto, la ventana para la administración del vector de AAV será comparativamente más corta.

Los anticuerpos de AAV pueden ser preexistentes y pueden estar presentes a niveles que reducen o bloquean la transducción terapéutica del vector de transferencia del gen GAA de las

células diana. Alternativamente, pueden desarrollarse anticuerpos de AAV después de la exposición a AAV o la administración de un vector de AAV. Si tales anticuerpos se desarrollan después de la administración de un vector de AAV, estos sujetos también pueden tratarse mediante aféresis, más particularmente, plasmaféresis.

En algunas modalidades, los ácidos nucleicos, los casetes de expresión y los vectores de AAV de la invención se pueden usar en combinación con terapias sintomáticas y de apoyo, que incluyen, por ejemplo, asistencia respiratoria (incluida la ventilación mecánica), fisioterapia para fortalecer los músculos, fisioterapia para mejorar la fuerza y capacidad física, terapia ocupacional, incluido el uso de bastones, andadores y sillas de ruedas, terapia del habla para mejorar la articulación y el habla, uso de dispositivos ortopédicos, incluidos aparatos ortopédicos, y terapia dietética y sondas de alimentación para garantizar una nutrición adecuada y un aumento de peso.

En algunas modalidades, los ácidos nucleicos, casetes de expresión y vectores de AAV de la invención se pueden usar en combinación con la terapia de acompañante farmacológico (también conocida como terapia de mejora enzimática), donde uno o más acompañantes farmacológicos se administran antes, concomitantemente o después de la administración del ácido nucleico, casete de expresión o vectores AAV de la invención, para el tratamiento de una GSD, como la enfermedad de Pompe.

En algunas modalidades, los ácidos nucleicos, casetes de expresión y vectores AAV de la invención pueden usarse en combinación con uno o más acompañantes farmacológicos, que pueden estabilizar la proteína GAA. Los acompañantes farmacológicos que se pueden usar en combinación con los ácidos nucleicos, casetes de expresión y vectores AAV de la invención incluyen 1-desoxinojirimicina (1-DNJ, también conocida como duvoglustat), N-butil-1-desoxinojirimicina (también conocida como miglustat), N-metil-DNJ, N-etil-DNJ, N-propil-DNJ, N-pentil-DNJ, N-hexil-DNJ, N-heptil-DNJ, N-octil-DNJ, N-nonil-DNJ, N-metilciclopropil-DNJ, N-metilciclopentil-DNJ, N-2-hidroxietil-DNJ, 5-N-carboxipentil DNJ y acompañantes farmacológicos descritos en las Patentes Estadounidense 6,599,919 y 9,181,184, y en la publicación de Solicitud de Patente Internacional WO/2013/182652.

En algunas modalidades, los ácidos nucleicos, casetes de expresión y vectores AAV de la invención se pueden usar en combinación con terapia adyuvante, con uno o más agonistas β_2 , incluyendo, por ejemplo, clenbuterol, albuterol, formoterol y salmeterol, y como se describe en la Solicitud Internacional de Publicación de Patente WO/2017/049161.

En modalidades particulares, los ácidos nucleicos y los casetes de expresión de la invención se suministran o administran mediante partículas de vector de AAV. En otras modalidades, los ácidos nucleicos y los casetes de expresión de la invención se pueden suministrar o administrar a través de otros tipos de partículas virales, incluyendo retrovirales, adenovirales, adenovirales auxiliares dependientes, adenovirales híbridos, virus del herpes simple, lentivirales, poxvirus, virus de Epstein-Barr, virus vaccinia y partículas de citomegalovirus humano.

En otras modalidades, los ácidos nucleicos y los casetes de expresión de la invención se suministran o administran con un sistema de suministro no viral. Los sistemas de suministro no virales incluyen, por ejemplo, métodos químicos, como liposomas, nanopartículas, nanopartículas de lípidos, polímeros, micropartículas, microcápsulas, micelas o vesículas extracelulares y métodos físicos, como pistola de genes, electroporación, bombardeo de partículas, utilización de ultrasonidos y magnetofección.

En algunas modalidades, los ácidos nucleicos y los casetes de expresión de la invención se administran como ADN desnudo, minicírculos, transposones de ADN dúplex lineal de extremos cerrados.

En otras modalidades, los ácidos nucleicos y los casetes de expresión de la invención se suministran o administran en partículas de vector de AAV, u otras partículas virales, que se encapsulan o complejan adicionalmente con liposomas, nanopartículas, nanopartículas de lípidos, polímeros, micropartículas, microcápsulas, micelas, o vesículas extracelulares.

Una "nanopartícula lipídica" o "LNP" se refiere a una vesícula a base de lípidos útil para el suministro de AAV y que tiene dimensiones en la nanoescala, es decir, desde aproximadamente 10 nm hasta aproximadamente 1000 nm, o desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 500 nm, o desde de aproximadamente 75 a aproximadamente 127 nm. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la LNP proporciona al ácido nucleico, el casete de expresión o el

vector de AAV un blindaje parcial o completo del sistema inmunológico. El blindaje permite el suministro del ácido nucleico, el casete de expresión o el vector de AAV a un tejido o célula mientras se evita inducir una respuesta inmune sustancial contra el ácido nucleico, el casete de expresión o el vector de AAV *in vivo*. El blindaje también puede permitir la administración repetida sin inducir una respuesta inmune sustancial contra el ácido nucleico, el vector de expresión o el vector de AAV *in vivo* (por ejemplo, en un sujeto como un ser humano). El blindaje también puede mejorar o aumentar la eficiencia de suministro de ácido nucleico, casete de expresión o vector de AAV *in vivo*.

El pI (punto isoeléctrico) de AAV está en un rango de aproximadamente 6 a aproximadamente 6.5. Por tanto, la superficie del AAV tiene una ligera carga negativa. Como tal, puede ser beneficioso que la LNP comprenda un lípido catiónico como, por ejemplo, un amino lípido. Se han descrito ejemplos de amino lípidos en las Patentes Estadounidenses Nos 9,352,042, 9,220,683, 9,186,325, 9,139,554, 9,126,966, 9,018,187, 8,999,351, 8,722,082, 8,642,076, 8,569,256, 8,466,122 y 7,745,651, y las publicaciones de Patente Estadounidense Nos. 2016/0213785, 2016/0199485, 2015/0265708, 2014/0288146, 2013/0123338, 2013/0116307, 2013/0064894, 2012/0172411 y 2010/0117125.

Los términos "lípido catiónico" y "amino lípido" se usan indistintamente en este documento para incluir aquellos lípidos y sales de los mismos que tienen una, dos, tres o más cadenas de ácidos grasos o alquilo graso y un grupo amino titulable por pH (por ejemplo, un alquilamino o grupo dialquilamino). El lípido catiónico está típicamente protonado (es decir, cargado positivamente) a un pH por debajo del pKa del lípido catiónico y es sustancialmente neutro a un pH por encima del pKa. Los lípidos catiónicos también pueden ser lípidos catiónicos titulables. En algunas modalidades, los lípidos catiónicos comprenden: un grupo amino terciario protonable (por ejemplo, titulable por pH); cadenas de alquilo C18, en las que cada cadena de alquilo tiene independientemente de 0 a 3 (por ejemplo, 0, 1, 2 o 3) dobles enlaces; y enlaces éter, éster o cetal entre el grupo principal y las cadenas de alquilo.

Los lípidos catiónicos pueden incluir, sin limitación, 1,2-dilinoileloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-di- γ -linoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (γ -DLenDMA), 2,2-dilinoileil-4- (2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA, también conocido como DLin-

C2K-DMA, XTC2, y C2K), 2,2-dilinoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), dilinoilmetil-3-dimetilaminopropionato (DLin-M-C2-DMA, también conocido como MC2), (6Z, 9Z, 28Z, 31 Z) -heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino) butanoato (DLin-M-C3-DMA, también conocido como MC3), sales de los mismos y mezclas de los mismos. Otros lípidos catiónicos también incluyen, pero sin limitación, 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DODMA), 2,2-dilinoil-4-(3-dimetilaminopropil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C3-DMA), 2,2-dilinoil-4-(3-dimetilaminobutil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C4-DMA), DLen-C2K-DMA, γ -DLen-C2K-DMA y (DLin-MP-DMA) (también conocido como 1-B11).

Otros lípidos catiónicos pueden incluir, sin limitación, 2,2-dilinoil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxano (DLin-K6-DMA), 2,2-dilinoil-4-N-metilpepiazino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-MPZ), 1,2-dilinoilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoileyoxi-3-(dimetilamino) acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-dilinoileyoxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-dilinoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoil-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoil-2-linoiloxi-Sal de cloruro de 3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMA), sal de cloruro de 1,2-dilinoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloruro de 1,2-dilinoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-dilinoil-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), 3-(N,N-dilinoilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propanodiol (DOAP), 1,2-dilinoil-3-(2-N,N-dimetilamino) etoxipropano (DLin-EG-DMA), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilammonio (DOTMA), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 3-(N-(N',N'-dimetilamino)etano)-carbamoilcolesterol (DC-Chol), N-(1,2-dimiriloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxiethyl amonio bromuro (DMRIE), Trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis, cis-9,12-octadecadienoxi) propano (CLinDMA), 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetil-1-(cis,cis-9',1-2'-octadecadienoxi) propano (CpLinDMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA), 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP), 1,2-N,N'-dilinoilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLincarbDAP), dexametasona-spermina (DS) y espermina disustituida (D2S) o mezclas de los mismos.

Se pueden usar varias preparaciones comerciales de lípidos catiónicos, tales como LIPOFECTIN® (que incluye DOTMA y DOPE, disponibles de GIBCO/BRL) y LIPOFECTAMINE® (que comprende DOSPA y DOPE, disponibles de GIBCO/BRL).

En ciertas modalidades, el lípido catiónico puede estar presente en una cantidad desde aproximadamente el 10% en peso de la LNP hasta aproximadamente el 85% en peso de la nanopartícula lipídica, o desde aproximadamente el 50% en peso de la LNP hasta aproximadamente el 75% en peso de la LNP.

Los esteroides pueden conferir fluidez a la LNP. Como se usa en el presente documento, "esterol" se refiere a cualquier esteroide natural de origen vegetal (fitoesteroides) o animal (zoosteroides), así como a los esteroides sintéticos no naturales, todos los cuales se caracterizan por la presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo A de esteroides. El esteroide puede ser cualquier esteroide usado convencionalmente en el campo de la preparación de liposomas, vesículas lipídicas o partículas lipídicas, más comúnmente colesterol. Los fitoesteroides pueden incluir campesterol, sitosterol y estigmasterol. Los esteroides también incluyen lípidos modificados con esteroide, tales como los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense 2011/0177156. En algunas modalidades, un esteroide puede estar presente en una cantidad desde aproximadamente el 5% en peso de la LNP hasta aproximadamente el 50% en peso de la nanopartícula lipídica o desde aproximadamente el 10% en peso de la LNP hasta aproximadamente el 25% en peso de la LNP.

La LNP puede comprender un lípido neutro. Los lípidos neutros pueden comprender cualquier especie de lípidos que exista en una forma zwitteriónica neutra o sin carga a pH fisiológico. Dichos lípidos incluyen, sin limitación, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, dihidroesfingomielina, cefalina y cerebrósidos. La selección de lípidos neutros se guía generalmente considerando, entre otras cosas, el tamaño de partícula y la estabilidad requerida. En algunas modalidades, el componente lipídico neutro puede ser un lípido que tiene dos grupos acilo (por ejemplo, diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina).

Los lípidos que tienen una variedad de grupos de cadena acilo de longitud de cadena variable y grado de saturación están disponibles o pueden aislarse o sintetizarse mediante técnicas bien

conocidas. En algunas modalidades, pueden usarse lípidos que contienen ácidos grasos saturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C14 a C22. En otro grupo de modalidades, se utilizan lípidos con ácidos grasos mono o diinsaturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C14 a C22. Además, se pueden usar lípidos que tienen mezclas de cadenas de ácidos grasos saturados e insaturados. Los lípidos neutros ejemplares incluyen, sin limitación, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidil-etanolamina (DOPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) o cualquier fosfatidilcolina relacionada. Los lípidos neutros también pueden estar compuestos de esfingomielina, dihidroesfingomielina o fosfolípidos con otros grupos de cabeza, como serina e inositol.

En algunas modalidades, el lípido neutro puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0.1% en peso de la nanopartícula lipídica a aproximadamente 75% en peso de la LNP, o de aproximadamente 5% en peso de la LNP a aproximadamente 15% en peso de la LNP.

Los ácidos nucleicos encapsulados con LNP, los casetes de expresión y el vector de AAV pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas, por ejemplo, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones farmacéuticas son útiles, entre otras cosas, para la administración y suministro de ácidos encapsulados con LNP, casetes de expresión y vector de AAV a un sujeto *in vivo* o *ex vivo*.

Las preparaciones de LNP se pueden combinar con componentes adicionales. Los ejemplos no limitantes incluyen polietilenglicol (PEG) y esteroides.

El término "PEG" se refiere a un polietilenglicol, un polímero lineal soluble en agua de unidades repetidas de etileno PEG con dos grupos hidroxilo terminales. Los PEGs se clasifican por sus pesos moleculares; por ejemplo, el PEG 2000 tiene un peso molecular medio de aproximadamente 2,000 daltons y PEG 5,000 tiene un peso molecular medio de aproximadamente 5,000 daltons. Los PEG están disponibles comercialmente de Sigma Chemical Co. y otras compañías e incluyen, por ejemplo, los siguientes PEGs funcionales: monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinimidil succinato (MePEG-S-NHS),

monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES) y monometoxipolietilenglicol-imidazolilcarbonilo (MePEG-IM).

En algunas modalidades, el PEG puede ser un polietilenglicol con un peso molecular medio de aproximadamente 550 a aproximadamente 10,000 daltons y está opcionalmente sustituido con alquilo, alcoxi, acilo o arilo. En algunas modalidades, el PEG puede estar sustituido con metilo en la posición terminal del hidroxilo. En otra modalidad preferida, el PEG puede tener un peso molecular medio de aproximadamente 750 a aproximadamente 5,000 daltons, o de aproximadamente 1,000 a aproximadamente 5,000 daltons, o de aproximadamente 1,500 a aproximadamente 3,000 daltons o de aproximadamente 2,000 daltons o de aproximadamente 750 daltons. El PEG puede estar opcionalmente sustituido con alquilo, alcoxi, acilo o arilo. En algunas modalidades, el grupo hidroxilo terminal puede estar sustituido con un grupo metoxi o metilo.

Los lípidos modificados con PEG incluyen los conjugados de PEG-dialquioxipropilo (PEG-DAA) descritos en las Patentes Estadounidense No. 8,936,942 y 7,803,397. Los lípidos modificados con PEG (o conjugados lípido-polioxi-etileno) que son útiles pueden tener una variedad de porciones de lípidos de "anclaje" para fijar la porción de PEG a la superficie de la vesícula lipídica. Ejemplos de lípidos modificados con PEG adecuados incluyen fosfatidiletanolamina y ácido fosfatídico modificados con PEG, conjugados de PEG-ceramida (por ejemplo, PEG-CerC14 o PEG-CerC20) que se describen en la Patente Estadounidense No. 5,820,873, dialquilaminas modificadas con PEG y 1,2-diaciloxipropan-3-aminas. En algunas modalidades, el lípido modificado con PEG puede ser diacilgliceroles y dialquilogliceroles modificados con PEG. En algunas modalidades, el PEG puede estar en una cantidad de aproximadamente 0.5% en peso de LNP a aproximadamente 20% en peso de LNP, o de aproximadamente 5% en peso de LNP a aproximadamente 15% en peso de LNP.

Además, la LNP puede ser una LNP modificada con PEG y una LNP modificada con esterol. Las LNPs, combinadas con componentes adicionales, pueden ser LNPs iguales o separadas. En otras palabras, la misma LNP se puede modificar con PEG y esterol o, alternativamente, una primera LNP se puede modificar con PEG y una segunda LNP se puede modificar con esterol. Opcionalmente, se pueden combinar la primera y segunda LNPs modificadas.

En algunas modalidades, antes de encapsular las LNPs pueden tener un tamaño en un intervalo de aproximadamente 10 nm a 500 nm, o de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 200 nm, o de 75 nm a aproximadamente 125 nm. En algunas modalidades, el ácido nucleico encapsulado en LNP, el vector de expresión o el vector de AAV pueden tener un tamaño en un intervalo de aproximadamente 10 nm a 500 nm.

Las células recombinantes capaces de expresar las secuencias de GAA de la invención pueden usarse para el suministro o la administración.

Se puede usar ADN desnudo, como minicírculos y transposones, para administración o suministro o vectores lentivirales. Además, también se pueden usar tecnologías de edición de genes como nucleasas con dedos de zinc, meganucleasas, TALENs y CRISPR para suministrar la secuencia codificante de la invención.

Una enfermedad por almacenamiento de glucógeno (GSD) resulta de la ausencia de una enzima que finalmente convierte los compuestos de glucógeno en glucosa. La deficiencia de enzimas da como resultado la acumulación de glucógeno en los tejidos. En muchos casos, el defecto tiene consecuencias sistémicas, pero, en algunos casos, el defecto se limita a tejidos específicos. La mayoría de los pacientes experimentan síntomas musculares, como debilidad y calambres, aunque ciertas GSDs se manifiestan como síndromes específicos, como convulsiones hipoglucémicas o cardiomegalia.

Los siguientes son ejemplos no limitativos de GSD:

0 - Deficiencia de glucógeno sintasa; deficiencia de Ia-glucosa-6-fosfatasa (enfermedad de von Gierke); II -Deficiencia de maltasa ácida (enfermedad de Pompe); III - Deficiencia de enzima desramificante (enfermedad de Forbes-Cori); IV - Deficiencia de transglucosidasa (enfermedad de Andersen, amilopectinosis); V - Deficiencia de miofosforilasa (enfermedad de McArdle); VI - Deficiencia de fosforilasa (enfermedad de Hers); y VII - Deficiencia de fosfofructoquinasa (enfermedad de Tarui).

Varias formas de GSD afectan las vías metabólicas de los carbohidratos. Aunque en la literatura se analizan por lo menos 14 GSD únicas, las 4 que causan debilidad muscular clínicamente significativa son la enfermedad de Pompe (GSD tipo II, deficiencia de maltasa ácida), la

enfermedad de Cori (GSD tipo IIIa, deficiencia de enzima desramificante), la enfermedad de McArdle (tipo GSD V, deficiencia de miofosforilasa) y enfermedad de Tarui (GSD tipo VII, deficiencia de fosfofructoquinasa). Una forma, la enfermedad de Von Gierke (GSD tipo Ia, deficiencia de glucosa-6-fosfatasa), causa enfermedad de órganos terminal clínicamente significativa con morbilidad significativa.

En general, las GSD se heredan como afecciones autosómicas recesivas. Estos defectos enzimáticos hereditarios generalmente se presentan en la infancia, aunque algunos, como la enfermedad de McArdle y la enfermedad de Pompe, tienen formas separadas de inicio en la edad adulta.

Las GSD pueden tratarse mediante terapia de reemplazo enzimático (ERT), por ejemplo, con GAA producida de forma recombinante. La terapia de reemplazo enzimático es un tratamiento aprobado para todos los pacientes con enfermedad de Pompe. Implica la administración intravenosa de α -glucosidasa ácida humana recombinante. Este tratamiento, fabricado por Genzyme, una Corporación de Sanofi, es Lumizyme (comercializado como Myozyme fuera de los Estados Unidos) y fue aprobado por primera vez por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA) en 2006. Ha sido aprobado para todos los pacientes con enfermedad de Pompe. Los beneficios de la ERT pueden atenuarse mediante la formación de anticuerpos, por lo que la ERT también se puede combinar con la expresión inmunitaria.

Las GSDs pueden tratarse mediante una terapia dietética, que implica un cumplimiento meticuloso de un régimen dietético, puede reducir el tamaño del hígado, prevenir la hipoglucemia, permitir la reducción de los síntomas y permitir el crecimiento y el desarrollo.

El tratamiento adicional de la enfermedad de Pompe es sintomático y de apoyo. Es posible que se requiera soporte respiratorio, ya que la mayoría de los pacientes tienen algún grado de compromiso respiratorio y/o insuficiencia respiratoria. La fisioterapia puede ser útil para fortalecer los músculos respiratorios. Algunos pacientes pueden necesitar asistencia respiratoria a través de ventilación mecánica (es decir, ventiladores bipap o de volumen) durante la noche y/o períodos del día. Además, puede ser necesario un apoyo adicional durante las infecciones del tracto respiratorio. El soporte de ventilación mecánica puede ser mediante técnicas invasivas o no invasivas. Es mejor que la familia tome la decisión sobre la duración

de la asistencia respiratoria en una consulta cuidadosa con los médicos del paciente y otros miembros del equipo de atención médica en función de las características específicas del paciente. Una dieta alta en proteínas puede ser beneficiosa en la forma no infantil de Pompe.

Se recomienda fisioterapia para mejorar la fuerza y la capacidad física. Puede ser necesaria la terapia ocupacional, incluido el uso de bastones o andadores. Eventualmente, algunas personas pueden requerir el uso de una silla de ruedas. La terapia del habla puede ser beneficiosa para mejorar la articulación y el habla en algunos pacientes.

Se pueden recomendar dispositivos ortopédicos, incluidos aparatos ortopédicos, para algunos pacientes. Es posible que se requiera cirugía para ciertos síntomas ortopédicos, como contracturas o deformidad espinal.

Dado que la enfermedad de Pompe puede debilitar los músculos que se utilizan para masticar y tragar, es posible que se requieran medidas para garantizar una nutrición y un aumento de peso adecuados. Algunos pacientes pueden necesitar dietas especializadas con alto contenido calórico y pueden necesitar aprender técnicas para cambiar el tamaño y la textura de los alimentos para reducir el riesgo de aspiración. Algunos bebés pueden requerir la inserción de una sonda de alimentación que se pasa por la nariz, baja por el esófago y llega al estómago (sonda nasogástrica). En algunos niños, es posible que sea necesario insertar una sonda de alimentación directamente en el estómago a través de una pequeña abertura quirúrgica en la pared abdominal. Algunas personas con enfermedad de Pompe de aparición tardía pueden requerir una dieta blanda, pero pocas requieren sondas de alimentación.

Los sujetos pueden analizarse para una o más enzimas hepáticas para una respuesta adversa al tratamiento o para determinar si dichos sujetos, pretratamiento, son apropiados para el tratamiento de acuerdo con un método de la invención. Por lo tanto, los sujetos candidatos pueden seleccionarse para determinar las cantidades de una o más enzimas hepáticas antes o después del tratamiento de acuerdo con un método de la invención. Los sujetos tratados pueden controlarse después del tratamiento para detectar niveles elevados de enzimas hepáticas, periódicamente, por ejemplo, cada 1 a 4 semanas, 1 a 6 meses, 6 a 12 meses o 1, 2, 3, 4, 5 o más años.

Las enzimas hepáticas ejemplares incluyen alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y lactato deshidrogenasa (LDH), pero también pueden monitorizarse otras enzimas indicativas de daño hepático. Un nivel normal de estas enzimas en la circulación se define típicamente como un rango que tiene un nivel superior, por encima del cual el nivel de la enzima se considera elevado y, por lo tanto, indica daño hepático. Un rango normal depende en parte de los estándares utilizados por el laboratorio clínico que realiza el ensayo.

La invención proporciona kits con material de embalaje y uno o más componentes en el mismo. Un kit incluye típicamente una etiqueta o un prospecto que incluye una descripción de los componentes o instrucciones de uso *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* de los componentes que contiene. Un kit puede contener una colección de dichos componentes, por ejemplo, una partícula de rAAV y opcionalmente un segundo activo, como otro compuesto, agente, fármaco o composición.

Un kit se refiere a una estructura física que alberga uno o más componentes del kit. El material de envasado puede mantener los componentes de forma estéril y puede estar hecho de material comúnmente utilizado para tales fines (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, papel de aluminio, ampollas, viales, tubos, etc.).

Las etiquetas o encartes pueden incluir información de identificación de uno o más de sus componentes, cantidades de dosis, farmacología clínica del ingrediente o ingredientes activos, incluido el mecanismo de acción, farmacocinética y farmacodinámica. Las etiquetas o encartes pueden incluir información de identificación del fabricante, números de lote, ubicación y fecha de fabricación, fechas de vencimiento. Las etiquetas o encartes pueden incluir información de identificación del fabricante, números de lote, ubicación y fecha del fabricante. Las etiquetas o encartes pueden incluir información sobre una enfermedad para la que se puede utilizar un componente del kit. Las etiquetas o encartes pueden incluir instrucciones para el médico o el sujeto para usar uno o más de los componentes del kit en un método, uso o protocolo de tratamiento o régimen terapéutico. Las instrucciones pueden incluir cantidades de dosificación, frecuencia o duración e instrucciones para practicar cualquiera de los métodos, usos, protocolos de tratamiento o regímenes profilácticos o terapéuticos descritos en este documento.

Las etiquetas o encartes pueden incluir información sobre cualquier beneficio que pueda proporcionar un componente, como un beneficio profiláctico o terapéutico. Las etiquetas o encartes pueden incluir información sobre posibles efectos secundarios adversos, complicaciones o reacciones, como advertencias para el sujeto o el médico sobre situaciones en las que no sería apropiado utilizar una composición en particular. Los efectos secundarios adversos o complicaciones también podrían ocurrir cuando el sujeto tiene, estará o está tomando actualmente uno o más medicamentos que pueden ser incompatibles con la composición, o el sujeto tiene, estará o está actualmente sometido a otro protocolo de tratamiento o régimen terapéutico que sería incompatible con la composición y, por tanto, las instrucciones podrían incluir información sobre dichas incompatibilidades.

Las etiquetas o encartes incluyen "material impreso", por ejemplo, papel o cartón, o separados o adheridos a un componente, un kit o material de embalaje (por ejemplo, una caja), o unidos a una ampolla, tubo o vial que contiene un componente del kit. Las etiquetas o encartes pueden incluir adicionalmente un medio legible por computadora, como una etiqueta impresa con código de barras, un disco, un disco óptico como CD o DVD-ROM / RAM, DVD, MP3, cinta magnética o un medio de almacenamiento eléctrico como RAM y ROM o híbridos de estos, como medios de almacenamiento magnético / óptico, medios FLASH o tarjetas de tipo de memoria.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen en este documento métodos y materiales adecuados.

Todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones y otras referencias, citas de GenBank y citas de ATCC citadas en este documento se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la especificación, incluidas las definiciones.

Todas las características descritas en este documento pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica descrita en la especificación puede ser reemplazada por una característica alternativa que tenga el mismo propósito, equivalente o similar. Por tanto, a menos que se indique expresamente lo contrario, las características descritas (por ejemplo,

ácidos nucleicos modificados que codifican GAA, casetes de expresión que comprenden ácidos nucleicos modificados que codifican GAA y partículas de rAAV que comprenden los ácidos nucleicos modificados que codifican GAA) son un ejemplo de un género de características equivalentes o similares.

Como se usa en este documento, las formas singulares "un", "y" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un ácido nucleico" incluye una pluralidad de tales ácidos nucleicos, la referencia a "un vector" incluye una pluralidad de tales vectores, y la referencia a "un virus" o "partícula" incluye una pluralidad de tales virus / partículas.

Como se usa en este documento, todos los valores numéricos o rangos numéricos incluyen números enteros dentro de dichos rangos y fracciones de los valores o los números enteros dentro de rangos a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, para ilustrar, la referencia al 86% o más de identidad, incluye 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% etc., así como 86.1%, 86.2%, 86.3%, 86.4%, 86.5%, etc., 87.1%, 88.2%, 88.3%, 88.4%, 88.5%, etc.

La referencia a un número entero con más (mayor) o menor que incluye cualquier número mayor o menor que el número de referencia, respectivamente. Así, por ejemplo, una referencia a menos de 127, incluye 126, 125, 124, 123, 122, 121, 120, 119, 118, 117, 116, 115, 114, 113, 112, 111, 110, etc. el camino hacia cero (0); y menos de 10, incluye 9, 8, 7, etc. hasta cero (0).

Como se usa en este documento, todos los valores numéricos o rangos incluyen subrangos y fracciones de los valores y números enteros dentro de dichos rangos y subrangos y el 1 incorrecto, así como el archivo okay, gracias a las fracciones de los números enteros dentro de dichos rangos a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, para ilustrar, la referencia a un rango numérico, como 1-10 incluye 1 - 2, 1 - 3, 1 - 4, 1 - 5, 1 - 6, 1 - 7, 1 - 8, 1 - 9, 2 - 3, 2 - 4, 2 - 5, 2 - 6, 2 - 7, 2 - 8, 2 - 9, 2 - 10, 3 - 4, 3 - 5, 3 - 6, 3 - 7, 3 - 8, 3 - 9, 3 - 10, etc. ; y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, así como 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, etc., y así sucesivamente. Por lo tanto, la referencia a un rango de 1-50 incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc., hasta 50 inclusive, así como 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, etc., 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, etc., y así sucesivamente.

La referencia a una serie de rangos incluye rangos que combinan los valores de los límites de diferentes rangos dentro de la serie. Así, para ilustrar la referencia a una serie de rangos, por ejemplo, de 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-850, incluye rangos de 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 10-30, 10-40, 10-50, 10-60, 10-70, 10-80, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 50-75, 50-100, 50-150, 50-200, 50-250, 100-200, 100-250, 100-300, 100-350, 100-400, 100-500, 150-250, 150-300, 150-350, 150-400, 150-450, 150-500, etc.

La invención se describe generalmente en el presente documento utilizando un lenguaje afirmativo para describir las numerosas modalidades y aspectos. La invención también incluye específicamente modalidades en las que se excluye un tema particular, en su totalidad o en parte, tales como sustancias o materiales, etapas y condiciones del método, protocolos o procedimientos. Por ejemplo, en ciertas modalidades o aspectos de la invención, se excluyen los materiales y/o las etapas del método. Por tanto, aunque la invención generalmente no se expresa aquí en términos de lo que la invención no incluye, los aspectos que no están expresamente excluidos en la invención, no obstante, se describen aquí.

Se han descrito varias modalidades de la invención. No obstante, un experto en la técnica, sin apartarse del espíritu y alcance de la invención, puede realizar diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones. Por consiguiente, los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, el alcance de la invención reivindicada de ninguna manera.

EJEMPLO 1

Tabla 1 – Descripción general del Casete de Expresión GAA

Casete de Expresión (SEQ ID NOs:16-24)	SEC ID NO	Variante Optimizada de Codones	Señal BGH PoliA	Envasado en (SEC ID NOs:30- 32) Vector
pAAV-ApoE/hAAT.fixUTR.GAA13.BGH	16	GAA13	CpG- reducido	SPK-AAV-01
pAAV-ApoE/hAAT.GAA13.BGH	17	GAA13	CpG- reducido	SPK-AAV-02
pAAV-ApoE/hAAT.GAA7.BGH	18	GAA7	CpG- reduced	SPK-AAV-03
pAAV-ApoE/hAAT.GAA8.BGH	19	GAA8	CpG- reducido	SPK-AAV-04
pAAV-ApoE/hAAT.GAA2.wtBGH	20	GAA2	wtBGH	SPK-AAV-05
pAAV-ApoE/hAAT.GAA5.wtBGH	21	GAA5	wtBGH	SPK-AAV-06

pAAV-ApoE/hAAT.GAA7.wtBGH	22	GAA7	wtBGH	SPK-AAV-07
pAAV-ApoE/hAAT.GAA8.wtBGH	23	GAA8	wtBGH	SPK-AAV-08
pAAV-ApoE/hAAT.GAA13.wtBGH	24	GAA13	wtBGH	SPK-AAV-09
pAAV-ApoE/hAAT.GAA13.BGH	17	GAA13	CpG-reducido	SPK-AAV-10*

* SPK-AAV-10 se envasa en cápside AAV6 y todos los demás se envasan en la variante de cápside AAV-4-1, descrita en la publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2016/210170.

Los casetes de expresión de GAA se muestran en las Figuras 1 a 9. Todos contienen repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV flanqueantes 5' y 3', una secuencia potenciadora / promotora de ApoE/hAAT específica del hígado unida operativamente a una secuencia de codificación GAA optimizada, incluida una secuencia humana intrón de la subunidad beta de hemoglobina (HBB2), seguido de una secuencia de poliadenilación (poli A) de la hormona de crecimiento bovina (bGH) reducida con CpG o de tipo natural.

SEC ID NO:1: secuencia de ácido nucleico para GAA2

ATGGCTTTTCTGTGGCTGCTGAGCTGCTGGGCTCTGCTGGGCACACCTTTGGGCTGCTGGTGCCTAGGGAGCTG
TCTGGGTCTAGCCCTGTGCTGGAGGAGACTCACCTGCCCATCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCTGGCCCCAGGGAT
GCTCAGGCCCCACCTGGCAGGCCCCAGGGCTGTGCCACCCAGTGTGATGTGCCCCCAACAGCAGGTTTGACTGT
GCCCCTGACAAGGCCATTACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGCTGCTGCTACATTCCAGCTAAGCAGGGCCTG
CAGGGGGCCCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGTCTTCCCCCCCCAGCTATCCTAGCTATAAACTGGAGAACCTGAGC
AGCTCTGAGATGGGCTATACTGCCACCTGACTAGGACTACTCCCACCTTTTTTCTAAGGATATCCTGACCCTG
AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAACAGGCTGCACTTCACTATTAAGGACCCTGCCAATAGGAGGTATGAA
GTGCCTCTGGAGACTCCTCATGTGCACTCTAGGGCCCCAGCCCCCTGTATTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAGCCC
TTTGGGGTGATTGTGAGGAGGCAGCTGGATGGCAGGGTGTGCTGCTGAACACCACTGTGGCCCCCTGTTCTTTGCT
GACCAGTTTCTGCACTGAGCACCAGCCTGCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCATCTGAGCCCTCTG
ATGCTGAGCACCTCTTGGACCAGGATCACCTGTGAATAGGGATCTGGCCCCACCCCTGGGGCTAATCTGTAT
GGCTCTCATCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCCATGGGGTGTCTTGCTGAACAGCAATGCC
ATGGATGTGGTGTGTCAGCCCTCTCCTGCCCTGAGCTGGAGGAGCACTGGGGCATCCTGGATGTGTACATCTTC
CTGGGGCCCTGAGCCCCAAGTCTGTGGTCCAGCAGTATCTGGATGTGGTGGGCTACCCCTTTATGCCCCCTATTGG
GGCCTGGGCTTCCACCTGTGCAGGTGGGGGTATTCTTCTACTGCTATCACCAGGCAGGTGGTGGAGAACATGACC
AGGGCTCACTTCCCCCTGGATGTGCAGTGAATGACCTGGACTATATGGACTCTAGGAGGGATTTACCTTCAAC
AAGGATGGCTTCAGGGACTTCCCTGCTATGGTCCAGGAGCTGCATCAGGGGGGAGGAGGTACATGATGATTGTG
GACCCTGCCATCAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGCAGCTATAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGGTGTTT
ATCACTAATGAACTGGGCAGCCCCCTGATTGGCAAGGTGTGGCCTGGCTCTACTGCCTTCCCTGACTTCACCAAC
CCCACTGCTCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCTTTTGATGGCATGTGGATT
GACATGAATGAGCCAGCAACTTCATCAGGGGCTCTGAGGATGGGTGCCCAATAATGAGCTGGAGAACCCCCC
TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACCCCTGCAGGCTGCCACTATTTGTGCCAGCTCTCACCAGTTCTGAGCACC
CACTACAACCTGCACAATCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCACAGGGCCCTGGTGAAGGCCAGGGG
CTAGGGCCCTTTGTGATCTCTAGAAGCACCTTTGCTGGCCATGGGAGGTATGCTGGCCACTGGACTGGGGATGTG
TGGAGCTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCCTGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGCCCTGGTG
GGGGCTGATGTGTGTGGCTTCTTGGGCAACACCTCTGAAGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGGGGCCCTTC
TACCCCTTTCATGAGGAACCAACAACAGCCTGCTGAGCCTGCCTCAGGAGCCTTACTCTTTCTCTGAGCCTGCCAG
CAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACCCTGAGGTATGCTCTGCTGCCCCACCTGTACACCCTGTTCCACCAGGCCCAT
GTGGCTGGGGAGACTGTGGCCAGGCCCTGTTCTGGAGTTTCTAAGGATAGCAGCACCTGGACTGTGGACCAC
CAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATTACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGACTGGCTACTTC
CCCCTGGGCACTTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAAGCCCTGGGCAGCCTGCCTCCCCCCCCCTGCTGCC
CCCAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCCCTGGACACCATTAATGTGCAT
CTGAGGGCTGGGTATATTATCCCCCTGCAGGGGCTGGGCTGACTACCACTGAGAGCAGGCAGCAGCCTATGGCC
CTGGCTGTGGCTCTGACTAAGGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGAGCCTGGAGGTG
CTGGAGAGGGGGGCTACACCCAGGTGATTTTCTGCGCCAGGAACAACACCATTTGTGAATGAGCTGGTGGGGT

ACCTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAAGTGAAGTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGCAGGTGCTG
AGCAATGGGGTGCCTGTGAGCAACTTCACCTACAGCCCTGACACCAAGGTGCTGGATATTTGTGTGAGCCTGCTG
ATGGGGGAGCAGTTCCCTGGTGAAGTGTGCTGGTGTGA

SEC ID NO:2: secuencia de ácido nucleico para GAA5

ATGGCTTTTCTGTGGCTGCTGTCTTGGCTGGGCCCTGCTGGGGACTACCTTTGGCCTGCTGGTGGCCAGGGAAGT
TCTGGCTCTAGCCAGTGTGAGGAGAGACCCACCTGCCCCACCAGCAGGGGGCTTCTAGGCCTGGCCCCAGGGAT
GCCCAGGCCCCACCTGGCAGGCCAAGGGCTGTGCCACCCAGTGTGATGTGCCCCCAACTCTAGATTTGATTGT
GCCCCCTGATAAGGCCATCACCCAGGAGCAGTGTGAGGCTAGGGGGCTGCTGTACATCCCTGCTAAGCAGGGCCTG
CAGGGGGCTCAGATGGGCCAGCCCTGGTGTCTTCTCCCCCAGCTATCCCTCTTACAAGCTGGAGAATCTGAGC
AGCTCTGAGATGGGCTACACTGCCACCCTGACCAGGACTACTCCCACCTTCTTCCCCAAGGACATCCTGACCCTG
AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAACAGGCTGCATTTTACCATCAAGGATCCTGCCAACAGGAGGTATGAG
GTGCTCTGAGACCCCCCATGTGCACAGCAGGGCTCCTTCTCCCCTGTACTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAACCC
TTTGGGGTGATTGTGAGGAGGCAGCTGGATGGCAGGGTCTGCTGAACACCCTGTGGCCCCCTGTTCTTTGCT
GATCAGTTTCTGCAGCTGTCCACTTCTCTGCCCTAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCACCTGAGCCCTCTG
ATGCTGAGCACCTCTTGGACTAGGATCACCTGTGGAACAGGGACCTGGCCCCACCCCTGGGGCCAACCTGTAT
GGCAGCCACCCCTTCTATCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCATGGGGTGTCTCTGCTGAATAGCAATGCT
ATGGATGTGGTGTGCTGAGCCAGCCCTGCCCTGTCTTGGAGGAGCAGTGGGGCATCCTGGATGTGTACATTTTC
CTGGGGCCTGAGCCCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTACCTGGATGTGGTGGGCTACCCCTTCATGCCCTCCCTATGAG
GGCTGGGGCTTCCACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCTCTACTGCCATCACCAGGCAGGTGGTGGAGAATATGACC
AGGGCCCACTTCCCCCTGGATGTGCAGTGGAAATGACCTGGACTACATGGACTCTAGGAGGGACTTACCTTCAAT
AAGGATGGCTTCAGAGACTTCCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCATCAGGGGGGCAGGAGGTACATGATGATTGTG
GACCCTGCCATCAGCTCTTCTGGCCCTGCTGGCTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGGTGTTC
ATCACCATGAGACTGGGCAGCCCTGATTGGGAAGGTGTGGCCTGGCTCTACTGCCTTCCCTGACTTCACCAAT
CCTACTGCCCTGGCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCCTTTGATGGCATGTGGATT
GACATGAATGAGCCCTCTAATTTTATCAGGGGCTCTGAGGATGGCTGCCCCAACATGAGCTGGAGAACCCCCC
TATGTGCTGGGGTGGTGGGGGGCACCCTGCAGGCTGCCACCATCTGTGCTAGCTCTCACCAGTTCTGAGCACC
CACTACAATCTGCATAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCACAGGGCCCTGGTGAAGGCTAGGGGC
ACCAGGCCCTTTGTGATTTCTAGGAGCACTTTTGTGCCATGGCAGGTATGCTGGGCACTGGACTGGGGATGTG
TGGTCTAGCTGGGAGCAGCTGGCTTCTTCTGTGCTGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTG
GGGGCTGATGTGTGTGGGTCTCTGGGCAACACTTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGGGGCCCTTC
TACCCCTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGCTGAGCCTGCCCCAGGAGCCCTACAGCTTCTCTGAGCCTGCCCAG
CAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACCCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCACCTGTACACCCTGTTCCACCAGGCCCAT
GTGGCTGGGGAGACTGTGGCTAGGCCTCTGTTCTGGAGTTCCCCAAGGACTCTAGCACCTGGACTGTGGACCAC
CAGCTGCTGTGGGGGGAGGCCCTGCTGATCACTCCTGTGCTGCAGGCTGGGAAGGCTGAGGTGACTGGCTATTTTC
CCCCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCCTGTGGAGGCCCTGGGGAGCCTGCCCCCCCCCCTGCTGCC
CCCAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCCCTCTGGATACCATCAATGTGCAC
CTGAGGGCTGGCTACATCATTTCCCTGCAGGGCCCTGGCCTGACCCTACTGAGTCTAGGCAGCAGCCCATGGCC
CTGGCTGTGGCCCTGACCAAGGGGGGGGAGGCTAGGGGGGAGCTGTTTTGGGATGATGGGGAGAGCCTGGAGGTG
CTGGAGAGGGGGGCCCTACACTCAGGTGATCTTCTGGCCAGGAACAATACCATTTGTGAATGAGCTGGTGGGGTG
ACCTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGAAGTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGCAGGTGCTG
AGCAATGGGGTGCCTGTGAGCAACTTCACCTATAGCCCTGATACCAAGGTGCTGGATATTTGTGTGAGCCTGCTG
ATGGGGGAGCAGTTCCCTGGTGAAGTGTGCTGGTGTGA

SEC ID NO:3: secuencia de ácido nucleico para GAA7

ATGGCTTTTCTGTGGCTGCTGTCTTGGTGGGCTCTGCTGGGCACCACCTTTGGCCTGCTGGTGGCCAGGGAGCTG
TCTGGCAGCAGCCCTGTGCTGGAGGAGACCCACCTGCTCATCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCTGGCCCCAGGGAT
GCCCAGGCTCACCTGGGAGACCCAGGGCTGTGCCCACTCAGTGTGATGTGCCCCCAACAGCAGGTTTGAAGTGT
GCTCCTGACAAGGCTATCACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGGTGTGCTACATTCCTGCTAAGCAGGGCCTG
CAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGTCTTCTCCCCCCTCTTATCCAGCTATAAGCTGGAGAACCTGAGC
AGCTCTGAGATGGGCTACACTGCCACCCTGACCAGGACCACTCCCACCTTCTTTCCCAAGGATATTTGACTCTG
AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAACAGGCTGCACTTCACTATCAAGGACCCTGCCAATAGGAGGTATGAG
GTGCCCCCTGGAGACTCCTCATGTGCATAGCAGGGCCCTTCTCCTCTGTATTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAGCCC
TTTGGGGTGATTGTGAGGAGGCAGCTGGATGGCAGGGTGTGCTGAACACCCTGTGGCCCCCTGTTCTTTGCT
GACCAGTTCTCTGCAGCTGAGCACTTCTCTGCCAGCCAGTACATTACTGGGCTGGCTGAGCATCTGAGCCCCCTG

ATGCTGAGCACCTCTTGACCAGGATCACCTGTGGAACAGGGACCTGGCCCCACTCCTGGGGCTAACCTGTAT
 GGCTCTCACCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCATGGGGTGTTCCTGCTGAACAGCAATGCT
 ATGGATGTGGTGTCTGCAGCCCTCTCCAGCCCTGTCTTGAGGAGCACTGGGGCATTCTGGATGTGTACATTTTC
 CTGGGGCCTGAACCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTACCTGGATGTGGTGGGCTACCCCTTCATGCCCCCTATTGG
 GGGCTGGGGTTTACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACCAGGCAGGTGGTGGAGAACATGACC
 AGGGCCCATTTCCCCCTGGATGTGCAGTGGAAATGACCTGGACTACATGGATAGCAGGAGGATTTACCTTCAAC
 AAGGATGGCTTCAGGGACTTTCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCACCAGGGGGCAGGAGGTATATGATGATTGTG
 GACCCTGCTATCAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGCTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGTGTTC
 ATCACTAATGAACTGGCCAGCCTCTGATTGGCAAGGTCTGGCCTGGCTCTACTGCCTTCCCTGATTTTACTAAC
 CCCACTGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGATCAGGTGCCTTTTGTATGGCATGTGGATT
 GATATGAATGAACCAAGCAACTTCATCAGAGGCTCTGAGGATGGCTGCCCAACAATGAGCTGGAGAACCCCCC
 TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGCACTCTGCAGGTGCCACCATTTGTGCTAGCAGCCACCAGTTCTGAGCACC
 CACTACAATCTGCACAACCTGTATGGCCTGACTGAAGCCATTGCCAGCCATAGGGCCCTGGTGAAGGCCAGGGGC
 ACTAGGCCTTTTGTGATCAGCAGGAGCACTTTTGTGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGACTGGGGATGTG
 TGGAGCAGCTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCTGAGATTCTGCAGTTTAACTGCTGGGGGTGCCCTGGTG
 GGGCTGATGTGTGTGGCTTCTGGGCAACACCTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGGGGCCTTT
 TATCCCTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGCTGAGCCTGCCTCAGGAGCCCTACTCTTTCTCTGAGCCTGCCAG
 CAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACCCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCACCTGTATACCCTGTTCCACCAGGCCCAT
 GTGGCTGGGGAGACTGTGGCCAGGCCCCCTGTTCTGGAGTTCCCCAAGGACAGCAGCACCTGGACTGTGGATCAT
 CAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATCACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTCACTGGCTACTTC
 CCTCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCTGTGGAGGCTCTGGGCAGCCTGCCCCCCCCCTGCTGCT
 CCCAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCTCCCCTGGACACCATCAATGTGCAC
 CTGAGGGCTGGCTACATTATCCCCCTGCAGGGGCCAGGGCTGACTACCACTGAGAGCAGACAGCAGCCCATGGCT
 CTGGCTGTGGCCCTGACCAAGGGGGGGGAAGCTAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGAGCCTGGAGGTG
 CTGGAGAGGGGGGCCATATACCAGGTGATCTTCTGGCTAGGAACAACACCATTTGTCAATGAGCTGGTGGGGTG
 ACTTCTGAGGGGGCTGGGCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCTCCCCAGCAGGTGCTG
 AGCAATGGGGTGCCCTGTGAGCAACTTCACCTACAGCCCTGACACCAAGGTGCTGGACATCTGTGTGTCTGCTG
 ATGGGGGAGCAGTTCTCTGGTGGCTGGTGTGA

SEC ID NO:4: secuencia de ácido nucleico para GAA8

ATGGCCTTCCTGTGGCTGCTGTCTTGCTGGGCTCTGCTGGGGACCACCTTTGGCCTGCTGGTCCCCAGGGAGCTG
 TCTGGCTCTTCTCCTGTCTGGAGGAGACCCACCTGCCACCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCTGGCCCCAGGGAT
 GCCCAGGGCCACCTGGCAGGCCAGGGCTGTGCCACCCAGTGTGATGTGCCTCCCAACAGCAGGTTTGACTGT
 GCCCCTGACAAGGCCATCACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGCTGCTGCTATATCCCTGCCAAGCAGGGCCTG
 CAGGGGGCTCAGATGGGCCAGCCCTGGTGTCTTTCCCCCTCTTATCCTAGCTATAAGCTGGAGAACCTGAGC
 AGCTCTGAGATGGGGTACACTGCCACCCTGACCAGGACCACCCCACTTTCTTCCCTAAGGACATCCTGACCCTG
 AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAATAGGCTGCACTTTACTATCAAGGACCCTGCCAACAGGAGGTATGAG
 GTGCCTCTGGAGACCCCCATGTGCATTCTAGGGCCCCAGCCCCCTGTACTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAGCCC
 TTTGGGGTGATTGTGAGGAGACAGCTGGATGGCAGGGTCTGCTGAACACCACTGTGGCTCCCCGTGTTTTTGTCT
 GACCAGTTCTCTGCAGCTGAGCACCAGCCTGCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCACCTGAGCCCCCTG
 ATGCTGAGCACCAGCTGGACCAGGATCACCTGTGGAACAGGGATCTGGCTCCTACCCCTGGGGCCAACCTGTAT
 GGCTCTCACCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCATGGGGTGTTCCTGCTGAACAGCAATGCT
 ATGGATGTGGTGTGCAGCCAGCCCTGCCCTGAGCTGGAGGTCTACTGGGGCATCCTGGATGTCTACATCTTT
 CTGGGGCCTGAGCCCCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTACCTGGATGTGGTGGGCTATCCTTTTATGCCCCCTATTGG
 GGCTTGGGCTTCCACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACCAGACAGGTGGTGGAGAACATGACC
 AGGGCCCACTTCCCCCTGGATGTGCAGTGGAATGACCTGGACTACATGGACAGCAGGAGGGACTTCACCTTTAAC
 AAGGATGGCTTTAGGGACTTCCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCATCAGGGGGGCAGGAGGTACATGATGATTGTG
 GACCCAGCCATCAGCAGCTCTGGGCCTGCTGGGTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGTGTTC
 ATACCAATGAGACTGGCCAGCCCTGATTGGCAAGGTGTGGCCTGGGAGCACTGCCTTCCCTGATTTTACCAAC
 CCCACTGCCCTGGCCTGGTGGGAGGATATGGTGGCTGAGTTTCATGACCAGGTGCCCTTTGATGGCATGTGGATT
 GACATGAATGAGCCCAGCAATTTTCATCAGGGGCTCTGAGGATGGCTGCCCAACAATGAGCTGGAGAATCCTCCC
 TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACCCCTGCAGGTGCCACCATCTGTGCCTCTAGCCACCAGTTCTGAGCACC
 CACTATAACCTGCATAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCATAGAGCCCTGGTGAAGGCCAGAGGG
 ACCAGGCCCTTTGTGATCTCTAGGAGCACCTTTGTGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGACTGGGGATGTG
 TGGAGCTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCAGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGCCCTGGTG
 GGGCTGATGTGTGTGGCTTCTGGGCAATACCTCTGAAGAGCTGTGTGTGAGGTGGACTCAGCTGGGGCCTTC

TATCCCTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGCTGTCTCTGCCCCAGGAGCCCTACAGCTTCTCTGAGCCTGCTCAG
 CAGGCTATGAGGAAGGCCCTGACCCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCATCTGTACACCCTGTTCCACCAGGCCCAT
 GTGGCTGGGGAGACTGTGGCCAGGCCCCCTGTTTCTGGAGTTTCCCAAGGACAGCAGCACCTGGACTGTGGACCAT
 CAGCTGCTGTGGGGGAGGCTCTGCTGATTACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGACTGGGTACTTC
 CCCCTGGGGACTTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAAGCTCTGGGCAGCCTGCCCCACCCCTGCTGCC
 CCTAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCCCTCTGGACACCATCAATGTGCAC
 CTGAGGGCTGGCTATATCATCCCCCTGCAGGGCCCTGGGCTGACCACCCTGAGAGCAGGCAGCAGCCCATGGCC
 CTGGCTGTGGCCCTGACTAAGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGAGCCTGGAGGTG
 CTGGAGAGAGGGGCCCTACACCCAGGTGATCTTTCTGGCCAGGAACAACACCATTGTGAATGAGCTGGTGAGGGTG
 ACTTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGCAGGTGCTG
 AGCAATGGGGTGCCTGTGTCTAACTTCACCTACAGCCCTGATACTAAGGTGCTGGATATCTGTGTGAGCCTGCTG
 ATGGGGGAGCAGTTTCTGGTGAGCTGGTGCTGA

SEC ID NO:5: secuencia de ácido nucleico para GAA13

ATGGCCTTTCTGTGGCTGCTGTCTGCTGGGCCCTGCTGGGGACCACCTTTGGCCTGCTGGTGCCAGGGAGCTG
 TCTGGGAGCAGCCAGTGCTGGAGGAGACCCACCTGCCCACCAGCAGGGGGCCAGCAGGCCTGGCCCTAGGGAT
 GCCCAGGCCCCACCTGGCAGGCCCCAGGGCTGTGCCTACCCAGTGTGATGTGCCACCCAATTCTAGGTTTGACTGT
 GCTCCTGACAAGGCCATCACTCAGGAGCAGTGTGAAGCTAGGGGGTGTGCTACATCCCAGCCAAGCAGGGCCTG
 CAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGCTTTCTCCCCAGCTACCCTAGCTACAAGCTGGAGAATCTGAGC
 AGCTCTGAGATGGGCTACACTGCTACCCTGACCAGGACCCTACCTACCTTCTTCCCCAAGGACATCCTGACTCTG
 AGGCTGGATGTGATGAGAGCTGAAAATAGGCTGCACTTCACCATCAAGGACCCTGCCAATAGGAGGTATGAG
 GTGCCTCTGGAGACCCCCCATGTGCATAGCAGGGCTCCCAGCCCCCTGTATTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAGCCC
 TTTGGGGTCATTGTGAGGAGACAGCTGGATGGGAGGGTGCTGCTGAACACTACTGTGGCTCCCCCTGTTCTTTGCT
 GACCAGTTTCTGCAGCTGTCTACCAGCCTGCCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCATCTGAGCCCCCTG
 ATGCTGAGCACCAGCTGGACCAGGATCACTCTGTGGAACAGGGATCTGGCCCCCACTCCTGGGGCCAACCTGTAT
 GGGAGCCATCCCTTCTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGGCTCTGCCATGGGGTGTTCTCTGCTGAACAGCAATGCC
 ATGGATGTGGTGCTGCAGCCTAGCCCTGCCCTGAGCTGGAGGAGCACTGGGGGCATCCTGGATGTCTACATCTTC
 CTGGGGCCTGAGCCCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTATCTGGATGTGGTGGGGTATCCCTTCATGCCCCCTACTGG
 GGCCTGGGCTTTACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACCAGGCAGGTGGTGGAGAACATGACC
 AGGGCCCACTTCCCTCTGGATGTGCAGTGAATGACCTGGACTATATGGATTCTAGGAGAGACTTTACTTTTAAC
 AAGGATGGCTTCAGGGATTTCCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCACCAGGGGGGCAGGAGGTACATGATGATTGTG
 GACCCTGCTATTAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGGTCTTACAGGCCTTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGGTGTTT
 ATCACCAATGAGACTGGCCAGCCCCCTGATTGGCAAGGTGTGGCCTGGCAGCACTGCCTTCCCTGACTTCACCAAC
 CCCACTGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCCTTTGATGGGATGTGGATT
 GACATGAATGAGCCCTCTAACTTCATCAGGGGGTCTGAGGATGGCTGCCCCAACCAATGAGCTGGAGAACCCCCC
 TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACTCTGCAGGCTGCCACTATCTGTGCTTCTTCTCACCAGTTTCTGAGCACC
 CACTATAATCTGCACAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCATAGGGCCCTGGTGAAGGCCAGGGGC
 ACCAGGCCCTTTGTGATCAGCAGGTCTACCTTTGCTGGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGACTGGGGATGTG
 TGGTCTTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCTGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTG
 GGGGCTGATGTGTGTGGCTTTCTGGGCAACACCTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGGGGGCCTTT
 TACCCCTTCATGAGGAACCACAATAGCCTGCTGAGCCTGCCCCAGGAGCCTTACTCTTTCTCTGAGCCTGCCCAG
 CAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACTCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCATCTGTATACCCTGTTTCACCAGGCCCAT
 GTGGCTGGGGAGACTGTGGCTAGGCCTCTGTTTCTGGAGTTCCCTAAGGACTCTAGCACCTGGACTGTGGACCAC
 CAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATCACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGACTGGCTACTTC
 CCCCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAGGCCCTGGGGAGCCTGCCTCCCCCCCCCTGCTGCC
 CCCAGGGAGCCTGCCATTCACTTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCTCTGGACACCATCAATGTGCAC
 CTGAGGGCTGGGTACATCATCCCCCTGCAGGGCCCTGGCCTGACCACCCTGAGAGCAGGCAGCAGCCCATGGCC
 CTGGCTGTGGCTCTGACCAAGGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGTCTCTGGAGGTG
 CTGGAGAGGGGGGCCCTACACCCAGGTGATCTTTCTGGCCAGGAACAATACTATTGTGAATGAGCTGGTGAGGGTG
 ACCTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGCAGGTCTCTG
 AGCAATGGGGTGCCTGTGAGCAACTTCACCTACTCTCCTGACACCAAGGTGCTGGACATTTGTGTGTCTCTGCTG
 ATGGGGGAGCAGTTTCTGGTGAGCTGGTGCTGA

SEC ID NO:6: secuencia de ácido nucleico para GAA2 más WT BGH poli A

ATGGCTTTCCTGTGGCTGCTGAGCTGCTGGGCTCTGCTGGGCACCACCTTTGGGCTGCTGGTGCCTAGGGAGCTG
 TCTGGGTCTAGCCCTGTGCTGGAGGAGACTCACCTGCCCATCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCTGGCCCCAGGGAT
 GCTCAGGCCCACCTGGCAGGCCCAGGGCTGTGCCACCCAGTGTGATGTGCCCCCAACAGCAGGTTTGACTGT
 GCCCCTGACAAGGCCATTACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGCTGCTGCTACATTCCAGCTAAGCAGGGCCTG
 CAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGTCTTCCCCCCCCAGCTATCCTAGCTATAAACTGGAGAACCTGAGC
 AGCTCTGAGATGGGCTATACTGCCACCCTGACTAGGACTACTCCACCTTTTTTCCCTAAGGATATCCTGACCCTG
 AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAACAGGCTGCATTTCACTATTAAGGACCCTGCCAATAGGAGGTATGAA
 GTGCCTCTGGAGACTCCTCATGTGCACTCTAGGGCCCCAGCCCCCTGTATTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAGCCC
 TTTGGGGTGATTGTGAGGAGGCAGCTGGATGGCAGGGTGTGCTGCTGAACACCACTGTGGCCCCCTGTTCTTTGCT
 GACCAGTTTCTGCAGCTGAGCACCAGCCTGCCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCATCTGAGCCCTCTG
 ATGCTGAGCACCTCTTGACCAGGATCACCTGTGGAATAGGGATCTGGCCCCACCCCTGGGGCTAATCTGTAT
 GGCTCTCATCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCATGGGGTGTCTTCTGCTGAACAGCAATGCC
 ATGGATGTGGTGTGTCAGCCCTCTCCTGCCCTGAGCTGGAGGAGCACTGGGGGCATCCTGGATGTGTACATCTTC
 CTGGGCCCTGAGCCCAAGTCTGTGGTCCAGCAGTATCTGGATGTGGTGGGCTACCCCTTTATGCCCCCTATTGG
 GGCTGGGCTTCCACCTGTGCAGGTGGGGTATTCTTCTACTGCTATCACCAGGCAGGTGGTGGAGAACATGACC
 AGGGCTCACTTCCCCCTGGATGTGCAGTGGAAATGACCTGGACTATATGGACTCTAGGAGGGATTTACCTTCAAC
 AAGGATGGCTTCAGGGACTTCCCTGCTATGGTCCAGGAGCTGCATCAGGGGGCAGGAGGTACATGATGATTGTG
 GACCTGCCATCAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGCAGCTATAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGGTGTTT
 ATCTAATGAACTGGGCAGCCCCCTGATTGGCAAGGTGTGGCCTGGCTCTACTGCCTTCCCTGACTTCACCAAC
 CCCACTGCTCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCTTTTGATGGCATGTGGATT
 GACATGAATGAGCCCAGCAACTTCATCAGGGGCTCTGAGGATGGGTGCCCAATAATGAGCTGGAGAACCCCCC
 TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACCTGCAGGTGCCACTATTTGTGCCAGCTCTCACCAGTTCCTGAGCACC
 CACTACAACCTGCACAATCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCACAGGGCCCTGGTGAAGGCCAGGGGC
 ACTAGGCCCTTTGTGATCTCTAGAAGCACCTTTGCTGGCCATGGGAGGTATGCTGGCCACTGGACTGGGGATGTG
 TGGAGCTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCTGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGCCCTGGTG
 GGGGCTGATGTGTGTGGCTTCTGGGCAACACCTCTGAAGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGGGGGCCTTC
 TACCCTTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGCTGAGCCTGCCTCAGGAGCCTTACTCTTTCTCTGAGCCTGCCCAG
 CAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACCCTGAGGTATGCTCTGCTGCCCCACCTGTACACCCTGTTCCACCAGGCCAT
 GTGGCTGGGGAGACTGTGGCCAGGCCCCCTGTTCTTGAGTTTCTTAAGGATAGCAGCACCTGGACTGTGGACCAC
 CAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATTACCCCTGTGCTGCAAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGACTGGCTACTTC
 CCCCTGGGCACCTTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAAGCCCTGGGCAGCCTCCCCCCCCCTGCTGCC
 CCCAGGGAGCCTGCACTCCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCCCTGGACACCATTAAATGTGCAT
 CTGAGGGCTGGGTATATTATCCCCCTGCAGGGGCTGGGCTGACTACCCTGAGAGCAGGCAGCAGCCTATGGCC
 CTGGCTGTGGCTCTGACTAAGGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGAGCCTGGAGGTG
 CTGGAGAGGGGGGCTACACCCAGGTGATTTTCTGGCCAGGAACAACACCATTGTGAATGAGCTGGTGGGGTG
 ACCTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAAGTGAAGTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGCAGGTGCTG
 AGCAATGGGGTGCCTGTGAGCAACTTCACCTACAGCCCTGACACCAAGGTGCTGGATATTTGTGTGAGCCTGCTG
 ATGGGGGAGCAGTTCTGGTGGTGTGCTGACTCGAGAGATCTACCGGTGAATTCACCGCGGGTTTAAACTGT
 GCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC
 TGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGT
 GGGGGCTAGCTCTAGA

SEC ID NO:7: secuencia de ácido nucleico para GAA5 más WT BGH poli A

ATGGCTTTCCTGTGGCTGCTGTCTTGTGCTGGGCCCTGCTGGGGACTACCTTTGGCCTGCTGGTGGCCAGGGAACCTG
 TCTGGCTCTAGCCAGTGTGAGGAGAGCCACCTGCCCACCAGCAGGGGGCTTCTAGGCCTGGCCCCAGGGAT
 GCCCAGGCCCACCTGGCAGGCCAAGGGCTGTGCCACCCAGTGTGATGTGCCCCCAACTCTAGATTTGATTGT
 GCCCCTGATAAGGCCATCACCCAGGAGCAGTGTGAGGCTAGGGGCTGCTGCTACATCCCTGCTAAGCAGGGCCTG
 CAGGGGGCTCAGATGGGCCAGCCCTGGTGTCTTCCCCCCCCAGCTATCCCTCTTACAAGCTGGAGAATCTGAGC
 AGCTCTGAGATGGGCTACACTGCCACCCTGACCAGGACTACTCCACCTTCTTCCCCAAGGACATCTGACCCTG
 AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAACAGGCTGCATTTACCATCAAGGATCCTGCCAACAGGAGGTATGAG
 GTGCCTCTGGAGACCCCCCATGTGCACAGCAGGGCTCCTTCTCCCCTGTACTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAACCC
 TTTGGGGTGATTGTGAGGAGGCAGCTGGATGGCAGGGTCTGCTGAACACCACTGTGGCCCCCTGTTCTTTGCT
 GATCAGTTTCTGCAGCTGTCCACTTCTCTGCCTAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCACCTGAGCCCTCTG
 ATGCTGAGCACCTCTTGACTAGGATCACCTGTGGAACAGGGACCTGGCCCCACCCCTGGGGCCAACCTGTAT
 GGCAGCCACCCCTTCTATCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCATGGGGTGTCTCTGCTGAATAGCAATGCT
 ATGGATGTGGTGTGTCAGCCAGCCCTGCCCTGTCTTGAGGAGCACTGGGGGCATCCTGGATGTGTACATTTTC

CTGGGGCCTGAGCCCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTACCTGGATGTGGTGGGCTACCCCTTCATGCCTCCCTACTGG
 GGCTGGGCTTCCACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCTCTACTGCCATCACCAGGCAGGTGGTGGAGAATATGACC
 AGGGCCCACTTCCCCCTGGATGTGCAGTGGAATGACCTGGACTACATGGACTCTAGGAGGGACTTCACCTTCAAT
 AAGGATGGCTTCAGAGACTTCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCATCAGGGGGCAGGAGGTACATGATGATTGTG
 GACCCTGCCATCAGCTCTTCTGGCCCTGCTGGCTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGGTGTTT
 ATACCAATGAGACTGGGCAGCCCCCTGATTGGGAAGGTGTGGCCTGACTGCTTCCCTGACTTACCAAT
 CCTACTGCCCTGGCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCCTTTGATGGCATGTGGATT
 GACATGAATGAGCCCTCTAATTTTCATCAGGGGCTCTGAGGATGGCTGCCCCAACATGAGCTGGAGAACCCCCC
 TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACCCTGCAGGTGCCACCATCTGTGCTAGCTCTCACCAGTTCCCTGAGCACC
 CACTACAATCTGCATAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCACAGGGCCCTGGTGAAGGCTAGGGGC
 ACCAGGCCCTTTGTGATTCTAGGAGCACTTTTGTGGCCATGGCAGGTATGCTGGGCACTGGACTGGGGATGTG
 TGGTCTAGCTGGGAGCAGCTGGCTTCTTCTGTGCCTGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTG
 GGGGCTGATGTGTGTGGGTCTCTGGGCAACACTTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGGGGCCCTTC
 TACCCTTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGCTGAGCCTGCCCCAGGAGCCCTACAGCTTCTCTGAGCCTGCCAG
 CAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACCCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCACCTGTACACCCTGTTCCACCAGGCCCAT
 GTGGCTGGGGAGACTGTGGCTAGGCCTCTGTTCTTGAGTTCCCCAAGGACTCTAGCACCTGGACTGTGGACCAC
 CAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATCACTCCTGTGCTGCAGGCTGGGAAGGCTGAGGTGACTGGCTATTTT
 CCCCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAGGCCCTGGGGAGCCTGCCCCCCCCCTGCTGCC
 CCCAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCCCTCTGGATACCATCAATGTGCAC
 CTGAGGGCTGGCTACATCATTTCCCTGCAGGGCCCTGGCCTGACCCTACTGAGTCTAGGCAGCAGCCCATGGCC
 CTGGCTGTGGCCCTGACCAAGGGGGGGGAGGCTAGGGGGGAGCTGTTTTGGGATGATGGGGAGAGCCTGGAGGTG
 CTGGAGAGGGGGGGCTACACTCAGGTGATCTTCTGGCCAGGAACAATACCATTGTGAATGAGCTGGTGGGGTG
 ACCTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGCAGGTGCTG
 AGCAATGGGGTGCCTGTGAGCAACTTCACCTATAGCCCTGATACCAAGGTGCTGGATATTTGTGTGAGCCTGCTG
 ATGGGGGAGCAGTTCTGGTGGTGTGCTGACTCGAGAGATCTACCGGTGAATTACCGCGGGTTTAACTGT
 GCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC
 TGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGT
 GGGGGCTAGCTCTAGA

SEC ID NO:8: secuencia de ácido nucleico para GAA7 más WT BGH poli A

ATGGCTTTTCTGTGGCTGCTGTCTTGTGGGCTCTGCTGGGCACCACCTTTGGCCTGCTGGTGGCCAGGGAGCTG
 TCTGGCAGCAGCCCTGTGCTGGAGGAGACCCACCTGCTCATCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCTGGCCCCAGGGAT
 GCCCAGGCTCACCTGGGAGACCCAGGGCTGTGCCACTCAGTGTGATGTGCCCCAACAGCAGGTTTACTGT
 GCTCCTGACAAGGCTATACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGGTGTGCTACATTCTGCTAAGCAGGGCCTG
 CAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGTCTTCTCCCCCTCTTATCCCAGCTATAAGCTGGAGAACCTGAGC
 AGCTCTGAGATGGGTACACTGCCACCCTGACCAGGACCACTCCCACCTTCTTTCCCAAGGATATTTGACTCTG
 AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAACAGGCTGCACTTCACTATCAAGGACCTGCCAATAGGAGGTATGAG
 GTGCCCTGGAGACTCCTCATGTGCATAGCAGGGCCCTTCTCCTCTGTATTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAGCCC
 TTTGGGGTGATTGTGAGGAGGCAGCTGGATGGCAGGGTGTGCTGAACACCACTGTGGCCCCCTGTTCTTTGCT
 GACCAGTTCTTGCAGCTGAGCACTTCTCTGCCCAGCCAGTACATTACTGGGCTGGCTGAGCATCTGAGCCCCCTG
 ATGCTGAGCACCTCTTGACCAGGATCACCTGTGGAACAGGGACCTGGCCCCACTCCTGGGGCTAACCTGTAT
 GGCTCTCACCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCATGGGGTGTCTGCTGAACAGCAATGCT
 ATGGATGTGGTGCAGCCCTCTCCAGCCCTGTCTTGAGGAGCACTGGGGCATTCTGGATGTGTACATTTTCT
 CTGGGGCCTGAACCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTACCTGGATGTGGTGGGCTACCCCTTCATGCCCCCTATTGG
 GGGCTGGGGTTTACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACCAGGCAGGTGGTGGAGAACATGACC
 AGGGCCCATTTCCCCCTGGATGTGCAGTGGAATGACCTGGACTACATGGATAGCAGGAGGGATTTACCTTCAAC
 AAGGATGGCTTCAGGGACTTTCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCACCAGGGGGGCAGGAGGTATATGATGATTGTG
 GACCCTGCTATCAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGCTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGGTGTTT
 ATCACTAATGAACTGGCCAGCCTCTGATTGGCAAGGTCTGGCCTGGCTCTACTGCCTTCCCTGATTTTACTAAC
 CCCACTGCCCTGGCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGATCAGGTGCCTTTTGTGATGGCATGTGGATT
 GATATGAATGAACCAAGCAACTTCATCAGAGGCTCTGAGGATGGCTGCCCCAACATGAGCTGGAGAACCCCCC
 TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACTCTGCAGGTGCCACCATTGTGCTAGCAGCCACCAGTTCTGAGCACC
 CACTACAATCTGCACAACCTGTATGGCCTGACTGAAGCCATTGCCAGCCATAGGGCCCTGGTGAAGGCCAGGGGC
 ACTAGGCCTTTTGTGATCAGCAGGAGCACTTTTGTGGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGACTGGGGATGTG
 TGGAGCAGCTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCTGAGATTCTGCAGTTTAACTGCTGGGGGTGCCCTGGTG
 GGGGCTGATGTGTGTGGCTTCTGGGCAACACCTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGGGGCCCTT

TATCCCTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGCTGAGCCTGCCTCAGGAGCCCTACTCTTTCTCTGAGCCTGCCAG
 CAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACCCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCACCTGTATACCCTGTTCCACCAGGCCAT
 GTGGCTGGGGAGACTGTGGCCAGGCCCCCTGTTCTGGAGTTCCCCAAGGACAGCAGCACCTGGACTGTGGATCAT
 CAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATCACCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTCACTGGCTACTTC
 CCTCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAGGCTCTGGGCAGCCTGCCCCCCCCCCTGCTGCT
 CCCAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCTCCCCCTGGACACCATCAATGTGCAC
 CTGAGGGCTGGCTACATTATCCCCCTGCAGGGCCAGGGCTGACTACCCTGAGAGCAGACAGCAGCCCATGGCT
 CTGGCTGTGGCCCTGACCAAGGGGGGGAAGCTAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGAGCCTGGAGGTG
 CTGGAGAGGGGGGCTATACCCAGGTGATCTTCTGGCTAGGAACAACACCATTGTCAATGAGCTGGTGAGGGTG
 ACTTCTGAGGGGGCTGGGCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCTCCCCAGCAGGTGCTG
 AGCAATGGGGTGCCTGTGAGCAACTTCACCTACAGCCCTGACACCAAGGTGCTGGACATCTGTGTCTCTGCTG
 ATGGGGGAGCAGTTCTGGTGAGCTGGTGTGCTGACTCGAGAGATCTACCGGTGAATTCACCGCGGGTTTAAACTGT
 GCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC
 TGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGT
 GGGGGCTAGCTCTAGA

SEC ID NO:9: secuencia de ácido nucleico para GAA8 más WT BGH poli A

ATGGCCTTCTGTGGCTGCTGTCTTGCTGGGCTCTGCTGGGGACCACCTTTGGCCTGCTGGTCCCCAGGGAGCTG
 TCTGGCTCTTCTCCTGTCTTGGAGGAGACCCACCTGCCACCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCTGGCCCCAGGGAT
 GCCAGGCCACCCCTGGCAGGCCAGGGCTGTGCCACCCAGTGTGATGTGCTCCCAACAGCAGGTTTGAAGTGT
 GCCCCTGACAAGGCCATCACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGCTGCTGCTATATCCCTGCCAAGCAGGGCCTG
 CAGGGGGCTCAGATGGGCCAGCCCTGGTGTCTTCTTCCCCCTCTTATCCTAGCTATAAGCTGGAGAACCTGAGC
 AGCTCTGAGATGGGGTACACTGCCACCCTGACCAGGACCACCCCACTTTCTTCCCTAAGGACATCTGACCCTG
 AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAATAGGCTGCACTTTACTATCAAGGACCCTGCCAACAGGAGGTATGAG
 GTGCCTCTGGAGACCCCCCATGTGCATTCTAGGGCCCCAGCCCCCTGTACTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAGCCC
 TTTGGGGTGATTGTGAGGAGACAGCTGGATGGCAGGGTCTGCTGAACACCACTGTGGCTCCCCGTGTTTTTTGCT
 GACCAGTTCTGCTGAGCTGAGCACCAGCCTGCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCACCTGAGCCCCCTG
 ATGCTGAGCACCAGCTGGACCAGGATCACCCCTGTGGAACAGGGATCTGGCTCCTACCCCTGGGGCCAACCTGTAT
 GGCTCTCACCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCATGGGGTGTTCCTGCTGAACAGCAATGCT
 ATGGATGTGGTGTGTCAGCCAGCCCTGCCCTGAGCTGGAGGTCTACTGGGGGCATCCTGGATGTGTACATCTTT
 CTGGGGCCTGAGCCCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTACCTGGATGTGGTGGGCTATCCTTTTATGCCCCCTATTGG
 GGCCTGGGCTTCCACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACCAGACAGGTGGTGGAGAACATGACC
 AGGGCCCACTTCCCCCTGGATGTGCAGTGAATGACCTGGACTACATGGACAGCAGGAGGGACTTCACCTTTAAC
 AAGGATGGCTTTAGGGACTTCCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCATCAGGGGGGCAGGAGGTACATGATGATTGTG
 GACCCAGCCATCAGCAGCTCTGGGCCTGCTGGGTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGGTGTTT
 ATCACCAATGAGACTGGCCAGCCCCTGATTGGCAAGGTGTGGCCTGGGAGCACTGCCTTCCCTGATTTTACCAAC
 CCCACTGCCCTGGCCTGGTGGGAGGATATGGTGGCTGAGTTTCATGACCAGGTGCCCTTTGATGGCATGTGGATT
 GACATGAATGAGCCCAGCAATTTTCATCAGGGGCTCTGAGGATGGCTGCCCCAACAATGAGCTGGAGAATCCTCCC
 TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACCCTGCAGGCTGCCACCATCTGTGCCTCTAGCCACCAGTTCTGAGCACC
 CACTATAACCTGCATAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCATAGAGCCCTGGTGAAGGCCAGAGGG
 ACCAGGCCCTTTGTGATCTCTAGGAGCACCTTTGCTGGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGACTGGGGATGTG
 TGGAGCTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCAGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTG
 GGGGCTGATGTGTGGCTTCCCTGGGCAATACCTCTGAAGAGCTGTGTGTGAGGTGGAAGTGGAGTGGGGGCTTC
 TATCCCTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGCTGTCTTGCCCCAGGAGCCCTACAGCTTCTCTGAGCCTGCTCAG
 CAGGCTATGAGGAAGGCCCTGACCCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCATCTGTACACCCTGTTCCACCAGGCCCAT
 GTGGCTGGGGAGACTGTGGCCAGGCCCTGTTTCTGGAGTTTCCCAAGGACAGCAGCACCTGGACTGTGGACCAT
 CAGCTGCTGTGGGGGAGGCTCTGCTGATTACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGACTGGGTACTTTC
 CCCCTGGGGACTTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAAGCTCTGGGCAGCCTGCCCCACCCCTGCTGCC
 CCTAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCCCTCTGGACACCATCAATGTGCAC
 CTGAGGGCTGGCTATATCATCCCCCTGCAGGGCCCTGGGCTGACCACCACTGAGAGCAGGCAGCAGCCCATGGCC
 CTGGCTGTGGCCCTGACTAAGGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGAGCCTGGAGGTG
 CTGGAGAGAGGGGGCTACACCCAGGTGATCTTTCTGGCCAGGAACAACACCATTGTGAATGAGCTGGTGAGGGTG
 ACTTCTGAGGGGGCTGGCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGCAGGTGCTG
 AGCAATGGGGTGCCTGTGTCTAACTTCACCTACAGCCCTGATACTAAGGTGCTGGATATCTGTGTGAGCCTGCTG
 ATGGGGGAGCAGTTTCTGGTGAGCTGGTGTGCTGACTCGAGAGATCTACCGGTGAATTCACCGCGGGTTTAAACTGT
 GCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC

TGTCCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGT
GGGGGCTAGCTCTAGA

SEC ID NO:10: secuencia de ácido nucleico para GAA13 más WT BGH poli A

ATGGCCTTTCTGTGGCTGCTGTCTGCTGGGCCCTGCTGGGGACCACCTTTGGCCTGCTGGTGCCAGGGAGCTG
TCTGGGAGCAGCCCAGTGCTGGAGGAGACCCACCTGCCCCACCAGCAGGGGGCCAGCAGGCCTGGCCCTAGGGAT
GCCAGGGCCACCCCTGGCAGGGCCAGGGCTGTGCCTACCCAGTGTGATGTGCCACCCAATTCTAGGTTTGACTGT
GCTCCTGACAAGGCCATCACTCAGGAGCAGTGTGAAGCTAGGGGGTGCTGTACATCCCAGCCAAGCAGGGCCTG
CAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCCCAGCTACCTTAGCTACAAGCTGGAGAATCTGAGC
AGCTCTGAGATGGGCTACACTGCTACCTGACCAGGACCACTCCTACCTTCTTCCCCAAGGACATCCTGACTCTG
AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAAAATAGGCTGCACTTCACCATCAAGGACCCCTGCCAATAGGAGGTATGAG
GTGCCTCTGGAGACCCCCATGTGCATAGCAGGGCTCCCAGCCCCCTGTATTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAGCCC
TTTGGGGTCATTGTGAGGAGACAGCTGGATGGGAGGGTGCTGTGAACACTACTGTGGCTCCCCTGTTCTTTGCT
GACCAGTTTCTGCAGCTGTCTACCAGCCTGCCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCATCTGAGCCCCCTG
ATGCTGAGCACCAGCTGGACCAGGATCACTCTGTGGAACAGGGATCTGGCCCCACTCCTGGGGCCAACCTGTAT
GGGAGCCATCCCTTCTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGGCTCTGCCATGGGGTGTTCTCTGCTGAACAGCAATGCC
ATGGATGTGGTGCTGCAGCCTAGCCCTGCCCAGCTGGAGGAGCACTGGGGGCATCCTGGATGTCTACATCTTC
CTGGGGGCTGAGCCCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTATCTGGATGTGGTGGGTATCCCTTTCATGCCCCCTACTGG
GGCCTGGGCTTTTCACTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCATGCCATCACCAGGCAGGTGGTGGAACATGACC
AGGGCCCACTTCCCTCTGGATGTGCAGTGAATGACCTGGACTATATGGATTCTAGGAGAGACTTTACTTTTAAC
AAGGATGGCTTCAGGGATTTCCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCACCAGGGGGGCAGGAGGTACATGATGATTGTG
GACCTGCTATTAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGGTCTTACAGGCCTTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGTGTTT
ATCACC AATGAGACTGGCCAGCCCTGATTGGCAAGGTGTGGCCTGGCAGCACTGCCTTCCCTGACTTCACCAAC
CCCACTGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCCTTTGATGGGATGTGGATT
GACATGAATGAGCCCTCTAACTTCATCAGGGGGTCTGAGGATGGCTGCCCCAACAATGAGCTGGAGAACCCCCC
TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACTCTGCAGGCTGCCACTATCTGTGCTTCTTCTCACCAGTTTCTGAGCACC
CACTATAATCTGCACAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCATAGGGCCCTGGTGAAGGCCAGGGGC
ACCAGGCCCTTTGTGATCAGCAGGTCTACCTTTTGTGGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGACTGGGGATGTG
TGCTCTTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCTGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTG
GGGGCTGATGTGTGTGGCTTTCTGGGCAACACCTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGGGGGCCTTT
TACCCCTTCATGAGGAACCACAATAGCCTGCTGAGCCTGCCCCAGGAGCCTTACTCTTTCTCTGAGCCTGCCAG
CAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACTCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCATCTGTATACCCTGTTTCACCAGGCCCAT
GTGGCTGGGGAGACTGTGGCTAGGCCTCTGTTTCTGGAGTTCCTAAGGACTCTAGCACCTGGACTGTGGACCAC
CAGCTGCTGTGGGGGGAGGCCCTGCTGATCACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGACTGGCTACTTC
CCCCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAGGCCCTGGGGAGCCTGCCTCCCCCCCCCTGCTGCC
CCCAGGGAGCCTGCCATTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCTCTGGACACCATCAATGTGCAC
CTGAGGGCTGGGTACATCATCCCCCTGCAGGGCCCTGGCCTGACCACCACTGAGAGCAGGCAGCAGCCCATGGCC
CTGGCTGTGGCTCTGACCAAGGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGTCTCTGGAGGTG
CTGGAGAGGGGGGCCACACCCAGGTGATCTTTCTGGCCAGGAACAATACTATTGTGAATGAGCTGGTGAGGGTG
ACCTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGCAGGTCTCTG
AGCAATGGGGTGCCCTGTGAGCAACTTCACCTACTCTCCTGACACCAAGGTGCTGGACATTTGTGTGTCTCTGCTG
ATGGGGGAGCAGTTCTGGTGAGCTGGTGCTGACTCGAGAGATCTACCGGTGAATTCACCGCGGGTTTAACTGT
GCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC
TGTCCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGT
GGGGGCTAGCTCTAGA

SEC ID NO:11: secuencia de ácido nucleico para GAA2 más BGH poli A reducida con CpG

ATGGCTTTTCTGTGGCTGCTGAGCTGCTGGGCTCTGCTGGGCACCACCTTTGGGCTGCTGGTGCCAGGGAGCTG
TCTGGGTCTAGCCCTGTGCTGGAGGAGACTCACCTGCCCCATCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCTGGCCCCAGGGAT
GCTCAGGGCCACCCCTGGCAGGGCCAGGGCTGTGCCACCCAGTGTGATGTGCCCCCAACAGCAGGTTTGACTGT
GCCCTGACAAGGCCATTACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGCTGCTGTACATTCCAGCTAAGCAGGGCCTG
CAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCCCAGCTATCCTAGCTATAAACTGGAGAACCTGAGC
AGCTCTGAGATGGGCTATACTGCCACCCTGACTAGGACTACTCCCACCTTTTTCTTAAGGATATCCTGACCCTG
AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAACAGGCTGCACTTCACTATTAAGGACCCCTGCCAATAGGAGGTATGAA
GTGCCTCTGGAGACTCCTCATGTGCACTCTAGGGCCCCAGCCCCCTGTATTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAGCCC

TTTGGGGTGATTGTGAGGAGGCAGCTGGATGGCAGGGTGCTGCTGAACACCACTGTGGCCCCCTGTTCTTTGCT
 GACCAGTTTCTGCAGCTGAGCACCAGCCTGCCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCATCTGAGCCCTCTG
 ATGCTGAGCACCTCTTGGACCAGGATCACCTGTGGAATAGGGATCTGGCCCCACCCCTGGGGCTAATCTGTAT
 GGCTCTCATCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCATGGGGTGTCTTCTGCTGAACAGCAATGCC
 ATGGATGTGGTGCTGCAGCCCTCTCTGCCCTGAGCTGGAGGAGCACTGGGGGCATCCTGGATGTGTACATCTTC
 CTGGGCCCTGAGCCCAAGTCTGTGGTCCAGCAGTATCTGGATGTGGTGGGCTACCCCTTTATGCCCCCTATTGG
 GGCTGGGCTTCCACCTGTGCAGGTGGGGGTATTCTTCTACTGCTATCACCAGGCAGGTGGTGGAGAACATGACC
 AGGGCTCACTTCCCCCTGGATGTGCAGTGGAATGACCTGGACTATATGGACTCTAGGAGGGATTTACCTTCAAC
 AAGGATGGCTTCAGGGACTTCCCTGCTATGGTCCAGGAGCTGCATCAGGGGGGCAGGAGGTACATGATGATTGTG
 GACCTGCCATCAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGCAGCTATAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGGTGTTT
 ATCACTAATGAACTGGGCAGCCCTGATTGGCAAGGTGTGGCCTGGCTCTACTGCCTTCCCTGACTTCACCAAC
 CCCACTGCTCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCTTTTGATGGCATGTGGATT
 GACATGAATGAGCCCAGCAACTTCATCAGGGGCTCTGAGGATGGGTGCCCAATAATGAGCTGGAGAACCCCCC
 TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACCTGCAGGTGCCACTATTTGTGCCAGCTCTCACCAGTTCTGAGCACC
 CACTACAACCTGCACAATCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCACAGGGCCCTGGTGAAGGCCAGGGGC
 ACTAGGCCCTTTGTGATCTCTAGAAGCACCTTTGTGCCATGGGAGGTATGCTGGCCACTGGACTGGGGATGTG
 TGGAGCTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCTGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGCCCTGGTG
 GGGGCTGATGTGTGTGGCTTCTTGGGCAACACCTCTGAAGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGGGGGCCTTC
 TACCCCTTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGCTGAGCCTGCCTCAGGAGCCTTACTCTTTCTCTGAGCCTGCCAG
 CAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACCCTGAGGTATGCTCTGCTGCCCCACCTGTACACCCTGTTCCACCAGGCCCAT
 GTGGCTGGGGAGACTGTGGCCAGGCCCTGTTCTTGGAGTTTCTTAAGGATAGCAGCACCTGGACTGTGGACCAC
 CAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATTACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGACTGGCTACTTC
 CCCCTGGGCACTTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAAGCCCTGGGCAGCCTGCCTCCCCCCCCCTGCTGCC
 CCCAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCCCTGGACACCATTAAATGTGCAT
 CTGAGGGCTGGGTATATTATCCCCCTGCAGGGGCTGGGCTGACTACCACTGAGAGCAGGCAGCAGCCTATGGCC
 CTGGCTGTGGCTCTGACTAAGGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGAGCCTGGAGGTG
 CTGGAGAGGGGGGCCACACCCAGGTGATTTTCTTGGCCAGGAACAACACCATTGTGAATGAGCTGGTGAGGGTG
 ACCTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAAGTGAAGTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGCAGGTGCTG
 AGCAATGGGGTGCCTGTGAGCAACTTCACCTACAGCCCTGACACCAAGGTGCTGGATATTTGTGTGAGCCTGCTG
 ATGGGGGAGCAGTTCTTGGTGTGAGCTGGTGTGAAGATCTAGAGCTGAATTCTTGCAGCCAGGGGGATCAGCCTCT
 ACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCTTGCCTTCTTACCCTGGAAGGTGCCACT
 CCCACTGTCTCTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGCATCACATTGTCTGAGTAGGTGTCACTTCTATTCTGGGGGT
 GGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCAGTGGGCTCTATG
 G

SEC ID NO:12: secuencia de ácido nucleico para GAA5 más BGH poli A reducida con CpG

ATGGCTTTCTGTGGCTGCTGTCTTGCTGGGCCCTGCTGGGGACTACCTTTGGCCTGCTGGTGCCCAGGGAAGTG
 TCTGGCTCTAGCCCAGTGCTGGAGGAGACCCACCTGCCCACCAGCAGGGGGCTTCTAGGCCTGGCCCCAGGGAT
 GCCCAGGCCACCCCTGGCAGGCCAAGGGCTGTGCCACCCAGTGTGATGTGCCCCCAACTCTAGATTTGATTGT
 GCCCTGATAAGGCCATCACCCAGGAGCAGTGTGAGGCTAGGGGCTGCTGCTACATCCCTGCTAAGCAGGGCCTG
 CAGGGGGCTCAGATGGGCCAGCCCTGGTGTCTTCCCCCCCCAGCTATCCCTCTTACAAGCTGGAGAATCTGAGC
 AGCTCTGAGATGGGCTACACTGCCACCCTGACCAGGACTACTCCCACCTTCTTCCCCAAGGACATCCTGACCCTG
 AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAACAGGCTGCATTTACCACATCAAGGATCCTGCCAACAGGAGGTATGAG
 GTGCCTCTGGAGAGCCCCATGTGCACAGCAGGGCTCCTTCTCCCCTGTACTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAACCC
 TTTGGGGTGATTGTGAGGAGGCAGCTGGATGGCAGGGTCTGCTGAACACCCTGTGGCCCCCTGTTCTTTGCT
 GATCAGTTTCTGCAGCTGTCCACTTCTCTGCCTAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCACCTGAGCCCTCTG
 ATGCTGAGCACCTCTTGGACTAGGATCACCTGTGGAACAGGGACCTGGCCCCCACCCTGGGGCCAACCTGTAT
 GGCAGCCACCCCTTCTATCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCATGGGGTGTCTCTGCTGAATAGCAATGCT
 ATGGATGTGGTGTGTCAGCCAGCCCTGCCCTGTCTTGGAGGAGCACTGGGGGCATCCTGGATGTGTACATTTTC
 CTGGGGCCTGAGCCCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTACCTGGATGTGGTGGGCTACCCCTTCATGCCTCCCTACTGG
 GGCTGGGCTTCCACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCTCTACTGCCATCACCAGGCAGGTGGTGGAGAATATGACC
 AGGGCCCACTTCCCCCTGGATGTGCAGTGGAATGACCTGGACTACATGGACTCTAGGAGGGACTTCACCTTCAAT
 AAGGATGGCTTCAGAGACTTCCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCATCAGGGGGGCAGGAGGTACATGATGATTGTG
 GACCTGCCATCAGCTCTTCTGGCCCTGCTGGCTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGGTGTTT
 ATACCAATGAGACTGGGCAGCCCCCTGATTGGGAAGGTGTGGCCTGGCTCTACTGCCTTCCCTGACTTCACCAAT
 CCTACTGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCCTTTGATGGCATGTGGATT

GACATGAATGAGCCCTCTAATTTTCATCAGGGGCTCTGAGGATGGCTGCCCCAACAAATGAGCTGGAGAACCCCCC
TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACCCTGCAGGCTGCCACCATCTGTGCTAGCTCTCACCAGTTCCCTGAGCACC
CACTACAATCTGCATAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCACAGGGCCCTGGTGAAGGCTAGGGGC
ACCAGGCCCTTTGTGATTCTTAGGAGCACTTTTGTGCCCATGGCAGGTATGCTGGGCACTGGACTGGGGATGTG
TGGTCTAGCTGGGAGCAGCTGGCTTCTTCTGTGCCTGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTG
GGGGCTGATGTGTGTGGGTTCTTGGGCAACACTTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGGGGGCCTTC
TACCCTTTTCATGAGGAACCAACAGCCTGCTGAGCCTGCCCCAGGAGCCCTACAGCTTCTCTGAGCCTGCCCAG
CAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACCCTGAGGTATGCCTGCTGCCCCACCTGTACACCCTGTTCCACCAGGCCCAT
GTGGCTGGGGAGACTGTGGCTAGGCCTCTGTTCTTGGAGTTCCCCAAGGACTCTAGCACCTGGACTGTGGACCAC
CAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATCACTCCTGTGCTGCAGGCTGGGAAGGCTGAGGTGACTGGCTATTTTC
CCCCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAGGCCCTGGGGAGCCTGCCCCCCCCCCTGCTGCC
CCCAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCTCTGGATACCATCAATGTGCAC
CTGAGGGCTGGCTACATCATTTCCCCTGCAGGGCCCTGGCCTGACCACTACTGAGTCTAGGCAGCAGCCCATGGCC
CTGGCTGTGGCCCTGACCAAGGGGGGGGAGGCTAGGGGGGAGCTGTTTTGGGATGATGGGGAGAGCCTGGAGGTG
CTGGAGAGGGGGGCTTACACTCAGGTGATCTTCTTGGCCAGGAACAATACCATTGTGAATGAGCTGGTGAGGGTG
ACCTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGCAGGTGCTG
AGCAATGGGGTGCCTGTGAGCAACTTCACCTATAGCCCTGATACCAAGGTGCTGGATATTTGTGTGAGCCTGCTG
ATGGGGGAGCAGTTCTTGTGAGCTGGTGTGAAGATCTAGAGCTGAATTCTGCAGCCAGGGGGATCAGCCTCT
ACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCTTGCCTTCTTACCCTGGAAGGTGCCACT
CCCCTGTCTCTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGCATCAGATTGTCTGAGTAGGTGTCACTTCTATTCTGGGGGT
GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCAGTGGGCTCTATG
G

SEC ID NO:13: secuencia de ácido nucleico para GAA7 más BGH poli A reducida con CpG

ATGGCTTTCTGTGGCTGCTGTCTTGTGGGCTCTGCTGGGCACCACCTTTGGCCTGCTGGTGCCAGGGAGCTG
TCTGGCAGCAGCCCTGTGCTGGAGGAGACCCACCTGCTCATCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCTGGCCCCAGGGAT
GCCAGGCTCACCTGGGAGACCCAGGGCTGTGCCACTCAGTGTGATGTGCCCCAACAGCAGGTTTGACTGT
GCTCCTGACAAGGCTATCACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGTGCTGCTACATTCTGCTAAGCAGGGCCTG
CAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGTCTTCTCCCCCTCTTATCCCAGCTATAAGCTGGAGAACCTGAGC
AGCTCTGAGATGGGCTACACTGCCACCCTGACCAGGACCACTCCCACCTTCTTCCCAAGGATATTCTGACTCTG
AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAACAGGCTGCACTTCACTATCAAGGACCCTGCCAATAGGAGGTATGAG
GTGCCCCCTGGAGACTCCTCATGTGCATAGCAGGGCCCTTCTCCTCTGTATTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAGCCC
TTTGGGGTGATTGTGAGGAGGCAGCTGGATGGCAGGGTGCTGCTGAACACCCTGTGGCCCCCTGTTCTTTGCT
GACCAGTTCTCTGCAGCTGAGCACTTCTCTGCCCAGCCAGTACATTACTGGGCTGGCTGAGCATCTGAGCCCCCTG
ATGCTGAGCACCTCTTGGACCAGGATCACCTGTGGAACAGGGACCTGGCCCCCACTCCTGGGGCTAACCTGTAT
GGCTCTCACCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCATGGGGTGTTTCTGCTGAACAGCAATGCT
ATGGATGTGGTGTGTCAGCCCTCTCCAGCCCTGTCTTGGAGGAGCACTGGGGGCATTCTGGATGTGTACATTTTC
CTGGGGCCTGAACCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTACCTGGATGTGGTGGGCTACCCCTTCATGCCCCCTATTGG
GGGCTGGGGTTTACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACAGGCAGGTGGTGGAGAACATGACC
AGGGCCCATTTCCCCCTGGATGTGCAGTGAATGACCTGGACTACATGGATAGCAGGAGGGATTTACCTTCAAC
AAGGATGGCTTCAGGGACTTCTCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCACCAGGGGGCAGGAGGTATATGATGATTGTG
GACCCTGCTATCAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGCTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGTGTTC
ATCACTAATGAACTGGCCAGCCTCTGATTGGCAAGGTCTGGCCTGGCTCTACTGCCTTCCCTGATTTTACTAAC
CCACTGCCCTGGCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGATCAGGTGCCTTTTATGATGGCATGTGGATT
GATATGAATGAACCAAGCAACTTCATCAGAGGCTCTGAGGATGGCTGCCCCAACAAATGAGCTGGAGAACCCCCC
TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACTCTGCAGGCTGCCACCATTGTGTGCTAGCAGCCACCAGTTCTCTGAGCACC
CACTACAATCTGCACAACCTGTATGGCCTGACTGAAGCCATTGCCAGCCATAGGGCCCTGGTGAAGGCCAGGGGC
ACTAGGCCTTTTGTGATCAGCAGGAGCACTTTTGTGCCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGACTGGGGATGTG
TGGAGCAGCTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCTGAGATTCTGCAGTTTAACTGCTGGGGGTGCCCTGGTG
GGGGCTGATGTGTGTGGCTTCTTGGGCAACACCTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGGGGGCCTTT
TATCCCTTCATGAGGAACCAACAGCCTGCTGAGCCTGCCTCAGGAGCCCTACTCTTTCTCTGAGCCTGCCCAG
CAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACCCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCACCTGTATACCCTGTTCCACCAGGCCCAT
GTGGCTGGGGAGACTGTGGCCAGGCCCTGTTCTTGGAGTTCCCCAAGGACAGCAGCACCTGGACTGTGGATCAT
CAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATCACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTCACTGGCTACTTC
CCTCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAGGCTCTGGGCAGCCTGCCCCCCCCCCTGCTGCT
CCCAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCTCCCCTGGACACCATCAATGTGCAC

CTGAGGGCTGGCTACATTATCCCCCTGCAGGGGCCAGGGCTGACTACCACTGAGAGCAGACAGCAGCCCATGGCT
 CTGGCTGTGGCCCTGACCAAGGGGGGGGAAGCTAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGAGCCTGGAGGTG
 CTGGAGAGGGGGGCCATATACCCAGGTGATCTTCCTGGCTAGGAACAACACCATTGTCAATGAGCTGGTGAGGGTG
 ACTTCTGAGGGGGCTGGGCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCTCCCCAGCAGGTGCTG
 AGCAATGGGGTGCCTGTGAGCAACTTCACCTACAGCCCTGACACCAAGGTGCTGGACATCTGTGTCTCTGCTG
 ATGGGGGAGCAGTTCCTGGTGAGCTGGTGCTGAAGATCTAGAGCTGAATTCCTGCAGCCAGGGGGATCAGCCTCT
 ACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCTTGCCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACT
 CCCACTGTCCTTTCCATAAAATGAGGAAATTGCATCACATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGT
 GGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCAGTGGGCTCTATG
 G

SEC ID NO:14: secuencia de ácido nucleico para GAA8 más BGH poli A reducida con CpG

ATGGCCTTCCTGTGGCTGCTGTCTTGCTGGGCTCTGCTGGGGACCACCTTTGGCCTGCTGGTCCCCAGGGAGCTG
 TCTGGCTCTTCTCCTGTCTGGAGGAGACCCACCTGCCCACCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCTGGCCCCAGGGAT
 GCCCAGGGCCACCTGGCAGGGCCAGGGCTGTGCCACCCAGTGTGATGTGCCTCCCAACAGCAGGTTTGACTGT
 GCCCTGACAAGGCCATCACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGCTGCTGCTATATCCCTGCCAAGCAGGGCCTG
 CAGGGGGCTCAGATGGGCCAGCCCTGGTGCTTCTTTCCCCCTCTTATCCTAGCTATAAGCTGGAGAACCTGAGC
 AGCTCTGAGATGGGGTACACTGCCACCCTGACCAGGACCACCCCACTTTCTTCCCTAAGGACATCCTGACCCTG
 AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAATAGGCTGCACTTTACTATCAAGGACCCTGCCAACAGAGGTATGAG
 GTGCCTCTGGAGACCCCCCATGTGCATTCTAGGGCCCCCAGCCCCCTGTACTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAGCCC
 TTTGGGGTGATTGTGAGGAGACAGCTGGATGGCAGGGTCTGCTGAACACCACTGTGGCTCCCCCTGTTTTTTGCT
 GACCAGTTTCTGCAGCTGAGCACCAGCCTGCCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCACCTGAGCCCCCTG
 ATGCTGAGCACCAGCTGGACCAGGATCACCTGTGGAACAGGGATCTGGCTCCTACCCCTGGGGCCAACCTGTAT
 GGCTCTCACCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGGCTCTGCCCATGGGGTGTTCTGCTGAACAGCAATGCT
 ATGGATGTGGTGTGTCAGCCAGCCCTGCCCTGAGCTGGAGGTCTACTGGGGGCATCCTGGATGTGTACATCTTT
 CTGGGGCCTGAGCCCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTACCTGGATGTGGTGGGCTATCCTTTTATGCCCCCTATTGG
 GGCTGGGCTTCCACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACCAGACAGGTGGTGGAGAACATGACC
 AGGGCCCACTTCCCCCTGGATGTGCAGTGGAAATGACCTGGACTACATGGACAGCAGGAGGGACTTCACCTTTAAC
 AAGGATGGCTTTAGGGACTTCCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCATCAGGGGGGCAGGAGGTACATGATGATTGTG
 GACCCAGCCATCAGCAGCTCTGGGCCTGCTGGGTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGGTGTTT
 ATACCAATGAGACTGGCCAGCCCCCTGATTGGCAAGGTGTGGCCTGGGAGCACTGCCTTCCCTGATTTTACCAAC
 CCCACTGCCCTGGCCTGGTGGGAGGATATGGTGGCTGAGTTTCATGACCAGGTGCCCTTTGATGGCATGTGGATT
 GACATGAATGAGCCCAGCAATTTTCATCAGGGGCTCTGAGGATGGCTGCCCCAACAAATGAGCTGGAGAATCCTCCC
 TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACCTGCAGGTGCCACCATCTGTGCCTCTAGCCACCAGTTTCTGAGCACC
 CACTATAACCTGCATAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCATAGAGCCCTGGTGAAGGCCAGAGGG
 ACCAGGCCCTTTGTGATCTCTAGGAGCACCTTTGCTGGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGACTGGGGATGTG
 TGGAGCTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCAGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTG
 GGGGCTGATGTGTGTGGCTTCTGGGCAATACCTCTGAAGAGCTGTGTGTGAGGTGGACTCAGCTGGGGGCCTTC
 TATCCCTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGCTGTCTCTGCCCCAGGAGCCCTACAGCTTCTCTGAGCCTGCTCAG
 CAGGCTATGAGGAAGGCCCTGACCCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCATCTGTACACCCTGTTCCACCAGGCCAT
 GTGGCTGGGGAGACTGTGGCCAGGCCCTGTTTCTGGAGTTTCCCAAGGACAGCAGCACCTGGACTGTGGACCAT
 CAGCTGCTGTGGGGGAGGCTCTGCTGATTACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGACTGGGTACTTC
 CCCCTGGGGACTTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAAGCTCTGGGCAGCCTGCCCCACCCCTGCTGCC
 CTTAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCCCTCTGGACACCATCAATGTGCAC
 CTGAGGGGCTGGCTATATCATCCCCCTGCAGGGCCCTGGGCTGACCACCCTGAGAGCAGGACAGCCCATGGCC
 CTGGCTGTGGCCCTGACTAAGGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGAGCCTGGAGGTG
 CTGGAGAGAGGGGCCCTACACCCAGGTGATCTTTCTGGCCAGGAACAACACCATTGTGAATGAGCTGGTGGGGTG
 ACTTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGCAGGTGCTG
 AGCAATGGGGTGCCTGTGTCTAACTTCACCTACAGCCCTGATACTAAGGTGCTGGATATCTGTGTGAGCCTGCTG
 ATGGGGGAGCAGTTTCTGGTGAGCTGGTGCTGAAGATCTAGAGCTGAATTCCTGCAGCCAGGGGGATCAGCCTCT
 ACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCTTGCCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACT
 CCCACTGTCCTTTCCATAAAATGAGGAAATTGCATCACATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGT
 GGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCAGTGGGCTCTATG
 G

SEC ID NO:15: secuencia de ácido nucleico para GAA13 más BGH poly A reducida con CpG

ATGGCCTTTCTGTGGCTGCTGTCTGCTGGGCCCTGCTGGGGACCACCTTTGGCCTGCTGGTGCCAGGGAGCTG
TCTGGGAGCAGCCCAGTGCTGGAGGAGACCCACCTGCCCACCAGCAGGGGGCCAGCAGGCCTGGCCCTAGGGAT
GCCCAGGCCCACCTTGGCAGGCCCAGGGCTGTGCCTACCCAGTGTGATGTGCCACCCAATTCTAGGTTTGACTGT
GCTCCTGACAAGGCCATCACTCAGGAGCAGTGTGAAGCTAGGGGGTGCTGCTACATCCCAGCCAAGCAGGGCCTG
CAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCCCAGCTACCCTAGCTACAAGCTGGAGAATCTGAGC
AGCTCTGAGATGGGCTACACTGCTACCCTGACCAGGACCACTCCTACCTTCTTCCCCAAGGACATCCTGACTCTG
AGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAAAATAGGCTGCACTTCACCATCAAGGACCCTGCCAATAGGAGGTATGAG
GTGCCTCTGGAGACCCCCATGTGCATAGCAGGGCTCCCAGCCCCCTGTATTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAGCCC
TTTGGGGTCATTGTGAGGAGACAGCTGGATGGGAGGGTGCTGCTGAACACTACTGTGGCTCCCCTGTTCTTTGCT
GACCAGTTTCTGCAGCTGTCTACCAGCCTGCCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCATCTGAGCCCCCTG
ATGCTGAGCACCAGCTGGACCAGGATCACTCTGTGGAACAGGGATCTGGCCCCACTCCTGGGGCCAACCTGTAT
GGGAGCCATCCCTTCTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCATGGGGTGTTCTGCTGAACAGCAATGCC
ATGGATGTGGTGCTGCAGCCTAGCCCTGCCCTGAGCTGGAGGAGCACTGGGGGCATCCTGGATGTCTACATCTTC
CTGGGGCCTGAGCCCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTATCTGGATGTGGTGGGGTATCCCTTCATGCCCCCTACTGG
GGCCTGGGCTTTACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACCAGGCAGGTGGTGGAGAACATGACC
AGGGCCCCTTCCCTCTGGATGTGCAGTGAATGACCTGGACTATATGGATTCTAGGAGAGACTTTACTTTTAAC
AAGGATGGCTTCAGGGATTTCCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCACCAGGGGGCAGGAGGTACATGATGATTGTG
GACCTGCTATTAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGGTCTTACAGGCCTTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGGTGTTT
ATACCAATGAGACTGGCCAGCCCCCTGATTGGCAAGTGTGGCCTGGCAGCACTGCCTTCCCTGACTTCACCAAC
CCCCTGCCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCATGACCAGGTGCCCTTTGATGGGATGTGGATT
GACATGAATGAGCCCTCTAACTTCATCAGGGGGTCTGAGGATGGCTGCCCCAACAAATGAGCTGGAGAACCCCCC
TATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACTCTGCAGGCTGCCACTATCTGTGCTTCTTCTCACCAGTTTCTGAGCACC
CACTATAATCTGCACAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCATAGGGCCCTGGTGAAGGCCAGGGG
ACCAGGCCCTTTGTGATCAGCAGGTCTACCTTTGCTGGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGACTGGGGATGTG
TGGTCTTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCTGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTG
GGGGCTGATGTGTGTGGCTTTCTGGGCAACACCTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGGGGCCTTT
TACCCCTTCATGAGGAACCACAATAGCCTGCTGAGCCTGCCCCAGGAGCCTTACTCTTTCTCTGAGCCTGCCAG
CAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACTCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCATCTGTATACCCTGTTTCACCAGGCCAT
GTGGCTGGGGAGACTGTGGCTAGGCCTCTGTTTCTGGAGTTCCCTAAGGACTCTAGCACCTGGACTGTGGACCAC
CAGCTGCTGTGTGGGGAGGCCCTGCTGATCACCCCTGTGCTGAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGACTGGCTACTTC
CCCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAGGCCCTGGGGAGCCTGCCTCCCCCCTGCTGCC
CCAGGGAGCCTGCCATTCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCTCTGGACACCATCAATGTGCAC
CTGAGGGCTGGGTACATCATCCCCCTGCAGGGCCCTGGCCTGACCACCACTGAGAGCAGGCAGCAGCCCATGGCC
CTGGCTGTGGCTCTGACCAAGGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGTCTCTGGAGGTG
CTGGAGAGGGGGGCTACACCCAGGTGATCTTTCTGGCCAGGAACAATACTATTGTGAATGAGCTGGTGAGGGTG
ACCTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGCAGGTCTG
AGCAATGGGGTGCTGTGAGCAACTTCACCTACTCTCCTGACACCAAGGTGCTGGACATTTGTGTGTCTCTGCTG
ATGGGGGAGCAGTTTCTGGTGAGCTGGTGCTGAAGATCTAGAGCTGAATTCCTGCAGCCAGGGGGATCAGCCTCT
ACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCTTGCCTTCTTGAACCTGGAAGGTGCCACT
CCCACTGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGCATCACATTGTCTGAGTAGGTGTCACTTCTATTCTGGGGGGT
GGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCAGTGGGCTCTATG
G

>pAAV-ApoE/hAAT.fixUTR.GAA13.BGH (SEC ID NO:16)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTG
GCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCTAG
TAGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTCTGGGCTCACCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCTATCCTCGAGCAG
CTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAACATT
GCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTGAGAGACCTCT
CTGGGGCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGGAAATTTCCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGCTCTGGCG
TGTTTATAGGTAGTGTGAGAGGGGTACCCGGGGATCTTGTCTACCAGTGGAAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAG
AGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGA
CGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAG
CGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGGCACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGG

GGTGACCTTGGTTAATATTACACAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGA
CAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACCTGACCTGGGACAGTGAATACCACCTTTCACAATCTGCTAGC
GTTTAAACGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGACCCCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTCTATGGT
TAAGTTTCATGTCTATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACACATATTGACCAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTA
ATTTTAAAAAATGCTTCTTCTTTTAAATATACTTTTTTGTATTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTC
TTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTCGACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGT
TAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATATTG
CTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTCTGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCC
AAGCTAGGCCCTTTTGTCAATCTTGTTCATACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACCTGCTGGTCTC
TCTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGCAGCGTGCCACCATGGCCTTTCTGTGGCTGCTGTCTGCTGGGCCCTG
CTGGGGACCACCTTTGGCCTGCTGGTGCCAGGGAGCTGTCTGGGAGCAGCCAGTGTGGAGGAGACCCACCT
GCCCACAGCAGGGGGCAGCAGGCCCTGGCCCTAGGGATGCCAGGCCACCTGGCAGGCCAGGCTGTGCCT
ACCCAGTGTGATGTGCCACCCAATTCTAGGTTTGTGCTGTCTGCTGACAAGGCCATCACTCAGGAGCAGTGTGAA
GCTAGGGGGTGCTGTACATCCCAGCCAAGCAGGGCCTGCAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGTCTTCTC
CCCCCAGCTACCCTAGCTACAAGCTGGAGAATCTGAGCAGCTCTGAGATGGGCTACACTGCTACCCTGACCAGG
ACCACTCCTACCTTCTTCCCAAGGACATCCTGACTCTGAGGCTGGATGTCTGATGGAGACTGAAAATAGGCTG
CACTTCACCATCAAGGACCTGCCAATAGGAGGTATGAGGTGCCTCTGGAGACCCCCCATGTGCATAGCAGGGCT
CCCAGCCCCCTGTATTCTGTGGAGTTCTCTGAGGAGCCCTTTGGGGTCATTGTGAGGAGACAGCTGGATGGGAGG
GTGCTGCTGAACACTACTGTGGCTCCCCTGTTCTTTGCTGACCAGTTCCTGCAGCTGTCTACCAGCCTGCCAGC
CAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCATCTGAGCCCCCTGATGCTGAGCACCAGCTGGACCAGGATCACTCTGTGG
AACAGGGATCTGGGCCCACTCCTGGGGCCAACTGTATGGGAGCCATCCCTTCTACCTGGCCCTGGAGGATGGG
GGCTCTGCCCATGGGGTGTTCTCTGCTGAACAGCAATGCCATGGATGTGGTGCTGCAGCCTAGCCCTGCCCTGAGC
TGGAGGAGCACTGGGGGCATCCTGGATGTCTACATCTTCTGGGGCCTGAGCCCAAGTCTGTGGTGACGAGTAT
CTGGATGTGGTGGGGTATCCCTTCATGCCCCCTACTGGGGCCTGGGCTTTCACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGC
AGCACTGCCATCACCAGGCAGGTGGTGGAGAACATGACCAGGGCCCACTTCCCTCTGGATGTGCAGTGGAATGAC
CTGGACTATATGATTCTAGGAGAGACTTTACTTTTAAACAAGGATGGCTTCAGGGATTTCCCTGCCATGGTGCAG
GAGCTGCACCAGGGGGGAGGAGGTACATGATGATTGTGGACCCTGCTATTAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGGTCT
TACAGGCCTTATGATGAGGGCCTGAGGAGGGGGGTGTTTCATCACCATGAGACTGGCCAGCCCCCTGATTGGCAAG
GTGTGGCCTGGCAGCACTGCCTTCCCTGACTTCACCAACCCCACTGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCT
GAGTTCCTATGACCAGGTGCCCTTTGATGGGATGTGGATGACATGAATGAGCCCTCTAATCTCATCAGGGGCTCT
GAGGATGGCTGCCCAACAATGAGCTGGAGAACCCCTATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGCACTCTGCAGGCT
GCCACTATCTGTGCTTCTTCTCACCAGTTTCTGAGCACCACCTATAATCTGCACAACCTGTATGGCCTGACTGAG
GCCATTGCCAGCCATAGGGCCCTGGTGAAGGCCAGGGGCACCAGGCCCTTTGTGATCAGCAGGTCTACCTTTGCT
GGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGACTGGGGATGTGTGGTCTTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCT
GAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGCCTCTGGTGGGGGCTGATGTGTGTGGCTTTCTGGGCAACACCTCT
GAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGGGGGCCCTTTTACCCCTTCATGAGGAACCACAATAGCCTGCTGAGC
CTGCCCCAGGAGCCTTACTCTTTCTCTGAGCCTGCCAGCAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACTCTGAGGTATGCC
CTGCTGCCCCATCTGTATACCCTGTTTCACCAGGCCATGTGGCTGGGGAGACTGTGGCTAGGCCCTCTGTTTCTG
GAGTTCCTTAAGGACTCTAGCACCTGGACTGTGGACCACCACTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATCACCCT
GTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGACTGGCTACTTCCCCCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCT
GTGGAGGCCCTGGGGAGCCTGCCTCCCCCCCCCTGCTGCCCCAGGGAGCCTGCCATTCTGAGGGCCAGTGG
GTGACCCTGCCTGCCCTCTGGACACCATCAATGTGCACCTGAGGGCTGGGTACATCATCCCCCTGCAGGGCCCT
GGCCTGACCACCACTGAGAGCAGGCAGCAGCCATGGCCCTGGCTGTGGCTCTGACCAAGGGGGGGGAGGCCAGG
GGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGTCTCTGGAGGTGCTGGAGAGGGGGGCTACACCCAGGTGATCTTTCTG
GCCAGGAACAATACTATTGTGAATGAGCTGGTGGGGTGACCTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTG
ACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGCAGGTCTGAGCAATGGGGTGCTGTGAGCAACTTCACCTACTCT
CCTGACACCAAGGTGCTGGACATTTGTGTGTCTCTGCTGATGGGGGAGCAGTTCTGGTGGAGCTGGTGTGAAGA
TCTAGAGCTGAATTCCTGCAGCCAGGGGATCAGCCTCTACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC
CCCTCCCCCTTGCCCTTGGACCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTCTTAATAAAATGAGGAATTGCA
TCACATTGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTATTTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA
GACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCAGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCAGAAAGAACAGCTGGGGCTCGAGA
TCCACTAGGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGC
CGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGAGCTGCCT
GCAGG

>pAAV-ApoE/hAAT.GAA13.BGH (SEC ID NO:17)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTC
GCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCCTAG
TAGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCCTGCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCTATCTCCAGCAG
CTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAACATT
GCAAGCAGCAACAGCAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTGAGAGACCTCT

CTGGGCCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGGAAATTTCCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCTTGGCG
TGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGTACCCGGGGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAG
AGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGA
CGCTGTGGTTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCCGGTAAGTGCAGTGGAGCTGTACACTGCCAGGCAAAG
CGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGG
GGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGA
CAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACAGTGAATAGATCCTGAGAATTCAGGGTG
AGTCTATGGGACCCCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTTCATAGGAAGGGGAGAAGT
AACAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATA
TACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCA
TGCTCTTTTGCACCATTTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGCAATAGCAATATTTCTGCATATAA
ATATTTCTGCATATAAATGTAACTGATGTAAGAGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCAATT
CTGCTTTTATTTTCTGGTTGGGATAAGGCTGGATTATCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCTGTGTCA
TACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACCTGCTGGTCTCTCTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGCAC
GCGTGCCACCATGGCCTTTCTGTGGCTGCTGTCTGCTGGGCCCTGCTGGGGACCACCTTTGGCCTGCTGGTGCC
CAGGGAGCTGTCTGGGAGCAGCCCAGTGCTGGAGGAGACCCACCCTGCCACCAGCAGGGGGCCAGCAGGCCTGG
CCCTAGGGATGCCAGGCCACCCTGGCAGGCCAGGGCTGTGCCTACCCAGTGTGATGTGCCACCCAATTCTAG
GTTTGAAGTGTGCTCCTGACAAGGCCATCACTCAGGAGCAGTGTGAAGCTAGGGGGTGCTGCTACATCCCAGCCAA
GCAGGGCCTGCAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCCCCCCAGCTACCCTAGCTACAAGCTGGA
GAATCTGAGCAGCTCTGAGATGGGCTACACTGCTACCCTGACCAGGACCCTCTACCTTCTTCCCCAAGGACAT
CCTGACTCTGAGGCTGGATGTGATGAGAGCTGAAAATAGGCTGCACCTTACCATCAAGGACCCTGCCAATAG
CAGGTATGAGGTGCCCTTGGAGACCCCCATGTGCATAGCAGGGCTCCCAGCCCCCTGTATTCTGTGGAGTTCTC
TGAGGAGCCCTTTGGGGTCATTGTGAGGAGACAGCTGGATGGGAGGGTGCTGCTGAACACTACTGTGGCTCCCCCT
GTTCTTTGCTGACCAGTTCTGCAGCTGTCTACCAGCCTGCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCATCT
GAGCCCCCTGATGCTGAGCACCAGCTGGACCAGGATCACTCTGTGGAACAGGGATCTGGCCCCCACTCTGGGGC
CAACCTGTATGGGAGCCATCCCTTCTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGGCTCTGCCCATGGGGTGTTCTGCTGAA
CAGCAATGCCATGGATGTGGTGCTGCAGCCTAGCCCTGCCCTGAGCTGGAGGAGCACTGGGGGCATCCTGGATGT
CTACATCTTCTGGGGCTGAGCCCAAGTCTGTGGTGCGAGCAGTATCTGGATGTGGTGGGGTATCCCTTCATGCC
CCCCTACTGGGGCTGGGCTTTCACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACCAGGCAGGTGGTGGA
GAACATGACCAGGGCCACTTCCCTCTGGATGTGAGTGGAAATGACCTGGACTATATGGATTCTAGGAGAGACTT
TACTTTTAAACAAGGATTTTCAGGGATTTCCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCACCAGGGGGCAGGAGGTACAT
GATGATTGTGGACCTGCTATTAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGGTCTTACAGGCCTTATGATGAGGGCCTGAGGAG
GGGGGTGTTTCATACCAATGAGACTGGCCAGCCCTGATTGGCAAGGTGTGGCTGGCAGCACTGCCTTCCCTGA
CTTCACCAACCCCACTGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCATGACCAGGTGCCCTTTGATGG
GATGTGGATTGACATGAATGAGCCCTCTAATTTCAATCAGGGGGTCTGAGGATGGCTGCCCAACAATGAGCTGGA
GAACCCCCCCTATGTGCCCTGGGGTGGTGGGGGGCACTCTGCAGGCTGCCACTATCTGTGCTTCTTCTCACCAGTT
TCTGAGCACCCTATAATCTGCACAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCATAGGGCCCTGGTGAA
GGCCAGGGGCACAGGCCCTTTGTGATCAGCAGGTCTACCTTTGCTGGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGAC
TGGGGATGTGGTCTTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGGCTGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGT
GCTCTGGTGGGGGCTGATGTGTGTGGCTTTCTGGGCAACACCTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGAGCCAGCT
GGGGGCTTTTACCCCTTCATGAGGAACCACAATAGCCTGCTGAGCCTGCCCCAGGAGCCTTACTCTTTCTCTGA
GCCTGCCCAGCAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACTCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCATCTGTATACCCTGTTTCA
CCAGGGCCATGTGGCTGGGAGACTGTGGCTAGGCCTCTGTTTCTGGAGTTCCCTAAGGACTCTAGCACCTGGAC
TGTGGACCACCAGCTGCTGTGGGGGGAGGCCCTGCTGATCACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGAC
TGGCTACTTCCCCCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAGGCCCTGGGGAGCCTGCCTCCCCC
CCCTGCTGCCCCCAGGGAGCCTGCCATTCTTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCCCTCTGGACACCAT
CAATGTGCACCTGAGGGCTGGGTACATCATCCCCCTGCAGGGCCCTGGCTGACCACCCTGAGAGCAGGCAGCA
CCCCATGGCCCTGTGGCTCTGACCAAGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGTC
TCTGGAGGTCTGGAGAGGGGGGCCCTACACCCAGGTGATCTTTCTGGCCAGGAACAATACTATTGTGAATGAGCT
GGTGAGGGTGACCTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCA
GCAGGTCTGAGCAATGGGGTGCCTGTGAGCAACTTACCTACTCTCCTGACACCAAGGTGCTGGACATTTGTGT
GTCTCTGCTGATGGGGGAGCAGTTCTTGGTGGTGGTGGTGAAGATCTAGAGCTGAATTCCTGCAGCCAGGGGG
ATCAGCCTCTACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCTTGCTTCTTGTACCTGGA
AGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTCATCACATTTGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTAT
TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCAGT
GGGCTCTATGGCTTCTGAGGCAGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGAGATCCACTAGGGCCGACGGAACCCCTAGTGA
TGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCCCCGACGCCCGG
GCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

>pAAV-ApoE/hAAT.GAA7.BGH (SEC ID NO:18)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTC
 GCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCTGCGGCCTAG
 TAGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCTCCATCTCCAGCAG
 CTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAAACATT
 GCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTGAGAGACCTCT
 CTGGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATTTTCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCTGGCG
 TGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGTACCCGGGGATCTTGTACCAGTGGAAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAG
 AGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGA
 CGCTGTGGTTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAG
 CGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGTCTCTCCGATAACTGG
 GGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGA
 CAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCTGACCTGGGACAGTGAATAGATCCTGAGAACCTCAGGGTG
 AGTCTATGGGACCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTATAGGAAGGGGAGAAGT
 AACAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTTCTTTAATA
 TACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCA
 TGCTCTTTTGCACCATTTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAA
 ATATTTCTGCATATAAAATGTAACTGATGTAAGAGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATT
 CTGCTTTTATTTTCTGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCTTGTTC
 TACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACCTGCTGGTCTCTCTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGCAC
 GCGTGCCACCATGGCTTTCTGTGGCTGCTGTCTTGTGGGCTCTGCTGGGCACCACCTTTGGCTGCTGGTGCC
 CAGGGAGCTGTCTGGCAGCAGCCCTGTGCTGGAGGAGACCCACCTGCTCATCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCCTGG
 CCCCAGGGATGCCAGGCTCACCTGGGAGACCCAGGGCTGTGCCACTCAGTGTGATGTGCCCCCAACAGCAG
 GTTTGACTGTGCTCCTGACAAGGCTATCACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGGTGTGCTACATTCTGTCTAA
 GCAGGGCCTGCAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCCCTCTTATCCAGCTATAAGCTGGA
 GAACCTGAGCAGCTCTGAGATGGGCTACACTGCCACCTGACCAGGACCACTCCACCTTCTTTCCCAAGGATAT
 TCTGACTCTGAGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAACAGGCTGCACCTCACTATCAAGGACCTGCCAATAG
 GAGGTATGAGGTGCCCCTGAGACTCCTCATGTGCATAGCAGGGCCCCCTTCTCTCTGTATTCTGTGGAGTTCTC
 TGAGGAGCCCTTTGGGGTGATTGTGAGGAGGACGTGGATGGCAGGGTGCTGCTGAACACCACCTGTGGCCCCCT
 GTTCTTTGCTGACCAGTTCTGCAGCTGAGCACTTCTCTGCCAGCCAGTACATTACTGGGCTGGCTGAGCATCT
 GAGCCCCATGATGGCTGAGCACCTCTTGGACCACTACCTGCTGGAACAGGGACCTGGCCCCCATCTGTGGGCT
 TAACCTGTATGGCTCTACCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGGCTCTGCCCATGGGGTGTCTTCTGCTGAA
 CAGCAATGCTATGGATGTGGTGCTGCAGCCCTCTCCAGCCCTGTCTTGGAGGAGCACTGGGGGCATTCTGGATGT
 GTACATTTTCTGGGGCTGAACCAAGTCTGTGGTGAGCAGTACCTGGATGTGGTGGGCTACCCCTTCATGCC
 CCCCTATTGGGGGCTGGGGTTTACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACCAGGCAGGTGGTGGA
 GAACATGACCAGGGGCCATTTCCCCCTGGATGTGCAGTGGAATGACCTGGACTACATGGATAGCAGGAGGATTT
 CACCTTCAACAAGGATGGCTTCAGGGACTTTCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCACCAGGGGGGCAGGAGGTATAT
 GATGATTGTGGACCTGCTATCAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGCTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAG
 GGGGGTGTCTTACTACTAATGAAACTGGCCAGCCTCTGATTGGCAAGGTCTGGCCTGGCTCTACTGCCCTCCCTGA
 TTTTACTAACCCTACTGCCCTGGCTGGTGGGAGACATGGTGGCTGAGTTCCATGATCAGGTGCCCTTTTGTATGG
 CATGTGGATTGATATGAATGAACCAAGCAACTTCATCAGAGGCTCTGAGGATGGCTGCCCCAACAATGAGCTGGA
 GAACCCCCCTATGTGCTGGGGTGGTGGGGGCACTCTGCAGGCTGCCACCATTGTGTCTAGCAGCCACCAGTT
 CCTGAGCACCCTACTACAATCTGCACAACCTGTATGGCCTGACTGAAGCCATTGCCAGCCATAGGGCCCTGGTGAA
 GGCCAGGGGCACTAGGCCCTTTGTGATCAGCAGGAGCACTTTTGTGCGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGAC
 TGGGGATGTGTGGAGCAGCTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCTGAGATTCTGCAGTTTAACTGCTGGGGGT
 GCCCCTGGTGGGGGCTGATGTGTGTGGCTTCTGGGCAACACCTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCT
 GGGGGCCTTTTATCCCTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGCTGAGCCTGCCTCAGGAGCCCTACTCTTTCTCTGA
 GCCTGCCCAGCAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCACCTGTATACCCTGTTC
 CCAGGGCCATGTGGCTGGGAGACTGTGGCCAGGCCCTGTTCTGGAGTTCCCCAAGGACAGCAGCAGCTGGAC
 TGTGGATCATCAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATCACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTCAC
 TGGCTACTTCCCTCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAGGCTCTGGGCAGCCTGCCCCCCC
 CCCTGCTGCTCCCAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCTCCCCTGGACACCAT
 CAATGTGCACCTGAGGGCTGGCTACATTATCCCCCTGCAGGGCCCAGGGCTGACTACCCTGAGAGCAGACAGCA
 GCCCATGGCTCTGGCTGTGGCCCTGACCAAGGGGGGGGAAGCTAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGAG
 CCTGGAGGTGCTGGAGAGGGGGGCTATACCCAGGTGATCTTCTGGCTAGGAACAACACCATTTGTCAATGAGCT
 GGTGAGGGTGACTTCTGAGGGGGCTGGGCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCTCCCCA
 GCAGGTGCTGAGCAATGGGGTGCCTGTGAGCAACTTCACCTACAGCCCTGACACCAAGGTGCTGGACATCTGTGT
 GTCTCTGCTGATGGGGGAGCAGTTCTGGTGAGCTGGTGTGAGTCTGAGAGCTGAATTCCTGAGCCAGGGGG
 ATCAGCCTCTACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCTCTGTGTTTGGCCCTCCCCCTTGCCTTCTTGCACCTGGA
 AGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTCATCACATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTAT
 TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCAGT
 GGGCTCTATGGCTTCTGAGGCAGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGAGATCCACTAGGGCCGAGGAACCCCTAGTGA

TGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGG
GCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGAGCTGCCTGCAGG

>pAAV-ApoE/hAAT.GAA8.BGH (SEC ID NO:19)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGGCAAAGCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTC
GCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGAGAGAGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGC GGCCCTAG
TAGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCTCCAGCAG
CTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAAACATT
GCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTGAGAGACCTCT
CTGGGCCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGGAATTTTCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCTGGCG
TGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGTACCCGGGGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAG
AGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGA
CGCTGTGGTTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTTCGGTAAGTGAGTGGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAG
CGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGAAGTTAGCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGG
GGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGA
CAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACAGTGAATAGATCCTGAGAACTTCAGGGTG
AGTCTATGGGACCCCTTGATGTTTTCTTTCCCTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTGCATAGGAAGGGGAGAAGT
AACAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTCTTTTAATA
TACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTCAGGGCAATAATGATACAAATGTATCA
TGCCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAA
ATATTTCTGCATATAAAATGTAACTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATT
CTGCTTTTATTTTCTGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCTTGTTCA
TACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACCTGCTGGTCTCTCTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGCAC
GCGTGCCACCATGGCCTTCTGTGGCTGCTGCTTGTCTGGGCTCTGCTGGGGACCACCTTTGGCCTGCTGGTCCC
CAGGGAGCTGTCTGGCTCTTCTCCTGTCTGGAGGAGACCCACCTGCCACCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCTGG
CCCCAGGGATGCCCAGGCCACCCCTGGCAGGGCCAGGGCTGTGCCACCCAGTGTGATGTGCCTCCCAACAGCAG
GTTTGAAGTGTGCCCCGTGACAAGGCCATCACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGCTGCTGCTATATCCCTGCCAA
GCAGGGCCTGCAGGGGGCTCAGATGGGCCAGCCCTGGTGTCTTTTCCCCCTCTTATCTAGCTATAAGCTGGA
GAACCTGAGCAGCTCTGAGATGGGGTACACTGCCACCCCTGACCAGGACCACCCCACTTTCTCCCTAAGGACAT
CCTGACCCTGAGGCTGGATGTGATGATGAGACTGAGAATAGGCTGCACCTTACTATCAAGGACCTGCCAACAG
GAGGTATGAGGTGCCTCTGGAGACCCCCATGTGATTCTAGGGCCCCCAGCCCCCTGTACTCTGTGGAGTTCTC
TGAGGAGCCCTTTGGGGTGATTGTGAGGAGACAGCTGGATGGCAGGGTCTGCTGAACACCCTGTGGCTCCCCCT
GTTTTTTGCTGACCAGTTCTGCAGCTGAGCACCAGCCTGCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCACCT
GAGCCCCCTGATGCTGAGCACCAGCTGGACCAGGATCACCCCTGTGGAACAGGGATCTGGCTCCTACCCCTGGGGC
CAACCTGTATGGCTCTCACCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGGCTCTGCCCATGGGGTGTTCTGCTGAA
CAGCAATGCTATGGATGTGGTGCTGCAGCCAGCCCTGCCCTGAGCTGGAGGTCTACTGGGGGCATCCTGGATGT
GTACATCTTTCTGGGGCTGAGCCCAAGTCTGTGGTGAGCAGTACCTGGATGTGGTGGGCTATCCTTTTATGCC
CCCCTATTGGGGCTGGGCTTCCACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACAGACAGGTGGTGGA
GAACATGACCAGGGGCCACTTCCCCCTGGATGTGCAGTGAATGACCTGGACTACATGGACAGCAGGAGGGACTT
CACCTTTAACAAGGATGGCTTTAGGGACTTCCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCATCAGGGGGGCAGGAGGTACAT
GATGATTGTGGACCAGCCATCAGCAGCTCTGGGCTGCTGGGTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAG
GGGGGTGTTTCATACCAATGAGACTGGCCAGCCCTGATTGGCAAGGTGTGGCCTGGGAGCACTGCCCTCCCTGA
TTTTACCAACCCCACTGCCCTGGCCTGGTGGGAGGATATGGTGGCTGAGTTTCATGACCAGGTGCCCTTTGATGG
CATGTGGATTGACATGAATGAGCCAGCAATTTTCATCAGGGGCTCTGAGGATGGCTGCCCCAACAAATGAGCTGGA
GAATCCTCCCTATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACCCCTGCAGGCTGCCACCATCTGTGCCTCTAGCCACCAGTT
CCTGAGCACCCACTATAACCTGCATAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCATAGAGCCCTGGTGAA
GGCCAGAGGGACCAGGCCCTTTGTGATCTCTAGGAGCACCTTTGCTGGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGAC
TGGGGATGTGTGGAGCTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCAGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGT
GCCTCTGGTGGGGGCTGATGTGTGTGGCTTCTGGGCAATACCTCTGAAGAGCTGTGTGTGAGGTGGACTCAGCT
GGGGGCCCTTCTATCCCTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGCTGTCTCTGCCCCAGGAGCCCTACAGCTTCTCTGA
GCCTGCTCAGCAGGCTATGAGGAAGGCCCTGACCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCATCTGTACACCTGTTC
CCAGGGCCATGTGGCTGGGGAGACTGTGGCCAGGCCCTGTTTCTGGAGTTTCCAAGGACAGCAGCACCTGGAC
TGTGGACCATCAGCTGCTGTGGGGGAGGCTCTGCTGATTACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGAC
TGGGTACTTCCCCCTGGGACTTGGTATGACCTGCAGAGTGCCTGTGGAAGCTCTGGGCAGGCTGCCCCACC
CCCTGTCTGCCCTAGGGAGCCTGCCATCCACTGAGGGGCTAGTGGGTGACCTGCTGCCCTCTGGACACCAT
CAATGTGCACCTGAGGGCTGGCTATATCATCCCTGTCAGGGCCCTGGGCTGACCACCCTGAGAGCAGGCAGCA
GCCCATGGCCCTGGCTGTGGCCCTGACTAAGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGAG

CCTGGAGGTGCTGGAGAGAGGGGCCTACACCCAGGTGATCTTTCTGGCCAGGAACAACACCATTGTGAATGAGCT
 GGTGAGGGTGACTTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCA
 GCAGGTGCTGAGCAATGGGGTGCCTGTGTCTAACTTCACCTACAGCCCTGATACTAAGGTGCTGGATATCTGTGT
 GAGCCTGCTGATGGGGGAGCAGTTTCTGGTGAGCTGGTGCTGAAGATCTAGAGCTGAATTCCTGCAGCCAGGGGG
 ATCAGCCTCTACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCTGCCTTCCTTGACCCTGGA
 AGGTGCCACTCCCAGTGTCTTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCACATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTAT
 TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCAGT
 GGCTCTATGGCTTCTGAGGCAGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGAGATCCACTAGGGCCGAGGAACCCCTAGTGA
 TGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCCCCGACCCCCG
 GCTTTGCCCCGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

>pAAV-ApoE/hAAT.GAA2. wtBGH (SEC ID NO:20)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTC
 GCCCCGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGC GGCCGCA
 GGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCTCCAGCAGCT
 GTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAACATTGC
 AAGCAGCAAAACAGCAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTGAGAGACCTCTCT
 GGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGGAAATTTCTGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCTTGGCGTG
 GTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGTACCCGGGGATCTTGCTACCAAGTGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAG
 CAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACG
 CTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCG
 TCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGTCTCCTCCGATAACTGGGG
 TGACCTTGGTTAATATTACACAGCAGCCTCCCCGTTGCCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACA
 GGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATAGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAG
 TCTATGGGACCCTTGATGTTTCTTTCCCTTCTTTCTATGGTTAAGTTCATGTATAGGAAGGGGAGAAGTAA
 CAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAATGCTTTCTTCTTTAATATA
 CTTTTTGTATTATCTTATTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATG
 CCTCTTTGCACCATTTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAAT
 ATTTCTGCATATAAATTGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCT
 GCTTTTATTTTCTGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCTTGTTCATA
 CCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACCTGCTGGTCTCTCTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGCACGC
 GTGCCACCATGGCTTTCTGTGGCTGCTGAGCTGCTGGGCTCTGCTGGGCACCACCTTTGGGCTGCTGGTGCCTA
 GGGAGCTGTCTGGGTCTAGCCCTGTGCTGGAGGAGACTACCCCTGCCCATCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCTGGCC
 CCAGGGATGCTCAGGCCCACCTGGCAGGCCCAGGGCTGTGCCACCCAGTGTGATGTGCCCCCAACAGCAGGT
 TTGACTGTGCCCCTGACAAGGCCATTACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGCTGCTGCTACATTCCAGCTAAGC
 AGGGCCTGCAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCCCAGCTATCCTAGCTATAAAGTGGAGA
 ACCTGAGCAGCTCTGAGATGGGCTATACTGCCACCTGACTAGGACTACTCCACCTTTTTTCTAAGGATATCC
 TGACCCTGAGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAACAGGCTGCACTTCACTATTAAGGACCCTGCCAATAGGA
 GGTATGAAGTGCTCTGGAGACTCCTCATGTGCACTCTAGGGCCCCCAGCCCCCTGTATTCTGTGGAGTTCTCTG
 AGGAGCCCTTTGGGGTGAATTGTGAGGAGGCAGCTGGATGGCAGGGTGCTGCTGAACACCAGTGTGGCCCCCTGT
 TCTTTGCTGACCAGTTCCTGCAGCTGAGCACCAGCCTGCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCATCTGA
 GCCCTCTGATGCTGAGCACCTCTTGGACCAGGATCACCTGTGGAATAGGGATCTGGCCCCCACCCTGGGGCTA
 ATCTGTATGGCTCTCATCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGGCTCTGCCCATGGGGTGTCTTCTGCTGAACA
 GCAATGCCATGGATGTGGTGCTGCAGCCCTCTCTGCCCTGAGCTGGAGGAGCACTGGGGGCATCCTGGATGTGT
 ACATCTTCTGGGCCCCGAGCCCAAGTCTGTGGTCCAGCAGTATCTGGATGTGGTGGGCTACCCCTTTATGCCCC
 CCTATTGGGGCCTGGGCTTCCACCTGTGCAGGTGGGGGATTCTTCTACTGCTATCACCCAGGCAGGTGGTGGAGA
 ACATGACCAGGGCTCACTTCCCCCTGGATGTGCAGTGGAATGACCTGGACTATATGGACTCTAGGAGGGATTCA
 CCTTCAACAAGGATGGCTTCAGGGACTTCCCTGCTATGGTCCAGGAGCTGCATCAGGGGGGCAGGAGGTACATGA
 TGATTGTGGACCCTGCCATCAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGCAGCTATAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGG
 GGGTGTATTACTACTAATGAACTGGGCAGCCCCGATTGGCAAGGTGTGGCTGGCTCTACTGCCTTCCCTGACT
 TCACCAACCCCACTGCTCTGGCCCTGGTGGGAGACATGGTGGCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCTTTTGATGGCA
 TGTGGATTGACATGAATTGAGCCAGCAACTTCATCAGGGGCTCTGAGGATGGGTGCCCAATGAATGAGCTGGAGA
 ACCCCCCCTATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACCTGCAGGCTGCCACTATTTGTGCCAGCTCTCACCAGTTCC
 TGAGCACCCACTACAACCTGCACAATCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCACAGGGCCCTGGTGAAGG
 CCAGGGGCACTAGGCCCTTTGTGATCTCTAGAAGCACCTTTGCTGGCCATGGGAGGTATGCTGGCCACTGGACTG
 GGGATGTGTGAGCTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCTGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGC
 CCCTGGTGGGGCTGATGTGTGGCTTCTGGGCAACACCTCTGAAGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGG

GGGCCTTCTACCCCTTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGCTGAGCCTGCCTCAGGAGCCTTACTCTTTCTCTGAGC
 CTGCCCAGCAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACCTGAGGTATGCTCTGCTGCCCCACCTGTACACCTGTTCACC
 AGGCCCATGTGGCTGGGGAGACTGTGGCCAGGCCCTGTTCCTGGAGTTTCCTAAGGATAGCAGCACCTGGACTG
 TGGACCACCAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATTACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGACTG
 GCTACTTCCCCCTGGGCCTTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAAGCCCTGGGCAGCCTGCCTCCCCC
 CTGCTGCCCCCAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCCCTGGACACCATTA
 ATGTGCATCTGAGGGCTGGGTATATTATCCCCCTGCAGGGCCCTGGGCTGACTACCCTGAGAGCAGGCAGCAGC
 CTATGGCCCTGGCTGTGGCTCTGACTAAGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGAGCC
 TGGAGGTGCTGGAGAGGGGGGCTACACCCAGGTGATTTTCTGGCCAGGAACAACACCATTTGTGAATGAGCTGG
 TGAGGGTGACCTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAAGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGC
 AGGTGCTGAGCAATGGGGTGCTGTGAGCAACTTCACCTACAGCCCTGACACCAAGGTGCTGGATATTTGTGTGA
 GCCTGCTGATGGGGGAGCAGTTCTGGTGAGCTGGTGCTGACTCGAGAGATCTACCGGTGAATTCACCGCGGGTT
 TAAACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCC
 ACTCCCACTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGG
 GGTGGGGTGGGGGCTAGCTCTAGACTCGAGATCCACTAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC
 CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGG
 CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAG

>pAAV-ApoE/hAAT.GAA5.wtBGH (SEC ID NO:21)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTC
 GCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTGCGGCCGCA
 GGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCTCCAGCAGCT
 GTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAACATTGC
 AAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTGAGAGACCTCTCT
 GGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATTTTCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCTGGCGTG
 GTTAGGTAGTGTGAGAGGGGTACCCGGGGATCTTGCTACCAGTGAACAGCCACTAAGGATTCGCAGTGAGAG
 CAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACG
 CTGTGGTTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAGCG
 TCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGG
 TGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACA
 GGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATAGATCCTGAGAATTCAGGGTGAG
 TCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTGCATAGGAAGGGGAGAAGTAA
 CAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTTTAAATATA
 CTTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATG
 CCTCTTTGCACCATTTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAAT
 ATTTCTGCATATAAATTTGTAAGTATGTAAGAGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCT
 GCTTTTATTTTCTGGTTGGGATAAGGCTGGATTATCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCTTGTTCATA
 CCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACCTGCTGGTCTCTCTGCTGGCCATCACTTTGGCAAAGCACGC
 GTGCCACCATGGCTTTCTGTGGCTGCTGTCTTGTGGGCCCTGCTGGGGACTACCTTTGGCCTGCTGGTGCCCA
 GGGAACTGTCTGGCTCTAGCCCAGTGCTGGAGGAGACCCACCCTGCCACCAGCAGGGGGCTTCTAGGCCTGGCC
 CCAGGGATGCCAGGCCACCCTGGCAGGCCAAGGGCTGTGCCACCCAGTGTGATGTGCCCCCAACTCTAGAT
 TTGATTGTGCCCTGATAAGGCCATCACCCAGGAGCAGTGTGAGGCTAGGGGCTGCTGCTACATCCCTGCTAAGC
 AGGGCCTGCAGGGGGCTCAGATGGGCCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCCCAGCTATCCCTCTTACAAGCTGGAGA
 ATCTGAGCAGCTCTGAGATGGGCTACACTGCCACCCTGACCAGGACTACTCCACCTTCTTCCCCAAGGACATCC
 TGACCCTGAGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAACAGGCTGCATTTACCATCAAGGATCCTGCCAACAGGA
 GGTATGAGGTGCCTCTGGAGACCCCATGTGCACAGCAGGGCTCCTTCTCCCTGTACTCTGTGGAGTTCTCTG
 AGGAACCCCTTTGGGGTGATTGTGAGGAGGACAGCTGGATGGCAGGGTCTGCTGAACACCACTGTGGCCCCCTGT
 TCTTTGCTGATCAGTTCTGCACTGTCCACTTCTCTGCCTAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCACCTGA
 GCCCTCTGATGCTGAGCACCTCTTGGACTAGGATCACCTGTGGAACAGGGACCTGGCCCCCACCCTGGGGCCA
 ACCTGTATGGCAGCCACCCTTCTATCTGGCCCTGGAGGATGGGGGCTCTGCCATGGGGTGTTCTGTGTAATA
 GCAATGCTATGGATGTGGTGTGCTGCAGCCCCAGCCCTGCCCTGTCTTGGAGGAGCACTGGGGGCTTCTGGATGTG
 ACATTTTCTGGGGCTGAGCCCCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTACCTGGATGTGGTGGGCTACCCCTTCTATGCCTC
 CCTACTGGGGCCTGGGCTTCCACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCTCTACTGCCATCACAGGCAGGTGGTGGAGA
 ATATGACCAGGGCCCACTTCCCCCTGGATGTGCAGTGGAATGACCTGGACTACATGGACTCTAGGAGGGACTTCA
 CCTTCAATAAGGATGGCTTCAGAGACTTCCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCATCAGGGGGGAGGAGGTACATGA
 TGATTGTGGACCCTGCCATCAGCTCTTCTGGCCCTGCTGGCTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGG
 GGGTGTTTCATACCAATGAGACTGGGCAGCCCTGATTGGGAAGGTGTGGCTGGCTCTACTGCCTTCCCTGACT

TCACCAATCCTACTGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCATGACCAGGTGCCCTTTGATGGCA
 TGTGGATTGACATGAATGAGCCCTCTAATTTTCATCAGGGGCTCTGAGGATGGCTGCCCCAACAAATGAGCTGGAGA
 ACCCCCCCTATGTGCTGGGGTGGTGGGGGGCACCCCTGCAGGCTGCCACCATCTGTGCTAGCTCTCACCAGTTCC
 TGAGCACCCACTACAATCTGCATAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCACAGGGCCCTGGTGAAGG
 CTAGGGGACACAGGCCCTTTGTGATTTCTAGGAGCACTTTTGTCTGGCCATGGCAGGTATGCTGGGCACTGGACTG
 GGGATGTGTGGTCTAGCTGGGAGCAGCTGGCTTCTTCTGTGCCTGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGC
 CTCTGGTGGGGCTGATGTGTGTGGGTTCCCTGGGCAACACTTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGG
 GGCCTTCTACCCCTTTCATGAGGAACCAACAGCCTGCTGAGCCTGCCCCAGGAGCCCTACAGCTTCTCTGAGC
 CTGCCCCAGCAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACCCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCACCTGTACACCCTGTTCCACC
 AGGCCCATGTGGCTGGGGAGACTGTGGCTAGGCCCTCTGTTTCTGGAGTTCCTCAAGGACTCTAGCACCTGGACTG
 TGGACCACAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATCACTCCTGTGCTGCAGGCTGGGAAGGCTGAGGTGACTG
 GCTATTTCCCCCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAGGCCCTGGGGAGCCTGCCCCCCCCC
 CTGCTGCCCCCAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCCCTCTGGATACCATCA
 ATGTGCACCTGAGGGCTGGCTACATCATTCCCCTGCAAGGCCCTGGCCTGACCCTACTGAGTCTAGGCAGCAGC
 CCATGGCCCTGGCTGTGGCCCTGACCAAGGGGGGGAGGCTAGGGGGGAGCTGTTTTGGGATGATGGGGAGAGCC
 TGGAGGTGCTGGAGAGGGGGGCTTACCTCAGGTGATCTTCTTGGCCAGGAACAATACCATTGTGAATGAGCTGG
 TGAGGGTGACCTCTGAGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGC
 AGGTGCTGAGCAATGGGGTGCTGTGAGCAACTTCACCTATAGCCCTGATACCAAGGTGCTGGATATTTGTGTGA
 GCCTGCTGATGGGGGAGCAGTTCTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 TAAACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCC
 ACTCCCACTGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATGTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGG
 GGTGGGGTGGGGGCTAGCTCTAGACTCGAGATCCACTAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC
 CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGG
 CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

>pAAV-ApoE/hAAT.GAA7.wtBGH (SEC ID NO:22)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTC
 GCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTGCGCCGCA
 GGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCCCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCTCCAGCAGCT
 GTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAAAACATTGC
 AAGCAGCAAAACAGCAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTGAGAGACCTCTCT
 GGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATTTGCGTGGAGAGGAGCAGAGGTGTCTTGGCGTG
 GTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGTACCCGGGGATCTTGCTACCAGTGGAAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAG
 CAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACG
 CTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCCGTAAGTGCAGTGGAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCG
 TCCGGGCAGCGTAGGGGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGTCTCTCCGATAACTGGGG
 TGACCTTGGTTAATATTACACAGCAGCCTCCCCCGTGGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACA
 GGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATAGATCCTGAGAATTCAGGGTGAG
 TCTATGGGACCCTTGATGTTTCTTTCCCTTCTTTCTATGGTTAAGTTCATGTATAGGAAGGGGAGAAGTAA
 CAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTTTAAATATA
 CTTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATG
 CCTCTTTGACCATTTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAAT
 ATTTCTGCATATAAATTGTAAGTATGTAAGAGGTTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCT
 GCTTTTATTTTCTGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCTTGTTCATA
 CCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACCTGCTGGTCTCTCTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGCACGC
 GTGCCACCATGGCTTTCTGTGGCTGCTGTCTTGTGGGCTCTGCTGGGCACCACCTTTGGCCTGCTGGTGCCCA
 GGGAGCTGTCTGGCAGCAGCCCTGTGCTGGAGGAGACCCACCTGCTCATCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCTGGCC
 CCAGGGATGCCCAGGCTCACCCCTGGGAGACCCAGGGCTGTGCCCCTCAGTGTGATGTGCCCCCAACAGCAGGT
 TTGACTGTGCTCCTGACAAGGCTATCACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGGTGTGCTACATTCTGTGCTAAGC
 AGGGCCTGCAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCCCTCTTATCCCAGCTATAAGCTGGAGA
 ACCTGAGCAGCTCTGAGATGGGCTACACTGCCACCTGACCAGGACCACTCCACCTTCTTTCCCAAGGATATTC
 TGACTCTGAGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAACAGGCTGCACTTCACTATCAAGGACCTGCCAATAGGA
 GGTATGAGGTGCCCCGAGACTCCTCATGTGCATAGCAGGGCCCCCTTCTCTCTGTATTCTGTGGAGTTCTCTG
 AGGAGCCCTTTGGGGTATTGTGAGGAGGCAGCTGGATGGCAGGGTGTGCTGTAACACCACTGTGGCCCCCTGT
 TCTTTGTGACCACTTCTGACAGTGTGACACTTCTCTGCCCAGCCAGTACATTACTGGGCTGGCTGAGCATCTGA
 GCCCCCTGATGCTGAGCACCTCTTGGACCAGGATCACCCCTGTGGAACAGGGACCTGGCCCCCACTCTGGGGCTA
 ACCTGTATGGCTCTCACCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCCATGGGGTGTCTTCTGTGAACA

GCAATGCTATGGATGTGGTGCTGCAGCCCTCTCCAGCCCTGTCTTGGAGGAGCACTGGGGGCATTCTGGATGTGT
ACATTTTCTGGGGCTGAACCCAAGTCTGTGGTGCAAGTACCTGGATGTGGTGGGCTACCCCTTCATGCCCC
CCTATTGGGGGCTGGGGTTTACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACCAGGCAGGTGGTGGAGA
ACATGACCAGGGCCCATTTCCCCCTGGATGTGCAGTGAATGACCTGGACTACATGGATAGCAGGAGGATTCA
CCTTCAACAAGGATGGCTTCAGGGACTTTCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCACCAGGGGGCAGGAGGTATATGA
TGATTGTGGACCTGCTATCAGCAGCTCTGGCCCTGTGGCTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGG
GGGTGTTTATCACTAATGAAACTGGCCAGCCTCTGATTGGCAAGGTCTGGCCTGGCTCTACTGCCTTCCCTGATT
TTACTAACCCCACTGCCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCCATGATCAGGTGCCTTTTATGGCA
TGTGGATTGATATGAATGAACCAAGCAACTTCATCAGAGGCTCTGAGGATGGCTGCCCCAACAATGAGCTGGAGA
ACCCCCCTATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACTCTGCAGGCTGCCACCATTGTGTCTAGCAGCCACCAGTTCC
TGAGCACCACCTACAATCTGCACAACCTGTATGGCCTGACTGAAGCCATTGCCAGCCATAGGGCCCTGGTGAAGG
CCAGGGGCACTAGGCCTTTGTGTATCAGCAGGAGCACTTTTGTGGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGACTG
GGGATGTGTGGAGCAGCTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCTGAGATTCTGCAGTTAACCTGCTGGGGGTGC
CCCTGGTGGGGCTGATGTGTGTGGCTTCTGGGCAACACCTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGG
GGGCCTTTTATCCCTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGTGAGCCTGCCTCAGGAGCCCTACTCTTTCTCTGAGC
CTGCCCAGCAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCACCTGTATACCTGTTCACC
AGGCCCATGTGGCTGGGGAGACTGTGGCCAGGCCCTGTTCTTGGAGTTCCCAAGGACAGCAGCACCTGGACTG
TGGATCATCAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGTGATCACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTCACTG
GCTACTTCCCTCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAGGCTCTGGGCAGCCTGCCCCCCCCC
CTGCTGCTCCCAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCTCCCCTGGACACCATCA
ATGTGCACCTGAGGGCTGGCTACATTATCCCCCTGCAGGGGCCAGGGCTGACTACCACTGAGAGCAGACAGCAGC
CCATGGCTCTGGCTGTGGCCCTGACCAAGGGGGGGGAAGCTAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGAGCC
TGGAGGTGCTGGAGAGGGGGGCTATACCCAGGTGATCTTCTGGCTAGGAACAACACCATTGTCAATGAGCTGG
TGAGGGTGACTTCTGAGGGGGCTGGGCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCTCCCCAGC
AGGTGCTGAGCAATGGGGTGCTGTGAGCAACTTCACCTACAGCCCTGACACCAAGGTGCTGGACATCTGTGTGT
CTCTGCTGATGGGGGAGCAGTTCTGGTGGCTGGTGGCTGACTCGAGAGATCTACCGGTGAATTCACCGCGGGTT
TAAACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCC
ACTCCCACTGTCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTATTTCTGGGG
GGTGGGGTGGGGGCTAGCTCTAGACTCGAGATCCACTAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC
CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGCGG
CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

>pAAV-ApoE/hAAT.GAA8.wtBGH (SEC ID NO:23)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGTC
GCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCA
GGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCTCCAGCAGCT
GTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAAAACATTGC
AAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTGAGAGACCTCTCT
GGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATTTTCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCTTGGCGTG
GTTTAGGTAGTGAGAGGGGTACCCGGGGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAG
CAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACG
CTGTGGTTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTTCGGTAAGTGAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCG
TCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGTCTCCTCCGATAACTGGGG
TGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACA
GGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATAGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAG
TCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTCTATGGTTAAGTTCATGTGCATAGGAAGGGGAGAAGTAA
CAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCAATTTTAAAAAATGCTTTCTTTTAAATATA
CTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATG
CCTCTTTCGACCATTTCAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAAT
ATTTCTGCATATAAATTTGTAAGTGTGTAAGGTTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCT
GCTTTTATTTTCTGGTTGGGATAAGGCTGGATTATCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCTTGTTCATA
CCTCTTATCTTCTCTCCACAGCTCCTGGGCAACCTGCTGGTCTCTCTGCTGGGCCATCACTTTGGCAAAGCACGC
GTGCCACCATGGCCTTCTGTGGCTGCTGTCTTGTGGGCTCTGCTGGGGACCACCTTTGGCCTGCTGGTCCCCA
GGGAGCTGTCTGGCTCTTCTCCTGTCTTGGAGGAGACCCACCCTGCCACCAGCAGGGGGCTAGCAGGCCTGGCC
CCAGGGATGCCAGGCCCACCCTGGCAGGCCAGGGCTGTGCCACCAGTGTGATGTGCCTCCCAACAGCAGGT
TTGACTGTGCCCTGACAAGGCCATACCCAGGAGCAGTGTGAGGCCAGGGGCTGCTGCTATATCCTGCCAAGC
AGGGCCTGCAGGGGGCTCAGATGGGCCAGCCCTGGTGCTTCTTTCCCCCTCTATCCTAGCTATAAGCTGGAGA

ACCTGAGCAGCTCTGAGATGGGGTACACTGCCACCCTGACCAGGACCACCCCACTTTCTTCCCTAAGGACATCC
TGACCCTGAGGCTGGATGTGATGATGGAGACTGAGAATAGGCTGCACTTTACTATCAAGGACCCTGCCAACAGGA
GGTATGAGGTGCCTCTGGAGACCCCATGTGCATTCTAGGGCCCCCAGCCCCCTGTACTCTGTGGAGTTCTCTG
AGGAGCCCTTTGGGGTGATTGTGAGGAGACAGCTGGATGGCAGGGTCTGCTGAACACCACTGTGGCTCCCCTGT
TTTTTGTGACCACTTCTGCAGCTGAGCACCAGCCTGCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCACCTGA
GCCCCCTGATGCTGAGCACCAGCTGGACCAGGATCACCTGTGGAACAGGGATCTGGCTCCTACCCCTGGGGCCA
ACCTGTATGGCTCTCACCCCTTTTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGGCTCTGCCATGGGGTGTTCCTGCTGAACA
GCAATGCTATGGATGTGGTGTGCTGCAGCCAGCCCTGCCCTGAGCTGGAGGTCTACTGGGGGCATCCTGGATGTGT
ACATCTTTTCTGGGGCCTGAGCCCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTACCTGGATGTGGTGGGCTATCCTTTTATGCCCC
CCTATTGGGGCCTGGGCTTCCACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACCAGACAGGTGGTGGAGA
ACATGACCAGGGCCCACTTCCCCCTGGATGTGCAGTGGGAATGACCTGGACTACATGGACAGCAGGAGGGACTTCA
CCTTTAACAAGGATGGCTTTAGGGACTTCCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCATCAGGGGGCAGGAGGTACATGA
TGATTGTGGACCCAGCCATCAGCAGCTCTGGGCCCTGTGGGTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCTGAGGAGGG
GGGTGTTTCATACCAATGAGACTGGCCAGCCCTGATTGGCAAGGTGTGGCTGGGAGCACTGCCTTCCCTGATT
TTACCAACCCCACTGCCCTGGCCTGGTGGGAGGATATGGTGGCTGAGTTTCATGACCAGGTGCCCTTTGATGGCA
TGTGGATTGACATGAATGAGCCAGCAATTTTCATCAGGGGCTCTGAGGATGGCTGCCCCAACAATGAGCTGGAGA
ATCCTCCCTATGTGCCTGGGGTGGTGGGGGGCACCTGCAGGCTGCCACCATCTGTGCCTCTAGCCACCAGTTCC
TGAGACCCCACTATAACCTGCATAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCATAGAGCCCTGGTGAAGG
CCAGAGGGACCAGGCCCTTTGTGATCTCTAGGAGCACCTTTGCTGGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGACTG
GGGATGTGTGGAGCTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGTCTGTGCCAGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGC
CTCTGGTGGGGGCTGATGTGTGTGGCTTCCCTGGGCAATACCTCTGAAGAGCTGTGTGTGAGGTGGACTCAGCTGG
GGGCTTCTATCCCTTCATGAGGAACCACAACAGCCTGCTGTCTCTGCCCCAGGAGCCCTACAGCTTCTCTGAGC
CTGCTCAGCAGGCTATGAGGAAGGCCCTGACCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCATCTGTACACCCTGTTCCACC
AGGCCCATGTGGCTGGGGAGACTGTGGCCAGGCCCTGTTTCTGGAGTTTCCCAAGGACAGCAGCACCTGGACTG
TGGACCATCAGCTGCTGTGGGGGGAGGCTCTGTGATTACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGACTG
GGTACTTCCCCCTGGGGACTTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAAGCTCTGGGCAGCCTGCCCCACCCC
CTGCTGCCCCCTAGGGAGCCTGCCATCCACTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCTGCCTGCCCCCTCTGGACACCATCA
ATGTGCACCTGAGGGCTGGCTATATCATCCCCCTGCAGGGCCCTGGGCTGACCACCACTGAGAGCAGGCAGCAGC
CCATGGCCCTGGCTGTGGCCCTGACTAAGGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTCTGGGATGATGGGGAGAGCC
TGGAGGTGCTGGAGAGAGGGGCCTACACCCAGGTGATCTTCTGGCCAGGAACAACACCATTGTGAATGAGCTGG
TGAGGGTGACTTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGC
AGGTGCTGAGCAATGGGGTGCCTGTGTCTAATTCACCTACAGCCCTGATACTAAGGTGCTGGATATCTGTGTGA
GCCTGCTGATGGGGGAGCAGTTTCTGGTGAGCTGGTGTGCTGACTCGAGAGATCTACCGGTGAATTCACCGGGTT
TAAACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCC
ACTCCCACTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGG
GGTGGGGTGGGGGCTAGCTCTAGACTCGAGATCCACTAGGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC
CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCGCGGGCTTTGCCCGGGCGG
CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

>pAAV-ApoE/hAAT.GAA13.wtBGH (SEC ID NO:24)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGTC
GCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTTCTGCGGCCGCA
GGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCCCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCTCCAGCAGCT
GTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAACATTGC
AAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTGAGAGACCTCTCT
GGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATTTGCGTGGAGAGGAGCAGAGGTGTCTTGGCGTG
GTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGTACCCGGGGATCTTGCTACCACTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAG
CAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACG
CTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAGCG
TCCGGGCGAGCTTAGCGGGGCGACTCAGATCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGTCTCTCCGATAACTGGGG
TGACCTTGAGTTAATATTCACAGCAGCCTCCCCGTGCCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACA
GGGCCCTGTCTCAGCTTTCAGGCACCACCACCTGACCTGGGACAGTGAATAGATCCTGAGAACCTCAGGGTGAG
TCTATGGGACCCCTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTCTATGGTTAAGTTTCATGTGCATAGGAAGGGGAGAAGTAA
CAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTTCTTTTAAATATA
CTTTTTTGTATCTTATTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATG
CCTCTTTGCACCATTTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAAT
ATTTCTGCATATAAATTGTAAGTGTGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCT

GCTTTTATTTTCTGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCTTGTTTCATA
 CCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACCTGCTGGTCTCTCTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGCACGC
 GTGCCACCATGGCCTTTCTGTGGCTGCTGTCTGCTGGGCCCTGCTGGGGACCACCTTTGGCCTGCTGGTGCCCA
 GGGAGCTGTCTGGGAGCAGCCAGTGTGGAGGAGACCCACCCTGCCCACCAGCAGGGGGCCAGCAGGCCTGGCC
 CTAGGGATGCCCAGGCCACCCTGGCAGGCCAGGGCTGTGCCTACCCAGTGTGATGTGCCACCCAATTCTAGGT
 TTGACTGTGCTCCTGACAAGGCCATCACTCAGGAGCAGTGTGAAGCTAGGGGGTGTGCTGCTACATCCCAGCCAAGC
 AGGGCCTGCAGGGGGCCAGATGGGCCAGCCCTGGTCTTCTTCCCCCAGCTACCCCTAGCTACAAGCTGGAGA
 ATCTGAGCAGCTCTGAGATGGGCTACACTGCTACCTTGACCAGGACCCTCTACCTTCTTCCCCAAGGACATCC
 TGACTCTGAGGCTGGATGTCATGATGGAGACTGAAAATAGGCTGCACTTCACCATCAAGGACCCTGCCAATAGGA
 GGTATGAGGTGCCTCTGGAGACCCCCATGTGCATAGCAGGGCTCCCAGCCCCCTGTATTCTGTGGAGTTCTCTG
 AGGAGCCCTTTGGGGTCATTGTGAGGAGACAGCTGGATGGGAGGGTGTGCTGCTGAACACTACTGTGGCTCCCCTGT
 TCTTTGCTGACCAGTTCCCTGCAGCTGTCTACCAGCCTGCCCAGCCAGTACATCACTGGGCTGGCTGAGCATCTGA
 GCCCCCTGATGCTGAGCACCAGCTGGACCAGGATCACTCTGTGGAACAGGGATCTGGCCCCCACTCTGGGGCCA
 ACCTGTATGGGAGCCATCCCTTCTACCTGGCCCTGGAGGATGGGGCTCTGCCCATGGGGTGTCTCTGTGAACA
 GCAATGCCATGGATGTGGTGTGCTGCAGCCTAGCCCTGCCCTGAGCTGGAGGAGCACTGGGGGCATCCTGGATGTCT
 ACATCTTCTGGGGCCTGAGCCCAAGTCTGTGGTGCAGCAGTATCTGGATGTGGTGGGGTATCCCTTCATGCCCC
 CCTACTGGGGCCTGGGCTTTCACCTGTGCAGGTGGGGCTACAGCAGCACTGCCATCACCAGGCAGGTGGTGGAGA
 ACATGACCAGGGGCCACTTCCCTCTGGATGTGCAGTGAATGACCTGGACTATATGGATTCTAGGAGAGACTTTA
 CTTTAAACAAGGATGGCTTCAGGGATTTCCCTGCCATGGTGCAGGAGCTGCACCAGGGGGCAGGAGGTACATGA
 TGATTGTGGACCCTGCTATTAGCAGCTCTGGCCCTGCTGGGTCTTACAGGCCCTATGATGAGGGCCTGAGGAGGG
 GGGTGTTCATACCAATGAGACTGGCCAGCCCCCTGATTGGCAAGGTGTGGCTGGCAGCACTGCCTTCCCTGACT
 TCACCAACCCCACTGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCATGACCAGGTGCCCTTTGATGGGA
 TGTGGATTGACATGAATGAGCCCTCTAACTTCATCAGGGGGTCTGAGGATGGCTGCCCCAACAAATGAGCTGGAGA
 ACCCCCCCTATGTGCTGGGGTGGTGGGGGGCACTCTGCAGGCTGCCACTATCTGTGCTTCTTCTCACCAGTTTC
 TGAGCACCCACTATAATCTGCACAACCTGTATGGCCTGACTGAGGCCATTGCCAGCCATAGGGCCCTGGTGAAGG
 CCAGGGGCACCAGGCCCTTTGTGATCAGCAGGTCTACCTTTGCTGGCCATGGCAGGTATGCTGGCCACTGGACTG
 GGGATGTGTGGTCTTCTTGGGAGCAGCTGGCCAGCTCTGTGCCTGAGATCCTGCAGTTCAACCTGCTGGGGGTGC
 CTCTGGTGGGGGCTGATGTGTGTGGCTTCTTGGGAACACCTCTGAGGAGCTGTGTGTGAGGTGGACCCAGCTGG
 GGGCCTTTTACCCCTTCATGAGGAACCACAATAGCCTGCTGAGCCTGCCCCAGGAGCCTTACTCTTCTCTGAGC
 CTGCCCAGCAGGCCATGAGGAAGGCCCTGACTCTGAGGTATGCCCTGCTGCCCCATCTGTATACCCTGTTTCACC
 AGCCCCATGTGGCTGGGGAGACTGTGGCTAGGCCCTCTGTTCTGGAGTTCCCTAAGGACTCTAGCACCTGGACTG
 TGGACCACCAGCTGCTGTGGGGGAGGCCCTGCTGATCACCCCTGTGCTGCAGGCTGGCAAGGCTGAGGTGACTG
 GCTACTTCCCCCTGGGCACCTGGTATGACCTGCAGACTGTGCCTGTGGAGGCCCTGGGGAGCCTGCCTCCCCC
 CTGCTGCCCCCAGGGAGCCTGCCATTCTGAGGGCCAGTGGGTGACCCTGCCTGCCCCCTCTGGACACCATCA
 ATGTGCACCTGAGGGCTGGGTACATCATCCCCCTGCAGGGCCCTGGCCTGACCACCACTGAGAGCAGGCAGCAGC
 CCATGGCCCTGGCTGTGGCTCTGACCAAGGGGGGGAGGCCAGGGGGGAGCTGTTCTGGGATGATGGGGAGTCTC
 TGGAGGTGCTGGAGAGGGGGGCTACACCCAGGTGATCTTTCTGGCCAGGAACAATACTATTGTGAATGAGCTGG
 TGAGGGTGACCTCTGAGGGGGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTGCTGGGGGTGGCCACTGCCCCCAGC
 AGGTCTGAGCAATGGGGTGCTGTGAGCAACTTCACCTACTCTCCTGACACCAAGGTGCTGGACATTTGTGTGT
 CTCTGCTGATGGGGGAGCAGTTCCTGGTGTGCTGCTGACTCGAGAGATCTACCGGTGAATTCACCGCGGGTT
 TAAACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCC
 ACTCCCACTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGG
 GGTGGGGTGGGGGCTAGCTCTAGACTCGAGATCCACTAGGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC
 CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGCGG
 CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

SEC ID NO:25: secuencia de ácido nucleico para una proteína secretable de GAA

MAFLWLLSCWALLGTTTFLLVPRELSGSSPVLEETHPAHQOGASRPGPRDAQAHFGRPRAVPTQCDVPPNSRFDC
 APDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPSPSYKLENLSSEMGYTATLTRPTTFPPKIDILTL
 RLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFA
 DQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTGANLYGSHPFYLALEDGGSAGHGVFLNSNA
 MDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQYLDVVGYPFMPYPWGLGFHLCRWYSSTAITRQVVENMT
 RAHFPLDVQWNDLDYMSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPHYDEGLRRGVF
 ITNETGQPLIGKVWPGSTAEPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIIRGSEDGCPNNELENPP
 YVPGVVGGLTQAATICASSHQFLSTHYNLHNLGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDV
 WSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNLSLLSPQEPYSFSEPAQ
 QAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYF

PLGTWYDLQTVPEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLOGPGLTTTESRQQPMA
LAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVL
SNGVPVSNFTYSPDTKVLDDICVSLLMGEQFLVSWC

SEC ID NO:26: Secuencia de ácido nucleico de BGH poli A reducida con CpG

AGATCTAGAGCTGAATTCCTGCAGCCAGGGGATCAGCCTCTACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT
TGCCCCCTCCCCCTTGCCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATT
GCATCACATTGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGG
GAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCAGTGGGCTCTATGG

SEC ID NO:27: Secuencia de ácido nucleico de wtBGH poli A

AGATCTACCGGTGAATTCACCGCGGGTTTAACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCC
CGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTG
TCTGAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGGCTAGCTCTAGA

SEC ID NO:28: Secuencia ApoE/hAAT bordeada por sitios de restricción ApaI (subrayado).

GGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATTTTCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCTTGGCGTG
GTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGTACCCGGGGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAG
CAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACG
CTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCG
TCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGG
TGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACA
GGGCCC

SEC ID NO:29: Secuencia ApoE/hAAT.

ATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATTTTCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCTTGGCGTGTTT
GTAGTGTGAGAGGGGTACCCGGGGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGG
GCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGG
TTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGG
CAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCT
TGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACA

Cápsides vectoriales de AAV:

VP1 (SEC ID NO:30)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLD
KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
AKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDS
ESVPDPQPIGEPPAAPSGVGPNMTAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV
ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQ
RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA
HQGCLPPFPADVFMIQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFESYNFED
VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNW
LPGPCYRQQRVSTTSLQNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSS
GVLMTGKQAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNS
QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADP
PTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTE

GTYSEPRPIGTRYLTRNL

VP2 (SEC ID NO:31)

TAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPIGEPPAGPS
 GLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHL
 YKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRHFCHFSRQRLINNNWGFRPKRLNFK
 LFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQ
 YGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLM
 NPLIDQYLYYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQ
 NNNNSFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMTFGKQAGKDNVDY
 SSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQ
 GPIWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYS
 TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSSEPRPIGTRYLTRN
 L

VP3 (SEC ID NO:32)

MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISN
 GTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRHFCHFSRQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQV
 KEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTL
 NNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQ
 YLYYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNF
 AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMTFGKQAGKDNVDYSSVMLT
 SEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAK
 IPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSV
 EIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSSEPRPIGTRYLTRNL

LK03-AAV VP1 (SEC ID NO:33)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWVALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLDKGEPVNAADAAALEH
 DKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLEPLGLVEEAAPTAPGKKRPVDQSP
 QEPDSSSGVGSGKQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSS
 GNWHCDSQWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRHFCHFSRQRLI
 NNNWGFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQY
 GYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQG
 TTSGETTQSRLLFSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQQRSLKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVPNGPAMA
 SHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNVMTDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQG
 ALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYS
 TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSSEPRPIGTRYLTRPL

EJEMPLO 2

Diseño de Estudio – Potencia *in vitro* (células Huh7)

Para evaluar la potencia de los casetes de expresión de GAA, se transfectaron 200 ng de ADN plasmídico correspondiente a cada casete en una línea celular de carcinoma hepatocelular humano (Huh7) usando Lipofectamine® 2000 (ThermoFisher). Después de 48 horas de incubación, se evaluaron las muestras de medio de cultivo de células transfectadas con plásmidos que llevaban cada casete de expresión para determinar los niveles de GAA mediante un ensayo de actividad de GAA y se normalizaron con respecto al contenido de proteína intracelular.

Resultados

La Figura 10 muestra la evaluación de diferentes plásmidos de expresión de GAA *in vitro* en células Huh7 mediante un ensayo de actividad de GAA. Los resultados son el promedio de réplicas biológicas $n = 3$. Las barras de error representan la desviación estándar.

Con la excepción de GAA5.wtBGH, todos los plásmidos demostraron niveles aumentados de expresión de GAA secretada en comparación con un plásmido de control de proteína verde fluorescente (GFP), lo que indica que estos plásmidos dieron como resultado la expresión del producto de proteína GAA (Figura 10). En general, los plásmidos "BGH" (que albergan una secuencia poli A reducida en CpG) superaron a los plásmidos "wtBGH" (con un poli A bGH de tipo natural). Además, las secuencias de codones optimizados GAA2, GAA7, GAA 8 y GAA13 parecían ser relativamente similares, con una tendencia hacia una mayor expresión de los plásmidos GAA13. Se observó una disminución general en los niveles de expresión en comparación con el plásmido Δ GAApar parental.

EJEMPLO 3

Diseño de Estudio – Potencia de Casete por Inyección Hidrodinámica en Ratones

Para evaluar la potencia de diferentes casetes de expresión de GAA en mamíferos, se introdujeron 25 microgramos de ADN plasmídico correspondiente a cada casete en ratones C57BL/6 macho (aproximadamente 8 semanas de edad) por vía intravenosa en la vena lateral de la cola mediante inyección hidrodinámica. Se recogió el plasma a las 72 horas después de la inyección y se evaluó la presencia de enzima GAA circulante mediante un ensayo de actividad GAA y Western blot.

Resultados

Las Figuras 11 y 12 muestran la evaluación de diferentes casetes de expresión de GAA mediante inyección hidrodinámica en ratones C57BL/6 macho mediante ensayo de actividad de GAA y Western blot, respectivamente, en plasma. Para la Figura 11, los niveles plasmáticos de GAA se normalizan a la construcción parental (spΔGAApar). Los resultados son el promedio de repeticiones biológicas $n = 4-5$. Las barras de error representan la desviación estándar. NS, no significativo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Para la Figura 12, el análisis de plasma de Western blot de GAA, el gráfico de barras representa la cuantificación de la banda superior normalizada a la banda inferior, no específica. Se muestra cada una de las réplicas biológicas ($n = 4-5$ por grupo).

La evaluación de casetes de expresión de GAA con codones optimizados en ratones mediante inyección hidrodinámica reveló que estos casetes eran capaces de expresar y secretar el producto transgénico GAA del hígado de ratón, con niveles similares a los observados con la construcción GAA parental, spΔGAApar (Figura 11). Como en los estudios *in vitro* en células Huh7 (Ejemplo 2), los casetes de expresión de GAA que albergan la secuencia de poli A de BGH reducida en CpG superaron a los de una poli A de BGH de tipo natural. Inesperadamente, en comparación con los resultados del Ejemplo 2, algunos de los constructos de GAA con codones optimizados se comportaron tan bien como o mejor que el plásmido spΔGAApar parental.

EJEMPLO 4

Diseño de Estudio – Potencia Vectorial en Ratones

Para evaluar la potencia de los casetes GAA con codones optimizados de la invención en comparación con el casete parental spΔGAApar, se empaquetaron spΔGAApar y 9 casetes optimizados con codones en un vector de AAV que comprende cápsides de SEC ID NOs: 30-32 (Tabla 1). Se inyectaron cinco ratones C57BL/6 macho por grupo por vía intravenosa a través de la vena de la cola con 1 de 2 dosis de vector (5×10^{11} vg/kg o 2×10^{12} vg/kg). La actividad de GAA circulante se midió longitudinalmente después de la administración del vector de AAV a los ratones. El plasma se analizó dos veces por semana para determinar la

actividad GAA. El día 70, se sacrificaron 7 de los 10 grupos de animales de prueba, y los tres grupos restantes (SPK-AAV-01, SPK-AAV-02 y el vector parental) se sacrificaron el día 147.

Resultados

La Figura 13 muestra la evaluación de diferentes casetes de expresión de GAA con codones optimizados empaquetados en el vector AAV (SEC ID NOs: 30-32) en ratones C57BL/6 machos por ensayo de actividad GAA en plasma 70 días después de la infusión del vector. Los resultados son el promedio de repeticiones biológicas $n = 4-5$. Las barras de error representan la desviación estándar. NS, no significativo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Dos vectores, SPK-AAV-01 y SPK-AAV-02, mostraron consistentemente una actividad GAA significativamente mayor en el plasma (aproximadamente de 2 a 3 veces mayor en la dosis alta) en comparación con el vector parental (designado aquí como SPK-AAV-11).

La Figura 14 muestra la evaluación de diferentes casetes de expresión de GAA con codones optimizados empaquetados en el vector AAV (SEC ID NOs: 30-32) en ratones C57BL/6 machos mediante Western blot de GAA en plasma 7 días después de la infusión del vector. Los resultados son el promedio de repeticiones biológicas $n = 4-5$. Las barras de error representan la desviación estándar. NS, no significativo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

La Figura 15 muestra los niveles de actividad de GAA medidos en plasma después de la administración de casetes de expresión de GAA con codones optimizados empaquetados en el vector AAV (SEC ID NOs: 30-32) a ratones. Se inyectaron ratones C57BL/6 machos con una dosis de 5×10^{11} (panel superior) o 2×10^{12} vg/kg (panel inferior) de cualquiera de los dos vectores de AAV (SEC ID NOs: 30-32) que expresan GAA de mejor rendimiento ($n = 5$ animales / grupo). La actividad de GAA medida en el plasma de ratones que recibieron el vector SPK-AAV-11 (constructo de Δ GAApar parental) se muestra para comparación. A partir del día 42, la actividad de GAA en plasma fue significativamente mayor para los vectores SPK-AAV-01 y SPK-AAV-02 que para el vector SPK-AAV-11 (***) $p = < 0.001$, **** $p = < 0.0001$ Prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

EJEMPLO 5

Diseño de Estudio – Potencia en Ratas

El propósito de este estudio fue evaluar la potencia de SPK-AAV-02 en dos cepas de ratas diferentes. La actividad de GAA circulante se midió en plasma después de la administración del vector a ratas Wistar Hanover (n = 4) y Sprague Dawley (n = 5). Se inyectaron ratas macho por vía intravenosa a través de la vena de la cola con 2×10^{13} vg/kg de vector.

Resultados

La figura 16 muestra la evaluación del vector SPK-AAV-02 (pAAV-ApoE/hAAT.GAA13.BGH empaquetado en el vector AAV (SEC ID NOs: 30-32)) en ratas macho Wistar Hanover y Sprague Dawley en comparación con ratones C57BL/6 por GAA ensayo de actividad en plasma. Los resultados son el promedio de repeticiones biológicas n = 4-5. Las barras de error representan la desviación estándar.

Los niveles de actividad de GAA comenzaron a estabilizarse el día 28 con una actividad de GAA medida alrededor de 15,000 nmol/h/mL. A los ratones se les inyectó SPK-AAV-02 a una dosis 10 veces menor (2×10^{12} vg/kg de vector) que las ratas.

EJEMPLO 6

Diseño de Estudio – Potencia en Primates No Humanos (NHPs), Parte 1

Para evaluar los efectos a largo plazo de la expresión secretable de GAA, se administró una dosis única del vector SPK-AAV-01, SPK-AAV-02 o SPK-AAV-10 a una especie filogenéticamente cercana a los humanos, los macacos rhesus (*Macaca mulatta*), y se evaluaron los niveles de actividad de GAA en plasma en los animales.

Los macacos rhesus machos (n = 3 / cohorte de dosis) recibieron una infusión intravenosa de 30 minutos en la vena safena de una dosis única de 6×10^{12} vg/kg del vector SPK-AAV-01, SPK-AAV-02 o SPK-AAV-10. Después de la administración del vector de AAV, los animales se controlaron diariamente para las observaciones clínicas y se recogió sangre semanalmente.

Resultados

Se inyectaron macacos Rhesus con una dosis de 6×10^{12} vg/kg de vectores de AAV que expresan GAA (SEC ID NOs: 30-32) ($n = 3$ animales / grupo). La Figura 17 muestra los niveles de actividad de GAA medidos en plasma tras la administración de casetes de expresión de GAA empaquetados en el vector de AAV (SEC ID NOs: 30-32) a macacos rhesus machos. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de actividad GAA en plasma de los NHPs inyectados con el vector SPK-AAV-01, SPK-AAV-02 y SPK-AAV-10.

Los datos preliminares del estudio NHP confirman los resultados observados en los estudios con ratones y muestran que los niveles de actividad de GAA en plasma resultantes de la administración de SPK-AAV-01 y SPK-AAV-02 son similares (Figura 17).

EJEMPLO 7

Diseño de Estudio – Potencia en Primates No Humanos, Parte 2

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el perfil de transducción de SPK-AAV-01 y SPK-AAV-02 en monos verdes africanos (AGM; *Chlorocebus sabaeus*). Los machos AGM ($n = 4$ / cohorte de dosis) recibieron una infusión intravenosa de 30 minutos en la vena safena de una dosis única de 6×10^{12} vg/kg del vector SPK-AAV-01 o SPK-AAV-02. Después de la administración del vector de AAV, los animales se controlaron diariamente para las observaciones clínicas y se recogió sangre semanalmente.

Resultados

Los datos preliminares en monos verdes africanos confirman los resultados observados en estudios con ratones de que los niveles de actividad de GAA en plasma resultantes de la administración de SPK-AAV-01 y SPK-AAV-02 son similares (Figura 18).

EJEMPLO 8

Conclusiones

Los casetes de GAA con codones optimizados que expresan GAA humana secretable representan una mejora significativa con respecto al constructo de spΔGAAPar parental. En

particular, SPK-AAV-01 y SPK-AAV-02 exhiben una excelente potencia y expresión de GAA humana secretable en cultivos celulares, roedores y dos modelos de primates no humanos.

EJEMPLO 9

Diseño de Estudio – Rango de dosis en NHPs

Para evaluar la respuesta a la dosis de la expresión secretable de GAA, se administraron tres dosis del vector SPK-AAV-02 a una especie de primates filogenéticamente cercana a los humanos, se evaluaron los macacos rhesus (*Macaca mulatta*) y los animales para determinar los niveles de actividad de GAA en el transcurso de un mes.

Los macacos rhesus machos ($n = 4$ / cohorte de dosis) recibieron una infusión intravenosa (IV) de 30 minutos en la vena safena de una dosis de 2×10^{12} , 6×10^{12} , 2×10^{13} vg/kg del vector SPK-AAV-02. Los macacos rhesus hembras ($n = 4$ / cohorte de dosis) recibieron una infusión intravenosa de 30 minutos en la vena safena de una dosis de 2×10^{13} vg/kg del vector SPK-AAV-02. Después de la administración del vector de AAV, los animales se controlaron diariamente para observar las observaciones clínicas. Se recogió sangre semanalmente durante 4 semanas para medir la actividad de GAA, los niveles de antígeno GAA, la formación de IgG anti-GAA, la hematología y la química clínica, incluidos los niveles de glucosa para controlar las posibles alteraciones de la glucemia.

Resultados

La Figura 21 muestra los niveles de actividad de GAA medidos en plasma tras la administración del vector SPK-AAV-02 a macacos rhesus machos y hembras. Los resultados de la actividad de GAA medida en plasma 7, 14, 21 y 28 días después de la inyección del vector muestran una correlación entre la dosis de vector y el nivel de actividad de GAA en plasma. Los niveles de actividad GAA en el plasma de los NHPs femeninos inyectados a una dosis de 2×10^{13} vg/kg fueron aproximadamente 0.5 veces más bajos (49.6%) que los medidos en los NHPs masculinos inyectados a una dosis igual.

Los datos de este estudio de NHP confirman los resultados observados en los estudios de ratones, a saber, que los niveles de actividad de GAA en plasma derivados de vectores de AAV para la expresión de GAA secretable dan como resultado una actividad de GAA dependiente de la dosis en el plasma después de la administración del vector (Figura 21). Una sola infusión de SPK-AAV-02 en NHPs a tres dosis ascendentes demostró una expresión dependiente de la dosis de GAA en plasma de NHP.

EJEMPLO 10

Estudio NHP de Nueve Meses

Cada uno de SPK-AAV-01, SPK-AAV-02 y SPK-AAV-10 se administraron en una sola dosis (6×10^{12} vg/kg) mediante infusión intravenosa a macacos Rhesus macho (*Macaca mulatta*). Durante el curso del estudio, se observó una disminución en la proteína GAA activa en plasma y un aumento concomitante en los niveles de anticuerpos IgG anti-GAA en una porción de animales a los que se les administró vectores que expresan GAA secretables. La pérdida de la actividad de GAA y del nivel de antígeno en plasma probablemente se debió al desarrollo de una depuración inmune humoral mediada por IgG del producto proteico transgénico humano. En un esfuerzo por reducir la respuesta inmune humoral y posiblemente recuperar niveles de enzima GAA circulantes detectables, a partir del día 183, se administró a ciertos animales un régimen de inmunosupresión de rituximab mensual en combinación con ciclosporina A diaria.

Resultados

Se detectaron niveles de GAA secretada y activa en plasma en todos los animales, que mostraron niveles de actividad media máxima en el día 15 de 482.07 ± 47.90 , 664.43 ± 417.55 y 427.833 ± 307.94 nmol/ml/hr para SPK-AAV-01, SPK-AAV-02 y SPK-AAV-10, respectivamente. Se observaron niveles detectables de antígeno GAA circulante con niveles máximos medios de 14.84 ± 2.21 , 19.11 ± 23.23 , 14.64 ± 16.96 ng/ml para animales a los que se les administró SPK-AAV-01, SPK-AAV-02 y SPK-AAV-10, respectivamente. Concomitante con la disminución observada en GAA circulante, a partir del día 15, se observó un aumento en los niveles de IgG anti-GAA circulantes. El análisis de los genomas del vector, mediante qPCR de tejido hepático, confirmó la presencia del vector en el hígado, mostrando

copias medias del genoma del vector de 6.39 ± 2.72 , 11.43 ± 4.23 y 19.01 ± 13.93 por genoma haploide, para animales a los que se les administró SPK-AAV-01, SPK-AAV-02 y SPK-AAV-10, respectivamente.

Las muestras de hígado se analizaron para determinar los niveles de proteína GAA de longitud completa y GAA escindida (forma lisosomal). Las muestras de estudio se compararon con muestras de hígado Rhesus sin vector previo que sirvieron como control negativo, que no mostraron niveles detectables de GAA escindido o intacto en los niveles de proteína cargada ($n = 3$). La cantidad de proteína completa en el hígado del animal del estudio fue de 4.0 ± 7.0 , 5.4 ± 9.1 , 11.0 ± 11.3 ng de GAA / mg de proteína total en animales a los que se les administró SPK-AAV-01, SPK-AAV-02 y SPK-AAV-10, respectivamente. Cada cohorte contenía niveles más altos de GAA escindido que GAA de longitud completa, exhibiendo niveles de 41.6 ± 57.6 , 44.4 ± 74.5 , 49.0 ± 40.3 ng de GAA / mg de proteína total en animales a los que se les administró SPK-AAV-01, SPK-AAV-02 y SPK-AAV-10, respectivamente. Independientemente del procesamiento de GAA, las diferencias entre los grupos no fueron significativas ($P = 0.72$ para la forma de longitud completa (intacta); $P = 0.83$ para la forma lisosomal (escindida) por Kruskal-Wallis). En el extremo, todos los grupos a los que se les administró vectores AAV de la invención mostraron niveles detectables promedio de GAA por encima de la línea de base en el hígado.

Conclusión

La administración de cada uno de SPK-AAV-01, SPK-AAV-02 y SPK-AAV-10 resultó en niveles plasmáticos detectables y crecientes de antígeno GAA, alcanzando un máximo durante las semanas 2-3 y correlacionándose linealmente con la actividad GAA, exhibiendo cinéticas similares independientemente de genoma del vector. Tanto la actividad de GAA como los niveles de antígeno de GAA en plasma disminuyeron consecutivamente durante los siguientes puntos de tiempo en todos los animales menos uno. Como se observó previamente en los NHPs tratados con vectores de AAV, se observó una respuesta humoral al producto transgénico humano a partir del día 43, que se correlacionó inversamente con los niveles de antígeno GAA en plasma en todos los animales que desarrollaron una respuesta IgG específica de GAA. La supresión de los niveles de IgG anti-GAA, mediante la administración de un agente inmunosupresor dirigido a la respuesta de IgG mediada por células B (rituximab), dio como

resultado una restauración de los niveles de GAA detectables en plasma en un subconjunto de animales. Para todos los grupos, las copias del genoma del vector fueron detectables en el hígado al final del estudio, incluso en ausencia de niveles plasmáticos circulantes medibles de GAA. En consecuencia, la proteína GAA se detectó en todos los tejidos hepáticos tratados con el vector al final del estudio, mientras que el antígeno GAA estaba por debajo del límite de detección en tejido hepático sin tratamiento previo. Tomados en conjunto, estos resultados indican que los vectores de AAV de la invención son capaces de mediar en la expresión duradera de GAA humana secretable en el hígado durante 9 meses, independientemente del desarrollo de una respuesta de anticuerpos al producto transgénico humano.

EJEMPLO 11

Estudio de Inmunosupresión en Roedores de Nueve Semanas

Se midieron los niveles de expresión del producto transgénico GAA durante nueve semanas después de la administración intravenosa de una dosis única de 2×10^{12} vg/kg de partículas SPK-AAV-02, en presencia o ausencia de rapamicina y/o prednisolona, en ratones C57BL/6 machos y hembras. Los ratones se probaron en 5 grupos, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2 – Designaciones de Grupo y Niveles de Dosis

Grupo	No. de Animales		SPK-AAV-02 (vg/kg)	Rapamicina (2-3 mg/kg)*	Prednisolona (1-0.25 mg/kg)**
	Macho	Hembra			
1	5	5	Vehículo		
2	10	10	2×10^{12}		
3	10	10		X	
4	10	10			X
5	10	10		X	X

vg = genomas del vector, X = tratamiento administrado

* La rapamicina se administró diariamente a 2 mg/kg desde el día (-) 7 hasta el día 5. A partir del día 6, la administración se cambió a 3 mg/kg en días alternos.

** La prednisolona se administró a una concentración de 1 mg/kg desde el día (-) 1 hasta el día 15, 0.5 mg/kg desde el día 16 hasta el día 22 y 0.25 mg/kg desde el día 23 hasta el día 28.

En los grupos que recibieron agente(s) inmunosupresore(s), se administraron agente(s) antes de la dosificación de partículas de AAV y durante las primeras 5 semanas del estudio. Una vez completada la dosificación de AAV, los animales se controlaron para las observaciones clínicas y el peso corporal durante 9 semanas. Al final del estudio, se realizó química clínica y hematología en muestras de sangre, y se realizó histopatología en tejidos seleccionados. Los anticuerpos IgG contra la cápside rAAV y la actividad GAA plasmática se evaluaron semanalmente durante todo el estudio.

Resultados

Los niveles de actividad de GAA en plasma se detectaron por encima del antecedente en todos los animales a los que se les administró el vector. Los machos administrados con vehículo en el Grupo 1 mostraron niveles de antecedente de aproximadamente entre 300-400 nmol/mL/h. Los niveles circulantes de actividad GAA aumentaron después de la administración del vector con cinéticas ligeramente diferentes dependiendo del grupo de tratamiento inmunosupresor, pero exhibieron niveles medios pico equivalentes de actividad GAA. En particular, los niveles medios pico de actividad GAA fueron 16114 ± 5411 , 14875 ± 6882 , 14890 ± 6882 y 21480 ± 6340 nmol/mL/h para los machos en el Grupo 2 (SPK-AAV-02 solo), Grupo 3 (SPK -AAV-02, 2-3 mg/kg de rapamicina), Grupo 4 (SPK-AAV-02, 1-0.25 mg/kg de prednisolona) y Grupo 5 (SPK-AAV-02, 2-3 mg/kg de rapamicina, 1-0.25 mg/kg de prednisolona), respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles máximos de actividad de GAA entre ninguno de los grupos de tratamiento de AAV.

En ratones hembras, los niveles medios pico de actividad GAA fueron 7380 ± 4034 , 5912 ± 3259 , 6096 ± 3249 y 9955 ± 3104 nmol/mL/h para el Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4 y Grupo 5, respectivamente. Estos niveles de actividad de GAA estaban significativamente por encima del fondo detectado en animales hembras a los que se les administró vehículo. Como se vio con los ratones machos, los niveles pico de actividad GAA en las hembras no fueron estadísticamente significativamente diferentes entre ninguno de los grupos de tratamiento con AAV. Las diferencias observadas en los niveles plasmáticos de actividad GAA entre machos y hembras son consistentes con el fenómeno bien documentado de la disminución de la transducción de hepatocitos de AAV en ratones hembra (Davidoff *et al.*, 2003, Blood, 102: 480-488; DOI: 10.1182 / sangre-2002-09-2889).

Se detectó IgG de cápside anti-rAAV en plasma en todos los animales a los que se les administró SPK-AAV-02, mostrando niveles medios máximos de 86527 ± 92140 , 6695 ± 3555 , 64368 ± 29635 y 11374 ± 6053 ng/mL para machos en el Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4 y Grupo 5, respectivamente, y niveles medios pico de 182009 ± 148148 , 66141 ± 77925 , 182654 ± 90161 y 57752 ± 59192 ng/ml para las hembras de los Grupos 2, 3, 4 y 5, respectivamente. El Grupo 1 (vehículo) tanto para machos como para hembras tenía niveles de IgG de la cápside anti-rAAV que estaban por debajo del límite cuantitativo del ensayo para todos los puntos de tiempo.

Conclusión

La administración de SPK-AAV-02 dio como resultado niveles de actividad GAA detectables en todos los animales. El tratamiento combinado con rapamicina y prednisolona provocó que los niveles de actividad GAA aumentaran estadísticamente (frente al vector rAAV solo) en los días 22, 36 y 42 en ratones machos y en el día 43 en animales hembras. Es de destacar que la diferencia en los niveles pico de actividad GAA, independientemente de cuándo se alcanzó la expresión máxima, no fue estadísticamente significativa entre ninguno de los grupos de tratamiento de AAV dentro de los sexos.

Se observó una respuesta de IgG humoral contra la cápside de rAAV en todos los grupos a los que se les administró SPK-AAV-02. En ambos sexos, la presencia de rapamicina (Grupos 3 y 5) redujo significativamente la formación de IgG anti-cápside en comparación con el vector solo. El tratamiento con prednisolona tuvo efectos más modestos sobre la formación de IgG anti-cápside, con una reducción significativa los días 15, 43 y 60 en machos y los días 43 y 60 en hembras en el Grupo 4.

La inmunosupresión con rapamicina y/o prednisolona en ratones dio como resultado una disminución de las respuestas humorales a la cápside rAAV y no afectó significativamente los niveles pico de actividad GAA en plasma.

EJEMPLO 12

Dosis única de 4 semanas coadministrada con rapamicina en NHP

Este estudio evaluó la actividad de GAA circulante (niveles de actividad de GAA en plasma) durante un período de cuatro semanas después de la administración de una dosis única de SPK-AAV-02 a 5.5×10^{13} vg/kg, en presencia de rapamicina, en tres monos machos verdes africanos (*Chlorocebus sabaeus*).

A los animales se les administró rapamicina (2 mg/kg al día) comenzando 5 días antes de la dosificación de AAV y continuando durante el estudio de cuatro semanas. Se administró por vía intravenosa una dosis única de 5.5×10^{13} vg/kg de SPK-AAV-02 a través de la vena safena. Una vez completada la dosificación de AAV, los animales se controlaron para observar las observaciones clínicas y el peso corporal durante 4 semanas. Al final del estudio, se realizó química clínica y hematología en muestras de sangre, y se realizó histopatología en tejidos seleccionados. La actividad de GAA en plasma se midió semanalmente durante todo el estudio.

Resultados

Los niveles de actividad de GAA en plasma estuvieron por encima del nivel de referencia en todos los animales después de la administración de SPK-AAV-02, con niveles de actividad pico para cada uno de los tres animales que alcanzaron 1158.1, 711.9 y 623.8 nmol/mL/h, en el punto final medido (Tabla 3).

Tabla 3 - Actividad de GAA en plasma para NHPs individuales administrados con rapamicina.

Actividad GAA en Plasma (nmol/ml/hr)				
	Número de NHP Individual			Media $\pm$ SD
	1	2	3	
Punto de Referencia	2.1	4.9	3.7	3.6 ± 1.4
Día 7	777.2	331.3	187.4	432.0 ± 307.5
Día 14	924.0	349.9	368.0	547.3 ± 326.4
Día 21	973.2	289.6	490.0	584.3 ± 351.4
Día 28	1158.1	711.9	623.8	831.3 ± 286.5

Conclusión

La administración de SPK-AAV-02 dio como resultado una actividad GAA plasmática detectable en los tres NHPs. La combinación de SPK-AAV-02 y rapamicina fue bien tolerada y tuvo un perfil de seguridad favorable en todas las pruebas medidas.

EJEMPLO 13

Eficacia terapéutica en Modelo Pompe en ratón $Gaa^{-/-}$

Se llevó a cabo un estudio de seguimiento de 10 meses en ratones $Gaa^{-/-}$ de 4 meses (un modelo de ratón establecido de la enfermedad de Pompe) a los que se les administró SPK-AAV-02 en tres dosis (1.25×10^{11} , 5×10^{11} y 2×10^{12} vg/kg). El estudio demostró: (1) aumentos dependientes de la dosis en la actividad de la enzima GAA circulante, (2) una mejora significativa de la fuerza muscular y (3) ninguna respuesta inmunitaria humoral anti-GAA significativa.

EJEMPLO 14

Métodos

Ensayo basado en células para medir la eficiencia de expresión de proteínas de plásmidos que codifican transgenes GAA humanos secretables

Las células Huh7 se sembraron en placas de 48 pocillos a 5×10^4 células por pocillo durante la noche en DMEM + FBS al 10% + penicilina / estreptomicina / L-glutamina. Los plásmidos preparados usando el kit Plasmid Giga (Qiagen) se transfectaron en células a 250 ng por pocillo usando Lipofectamine® 2000. Las células se mantuvieron a 37 grados Celsius y CO₂ al 5% durante 48-72 horas y los sobrenadantes se recolectaron y almacenaron en placas de microvaloración de baja retención a -80 grados Celsius hasta que se analice la actividad GAA. Los sobrenadantes se diluyeron 1:10 y se incubaron con 3 mM de sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil α -D-glucopiranosido durante 1 hora a 37 grados Celsius. La reacción se detuvo después de 1 hora con tampón de carbonato (pH 10.5) y se comparó con una curva estándar generada al diluir 4-metilumbeliferona (4-MU) en el tampón de parada, creando una curva estándar de 12 puntos a partir de 250 pmol/ μ L y terminando en 0 pmol/ μ L. La placa se leyó a λ_{ex} 360 nm; λ_{em} 449 nm.

Inyección hidrodinámica de ADN plasmídico para evaluar la potencia de los plásmidos que codifican transgenes GAA humanos secretables

Los plásmidos preparados usando el kit Plasmid Giga (Qiagen) se diluyeron en PBS180 + Pluronic al 0.001%. Se introdujeron 25 microgramos de ADN plasmídico correspondientes a cada casete a ensayar en ratones C57BL/6 macho de aproximadamente 8 semanas de edad por vía intravenosa en la vena lateral de la cola mediante inyección hidrodinámica. 72 horas después de la inyección, se recogió sangre completa en tubos de citrato de sodio mediante punción en la vena submandibular. Se desechó la primera gota de sangre y se recogieron 200 μ L de sangre en citrato de sodio, y se invirtió el tubo para evitar la hemólisis y la coagulación. La muestra se centrifugó a 10,000 RPM durante 10 minutos a 4 grados Celsius. El plasma se dividió en alícuotas en tubos y se almacenó en un congelador a -80 grados Celsius hasta que se analizó la actividad de GAA. Las muestras de plasma se diluyeron en diversos grados y se incubaron con 3 mM de sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil α -D-glucopiranosido durante 1 hora a 37 grados Celsius. La reacción se detuvo después de 1 hora con tampón de carbonato (pH 10.5) y se comparó con una curva estándar generada al diluir 4-MU en el tampón de parada, creando una curva estándar de 12 puntos comenzando en 250 pmol/ μ L y terminando en 0 pmol/ μ L. La placa se leyó a λ ex 360 nm; λ em 449 nm.

Ensayo basado en células para medir la potencia de los vectores de AAV que codifican transgenes GAA humanos secretables

Las células Huh7 se sembraron en placas de 48 pocillos a razón de 5×10^4 células por pocillo durante la noche. Se prepararon SPK-AAV-01 y SPK-AAV-02 del vector stock en una curva de dosis (multiplicidad de infección, MOI, rango de 2×10^6 - 1×10^4) en Opti-MEMTM o DMEM + 10% FBS + penicilina / estreptomycin / L-glutamina. El medio existente se eliminó de las células Huh7 y se reemplazó con un medio que contenía partículas de virus. Las células se mantuvieron a 37 grados Celsius y CO₂ al 5% durante 72 horas, y los sobrenadantes se recolectaron y almacenaron en placas de microvaloración de baja retención a -80 grados Celsius hasta que se ensayaron para determinar la actividad GAA. Los sobrenadantes se diluyeron 1:10 y se incubaron con 3 mM de sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil α -D-glucopiranosido durante 1 hora a 37 grados Celsius. La reacción se detuvo después de 1 hora

con tampón de carbonato (pH 10.5) y se comparó con una curva estándar generada al diluir 4-MU en el tampón de parada, creando una curva estándar de 12 puntos comenzando en 250 pmol/ μ L y terminando en 0 pmol/ μ L. La placa se leyó a λ_{ex} 360 nm; λ_{em} 449 nm.

Ensayo de actividad GAA en plasma de ratón / rata

Se recogió sangre completa en tubos de citrato de sodio mediante punción en la vena submandibular. Se desechó la primera gota de sangre y se recogieron 200 μ L de sangre en citrato de sodio; el tubo se invirtió para evitar la hemólisis y la coagulación. La muestra se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 grados Celsius. El plasma se dividió en alícuotas en tubos y se almacenó en un congelador a -80 grados Celsius hasta que se analizó la actividad de GAA. Las muestras de plasma se diluyeron en diversos grados y se incubaron con 3 mM de sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil α -D-glucopiranosido durante 1 hora a 37 grados Celsius. La reacción se detiene después de 1 hora con tampón de carbonato (pH 10.5) y se compara con una curva estándar generada al diluir 4-MU en el tampón de parada, creando una curva estándar de 12 puntos que comienza en 250 pmol/ μ L y termina en 0 pmol/ μ L. La placa se leyó a λ_{ex} 360 nm; λ_{em} 449 nm.

Ensayo de actividad GAA en plasma NHP (rhesus / AGM)

Se inyectaron macacos rhesus machos / monos verdes africanos por vía intravenosa a través de la vena safena y se recogió sangre completa en tubos de citrato de sodio, que se invirtieron para evitar la hemólisis y la coagulación. La muestra se centrifugó a 10,000 RPM durante 10 minutos a 4 grados Celsius. El plasma se dividió en alícuotas en tubos y se almacenó en un congelador a -80 grados Celsius hasta que se analizó la actividad de GAA. Las muestras de plasma se diluyeron en diversos grados y se incubaron con 3 mM de sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil α -D-glucopiranosido durante 1 hora a 37 grados Celsius. La reacción se detuvo después de 1 hora con tampón de carbonato (pH 10.5) y se comparó con una curva estándar generada al diluir 4-MU en el tampón de parada, creando una curva estándar de 12 puntos comenzando en 250 pmol/ μ L y terminando en 0 pmol/ μ L, o una curva estándar de 11 puntos (5 μ M / mL – 0.49 nM/mL). La placa se lee a λ_{ex} 360 nm; λ_{em} 449 nm. La actividad GAA para las muestras analizadas se interpoló a partir de la curva estándar de 4-MU y se expresó como velocidad (nanomol / mililitro / hora (nmol / mL / h)).

Evaluación del nivel de proteína de GAA en sobrenadantes de Huh7 por Western Blot

Las células Huh7 se sembraron en placas de 48 pocillos a razón de 5×10^4 células por pocillo durante la noche. Se prepararon SPK-AAV-01 y SPK-AAV-02 del vector stock en una curva de dosis (multiplicidad de infección, MOI, rango de 2×10^6 - 1×10^4) en Opti-MEM™ o DMEM + 10% FBS + penicilina / estreptomycin / L-glutamina. El medio existente se eliminó de las células Huh7 y se reemplazó con medio que contenía partículas de virus. Las células se mantuvieron a 37 grados Celsius y CO₂ al 5% durante 72 horas, y los sobrenadantes se recolectaron y almacenaron en placas de microvaloración de baja retención a -80 grados Celsius hasta que se analizaron para determinar el nivel de proteína GAA. Los sobrenadantes se diluyeron 1:20 con tampón RIPA, se incubaron a 95 grados Celsius durante 5 minutos y se procesaron en un gel Bis-Tris NuPage al 4-12% con tampón de ejecución MOPS. La proteína se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (pvdf) usando el sistema iBlot® (ThermoFisher) y se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón Odyssey® TBS. La membrana se incubó durante la noche a 4 grados Celsius con el anticuerpo primario, anti-GAA humana de conejo (Abcam) diluido 1:1000. La membrana se lavó y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con el anticuerpo anti-conejo secundario fluorescente diluido 1:10,000. La membrana se lavó y se obtuvieron imágenes usando el sistema de imágenes Li-Core®. Las bandas se compararon con 10 ng de Myozyme® y el marcador. El análisis de densitometría se realizó usando el software Li-Core® y las bandas se normalizaron al control Myozyme®.

Evaluación del nivel de proteína de GAA en plasma de ratón por Western Blot

Se inyectaron ratones C57BL/6 machos y hembras por vía intravenosa a través de la vena de la cola, y se recogió sangre completa en tubos de citrato de sodio mediante punción en la vena submandibular. Se desechó la primera gota de sangre y se recogieron 200 µL de sangre en citrato de sodio; el tubo se invirtió para evitar la hemólisis y la coagulación. La muestra se centrifugó a 10,000 RPM durante 10 minutos a 4 grados Celsius. El plasma se dividió en alícuotas en tubos y se almacenó en un congelador a -80 grados Celsius hasta que se analizó el nivel de proteína GAA. El plasma se diluyó 1:20 con tampón RIPA, se incubó a 95 grados Celsius durante 5 minutos y se corrió en un gel Bis-Tris NuPage al 4-12% con tampón de ejecución MOPS. La proteína se transfirió a una membrana de pvdf usando el sistema iBlot®

(ThermoFisher) y se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón Odyssey® TBS. La membrana se incubó durante la noche a 4 grados Celsius con el anticuerpo primario, anti-GAA humana de conejo (Abcam) diluido 1:1000. La membrana se lavó y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con el anticuerpo anti-conejo secundario fluorescente diluido 1:10,000. La membrana se lavó y se obtuvieron imágenes usando el sistema de imágenes Li-Core®. Las bandas se compararon con 10 ng de Myozyme® y el marcador. El análisis de densitometría se realizó usando el software Li-Core® y las bandas se normalizaron al control Myozyme®.

Evaluación del nivel de proteína de GAA en plasma NHP por WES

Se inyectaron macacos rhesus machos / monos verdes africanos por vía intravenosa a través de la vena safena y se recogió sangre completa en tubos de citrato de sodio, que se invirtieron para evitar la hemólisis y la coagulación. La muestra se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 grados Celsius. El plasma se dividió en alícuotas en tubos y se almacenó en un congelador a -80 grados Celsius hasta que se analizaron los niveles de proteína GAA. Las muestras de plasma se diluyeron 1:6000 en diluyente de muestra. Se añadió una curva estándar doble de 8 puntos a cada chip con el Myozyme® comenzando a una concentración de 50 ng/mL. Las muestras se diluyeron en el tampón, se desnaturalizaron a 95 grados Celsius durante 5 minutos y se cargaron en el chip WES™ (Protein Simple). El anticuerpo primario se añadió a una dilución de 1:1000 y el anticuerpo secundario se cargó a la dilución de trabajo. El chip se ejecutó de acuerdo con el software WES™ Protein Simple, y las bandas resultantes se analizan y comparan con la curva estándar de Myozyme® y se normalizan a la segunda banda no específica.

Anticuerpos IgG de cápside anti-AAV

La formación de IgG total de la cápside anti-AAV se midió con un ensayo de captura ELISA. Los pocillos de la placa ELISA se recubrieron con 50 µL de una solución que contenía 1 µg/mL de partículas de rAAV. Se diluyó IgG humana total (Southern Biotech, 0150-01) para generar una curva estándar de 10 puntos que fluctuaba de 10,000 ng/mL a 0.5 ng/mL y se añadió a la placa. El límite de cuantificación del ensayo fue de 460 ng/mL después del cálculo inverso. Se prepararon e incluyeron tres niveles de muestras de control de calidad en cada placa para

evaluar el rendimiento del ensayo. Las partículas de la cápside, los estándares y los controles de calidad se incubaron durante la noche a 4 grados Celsius. Después del lavado, los pocillos se bloquearon con BSA al 2%, Tween-20 al 0.05% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Se cargaron en la placa diluciones en serie de muestras en tampón de bloqueo y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Se utilizó un anticuerpo IgG antihumano de oveja conjugado con HRP (GE Healthcare, NA933V) diluido 1:5000 en tampón de bloqueo como anticuerpo de detección y se incubó en la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se desarrolló la actividad peroxidasa durante una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con sustrato de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1M y la placa se leyó mediante un lector de placas de absorbancia para determinar la densidad óptica (DO) a 450 nm. La concentración de IgG se determinó frente a una curva estándar hecha con dilución en serie de IgG total humana purificada.