

VECTORES DE VIRUS ADENOASOCIADOS PARA EL TRATAMIENTO DE MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IV A

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a secuencias de polinucleótido y vectores útiles para la expresión de proteínas de interés y su utilización en terapia génica. La presente invención también se refiere a vectores y secuencias de ácido nucleico útiles para el tratamiento de mucopolisacaridosis (MPS), y en particular, para el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo IVA o síndrome de Morquio A.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El lisosoma es un orgánulo que se encuentra en el citoplasma de las células animales que contiene más de 50 hidrolasas que descomponen las biomoléculas durante el reciclado de los componentes celulares gastados o después de haber engullido virus y bacterias. Este orgánulo contiene varios tipos de enzimas hidrolíticas, incluyendo proteasas, nucleasas, glucosidasas, lipasas, fosfolipasas, fosfatasas y sulfatasas. Todas las enzimas son hidrolasas ácidas.

15

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSD) están causadas por defectos genéticos que afectan a una o más enzimas lisosomales. Estas enfermedades genéticas en general resultan de una deficiencia en una actividad enzimática particular presente en el lisosoma. En un menor grado, estas enfermedades pueden ser debidas a deficiencias en proteínas implicadas en la biogénesis lisosomal.

20

25

Las LSD son individualmente raras, aunque como grupo estos trastornos son relativamente comunes en la población en general. La prevalencia combinada de las LSD es de aproximadamente 1 por 5.000 nacimientos vivos. Sin embargo, algunos grupos dentro de la población general están particularmente afectados por una alta ocurrencia de LSD. Por ejemplo, la prevalencia de enfermedades de Gaucher y Tay-Sachs en descendientes de individuos de la Europa del Este y Central judíos (Ashkenazi) es de 1 por 600 y 1 por 3.900 nacimientos, respectivamente.

30

Las mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo de siete enfermedades LSD caracterizadas por la ausencia o deficiencia de una enzima lisosomal específica

35

implicada en el metabolismo de Glicosaminoglicanos (GAG). Todas las MPS tienen un patrón recesivo autosómico de herencia, con la excepción de MPSII (síndrome de Hunter) que tiene una herencia ligada al cromosoma X.

De las siete MPS, la mucopolisacaridosis tipo IV (MPSIV o síndrome de Morquio) tiene dos subtipos, A y B. Morquio A y B son ambas afecciones hereditarias recesivas autosómicas, que afectan a machos y hembras igualmente. Morquio A o MPSIVA es una afección rara y son escasos y variables los datos existentes sobre la prevalencia. Las estimaciones publicadas oscilan de 1 por 76.320 en Irlanda del Norte a 1 por 641.178 en Australia Occidental. MPSIVA está causada por la deficiencia de una de las enzimas implicadas en la degradación del GAG queratán sulfato (KS) y condroitín 6-sulfato (C6S). El gen que codifica esta enzima se ha identificado y se han publicado diversas mutaciones.

MPSIVA está causada por la deficiencia en la actividad de la enzima galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa (GALNS, EC 3.1.6.4). La GALNS es una enzima lisosomal que hidroliza el grupo éster del sulfato de N-acetilgalactosamina-6-sulfato en el extremo no reductor de condroitín-6-sulfato (C6S) y aquel de galactosa-6-sulfato en el extremo no reductor del queratán sulfato (KS). Como consecuencia de la acumulación prolongada de C6S y KS no degradado se produce daño celular progresivo, dando como resultado enfermedad multisistémica. Actualmente, se han identificado 180 mutaciones diferentes en el gen *GALNS* humano que conducen a la deficiencia de la actividad de la enzima GALNS.

La mayoría de KS y C6S se producen por los condrocitos, y por lo tanto, los sustratos no degradados se acumulan principalmente en las células y la matriz extracelular del cartílago. Esto tiene un impacto directo sobre el desarrollo del cartílago y el hueso, conduciendo a displasia esquelética sistémica. En pacientes con Morquio A, las células de cartílago se disponen en vacuolas, y esto da como resultado condrogénesis anormal y/o osificación endocondral. La mayoría de los pacientes con MPSIVA nacen aparentemente sanos y los síntomas se desarrollan progresivamente. Los síntomas iniciales se reconocen entre 1 y 3 años de edad y la edad media en el diagnóstico es alrededor de 4,7 años. Las características esqueléticas principales incluyen: enanismo de tronco notablemente corto, hipoplasia odontoide, *pectus carinatum*, cifosis, escoliosis, genu valgo, *coxa valga*, alado de las costillas inferiores, articulaciones

hipermóviles y andares anormales con una tendencia a la caída. Otras complicaciones potenciales incluyen compromiso pulmonar, cardiopatía valvular, pérdida de audición, hepatomegalia, tela glerosa corneal fina, características faciales gruesas y dientes muy espaciados con esmalte anormalmente fino y
5 frecuentes caries. Los pacientes con MPSIVA conservan la inteligencia. La tasa de progresión de la enfermedad y las características fenotípicas presentes son variables entre los pacientes. Los fenotipos de MPSIVA están definidos como graves si la altura final está por debajo de 120 cm, como intermedio si la altura final está por encima de 120 cm y por debajo de 140 cm, y como leve si la altura
10 última está por encima de 140 cm a lo largo de los años. Las expectativas de vida publicadas oscilan desde la segunda década de vida a los 70 años de edad. Esta variabilidad puede estar relacionada con múltiples factores, tales como la naturaleza de la mutación, etnicidad o diferencias en la atención sanitaria que recibe el paciente.

15 Hasta recientemente, no ha habido terapias aprobadas específicas de enfermedad para el síndrome de MPSIVA. Los tratamientos disponibles eran sintomáticos y estaban basados en la administración de un amplio rango de fármacos no específicos para la prevención y el control de las complicaciones de la enfermedad. Sin embargo, en los últimos años han llegado a estar disponibles
20 dos opciones terapéuticas principales para pacientes con MPSIVA: terapia de reemplazo enzimático (TRE) y trasplantes de células madre hematopoyéticas (TCMH). El diseño de ambas estrategias terapéuticas depende de la posibilidad de reacción cruzada, basándose en el hecho de que las células normales secretan cantidades significativas de enzimas lisosomales solubles etiquetadas
25 como manosa-6-fosfato (M6P), tales como GALNS, que se pueden absorber posteriormente desde el compartimento extracelular por otras células mediante receptores de M6P de la membrana plasmática y dirigirse a los lisosomas. Además, hay un umbral de actividad enzimática residual, en general muy bajo, por encima del cual la célula es capaz de copiar con influjo de sustrato y la
30 enfermedad no afecta a los sujetos, sugiriendo que restaurar la actividad normal no es un requisito para modificar el curso clínico.

Para MPSIVA, se ha ensayado TRE en dos modelos de ratón murinos diferentes de la enfermedad (Tomatsu y col., 2008, 2010a, 2015). En este estudio, una dosis de 250 U/g de GALNS murina recombinante (rGALNS) se
35 administró semanalmente por vía intravenosa o intraperitonealmente al ratón con

MPSIVA de 0,5 a 12 semanas de vida. Una semana después de la última dosis, los ratones con MPSIVA mostraron una reducción marcada del almacenamiento de GAG en órganos viscerales, células del revestimiento sinusal en la médula ósea, válvulas cardíacas, ligamentos y tejidos conectivos y una reducción marcada de niveles de KS en sangre, evidenciando corrección somática mediante la infusión de rGALNS.

En 2014, la GALNS humana recombinante comercializada como Elosulfase alfa, VIMIZIM® (BioMarin Pharmaceutical Inc) fue aprobada por la "Food and Drug Administration" (FDA) y la "European Medicines Agency" (EMA) para el tratamiento de MPSIVA. El tratamiento se administró semanalmente a una dosis de 2 mg/kg mediante infusión intravenosa, con un periodo de tiempo de infusión promedio de 3,5-4,5 horas. La edad de los pacientes inscritos oscilaba de 5 a 57 años. En el momento inicial, todos los pacientes inscritos podían caminar entre 30 y 325 m en el ensayo de caminar durante 6 minutos (6MWT) (Sanford and Lo, 2014). El criterio de valoración primario se estableció como el cambio desde el momento inicial en la distancia caminada en 6MWT en la semana 24 después de iniciar el tratamiento. Los criterios de valoración secundarios incluyeron cambios desde el momento inicial en el ritmo de subir escaleras en tres minutos (3MSCT) y en los niveles de KS en orina en la semana 24. Los pacientes se dividieron en dos grupos de tratamiento: aquellos que recibieron VIMIZIM® a una dosis semanal de 2 mg/kg y aquellos con 2 mg/kg una vez cada dos semanas. En pacientes que recibieron VIMIZIM® 2 mg/kg semanalmente, la distancia caminada en 6MWT se incrementó hasta 22,5 m en comparación con la cohorte de placebo 24 semanas después de iniciar el tratamiento. Sin embargo, no había diferencia en el ritmo de subir escaleras en pacientes que recibieron VIMIZIM®. Además, no se observó mejora adicional en la capacidad de caminar con respecto a las primeras 24 semanas de tratamiento. Por otro lado, no había diferencias en 6MWT y 3MSCT en pacientes que recibieron VIMIZIM® 2 mg/kg una vez cada dos semanas, en comparación con el grupo placebo. La reducción en los niveles de KS en orina desde el momento inicial, una medida del efecto farmacodinámico, era mayor en todos los grupos de tratamiento con VIMIZIM® (2014). Los pacientes que inicialmente estaban incluidos en el ensayo control con placebo eran después idóneos para iniciar el tratamiento con VIMIZIM® en un ensayo abierto (MOR-005).

Debido a una posible hipersensibilidad a VIMIZIM®, el soporte médico está

disponible durante la administración del producto. Durante el ensayo, los sucesos adversos más graves descritos han sido reacciones anafilácticas y de hipersensibilidad, que pueden aparecer en cualquier momento durante la infusión de VIMIZIM® o hasta 3 horas después de la administración del producto.

5 Los pacientes con enfermedad respiratoria aguda pueden tener riesgo incrementado y requerir seguimiento adicional. Estas reacciones anafilácticas, que pueden comprometer la vida del paciente, incluyen tos, erupción, tensión de garganta, urticaria, enrojecimiento, cambios en el color de la piel, baja presión arterial, dificultad para respirar, dolor de pecho, y síntomas gastrointestinales
10 tales como náuseas, dolor abdominal, arcadas, y vómitos (<http://vimizim.com>). Otras desventajas de TRE incluyen: 1) la dificultad de realizar infusiones intravenosas largas de 3,5-4,5 horas en pacientes de pediatría, 2) el hecho de que el 100 % de los pacientes tratados con VIMIZIM® 2 mg/kg una vez a la semana desarrollaron anticuerpos anti-fármaco después de 4 semanas, 3) todos
15 los pacientes ensayados desarrollaron anticuerpos neutralizantes capaces de inhibir el fármaco desde la unión al receptor de manosa-6-fosfato al menos una vez durante el ensayo, y 4) el alto coste de la terapia, que incluye también los coste del cuidado en casa (2014).

El trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) usando células
20 madre derivadas de la médula ósea (trasplante de médula ósea, TMO) ha demostrado eficacia en el tratamiento de la patología tanto somática como neurológica en pacientes con otras MPS. El inconveniente principal sobre la corrección del fenotipo por TCMH es el impacto mínimo que el tratamiento tiene sobre el crecimiento de pacientes con MPSIVA (Chinen y col., 2014; Wang y col.,
25 2016; Yabe y col., 2016).

Dadas las limitaciones de las opciones terapéuticas actuales para MPSIVA, se necesitan planteamientos alternativos.

La terapia génica *in vivo* ofrece la posibilidad de un tratamiento de una vez para MPSIVA y otras enfermedades hereditarias, con la posibilidad de
30 efectos beneficiosos a largo plazo.

Los estudios preclínicos de terapia génica para el síndrome de Morquio A se han basado principalmente en la administración de vectores derivados de γ -retrovirus, lentivirus, y adenoasociados.

La transducción *in vitro* de linfoblastos B humanos de MPSIVA,
35 queratinocitos humanos, mioblastos murinos, y sinoviocitos de conejo con

vectores derivados de γ -retrovirus que codifican el gen de GALNS humana resultó en un incremento en la actividad enzimática de GALNS que conduce a una reducción del almacenamiento intracelular de GAG (Toietta y col., 2001).

La administración de vectores derivados de lentivirus que codifican para el ADNc de GALNS humana a fibroblastos de piel de Morquio A mostró niveles de actividad enzimática 7,5 veces mayores que aquellos de fibroblastos de MPSIVA no sometidos a transducción, aunque menos que aquellos de fibroblastos sanos humanos. El uso de vectores lentivirales también condujo a la normalización de las actividades de β -hexosaminidasa y β -galactosidasa, las cuales se han publicado que son biomarcadores secundarios para Morquio A (Almeciga y col., 2013; Salazar y col., 2016).

La transferencia génica mediada por vectores virales adenoasociados (AVV), en particular, está rápidamente surgiendo como el enfoque de elección para muchas aplicaciones de terapia génica *in vivo*, debido a la alta eficiencia de transducción y a la ausencia de patogenicidad de estos vectores. Los vectores AAV pueden transducir células postmitóticas y varios estudios preclínicos y clínicos han demostrado el potencial de la transferencia génica mediada por vector AAV para conducir eficazmente la expresión prolongada de transgenes terapéuticos para una variedad de enfermedades.

El uso de vectores AAV permitió la evaluación del efecto de la coexpresión de GALNS y el factor modificador de sulfatasa 1 (SUMF1) sobre la actividad enzimática. Esta coexpresión dio como resultado un incremento de hasta 4 veces en la actividad enzimática en cultivos celulares (Almeciga-Díaz y col., 2010). La administración *in vivo* de vectores AAV-GALNS en un modelo de Morquio A en ratón mostró que la actividad enzimática en plasma se restauraba hasta un 8,5 % de los niveles del tipo silvestre 12 semanas después de una administración intravenosa única, mientras que la coadministración con el vector AAV-SUMF1 dio como resultado un incremento de la actividad de GALNS de hasta un 19 % de los niveles del tipo silvestre. La actividad enzimática de GALNS también se incrementó hasta el 30 % y 33 % del tipo silvestre en corazón y hueso, respectivamente (Almeciga Javier, Montaña Adriana, Shunji Tomatsu, 2012).

Para mejorar la administración en hueso de la enzima GALNS, se desarrolló un vector AAV modificado que portaba un péptido de aminoácidos ácidos corto dentro de la cápside viral para conferir afinidad al virus por la hidroxiapatita de hueso. Este vector AAV que codifica GALNS modificado

incrementó significativamente las copias de genoma del vector y la expresión del transgén en hueso del modelo de MPSIVA en ratón y condujo a niveles de actividad de GALNS del 42 % del tipo silvestre (Alméciga Javier, Montaña Adriana, Shunji Tomatsu, 2012; Tomatsu y col., 2010b).

5 Ninguno de los enfoques anteriormente mencionados ha restaurado completamente la actividad de la galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa, ha conseguido la erradicación completa de las inclusiones intracitoplásmicas, o ha corregido todos los síntomas clínicos de MPSIVA. Por lo tanto, hay una necesidad de enfoques novedosos para el tratamiento de MPSIVA que tengan
10 mejores perfiles de eficacia y seguridad.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nuevas secuencias de polinucleótidos
15 y vectores para el tratamiento de mucopolisacaridosis, en particular mucopolisacaridosis tipo IVA o síndrome de Morquio A.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una nueva secuencia de polinucleótidos aislada que tiene entre un 75 % y un 90 % de identidad con la secuencia de nucleótidos tal como se expone en la SEQ ID NO:
20 1 donde dicha secuencia codifica una galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana funcional.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la invención.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una
25 composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de las secuencias de polinucleótidos o el vector de la invención.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos o un vector, o una composición farmacéutica descrita en el presente documento para su uso como medicamento, en particular para el
30 tratamiento de mucopolisacaridosis tipo IVA o síndrome de Morquio A.

La presente invención también proporciona un método para la producción del vector viral adenoasociado según la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Generación de pAAV-CAG-hGALNS y AAV9-CAG-hGALNS. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-CAG-hGALNS y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector adenoasociado que contiene la secuencia codificante de hGALNS.

5 **Figura 2.** Generación de pAAV-CAG-ohGALNS-v1 y AAV9-CAG-ohGALNS-v1. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-CAG-ohGALNS- v1 y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector adenoasociado que contiene la secuencia codificante de ohGALNS-v1.

10 **Figura 3.** Generación de pAAV-CAG-ohGALNS-v2 y AAV9-CAG-ohGALNS-v2. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-CAG-ohGALNS- v2 y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector adenoasociado que contiene la secuencia codificante de ohGALNS-v2.

15 **Figura 4.** Generación de pAAV-CAG-ohGALNS-v3 y AAV9-CAG-ohGALNS-v3. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-CAG-ohGALNS- v3 y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector adenoasociado que contiene la secuencia codificante de ohGALNS-v3.

20 **Figura 5.** Generación de pAAV-CAG-omGalns, AAV9-CAG-omGalns y AAV8-CAG-omGalns. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-CAG-omGalns y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector adenoasociado que contiene la secuencia codificante de omGalns.

25 **Figura 6.** Generación de pAAV-hAAT-omGalns y AAV8-hAAT-omGalns. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-hAAT-omGalns y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector adenoasociado que contiene la secuencia codificante de omGalns.

30 **Figura 7.** Administración intravenosa de vectores AAV9 que codifican las diferentes versiones de *Galns* humana (AAV9-CAG-hGalns, AAV9-CAG-ohGalns-v1, AAV9-CAG-ohGalns-v2, y AAV9-CAG-ohGalns-v3) a ratones machos. Actividad de GALNS en (A) hígado y (B) suero de ratones de tipo silvestre (sanos) (WT), ratones *Galns*^{-/-} no tratados y ratones *Galns*^{-/-} administrados sistémicamente, por inyección intravenosa (IV), con 5×10^{10} vg de
35 cada vector a los 2 meses de vida. La actividad de GALNS WT se fijó al 100 %.

Los valores son las medias $\pm$ EEM de 4-5 ratones por grupo.

Figura 8. Administración intravenosa del vector AAV9 que codifica *Galns* murino optimizado (AAV9-CAG-omGalns) a ratones machos. Actividad de GALNS en (A) hígado, (B) fémur, (C) tejido adiposo de ratones de tipo silvestre (sanos) (WT), ratones *Galns*^{-/-} no tratados y ratones *Galns*^{-/-} administrados sistémicamente, por inyección intravenosa (IV), con 1×10^{12} vg de AAV9-CAG-omGalns al mes de vida. (D) Actividad de GALNS en el suero a diferentes momentos después de la inyección en la misma cohorte de animales. La actividad de GALNS WT se fijó al 100 %. Los valores son las medias $\pm$ EEM de 4-5 ratones por grupo. * $P < 0,05$, *** $P < 0,0001$, frente a ratones *Galns*^{-/-} no tratados.

Figura 9. Administración intravenosa del vector AAV8 que codifica *Galns* murino optimizado (AAV8-CAG-omGalns) a ratones machos. Actividad de GALNS en (A) hígado, (B) fémur, (C) tejido adiposo de ratones de tipo silvestre (sanos) (WT), ratones *Galns*^{-/-} no tratados y ratones *Galns*^{-/-} administrados sistémicamente, por inyección intravenosa (IV), con 1×10^{12} vg de AAV8-CAG-omGalns al mes de vida. (D) Actividad de GALNS en el suero a diferentes momentos después de la inyección en la misma cohorte de animales. La actividad de GALNS WT se fijó al 100 %. Los valores son las medias $\pm$ EEM de 4-5 ratones por grupo. * $P < 0,05$, *** $P < 0,0001$, frente a ratones *Galns*^{-/-} no tratados.

Figura 10. Administración intravenosa del vector AAV8 que codifica *Galns* murino optimizado (AAV8-hAAT-omGalns) a ratones machos. Actividad de GALNS en (A) hígado, (B) fémur, (C) tejido adiposo de ratones de tipo silvestre (sanos) (WT), ratones *Galns*^{-/-} no tratados y ratones *Galns*^{-/-} administrados sistémicamente, por inyección intravenosa (IV), con 1×10^{11} vg de AAV8-hAAT-omGalns al mes de vida. (D) Actividad de GALNS en el suero a diferentes momentos después de la inyección en la misma cohorte de animales. La actividad de GALNS WT se fijó al 100 %. Los valores son las medias $\pm$ EEM de 4-5 ratones por grupo. * $P < 0,05$, *** $P < 0,0001$, frente a ratones *Galns*^{-/-} no tratados.

Figura 11. Administración intravenosa de los vectores AAV9 y AAV8 que codifican *Galns* murino optimizado (AAV9-CAG-omGalns, AAV8-CAG-omGalns y AAV8-hAAT-omGalns) a ratones machos. Cuantificación de queratán sulfato (KS) en (A) hígado y (B) suero mediante análisis por LC-MS/MS. *** $P < 0,0001$,

frente a ratones machos $Galns^{-/-}$ no tratados.

Figura 12. Administración intravenosa de los vectores AAV9 y AAV8 que codifican *Galns* murino optimizado (AAV9-CAG-omGalns, AAV8-CAG-omGalns y AAV8-hAAT-omGalns) a ratones machos. Histopatología de la placa de crecimiento epifisario tibial en secciones teñidas con azul de toluidina. Aumento original 100x.

Figura 13. Administración intravenosa de los vectores AAV9 y AAV8 que codifican *Galns* murino optimizado (AAV9-CAG-omGalns, AAV8-CAG-omGalns y AAV8-hAAT-omGalns) a ratones $Galns^{-/-}$ machos. (A) Cuantificación de la intensidad de tinción obtenida en epitelio corneal seguido de tinción de Mowry para glicosaminoglicanos. (B) Histopatología de la glándula lagrimal en secciones teñidas con azul de toluidina en ratones (sanos) de tipo silvestre (WT), ratones $Galns^{-/-}$ no tratados y ratones $Galns^{-/-}$ administrados sistémicamente, por inyección intravenosa (IV). Aumento original 40x. *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ frente a ratones machos $Galns^{-/-}$ no tratados.

Figura 14. Administración intravenosa de vectores AAV9 que codifican GALNS murina optimizada (AAV9-CAG-omGalns) a ratones machos. Análisis por microscopía electrónica de transmisión de la ultraestructura del giro dentado y amígdala extraídos de machos WT y $Galns^{-/-}$ sanos de 6 meses de vida administrados sistémicamente con 1×10^{12} vg de vectores que codifican *Galns* murino optimizado (AAV9-CAG-omGALNS). Los lisosomas agrandados en macrófagos perivascuales (giro dentado), las células gliales perineuronales y las células endoteliales (Amígdala) están indicadas por puntas de flechas.

25 DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

Los plásmidos pAAV-CAG-hGALNS (SEQ ID NO: 2), pAAV-CAG-ohGALNS-v1 (SEQ ID NO: 4), pAAV-CAG-ohGALNS-v2 (SEQ ID NO: 6) y pAAV-CAG-ohGALNS-v3 (SEQ ID NO: 8) se depositaron el 19 de abril de 2018 bajo los números de acceso DSM 32791, DSM 32792, DSM 32793 y DSM 32794 respectivamente en el DSMZ - "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen", Inhoffenstraße 7 B, D-38124 Braunschweig, República Federal de Alemania.

35 DEFINICIONES

Los términos "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de nucleótidos aislada" o "secuencia de polinucleótidos" o "polinucleótido" o "secuencia de polinucleótidos aislada" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que contiene desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos respectivamente. El ácido nucleico puede ser bicatenario, monocatenario o contener porciones tanto de secuencia bicatenaria como monocatenaria.

Los términos "% de identidad de secuencia", "% de identidad" o "% de homología de secuencia" se refieren al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos de una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos o aminoácidos en la secuencia de referencia, después de alinear las secuencias para conseguir el máximo % de identidad de secuencia. En una realización preferida, la identidad de secuencia se calcula basándose en la longitud completa de dos SEQ ID NO dadas o en parte de las mismas. El % de identidad de secuencia se puede determinar mediante cualquier método o algoritmo establecido en la técnica, tales como los algoritmos ALIGN, BLAST y BLAST 2.0. Véase Altschul S, y col., *Nuc Acids Res.* 1977;25:3389-3402 y Altschul S, y col., *J Mol Biol.* 1990;215:403-410.

En el presente documento, el "% de identidad de secuencia", "% de identidad" o "% de homología de secuencia" se calcula dividiendo el número de nucleótidos o aminoácidos que son idénticos después de alinear la secuencia de referencia y la secuencia candidata, por el número total de nucleótidos o aminoácidos en la secuencia de referencia y multiplicando el resultado por 100.

Opcionalmente, en la determinación del grado de similitud de aminoácidos, el experto en la técnica también puede tener en cuenta las denominadas sustituciones de aminoácidos "conservativas", ya que serán evidentes para el experto en la técnica. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se basan en la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, el grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas incluye glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; el grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático incluye serina y treonina; el grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida incluye asparagina y glutamina; el grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas incluye fenilalanina, tirosina y triptófano; el grupo

de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas incluye lisina, arginina e histidina; y el grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen sulfuro incluye cisteína y metionina. Variantes de sustitución de la secuencia de aminoácidos divulgadas en el presente documento son aquellas en las que se ha retirado al menos un residuo en las secuencias divulgadas y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Preferentemente, el cambio de aminoácidos es conservativo. Las sustituciones conservativas preferidas para cada uno de los aminoácidos de origen natural son las siguientes: Ala por Ser; Arg por Lys; Asn por Gln o His; Asp por Glu; Cys por Ser o Ala; Gln por Asn; Glu por Asp; Gly por Pro; His por Asn o Gln; Ile por Leu o Val; Leu por Ile o Val; Lys por Arg; Gln por Glu; Met por Leu o Ile; Phe por Met, Leu o Tyr; Ser por Thr; Thr por Ser; Trp por Tyr; Tyr por Trp o Phe; y, Val por Ile o Leu.

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

El término "proteína" se refiere a una macromolécula compuesta de una o más cadenas lineales de aminoácidos o polipéptidos. Las proteínas pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, como la conversión de un resto de cisteína en 3-oxoalanina, glicosilación o unión metálica. La glicosilación de una proteína es la adición de diferentes carbohidratos que están covalentemente unidos a la cadena de aminoácidos.

El término "región reguladora transcripcional", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento de ácido nucleico capaz de regular la expresión de uno o más genes. Las regiones reguladoras de los polinucleótidos de la invención pueden incluir un promotor, más elementos de respuesta, secuencias de activador y potenciador para unir los factores de transcripción para ayudar a la unión de la ARN polimerasa y fomentar la expresión, y secuencias de operador o silenciadoras a las cuales se unen las proteínas represoras para bloquear la unión de la ARN polimerasa y prevenir la expresión.

El término "promotor" se debe entender como un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más polinucleótidos, por ejemplo, secuencias codificantes, que se coloca 5' aguas arriba de la(s) secuencia(s) de polinucleótidos, y que se identifica

estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para la ARN polimerasa dependiente de ADN, sitios iniciación de la transcripción y, pero sin limitación, sitios de unión para los factores de transcripción, represores y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida en la técnica para actuar directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción a partir del promotor.

Se dice que un promotor está activo o se dice que conduce la expresión de una secuencia de nucleótidos operativamente unida al mismo cuando puede iniciar la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos en un sistema de expresión usando una construcción génica que comprende dicho promotor operativamente unido a una secuencia de nucleótidos de interés usando un ensayo adecuado tal como RT-qPCR o transferencia Northern (detección del transcrito). La actividad de dicho promotor también se puede valorar al nivel de proteína usando un ensayo adecuado para la proteína codificada tal como transferencia Western o un ELISA. Se dice que un promotor es capaz de iniciar la transcripción si se puede detectar un transcrito o si se encuentra un incremento en un nivel de transcrito o proteína de al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 500 %, 1.000 %, 1.500 o 2.000 % en comparación con la transcripción usando una construcción que solamente difiere en que está libre de dicho promotor.

El término promotor "constitutivo" se refiere a un promotor que está activo bajo la mayoría de las condiciones fisiológicas y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que preferiblemente se regula dependiendo de las condiciones fisiológicas o de desarrollo. Un promotor inducible puede estar activo después de la administración del fármaco o la exposición a la luz. Por lo tanto, un promotor "constitutivo" no se regula en el sentido de un promotor "inducible". Un promotor "específico de tejido" está preferentemente activo en tipos específicos de células/tejidos. Un promotor ubicuo se puede definir como un promotor que está activo en muchos o en algún tejido diferente. Normalmente, "muchos" en este contexto significa más de 5 o al menos 6, 10, 15, 20 o en 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 tejidos diferentes.

El término promotor "CAG" se refiere a un promotor que comprende el promotor de β -actina de pollo y el potenciador de citomegalovirus (Alexopoulou A. y col. *BMC Cell Biology* 2008; 9(2): 1-11). De forma más precisa, dicho promotor CAG comprende (i) el elemento potenciador temprano de citomegalovirus (CMV), (ii) el promotor de beta-actina de pollo, (iii) el primer

intrón del gen de la beta-actina de pollo, y (iv) el intrón 2/exón 3 del gen de la beta-globina de conejo.

El término promotor "hAAT" se refiere a un promotor híbrido que comprende el promotor de α 1-antitripsina humana y tres copias del potenciador de la región control de hepatocito (HCR) de la apolipoproteína E.

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

El término "región reguladora postranscripcional", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier polinucleótido que facilita la expresión, estabilización, o localización de las secuencias contenidas en el casete o el producto génico resultante.

El término "vector", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una construcción capaz de administrar, y opcionalmente expresar, uno o más polinucleótidos de interés en una célula hospedadora. Ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, plásmido, cósmido o vectores fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónica, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y determinadas células eucariotas, tales como células productoras. Los vectores pueden ser estables y pueden ser autoreplicantes. No hay limitaciones respecto al tipo de vector que se puede usar. El vector puede ser un vector de clonación, adecuado para la propagación y para obtener polinucleótidos, construcciones génicas o vectores de expresión incorporados a diversos organismos heterólogos.

En una realización particular, dicho vector es un vector de expresión. El término "vector de expresión" tal como se usan en el presente documento se refiere a un vector diseñado para la expresión génica en células, es decir, el vector se usa para introducir un gen específico en una célula diana para producir la proteína codificada por el gen.

El vector según la presente invención puede contener secuencias reguladoras que actúan como regiones potenciadoras y/o promotoras y

conducen a la transcripción eficaz del gen portado en el vector de expresión. Vectores adecuados incluyen vectores de expresión procariotas (por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados), mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColEI, pCRI, RP4, fagos y vectores lanzadera (por ejemplo, pSA3 y pAT28), y vectores de expresión eucariotas basados en vectores virales (por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociados así como retrovirus y lentivirus), así como vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion®, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EEUU), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAXI, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-I, pML2d y pTDTI.

El término "plásmido recombinante" o "plásmido" se refiere a una molécula de ADN autoreplicante, pequeña, circular, bicatenaria, obtenida por técnicas de ingeniería genética capaz de transferir material genético de interés a una célula, que da como resultado la producción del producto codificado por dicho material genético (por ejemplo, un polipéptido de proteína, péptido o ARN funcional) en la célula diana. Además, el término "plásmido recombinante" o "plásmido" también se refiere a una molécula de ADN autoreplicante, pequeña, circular, bicatenaria, obtenida por técnicas de ingeniería genética usadas durante la fabricación de vectores virales como portadores del genoma del vector recombinante.

El término "vector viral recombinante" o "vector viral" se refiere a un agente obtenido de un virus de origen natural por técnicas de ingeniería genética capaz de transferir material genético (por ejemplo, ADN o ARN) de interés a una célula, que da como resultado la producción del producto codificado por dicho material genético (por ejemplo, un polipéptido de proteína, péptido o ARN funcional) en la célula diana.

Los términos "virus adenoasociado", "virus AAV", "virión de AAV" "partícula viral de AAV" y "partícula de AAV", usados de manera indistinta en el presente documento, se refieren a una partícula viral compuesta de al menos una proteína de cápside de AAV (preferiblemente compuesta de todas las proteínas de la cápside de un serotipo de AAV particular) y un polinucleótido encapsulado que corresponde al genoma de AAV. El AAV de tipo silvestre se refiere a un virus que pertenece al género *Dependovirus*, familia Parvoviridae. El genoma de AAV tipo silvestre es de aproximadamente 4,7 kb de longitud y consiste en un ácido desoxirribonucleico monocatenario (ADNmc) que puede

estar en sentido positivo o negativo. El genoma de tipo silvestre incluye repeticiones terminales invertidas (ITR) en ambos extremos de la cadena de ADN, y tres marcos abiertos de lectura (ORF). El ORF rep codifica cuatro proteínas Rep necesarias para el ciclo de vida de AAV. El ORF cap contiene
5 secuencias de nucleótidos que codifican proteínas de la cápside: VP1, VP2 y VP3, que interactúan para formar una cápside de simetría icosaédrica. Por último, el AAP ORF, que solapa con el Cap ORF, codifica para la proteína AAP que parece que fomenta el ensamblaje de la cápside. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido diferente de un genoma
10 de AAV de tipo silvestre, tal como un transgén a administrar a una célula de mamífero) flanqueado por ITRs de AAV, entonces normalmente se conoce como "partícula de vector AAV" o "vector viral AAV" o "vector AAV". La invención también abarca el uso de AAV bicatenario también denominado dsAAV o scAAV.

El término "ITRs de virus adenoasociado " o "ITRs de AAV ", tal como se
15 usa en el presente documento, se refiere a las repeticiones terminales invertidas presentes en ambos extremos de la cadena de ADN del genoma de un AAV. Las secuencias de ITR se requieren para la multiplicación eficaz del genoma de AAV. Otra propiedad de estas secuencias es su capacidad de formar una horquilla. Esta característica contribuye a su auto cebado, lo cual permite la síntesis
20 independiente de primasa de la segunda cadena de ADN. También se ha demostrado que las ITR requieren tanto integración del ADN de AAV de tipo silvestre en el genoma de la célula hospedadora (por ejemplo, en el cromosoma 19 humano para el AAV de serotipo 2) y rescate a partir del mismo, así como para la encapsidación eficaz del ADN de AAV en una partícula de AAV
25 completamente ensamblada, resistente a desoxirribonucleasa. Las secuencias de ITR son de aproximadamente 145 pb de longitud. Preferiblemente, las secuencias enteras de las ITRs se usan en el genoma del vector viral de AAV, aunque es permisible algún grado de modificación menor de estas secuencias. Una secuencia de ITR de tipo silvestre puede alterarse por inserción, delección o
30 truncamiento, siempre que la ITR medie las funciones deseadas, por ejemplo, replicación, corte, empaquetamiento de virus, integración, y/o rescate de provirus. Los procedimientos para la modificación de estas secuencias de ITR son bien conocidas en la técnica. La ITR puede ser de cualquier AAV de tipo silvestre, incluyendo, pero sin limitación, los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
35 11 o 12 o cualquier otro AAV conocido o posteriormente descubierto. El AAV

comprende dos ITR, que pueden ser iguales o diferentes. Además, las dos ITR de AAV pueden ser del mismo serotipo de AAV que la cápside de AAV, o pueden ser diferentes. En una realización preferida, las ITR de AAV 5' y 3' derivan de AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV7, AAV8 y/o AAV9. Preferiblemente las ITRs son de AAV2, AAV8 y/o AAV9 siendo AAV2 el más preferido. En una realización, las ITRs de AAV2 se seleccionan para generar un AAV pseudotipado (es decir, un AAV que tiene cápside e ITRs derivadas de diferentes serotipos).

La expresión "genoma viral recombinante", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un genoma de AAV en el que al menos un polinucleótido extraño está insertado en el genoma de AAV de origen natural. El genoma del AAV según la invención normalmente comprende las secuencias de repetición terminales invertidas (ITR) 5' y 3' que actúan en cis y un casete de expresión.

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

El término "someter a transducción" o "transducción", tal como se usa en el presente documento, se refiere al proceso por el cual se introduce una secuencia de nucleótidos extraña en una célula por medio de un vector viral.

El término "transfección", tal como se usa en el presente documento, se refiere al proceso de introducir deliberadamente ácidos nucleicos purificados mediante métodos no virales en células eucariotas.

El término "tratar" o "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de un compuesto o composición de la invención para controlar la progresión de una enfermedad. Control de la progresión de la enfermedad se entiende como el logro de los resultados clínicos beneficiosos o deseados que incluyen, pero sin limitación, reducción de los síntomas, reducción de la duración de la enfermedad, estabilización de los estados patológicos (específicamente para evitar el deterioro adicional), retraso de la progresión de la enfermedad, mejora en el estado patológico, y remisión (tanto parcial como total). El control de la progresión de la enfermedad también implica una extensión de la supervivencia, en comparación con la supervivencia

esperada si no se aplica tratamiento.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una sustancia suficiente para conseguir el fin deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un vector AAV para incrementar la actividad de la galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa (GALNS) es una cantidad suficiente para reducir la acumulación de glicosaminoglicano. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un vector de expresión para tratar una enfermedad o trastorno es una cantidad del vector de expresión suficiente para reducir o erradicar las señales y los síntomas de la enfermedad o trastorno. La cantidad eficaz de una sustancia dada variará con factores tales como la naturaleza de la sustancia, la vía de administración, el tamaño y la especie del animal que va a recibir la sustancia y el propósito de administrar la sustancia. La cantidad eficaz en cada caso individual se puede determinar empíricamente por un experto en la técnica según los métodos establecidos en la técnica.

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

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nuevas secuencias de polinucleótidos y vectores para el tratamiento de mucopolisacaridosis, en particular mucopolisacaridosis tipo IVA o síndrome de Morquio A.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos aislada (más adelante referida como "polinucleótido de la invención") que tiene entre un 75 % y un 90 % de identidad con la secuencia de nucleótidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 1 donde dicha secuencia codifica una galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana funcional.

Tal como se ha mencionado anteriormente, MPSIVA está causada por la deficiencia en la actividad de la enzima galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa (GALNS). La GALNS es una enzima lisosomal que hidroliza el grupo éster del sulfato de N-acetilgalactosamina-6-sulfato en el extremo no reductor del condroitín-6-sulfato (C6S) y aquel de galactosa-6-sulfato en el extremo no reductor del queratán sulfato (KS). Como consecuencia de la acumulación

prolongada de C6S y KS no degradados, se da daño celular progresivo, dando como resultado una enfermedad multisistémica.

Los inventores han demostrado que la administración *in vivo* de vectores que contienen diferentes versiones del casete de expresión de galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa (GALNS) humana, donde dicha secuencia codificante de GALNS tiene entre un 75 % y un 90 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de GALNS codificante de tipo silvestre, dio como resultado un incremento sustancial en la actividad de GALNS sobre los niveles medidos en animales con MPSIVA. De hecho, los niveles de actividad de GALNS humana alcanzados con los vectores de expresión que contienen las secuencias que tienen entre un 75 % y un 90 % de identidad con el tipo silvestre eran mayores que aquellos mediados por el vector que contiene la secuencia de tipo silvestre.

La invención también contempla las secuencias de polinucleótidos que tienen entre un 75 % y un 90 % de identidad con la secuencia de nucleótidos que codifica la GALNS de tipo silvestre tal como se expone en la SEQ ID NO: 1 donde dichas secuencias codifican variantes de GALNS humana funcionales y fragmentos conocidos en la técnica. Por lo tanto, la invención se debería construir para incluir el ADN que codifica variantes funcionalmente equivalentes de GALNS.

La expresión "variante funcionalmente equivalente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enzima sustancialmente homóloga a la enzima codificada por la secuencia de polipéptido de GALNS y que conserva la actividad biológica de GALNS. La secuencia de tales variantes funcionalmente equivalente se puede obtener de la secuencia de GALNS por medio de inserción, sustitución o delección de uno o más aminoácidos y la cual conserva sustancialmente la actividad biológica de GALNS. Métodos para determinar si una variante conserva la actividad biológica de la GALNS nativa son ampliamente conocidos por el experto en la técnica e incluyen cualquiera de los ensayos usados en la parte experimental de la presente solicitud. En particular, variantes funcionalmente equivalentes de GALNS incluidas por la presente invención tienen al menos una de las funciones de GALNS tales como, por ejemplo, normalizar o reducir los niveles de glicosaminoglicano (GAG), en particular, los niveles de C6S y KS. En la sección Ejemplos de la presente invención se detalla un método adecuado para determinar la capacidad de una enzima GALNS funcional para reducir o normalizar dichos niveles de GAG.

Tal como se muestra en los ejemplos que acompañan a la presente invención, las secuencias de polinucleótidos de la presente invención codifican enzimas GALNS funcionales. Dichas enzimas muestran actividad aumentada cuando se comparan con la WT. Los resultados muestran una restauración de la actividad de GALNS después de la administración del vector, lo que conduce a un incremento sustancial en la actividad de la galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa sobre los niveles medidos en animales con MPSIVA. Tal como se muestra en los Ejemplos que acompañan a la presente invención, los niveles de actividad de GALNS oscilaron de 1.500 % a 2.600 % de los niveles de WT en hígado.

En una realización preferida, un polipéptido se considera una variante funcionalmente equivalente de enzima GALNS si muestra capacidad en las funciones tal como las mencionadas anteriormente, particularmente, si es capaz de degradar los glicosaminoglicanos queratán sulfato (KS) y condroitín-6-sulfato (C6S) con al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la capacidad del polipéptido de tipo silvestre de GALNS, preferiblemente con al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la capacidad del polipéptido de tipo silvestre de GALNS.

Las variantes funcionalmente equivalentes de GALNS son polipéptidos sustancialmente homólogos a la GALNS nativa. La expresión "sustancialmente homólogo", se refiere a una secuencia de proteína cuando dicha secuencia de proteína tiene un grado de identidad con respecto a la secuencia de tipo silvestre de GALNS de al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos y métodos informáticos que son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S., y col, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., y col, *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990)], aunque también se pueden usar otros algoritmos similares.

Las variantes funcionalmente equivalentes de GALNS se pueden obtener reemplazando nucleótidos dentro de su polinucleótido codificante, considerando

la preferencia de codón en la célula hospedadora que va a ser usada para producir la GALNS.

Variantes funcionalmente equivalentes de GALNS se pueden generar haciendo cambios de aminoácidos conservativos y ensayando la variante
5 resultante en uno de los ensayos funcionales anteriormente descritos u otros ensayos funcionales conocidos en la técnica. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de
10 aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina;
15 y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen sulfuro es cisteína y metionina. Son grupos de sustitución de aminoácidos conservativos preferidos: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

En una realización particular de la invención, la secuencia de nucleótidos
20 que codifica la proteína GALNS o una variante funcionalmente equivalente de la misma contenida en el polinucleótido de la invención tiene entre un 75 % y un 90 % de identidad con la secuencia de nucleótidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 1. En una realización más particular, dicha secuencia de nucleótidos tiene entre un 80 % y un 85 % de identidad con la secuencia de nucleótidos tal como
25 se expone en la SEQ ID NO: 1. En una realización más preferida, dicha secuencia se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 7.

En otra realización de la invención, la proteína GALNS codificada por el polinucleótido de la invención se selecciona del grupo que consiste en GALNS
30 humana (hGALNS) y GALNS de ratón (mGALNS), preferiblemente GALNS humana (hGALNS).

El polinucleótido de la invención puede comprender además secuencias de control de la expresión incluyendo, pero sin limitación, secuencias reguladoras de la transcripción apropiadas (es decir, de iniciación, terminación,
35 un promotor y un potenciador), señales eficaces del procesamiento de ARN (por

ejemplo, señales de corte y empalme y poliadenilación (poliA)), secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico, secuencias que potencian la eficacia de la traducción (es decir, secuencia consenso Kozak), secuencias que potencian la estabilidad proteica, y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción
5 del producto codificado. Un gran número de secuencias control de la expresión son conocidas en la técnica y se pueden utilizar según la presente invención.

Por lo tanto, de acuerdo con la invención, en una realización particular el polinucleótido de la invención tiene una región reguladora transcripcional operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica GALNS. En
10 una realización particular de la invención, dicha región reguladora transcripcional comprende un promotor. En otra realización particular de la invención, la región reguladora transcripcional del polinucleótido de la invención comprende además un potenciador operativamente unido al promotor.

El polinucleótido de la invención se podría incorporar en un vector. En una
15 realización particular, dicho vector es un vector de expresión. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un vector de expresión, referido en el presente documento como "vector de la invención", que contiene el polinucleótido de la invención. En una realización particular, dicho vector es un plásmido. En otra realización particular dicho vector es un vector AAV,
20 conteniendo dicho vector AAV un genoma viral recombinante que comprende un polinucleótido según la invención.

Todas las realizaciones descritas en el contexto del polinucleótido de la invención también son aplicables al vector de la invención.

En otra realización, la secuencia de polinucleótidos de la invención está
25 flanqueada por ITRs de AAV. En una realización más particular, dichas ITRs de AAV son ITRs de AAV2.

En otra realización, el polinucleótido de la invención comprende además una región reguladora postranscripcional. El término "región reguladora postranscripcional", tal como se usa en el presente documento, se refiere a
30 cualquier polinucleótido que facilita la expresión, estabilización, o localización de las secuencias contenidas en el casete o el producto génico resultante. La región reguladora postranscripcional puede ser, sin limitación, la región postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). La expresión "elemento postregulador del virus de la hepatitis B de la marmota" o "WPRE", tal
35 como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN que,

cuando se transcribe, crea una estructura terciaria capaz de aumentar la expresión de un gen.

En otra realización, la secuencia de polinucleótidos de la invención comprende además una señal de poliadenilación.

5 La expresión "señal de poliadenilación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que media la unión de una cola de poliadenina al 3' terminal del ARNm. Señales de poliadenilación adecuadas incluyen, sin limitación, la señal de poliadenilación temprana de SV40, la señal de poliadenilación tardía de SV40, la señal de poliadenilación de
10 timidina quinasa de HSV, la señal de poliadenilación del gen de protamina, la señal de poliadenilación de 5 Elb de adenovirus, la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento variante humana, la señal de poliA de beta-globina de conejo y similares. En una realización particular, la señal de poliadenilación es la señal de
15 poliA de beta-globina de conejo o variantes funcionales y fragmentos de la misma.

Tal como se ha mencionado anteriormente, en una realización particular de la invención, el polinucleótido de la invención se incorpora en un vector. En una realización particular, dicho vector es un vector de expresión. En una
20 realización particular, dicho vector de expresión comprende una secuencia de un promotor operativamente unida a dicha secuencia de polinucleótidos. Dicho promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido. En una realización particular, dicho promotor se selecciona de un promotor CAG, promotor hAAT o promotor de CMV. En una realización preferida de la invención,
25 dicho promotor es el promotor CAG. En otra realización particular, dicho promotor es un promotor hAAT.

El polinucleótido de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica GALNS o una variante funcionalmente equivalente de la misma. En una realización, dicha secuencia de nucleótidos es la secuencia de nucleótidos
30 que codifica GALNS humana, que corresponde a la secuencia de la base de datos NCBI con número de acceso NM_000512.4, más particularmente es la SEQ ID NO: 1. En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos es una variante de la secuencia de nucleótidos que codifica GALNS humana. Más particularmente, dicha secuencia tiene entre un 75 y un 90 % de identidad con la
35 secuencia de nucleótidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 1. Más

particularmente, dicha secuencia tiene entre un 80 y un 85 % de identidad con la secuencia de nucleótidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, dicha secuencia es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 7.

5 En una realización más particular, el vector de expresión según la invención se selecciona del grupo que consiste en plásmido pAAV-CAG-ohGALNS-v1, con número de acceso DSM 32792, tal como se expone en la SEQ ID NO: 4, plásmido pAAV-CAG-ohGALNS-v2 con número de acceso DSM 32793, tal como se expone en la SEQ ID NO: 6, pAAV-CAG-ohGALNS-v3 con
10 número de acceso DSM 32794, tal como se expone en la SEQ ID NO: 8.

 En otra realización particular, la invención se refiere a un vector de expresión. Más particularmente, un vector viral adenoasociado o vector AAV, conteniendo dicho vector AAV un genoma viral recombinante donde dicho genoma viral recombinante comprende un polinucleótido que comprende una
15 región reguladora transcripcional operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica GALNS o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

 AAV según la presente invención incluye cualquier serotipo de los serotipos conocidos de AAV. En general, los diferentes serotipos de AAV tienen
20 secuencias genómicas con una homología significativa, proporcionado una serie idéntica de funciones genéticas, producen viriones que son básicamente equivalentes en términos físicos y funcionales, y se replican y ensamblan por mecanismos prácticamente idénticos. En particular, el AAV de la presente invención puede pertenecer al serotipo 1 de AAV (AAV1), AAV2, AAV3
25 (incluyendo los tipos 3A y 3B), AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino, y cualquier otro AAV. Ejemplos de las secuencias del genoma de los diferentes serotipos de AAV se pueden encontrar en la bibliografía o en las bases de datos públicas tales como GenBank. Véase los números de acceso al GenBank AF028704.1 (AAV6),
30 NC006260 (AAV7), NC006261 (AAV8), y AX753250.1 (AAV9). En una realización preferida, el vector AAV de la invención es de un serotipo seleccionado del grupo que consiste en los serotipos AAV2, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 y AAVrh10. En una realización preferida, dicho vector AAV de la invención es del serotipo 9, AAV9 o serotipo 8, AAV8.

35 En una realización particular dicho vector AAV contiene una secuencia de

GALNS humana o murina. En una realización, dicho vector contiene la secuencia de nucleótidos que codifica GALNS humana, que corresponde a la secuencia de la base de datos NCBI con número de acceso NM_000512.4, más particularmente es la SEQ ID NO: 1. En una realización preferida, dicho vector

5 contiene una secuencia de nucleótidos que es una variante de la secuencia de nucleótidos que codifica GALNS humana. Más particularmente, dicha secuencia tiene entre un 75 y un 90 % de identidad con la secuencia de nucleótidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 1. Más particularmente, dicha secuencia tiene entre un 80 y un 85 % de identidad con la secuencia de nucleótidos tal como se

10 expone en la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, dicha secuencia es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 7.

En otra realización particular de la invención, el vector AAV es el AAV9-CAG-hGALNS, SEQ ID NO: 12, que contiene la secuencia de nucleótidos SEQ

15 ID NO: 1 unida al promotor CAG. En otra realización, el vector AAV es el AAV9-CAG-ohGALNS-v1, SEQ ID NO: 13 conteniendo la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3 unida al promotor CAG. En otra realización, el AAV es el AAV9-CAG-ohGALNS-v2, SEQ ID NO: 14 conteniendo la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5 unida al promotor CAG. En otra realización, el vector AAV es el

20 AAV9-CAG-ohGALNS-v3, SEQ ID NO: 15 conteniendo la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7 unida al promotor CAG.

En una realización preferida, el AAV de la invención contiene un genoma viral recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que comprende en la dirección 5' a 3', (i) una ITR de AAV2 5', (ii) un potenciador inmediato-temprano de CMV, (iii) un promotor de la beta-actina de pollo, (iv) el primer intrón del gen de la beta-actina de pollo, (v) el intrón 2/exón 3 del gen de la beta-globina de conejo, (vi) un ADNc de GALNS o una variante funcionalmente

25 equivalente del mismo, (vii) una señal de poli A, tal como la señal de poli A de la beta-globina de conejo, y (viii) una ITR de AAV2 3'. Los expertos en la técnica valorarán que el genoma del vector puede comprender otras secuencias (por ejemplo, secuencias intermedias entre las secuencias anteriormente descritas específicamente). Los componentes (i) a (v) tienen el significado normalmente entendido por el experto en la técnica.

30

En una realización preferida, el genoma viral recombinante comprende la

35 secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 12. Específicamente, la ITR de AAV2 5'

comprende los nucleótidos 1-131, el promotor CAG comprende los nucleótidos 185-1.707, el ADNc de la GALNS humana comprende los nucleótidos 1.918-3.494, la señal de poli A de beta-globina de conejo comprende los nucleótidos 3.520-4.048, y la ITR de AAV2 3' comprende los nucleótidos 4.107-4.215 de la SEQ ID NO: 12.

En otra realización preferida, el genoma viral recombinante comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 13. Específicamente, la ITR de AAV2 5' comprende los nucleótidos 1-131, el promotor CAG comprende los nucleótidos 185-1.707, el ADNc de la GALNS humana comprende los nucleótidos 1.918-3.494, la señal de poli A de beta-globina de conejo comprende los nucleótidos 3.520-4.048, y la ITR de AAV2 3' comprende los nucleótidos 4.107-4.215 de la SEQ ID NO: 13.

En otra realización preferida, el genoma viral recombinante comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 14. Específicamente, la ITR de AAV2 5' comprende los nucleótidos 1-120, el potenciador de CMV comprende los nucleótidos 194-557, el promotor de beta-actina comprende los nucleótidos 558-839, el primer intrón del gen de beta-actina de pollo comprende los nucleótidos 840-1.804, el intrón 2/exón 3 del gen de beta-globina de conejo comprende los nucleótidos 1.805-1.906, el ADNc de la GALNS humana comprende los nucleótidos 1.934-3.592, la señal de poli A de beta-globina de conejo comprende los nucleótidos 3.619-4.147 y la ITR de AAV2 3' comprende los nucleótidos 4.206-4.313 de la SEQ ID NO: 14.

En otra realización preferida, el genoma viral recombinante comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 15. Específicamente, la ITR de AAV2 5' comprende los nucleótidos 1-120, el potenciador de CMV comprende los nucleótidos 194-557, el promotor de beta-actina comprende los nucleótidos 558-839, el primer intrón del gen de beta-actina de pollo comprende los nucleótidos 840-1.804, el intrón 2/exón 3 del gen de beta-globina de conejo comprende los nucleótidos 1.805-1.906, el ADNc de la GALNS humana comprende los nucleótidos 1.934-3.592, la señal de poli A de beta-globina de conejo comprende los nucleótidos 3.619-4.147 y la ITR de AAV2 3' comprende los nucleótidos 4.206-4.313 de la SEQ ID NO: 15.

En el contexto de la presente invención también pueden usarse secuencias de AAV modificadas. Tales secuencias modificadas, por ejemplo, incluyen secuencias que tienen al menos aproximadamente un 70 %, al menos

aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o más de identidad de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos (por ejemplo, una secuencia que tiene aproximadamente un 75-99

5 % de identidad de secuencia de nucleótidos o aminoácidos) con una ITR o VP de AAV de cualquiera de los serotipos conocidos y que mantienen la función de dichos componentes. Ensayos para la determinación de la función de ITR o VP de AAV son conocidos en la técnica. Dichas secuencias modificadas se pueden usar en lugar de la ITR del AAV o las secuencias de VP de tipo silvestre.

10 El vector AAV de la invención comprende una cápside de cualquier serotipo. En general, los diferentes serotipos de AAV tienen secuencias genómicas de homología significativa a niveles de los aminoácidos y los ácidos nucleicos, proporcionando un conjunto idéntico de funciones genéticas, producen viriones que son básicamente equivalentes en términos físicos y

15 funcionales, y se replican y ensamblan por mecanismos prácticamente idénticos. En particular, el AAV de la presente invención puede pertenecer al serotipo 1 de AAV (AAV1), AAV2, AAV3 (incluyendo los tipos 3 A y 3B), AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino, y cualquier otro AAV. Ejemplos de las secuencias del

20 genoma de los diferentes serotipos de AAV se pueden encontrar en la bibliografía o en las bases de datos públicas tales como GenBank. Véase los números de acceso al GenBank AF028704.1 (AAV6), NC006260 (AAV7), NC006261 (AAV8), y AX753250.1 (AAV9). En una realización preferida, el vector viral adenoasociado de la invención es de un serotipo seleccionado del grupo

25 que consiste en los serotipos AAV2, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 y AAVrh10. En una realización más preferida, dicho AAV es AAV serotipo 9, AAV9 o AAV serotipo 8, AAV8.

El genoma del vector AAV de la invención carece de los marcos abiertos de lectura rep y cap. Tales vectores AAV solamente se pueden replicar y

30 empaquetar dentro de las partículas virales infecciosas en células hospedadoras que se han sometido a transfección con un vector que codifica y expresa los productos génicos rep y cap (es decir, proteínas Rep y Cap de AAV), y donde las células hospedadoras se han sometido a transfección con un vector que codifica y expresa unas proteínas del adenovirus.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE LA INVENCIÓN

El polinucleótido o vector de expresión de la invención se puede administrar al cuerpo humano o animal mediante métodos convencionales, los cuales requieren su formulación en una composición farmacéutica. Por lo tanto, en un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica (más adelante referida como "composición farmacéutica de la invención") que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del polinucleótido de la invención o el vector de la invención. La composición farmacéutica puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Todas las realizaciones descritas en el contexto del polinucleótido de la invención o el vector de la invención también son aplicables a las composiciones farmacéuticas de la invención.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del polinucleótido, vector o vector AAV de la invención calculada para producir el efecto deseado y en general se determinará, entre otras razones, por las propias características del polinucleótido, vector o vector AAV de la invención y el efecto terapéutico a obtener. Por lo tanto, dicha cantidad que será eficaz en el tratamiento de una enfermedad se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales descritas en el presente documento o de otro modo conocidas en la técnica. La dosis precisa usada en la formulación dependerá de la vía de administración. La dosis inicial se puede estimar a partir de datos *in vivo* (por ejemplo, modelos animales) usando técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. Alguien con la experiencia normal en el estado de la técnica puede optimizar fácilmente la administración a seres humanos basándose en los datos en los animales.

En una realización particular, la dosis de la formulación se puede medir o calcular como partículas virales o como copias de genoma ("GC")/genomas virales ("vg").

Cualquier método conocido en la técnica se puede usar para determinar el número de copias de genoma (GC) por mililitro de las composiciones virales de la invención. Un método para la realización de la titulación del número de GC de AAV es como sigue: las muestras de vector AAV purificadas primero se tratan con ADNasa para eliminar el ADN del genoma de AAV no sometido a encapsidación o ADN plasmídico contaminante del proceso de producción. A

continuación, las partículas resistentes a ADNasa se someten a tratamiento por calor para liberar el genoma de la cápside. A continuación, los genomas liberados se cuantifican mediante PCR a tiempo real usando conjuntos de cebador/sonda frente a una región específica del genoma viral.

5 Las expresiones "vehículo farmacéuticamente aceptable", "diluyente farmacéuticamente aceptable", o "excipiente farmacéuticamente aceptable", usadas de manera indistinta en el presente documento, se refieren a un sólido no tóxico, relleno semisólido o líquido, diluyente, material de encapsulación o formulación auxiliar de cualquier tipo convencional. Un vehículo
10 farmacéuticamente aceptable es básicamente no tóxico para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. El número y la naturaleza de los vehículos farmacéuticamente aceptables dependen de la forma de administración deseada. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos y se pueden preparar mediante
15 métodos bien conocidos en la técnica.

La composición farmacéutica se puede formular de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intra-líquido cefalorraquídeo (CSF) por ejemplo, intracisternal o intracerebroventricular, a
20 seres humanos. En una realización preferida, la composición farmacéutica es para la administración intravenosa o intra-líquido cefalorraquídeo (CSF). Más preferiblemente, la composición farmacéutica es para la administración intravenosa.

El vector AAV se puede formular para administración parenteral mediante
25 inyección, (por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria (por ejemplo, en ampollas o en recipientes mono o multidosis) con un conservante añadido. Las composiciones virales pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos,
30 y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Las preparaciones líquidas de las formulaciones de AAV se pueden preparar mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles),
35 agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica), vehículos no

acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales en fracciones), y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón. Como alternativa, las composiciones pueden estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua libre de pirógeno estéril) antes de su uso. Cuando es necesario, la composición también puede incluir un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Cuando la composición se va a administrar por infiltración, se puede dispensar con una botella de infiltración que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar un vial de agua para la inyección o solución salina estéril, de manera que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración. Preferiblemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es solución salina y un detergente tal como copolímero en bloque de polietileno-polioxipropileno, Pluronic F68®.

Se pueden formular composiciones de la invención para administrar a animales para fines veterinarios (por ejemplo, ganado (ganado bovino, cerdos, otros)), y otros sujetos mamíferos no humanos, así como a sujetos humanos. La composición farmacéutica de la invención se puede formular con un vehículo fisiológicamente aceptable para su uso en transferencia génica y aplicaciones de terapia génica.

También se incluye el uso de adyuvantes en combinación con o en mezcla con el polinucleótido, vector o vector AAV de la invención. Los adyuvantes contemplados incluyen, pero sin limitación, adyuvantes de sal mineral o adyuvantes de gel de sal mineral, adyuvantes particulados, adyuvantes microparticulados, adyuvantes mucosos.

Se pueden administrar adyuvantes a un sujeto como una mezcla con el polinucleótido, vector o vector AAV de la invención, o se pueden usar en combinación.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar localmente o sistémicamente. En una realización, la composición farmacéutica se administra cerca del tejido u órgano cuyas células van a ser sometidas a transducción. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se administra sistémicamente.

El término "administrado sistémicamente" y "administración sistémica", tal

como se usa en el presente documento, significa que el polinucleótido, vectores, vectores AAV o composiciones de la invención se pueden administrar a un sujeto de una manera no localizada. La administración sistémica puede alcanzar varios órganos o tejidos por todo el cuerpo del sujeto o puede alcanzar órganos o tejidos
5 específicos del sujeto. Por ejemplo, la administración intravenosa puede dar como resultado la transducción de más de un tejido u órgano en un sujeto. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en una dosis única o, en realizaciones particulares de la invención, dosis múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, o más administraciones) se pueden emplear para
10 conseguir un efecto terapéutico. En una realización preferida de la invención, la composición farmacéutica de la invención se administra en una dosis única o, es decir, se administra una vez en la vida.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido o un vector según la invención o una composición farmacéutica según la invención
15 para su uso en medicina.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un polinucleótido o un vector según la invención o una composición farmacéutica según la invención para su uso en el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo IVA o síndrome de Morquio A.

Tal como se muestra en los ejemplos que acompañan a la presente invención, los vectores de AAV que contienen diferentes versiones del casete de expresión de la galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana se administraron por vía intravenosa a ratones afectados con MPSIVA de 2 meses de vida por inyección en vena de la cola. El análisis de la actividad de GALNS mostró que la
20 transducción con todos los vectores que contenían galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa dio como resultado un incremento sustancial en la actividad de la galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa sobre los niveles medidos en animales con MPSIVA.
25

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido o un vector según la invención o una composición farmacéutica según la invención para incrementar la actividad de la galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa.
30

En otro aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento y/o prevención de una mucopolisacaridosis tipo IVA en un sujeto en necesidad del mismo que comprende la administración a dicho sujeto de un polinucleótido según la invención o el vector según la invención o una composición
35

farmacéutica según la invención.

Los términos "prevenir", "que previene", y "prevención", tal como se usan en el presente documento, se refieren a inhibir el comienzo o disminuir la ocurrencia de una enfermedad en un sujeto. La prevención puede ser completa (por ejemplo, la ausencia total de células patológicas en un sujeto) o parcial. La prevención también se refiere a una susceptibilidad reducida a una afección clínica. El término "tratar" o "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de un polinucleótido, o vector o vector AAV o una composición farmacéutica de la invención para controlar la progresión de una enfermedad después de que hayan aparecido sus síntomas clínicos. Control de la progresión de la enfermedad se entiende que significa el logro de los resultados clínicos beneficiosos o deseados que incluyen, pero sin limitación, reducción de los síntomas, reducción de la duración de la enfermedad, estabilización de los estados patológicos (específicamente para evitar el deterioro adicional), retraso de la progresión de la enfermedad, mejora del estado patológico, y remisión (tanto parcial como total). El control de la progresión de la enfermedad también implica una extensión de la supervivencia, en comparación con la supervivencia esperada si no se aplica tratamiento.

El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un individuo o animal, tal como un ser humano, un primate no humano (por ejemplo, chimpancés y otras especies de simios y monos), un animal de granja (por ejemplo, aves, peces, ganado bovino, ovejas, cerdos, cabras, y caballos), un mamífero doméstico (por ejemplo, perros y gatos), o un animal de laboratorio (por ejemplo, roedores, tales como ratones, ratas y cobayas). El término incluye un sujeto de cualquier edad o sexo. En una realización preferida el sujeto es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

MÉTODOS PARA OBTENER LOS AAV DE LA INVENCIÓN

La invención también se refiere a un método para obtener los vectores AAV de la invención. Dichos vectores AAV se pueden obtener introduciendo los polinucleótidos de la invención en células que expresan las proteínas Rep y Cap constitutivamente o donde las secuencias codificantes de Rep y Cap se proporcionan en plásmidos o vectores.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para

obtener un vector AAV que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una célula que comprende un polinucleótido de la invención, proteínas cap de AAV, proteínas rep de AAV y, opcionalmente, proteínas virales sobre las cuales AAV es dependiente para la replicación,
- 5 (ii) mantener la célula bajo condiciones adecuadas para el ensamblaje del AAV y
- (iii) purificar el vector viral adenoasociado producido por la célula.

En la presente invención se puede usar cualquier célula capaz de producir vectores de AAV.

10 El polinucleótido de la invención usado en este método se ha descrito previamente. Cualquiera de las realizaciones descritas en el contexto de los polinucleótidos de la invención es aplicable en el contexto de los métodos para obtener AAV de la invención.

El término "proteína cap", tal como se usa en el presente documento, se
15 refiere a un polipéptido que tiene al menos una actividad funcional de una proteína cap de AAV nativa (por ejemplo, VP1, VP2 y VP3). Ejemplos de actividades funcionales de las proteínas cap incluyen la capacidad de inducir la formación de una cápside, facilitar la acumulación de ADN monocatenario, facilitar el empaquetamiento del ADN de AAV en cápsides (es decir,
20 encapsidación), unirse a receptores celulares, y facilitar la entrada del virión en células hospedadoras. En principio, en el contexto de la presente invención puede usarse cualquier proteína cap.

En una realización preferida, las proteínas cap se derivan de AAV8 o AAV9.

25 El término "cápside", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la estructura en la que el genoma viral se empaqueta. Una cápside consiste en varias subunidades estructurales oligoméricas hechas de proteínas. Por ejemplo, AAV tienen una cápside icosaédrica formada por la interacción de tres proteínas de cápside: VP1, VP2 y VP3.

30 El término "proteína rep", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene al menos una actividad funcional de una proteína rep de AAV nativa. Una "actividad funcional" de una proteína rep es cualquier actividad asociada con la función fisiológica de la proteína, incluyendo facilitar la replicación de ADN a través del reconocimiento, unión y corte del
35 origen de la replicación de ADN del AAV así como actividad de la ADN helicasa.

Las funciones adicionales incluyen la modulación de la transcripción desde promotores de AAV (u otros heterólogos) y la integración específica de sitio del ADN de AAV en un cromosoma hospedador. En una realización particular, los genes rep de AAV derivan del serotipo AAV2.

5 La expresión "proteínas virales sobre las que AAV es dependiente para la replicación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos que realizan funciones sobre las que AAV es dependiente para la replicación (es decir, "funciones auxiliares"). Las funciones auxiliares incluyen, sin limitación, aquellas funciones requeridas para la activación de la transcripción del gen de
10 AAV, el corte y empalme del ARNm de AAV específico de fase, la replicación del ADN de AAV, la síntesis de proteínas cap, y el ensamblaje de la cápside de AAV. Las funciones accesorias basadas en virus se pueden derivar de cualesquiera de los virus auxiliares conocidos tales como adenovirus, herpesvirus (distintos del virus del herpes simple tipo-1), y vaccinia virus. Funciones auxiliares incluyen,
15 sin limitación, EI, E2a, VA, y E4 de adenovirus o UL5, UL8, UL52 y UL29 de herpesvirus y polimerasa de herpesvirus.

El polinucleótido de la invención, o los genes rep de AAV, cap de AAV y genes que proporcionan funciones auxiliares se pueden introducir en la célula incorporando dichos genes en un vector tal como, por ejemplo, un plásmido, e
20 introduciendo dicho vector en la célula. Los genes se pueden incorporar en el mismo plásmido o en diferentes plásmidos. En una realización preferida, el polinucleótido de la invención se incorpora en un plásmido, los genes rep y cap de AAV se incorporan en otro plásmido y los genes que proporcionan funciones auxiliares se incorporan en otro plásmido.

25 Los plásmidos que contienen el polinucleótido de la invención y o los genes rep y cap de AAV o los genes que proporcionan funciones auxiliares se pueden introducir en la célula usando cualquier método adecuado bien conocido en la técnica. Ejemplos de métodos de transfección incluyen, pero sin limitación, coprecipitación con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, polibreno, electroporación,
30 microinyección, fusión mediada por liposoma, lipofección, infección por retrovirus y transfección biolística. En una realización particular, la transfección se lleva a cabo por medio de coprecipitación con fosfato de calcio. Cuando la célula carece de la expresión de cualquiera de los genes rep y cap de AAV y los genes que proporcionan funciones auxiliares adenovirales, dichos genes se pueden
35 introducir en la célula simultáneamente con el polinucleótido de la invención.

Como alternativa, dichos genes se pueden introducir en la célula antes o después de la introducción del polinucleótido de la invención.

En una realización particular, las células se someten a transfección simultáneamente con tres plásmidos i) un plásmido que comprende el polinucleótido de la invención, ii) un plásmido que comprende los genes rep y cap de AAV y iii) un plásmido que comprende los genes que proporcionan las funciones auxiliares.

La etapa (ii) del método de la invención implica mantener la célula bajo condiciones adecuadas para el ensamblaje del AAV.

Métodos de cultivo de células y condiciones ilustrativas que fomentan la liberación de partículas del vector AAV, tales como la lisis de las células, se pueden llevar a cabo tal como se ha descrito en los ejemplos en el presente documento. Se cultivan células productoras durante un periodo de tiempo adecuado para fomentar el ensamblaje del AAV y la liberación de vectores virales al medio. En general, se mide el tiempo de cultivo desde el punto de la producción viral. Por ejemplo, en el caso de AAV, la producción viral en general comienza tras el suministro de la función del virus auxiliar en una célula productora apropiada tal como se ha descrito en el presente documento.

La etapa (iii) del método de la invención implica purificar el vector AAV producido por la célula.

Se puede usar cualquier método para la purificación del AAV a partir de dichas células o de dicho medio de cultivo para obtener el AAV de la invención. En una realización particular, el AAV de la invención se purifica siguiendo un método optimizado basado en una etapa de precipitación con polietilenglicol y dos gradientes de cloruro de cesio (CsCl) consecutivos.

Diversos AAV de origen natural y modificados por ingeniería, sus ácidos nucleicos codificantes, proteínas cap y rep de AAV, así como métodos para aislar o generar, propagar, y purificar tal AAV, y en particular, sus cápsides, adecuados para su uso en la producción de AAV son conocidos en la técnica.

La presente invención proporciona además una célula aislada que comprende la secuencia de polinucleótidos de la invención que codifica la proteína GALNS o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

Todas las realizaciones divulgadas en el contexto de los polinucleótidos, vectores o vectores AAV de la invención y las composiciones farmacéuticas de la invención son aplicables a los métodos terapéuticos de la invención.

PROCEDIMIENTOS GENERALES

1. Vectores AAV recombinantes

5

Los vectores AAV descritos en el presente documento se obtuvieron mediante transfección triple. Los materiales requeridos para producir los vectores eran: células HEK293 (que expresan genes E1 adenoviral), plásmido auxiliar que proporciona funciones de adenovirus, plásmido que proporciona los genes *rep* de AAV del serotipo 2 y genes *cap* de serotipos 8 o 9 (AAV8 o AAV9) y, finalmente, el plásmido esqueleto con ITRs de AAV2 y la construcción de interés.

Para generar vectores AAV que expresan galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa, las secuencias codificantes optimizadas o no optimizadas de galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana o murina se clonaron en un plásmido esqueleto de AAV bajo el control del promotor CAG híbrido ubicuo o el promotor hAAT específico de hígado. La producción a gran escala de plásmidos se hace usando un kit EndoFree Plasmid Megaprep (Qiagen).

Los vectores se generaron mediante transfección libre de virus auxiliar de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones (Matsushita y col., 1998; Wright y col., 2005). Se cultivaron células a 70 % de confluencia en botellas de cultivo rotativas (RB) (Corning, Corning, NY, EEUU) en DMEM suplementado con FBS al 10 % y, a continuación, se sometieron a cotransfección con: 1) un plásmido que portaba el casete de expresión flanqueado por las ITRs virales de AAV serotipo 2 (anteriormente descrito); 2) un plásmido que portaba los genes *rep2* y *cap8* o *cap9* de AAV; y 3) un plásmido que portaba las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes de cloruro de cesio consecutivos usando un protocolo optimizado tal como previamente se ha descrito (Ayuso y col., 2010). Los vectores se sometieron a diálisis frente a PBS + 0,001 % de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron mediante qPCR y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

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

35 2. Estudios de transfección *in vitro*

Las células HEK293 se sometieron a transfección con 4 µg de pAAV-CAG-omGALNS, pAAV-hAAT-omGALNS, pAAV-CAG-hGALNS, pAAV-CAG-ohGALNS-v1, pAAV-CAG-ohGALNS-v2 o pAAV-CAG-ohGALNS-v3 usando
 5 Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas, las células y los medios de cultivo se recogieron y se procesaron para la extracción proteica.

Se obtuvieron extractos proteicos mediante sonicación de células en 250 µl de agua Mili-Q y se cuantificó el contenido de proteína usando el ensayo de
 10 proteína Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). La actividad de la galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa se determinó en 1 µg de extractos de proteína celular y 5 µl de medios de cultivo y se normalizó por la cantidad total de proteína y volumen, respectivamente, con un sustrato fluorogénico derivado de 4-metilumbeliferona (Toronto Rerearch Chemicals Inc, Ontario, Canadá), tal
 15 como se ha descrito previamente (van Diggelen y col., 1990).

3. Animales

Se obtuvieron células madre embrionarias C57BL/6N-A/a que portaban
 20 una inserción etiquetada del gen reportero (*LacZ*) en el gen *Galns* disponible por el "International Mouse Phenotyping Consortium" (IMPC, www.mousephenotype.org). Los clones se microinyectaron en blastocitos C57BL/6J0laHsd en la Unidad Animal Transgénica del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) en la Universitat Autònoma de Barcelona
 25 (UAB), y las quimeras macho resultantes se reprodujeron con hembras C57Bl/6NTac para generar la descendencia con gen desactivado ("knock-out") *Galns* (ratones con MPSIVA o *Galns*^{-/-}). El genotipo se determinó sobre ADN genómico a partir de muestras cortadas de la cola con un análisis por PCR que amplifica una secuencia que incluye la mutación dirigida. Las secuencias de los
 30 respectivos cebadores sentido y antisentido eran: Cebador sentido: 5' CCA GGG AAT GTC CCA CCT ATT T 3' (SEQ ID NO: 20); Cebador antisentido: 5' GTC AGG TTG ACA CGA AGC TG 3' (SEQ ID NO: 21); y cebador antisentido KO: 5' GGA ACT TCG GTT CCG GCG 3' (SEQ ID NO: 22). Los cebadores sentido y antisentido permiten genotipar ratones WT. El cebador sentido y antisentido KO:
 35 permiten genotipar ratones *Galns*^{-/-}.

Los ratones se alimentaron *ad libitum* con una dieta convencional (Harlan, Tekland) y se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (luces a las 9:00 AM).

Debido a la carencia de la actividad de GALNS estos animales muestran tan temprano como en un mes de vida varias características patológicas de la enfermedad MPSIVA, incluyendo la acumulación de glicosaminoglicanos (GAG) y el aumento del compartimento lisosomal en diferentes regiones de la placa epifisaria del fémur y la tibia. Además, muchos de estos descubrimientos patológicos se exacerban cuando los animales envejecen, sugiriendo empeoramiento de la patología cuando los animales envejecen. Asimismo, a medida que los animales envejecen también se observa acumulación de GAG en órganos periféricos tales como hígado, corazón y bazo. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la duración de vida entre camadas *Galns*^{-/-} y WT.

15

4. Administración del vector a ratones

Para la administración intravenosa del vector de vectores AAV8-hAAT-omGALNS, se inyectó una dosis total de 1×10^{11} vg a ratones en un volumen total de 200 μ l a través de la vena de la cola de animales *Galns*^{-/-} de 3-4 semanas de vida. Se inyectó una cohorte similar de animales con 1×10^{11} vg de vector (AAV8-hAAT-nulo) no codificante control.

Para la administración intravenosa del vector de vectores AAV8-CAG-omGALNS a ratones, se inyectó una dosis total de 1×10^{12} vg a ratones en un volumen total de 200 μ l a través de la vena de la cola de animales *Galns*^{-/-} de 3-4 semanas de vida. Se inyectó una cohorte similar de animales con 1×10^{12} vg de vector (AAV8-CAG-nulo) no codificante control.

Para la administración intravenosa del vector de vectores AAV9-CAG-omGALNS a ratones, se inyectó una dosis total de 1×10^{12} vg a ratones en un volumen total de 200 μ l a través de la vena de la cola de animales *Galns*^{-/-} de 3-4 semanas de vida. Se inyectó una cohorte similar de animales con 1×10^{12} vg de vector (AAV9-CAG-nulo) no codificante control.

A los 7 meses de vida, 6 meses después de la administración del vector, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los tejidos.

Para la administración intravenosa del vector, se administraron 5×10^{10}

35

genomas de vector de vectores AAV9 que portaban diferentes versiones de la secuencia codificante de la galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana a ratones en un volumen total de 200 μ l por inyección en vena de la cola de animales *Galns*^{-/-} de 2 meses de vida. Se usaron animales *Galns*^{-/-} no tratados y WT como control.

A los 2,5 meses de vida, 15 días después de la administración del vector, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los tejidos.

5. Recogida de muestras

En el sacrificio, los animales se anestesiaron profundamente y, a continuación, se perfundieron transcardialmente con 50 ml de PBS para aclarar completamente la sangre de los tejidos. El cerebro completo y múltiples tejidos somáticos (incluyendo hígado, bazo, riñón, pulmón, corazón, tejido adiposo, ojo, glándula lagrimal y huesos) se extrajeron y o bien se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C o se sumergieron en formalina para posterior análisis fisiológico.

6. Cuantificación de la actividad de la galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa y glicosaminoglicano

Muestras de hígado y tejido adiposo se sometieron a sonicación en agua Mili-Q y las muestras de fémur se homogeneizaron en tampón de homogeneización que consistía en 25 mmol/l de Tris-HCl, pH 7,2 y 1 mmol/l de fluoruro de fenilmetilsulfonilo. La actividad de la galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa se determinó con un sustrato fluorogénico derivado de 4-metilumbeliferona (Toronto Rerearch Chemicals Inc, Ontario, Canadá), tal como se ha descrito previamente (van Diggelen y col., 1990). Los niveles de actividad de GALNS en hígado, tejido adiposo y fémur se normalizaron frente a la cantidad total de proteína, cuantificada usando el ensayo de proteína Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU).

Para la cuantificación de GAG, se pesaron las muestras de tejido y, a continuación, se digirieron con proteinasa K y los extractos se aclararon mediante centrifugación y filtración. Los niveles de GAG se determinaron mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) en

extractos tisulares y suero. Los niveles de GAG se normalizaron a peso húmedo de tejido o a volumen total de muestras digeridas.

7. Análisis histológico

5

Los tejidos se fijaron durante 12-24 h en formalina, se incluyeron en parafina y se seccionaron.

Para la detección del almacenamiento de GAG en epitelio córneo, las secciones de parafina se sometieron a tinción coloidal de Mowry, que revela los GAG en color azul. Para la detección de almacenamiento de GAG en la glándula lagrimal y la placa de crecimiento epifisario tibial, las secciones de resina se sometieron a tinción con azul de toluidina que revela el almacenamiento de GAG en color blanco.

Se usó el programa informático NIS Elements Advanced Research 2.20 para cuantificar el % del área de GAG+ en 15-20 imágenes de cada ojo (aumento original, x40) por animal, usando los mismos ajustes señal de umbral para todos los animales. A continuación, se calculó el porcentaje del área positiva, es decir, el área, en píxeles, con una señal positiva sobre el área de tejido total en la región de interés de la imagen.

20

8. Análisis por microscopía electrónica de transmisión

Los ratones se sacrificaron por una sobredosis de isoflurano (Isoflo, Labs. Esteve, Barcelona, ES) y se perfundieron por la vena cava inferior con 1 ml de 2,5 % de glutaraldehído y 2 % de paraformaldehído. Se seccionaron una pequeña porción (aproximadamente 1 mm³) del giro dentado y amígdala y se incubaron durante 2 horas a 4 °C en el mismo fijador. Después de lavar en tampón de cacodilato frío, los especímenes se fijaron posteriormente en 1 % de tetróxido de osmio, se tiñeron en acetato de uranilo acuoso y, a continuación, se deshidrataron a través de una serie de etanol graduado y se introdujeron en resina epoxi. Las secciones de ultratina (600-800 Å) de los bloques de resina se tiñeron usando citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión (H-7000; Hitachi, Tokyo, JP).

9. Análisis estadístico

35

Todos los resultados se expresan como las medias $\pm$ EEM. Las comparaciones estadísticas se realizaron usando ANOVA de una vía. Las comparaciones múltiples entre los grupos control y tratamiento se realizaron usando el ensayo posterior de Dunnett, y entre todos los grupos usando el ensayo posterior de Tukey. La significancia estadística se consideró si $P < 0,05$.

EJEMPLOS

10 **Ejemplo 1: Construcción de pAAV-CAG-hGALNS**

La CDS para galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana (Secuencia de Referencia de NCBI: NM_000512.4) se usó como material de partida y se sintetizó químicamente con este fin (GeneArt; Life Technologies). La CDS SEQ ID NO: 1 se recibió clonada dentro del plásmido pMK-RQ (KanR) flanqueada por los sitios de restricción MluI y EcoRI en 5' y 3', respectivamente.

El fragmento de CDS de galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana MluI/EcoRI se escindió del plásmido pMK-RQ y posteriormente se clonó entre los sitios de restricción MluI y EcoRI del plásmido esqueleto de AAV pAAV-CAG. El plásmido resultante se denominó pAAV-CAG-hGALNS (número de acceso DSM 32791). Véase la Figura 1A y la SEQ ID NO: 2.

El plásmido esqueleto de AAV pAAV-CAG usado en el presente documento se había generado previamente y contenía las ITR del genoma de AAV2, el promotor CAG, y la señal de poliA de β -globina de conejo, así como un sitio de multiclonación para la clonación de las CDS de interés. El promotor CAG es un promotor híbrido compuesto del potenciador temprano/intermedio de CMV y el promotor de β -actina de pollo. Este promotor es capaz de conducir una expresión potente de manera ubicua.

30 **Ejemplo 2: Construcción de pAAV-CAG-ohGALNS-v1**

Se diseñaron y se obtuvieron casetes de expresión que incluían una versión optimizada de la secuencia de ADNc de galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa (ohGALNS). La optimización de secuencia se realizó para maximizar la eficacia de la producción de la proteína galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa

en seres humanos a través de la eliminación de sitios de corte y empalme crípticos y los elementos de secuencia de desestabilización de ARN para incrementar la estabilidad del ARN, adición de elementos de secuencia estabilizantes de ARN, optimización de codón y adaptación del contenido de G/C, evitar las estructuras secundarias de ARN estables entre otros cambios. La CDS para galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana (Secuencia de Referencia de NCBI: NM_000512.4) se usó como punto de partida para la optimización de secuencia.

La CDS optimizada SEQ ID NO: 3 (GeneArt; Life Technologies) se recibió clonada dentro del plásmido pMK-RQ (KanR) flanqueada por los sitios de restricción MluI y EcoRI en 5' y 3', respectivamente.

El fragmento de CDS de galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana optimizado MluI/EcoRI se escindió del plásmido pMK-RQ y posteriormente se clonó entre los sitios de restricción MluI y EcoRI del plásmido esqueleto de AAV pAAV-CAG. El plásmido resultante se denominó pAAV-CAG-ohGALNS-v1 (número de acceso DSM 32792). Véase la Figura 2A y la SEQ ID NO: 4.

Ejemplo 3: Construcción de pAAV-CAG-ohGALNS-v2

La CDS para galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana (Secuencia de Referencia de NCBI: NM_000512.4) se sometió a optimización de secuencia (GenScript, Inc). La CDS optimizada SEQ ID NO: 5 se recibió clonada dentro del plásmido pUC57 (AmpR) flanqueada por los sitios de restricción MluI y EcoRI en 5' y 3', respectivamente.

El fragmento de CDS de galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana optimizado MluI/EcoRI se escindió del plásmido pUC57 y posteriormente se clonó entre los sitios de restricción MluI y EcoRI del plásmido esqueleto de AAV pAAV-CAG. El plásmido resultante se denominó pAAV-CAG-ohGALNS-v2 (número de acceso DSM 32793). Véase la Figura 3A y la SEQ ID NO: 6.

Ejemplo 4: Construcción de pAAV-CAG-ohGALNS-v3

La CDS para galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana (Secuencia de Referencia de NCBI: NM_000512.4) se sometió a optimización de secuencia (DNA 2.0 Inc). La CDS optimizada SEQ ID NO: 7 se recibió clonada dentro del

plásmido pj201 (KanR) flanqueada por los sitios de restricción MluI y EcoRI en 5' y 3', respectivamente.

El fragmento de CDS de galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana optimizado MluI/EcoRI se escindió del plásmido pj201 y posteriormente se clonó entre los sitios de restricción MluI y EcoRI del plásmido esqueleto de AAV pAAV-CAG. El plásmido resultante se denominó pAAV-CAG-ohGALNS-v3 (número de acceso DSM 32794). Véase la Figura 4A y la SEQ ID NO: 8.

Ejemplo 5: Construcción de pAAV-CAG-omGALNS

10

La CDS para galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa murina (Secuencia de Referencia de NCBI: NM_016722.4) se sometió a optimización de secuencia (GeneArt; Life Technologies). La CDS optimizada SEQ ID NO: 9, se recibió clonada dentro del plásmido pMA-RQ-Bb (AmpR) flanqueada por los sitios de restricción MluI y EcoRI en 5' y 3', respectivamente.

El fragmento de CDS de galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa murina optimizado MluI/EcoRI se escindió del plásmido pMA-RQ-Bb y posteriormente se clonó entre los sitios de restricción MluI y EcoRI del plásmido esqueleto de AAV pAAV-CAG. El plásmido resultante se denominó pAAV-CAG-omGALNS. Véase la Figura 5A y la SEQ ID NO: 10.

20

Ejemplo 6: Construcción de pAAV-hAAT-omGALNS

La CDS para galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa murina (Secuencia de Referencia de NCBI: NM_016722.4) se sometió a optimización de secuencia (GeneArt; Life Technologies) SEQ ID NO: 9.

El promotor hAAT (SEQ ID NO: 19) se recibió clonado dentro del plásmido pGG2-hAAT (AmpR) flanqueado por los sitios de restricción BglII y MluI en 5' y 3', respectivamente.

El promotor CAG (SEQ ID NO: 18) se escindió del plásmido pAAV-CAG-omGALNS y posteriormente se reemplazó por el promotor hAAT. El plásmido resultante se denominó pAAV-hAAT-omGALNS. Véase la Figura 6A y la SEQ ID NO: 11.

El promotor hAAT es un promotor híbrido compuesto del promotor de α 1-antitripsina humana y tres copias del potenciador de la región control de

35

hepatocito (HCR) de la apolipoproteína E. Este promotor es capaz de conducir una expresión potente específica de hígado.

Ejemplo 7: Producción de AAV9-CAG-hGALNS

5

Los vectores AAV9-CAG-hGALNS (SEQ ID NO: 12) se generaron mediante transfección libre de virus auxiliar de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones (Matsushita y col., 1998; Wright y col., 2005). Se cultivaron células a 70 % de confluencia en botellas de cultivo rotativas (RB) (Corning, Corning, NY, EEUU) en DMEM suplementado con FBS al 10 % y, a continuación, se sometieron a cotransfección con: 1) un plásmido que portaba el casete de expresión flanqueado por las ITR de AAV2 (pAAV-CAG-hGALNS; SEQ ID NO: 2); 2) un plásmido que portaba los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV9 (pREP2CAP9); y 3) un plásmido que portaba las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes de cloruro de cesio consecutivos usando un protocolo optimizado tal como previamente se ha descrito (Ayuso y col., 2010). Los vectores se sometieron a diálisis frente a PBS + 0,001 % de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron mediante qPCR y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Véase la Figura 1B.

20

Ejemplo 8: Producción de AAV9-CAG-ohGALNS-v1

Los vectores AAV9-CAG-ohGALNS-v1 (SEQ ID NO: 13) se generaron mediante transfección libre de virus auxiliar de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones. (Matsushita y col., 1998; Wright y col., 2005). Se cultivaron células a 70 % de confluencia en botellas de cultivo rotativas (RB) (Corning, Corning, NY, EEUU) en DMEM suplementado con FBS al 10 % y, a continuación, se sometieron a cotransfección con: 1) un plásmido que portaba el casete de expresión flanqueado por las ITR de AAV2 (pAAV-CAG-ohGALNS-v1; SEQ ID NO: 4); 2) un plásmido que portaba los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV9 (pREP2CAP9); y 3) un plásmido que portaba las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes de cloruro de cesio consecutivos usando un protocolo optimizado tal como previamente se ha descrito (Ayuso y col., 2010). Los vectores se sometieron a diálisis frente a PBS + 0,001 % de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron mediante qPCR y se

35

almacenaron a -80 °C hasta su uso. Véase la Figura 2B.

Ejemplo 9: Producción de AAV9-CAG-ohGALNS-v2

5 Los vectores AAV9-CAG-ohGALNS-v2 (SEQ ID NO: 14) se generaron mediante transfección libre de virus auxiliar de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones. (Matsushita y col., 1998; Wright y col., 2005). Se cultivaron células a 70 % de confluencia en botellas de cultivo rotativas (RB) (Corning, Corning, NY, EEUU) en DMEM suplementado con FBS al 10 % y, a
10 continuación, se sometieron a cotransfección con: 1) un plásmido que portaba el casete de expresión flanqueado por las ITR de AAV2 (pAAV-CAG-ohGALNS-v2; SEQ ID NO: 6); 2) un plásmido que portaba los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV9 (pREP2CAP9); y 3) un plásmido que portaba las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes de cloruro de cesio
15 consecutivos usando un protocolo optimizado tal como previamente se ha descrito (Ayuso y col., 2010). Los vectores se sometieron a diálisis frente a PBS + 0,001 % de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron mediante qPCR y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Véase la Figura 3B.

Ejemplo 10: Producción de AAV9-CAG-ohGALNS-v3

Los vectores AAV9-CAG-ohGALNS-v3 (SEQ ID NO: 15) se generaron mediante transfección libre de virus auxiliar de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones. (Matsushita y col., 1998; Wright y col., 2005). Se
25 cultivaron células a 70 % de confluencia en botellas de cultivo rotativas (RB) (Corning, Corning, NY, EEUU) en DMEM suplementado con FBS al 10 % y, a continuación, se sometieron a cotransfección con: 1) un plásmido que portaba el casete de expresión flanqueado por las ITR de AAV2 (pAAV-CAG-ohGALNS-v3; SEQ ID NO: 7); 2) un plásmido que portaba los genes *rep* de AAV2 y *cap* de
30 AAV9 (pREP2CAP9); y 3) un plásmido que portaba las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes de cloruro de cesio consecutivos usando un protocolo optimizado tal como previamente se ha descrito (Ayuso y col., 2010). Los vectores se sometieron a diálisis frente a PBS + 0,001 % de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron mediante qPCR y se
35 almacenaron a -80 °C hasta su uso. Véase la Figura 4B.

Ejemplo 11: Producción de AAV9-CAG-omGALNS

Los vectores AAV9-CAG-omGALNS (SEQ ID NO: 16) se generaron mediante transfección libre de virus auxiliar de células HEK293 usando tres
 5 plásmidos con modificaciones. Véase (Matsushita y col., 1998; Wright y col., 2005). Se cultivaron células a 70 % de confluencia en botellas de cultivo rotativas (RB) (Corning, Corning, NY, EEUU) en DMEM suplementado con FBS al 10 % y, a continuación, se sometieron a cotransfección con: 1) un plásmido que portaba el casete de expresión flanqueado por las ITR de AAV2 (pAAV-CAG-omGALNS; SEQ ID NO: 10); 2) un plásmido que portaba los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV9 (pREP2CAP9); y 3) un plásmido que portaba las funciones
 10 auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes de cloruro de cesio consecutivos usando un protocolo optimizado tal como previamente se ha descrito (Ayuso y col., 2010). Los vectores se sometieron a diálisis frente a PBS + 0,001 % de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron mediante qPCR y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Véase la Figura 5B y la SEQ ID NO: 16.

Ejemplo 12: Producción de AAV8-CAG-omGALNS

20 Los vectores AAV8-CAG-omGALNS (SEQ ID NO: 16) se generaron mediante transfección libre de virus auxiliar de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones. Véase (Matsushita y col., 1998; Wright y col., 2005). Se cultivaron células a 70 % de confluencia en botellas de cultivo rotativas
 25 (RB) (Corning, Corning, NY, EEUU) en DMEM suplementado con FBS al 10 % y, a continuación, se sometieron a cotransfección con: 1) un plásmido que portaba el casete de expresión flanqueado por las ITR de AAV2 (pAAV-CAG-omGALNS; SEQ ID NO: 10); 2) un plásmido que portaba los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV8 (pREP2CAP8); y 3) un plásmido que portaba las funciones
 30 auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes de cloruro de cesio consecutivos usando un protocolo optimizado tal como previamente se ha descrito (Ayuso y col., 2010). Los vectores se sometieron a diálisis frente a PBS + 0,001 % de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron mediante qPCR y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Véase la Figura 5B y
 35 la SEQ ID NO: 16.

Ejemplo 13: Producción de AAV8-hAAT-omGALNS

Los vectores AAV8-hAAT-omGALNS (SEQ ID NO: 17) se generaron mediante transfección libre de virus auxiliar de células HEK293 usando tres
 5 plásmidos con modificaciones. Véase (Matsushita y col., 1998; Wright y col., 2005). Se cultivaron células a 70 % de confluencia en botellas de cultivo rotativas (RB) (Corning, Corning, NY, EEUU) en DMEM suplementado con FBS al 10 % y, a continuación, se sometieron a cotransfección con: 1) un plásmido que portaba el casete de expresión flanqueado por las ITR de AAV2 (pAAV-hAAT-omGALNS; SEQ ID NO: 11); 2) un plásmido que portaba los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV8 (pREP2CAP8); y 3) un plásmido que portaba las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes de cloruro de cesio consecutivos usando un protocolo optimizado tal como
 10 previamente se ha descrito (Ayuso y col., 2010). Los vectores se sometieron a diálisis frente a PBS + 0,001 % de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron mediante qPCR y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Véase la Figura 6B y la SEQ ID NO: 17.

Ejemplo 14: Inyección intravenosa de AAV9-CAG-hGALNS, AAV9-CAG-ohGALNS-v1, AAV9-CAG-ohGALNS-v2, o AAV9-CAG-ohGALNS-v3 a ratones con MPSIVA

Una dosis total de 5×10^{10} genomas de vector de AAV9-CAG-hGALNS, AAV9-CAG-ohGALNS-v1, AAV9-CAG-ohGALNS-v2 o AAV9-CAG-ohGALNS-v3
 25 que contenían diferentes versiones del casete de expresión de galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana se administraron por vía intravenosa a ratones afectados con MPSIVA de 2 meses de vida por inyección en la vena de la cola.

El análisis de la actividad de GALNS se realizó 2 semanas después de la administración del vector. La transducción con todos los cuatro vectores que
 30 contenían galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa dio como resultado un incremento sustancial en la actividad de la galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa sobre los niveles medidos en animales con MPSIVA. Los niveles de actividad de la galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa oscilaron de 1.500 % a 2.600 % de los niveles de WT en hígado y 55 % a 99 % de WT en suero. Véase las Figuras 7A y 7B. En el hígado, los niveles de actividad alcanzados con el casete de
 35

expresión que contenía tanto la versión 2 como la versión 3 de galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana eran mayores que los mediados por el vector que contenía la secuencia de tipo silvestre. Véase la Figura 7A. En el suero, tanto la versión 2 como la versión 3 de la galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa humana condujeron a incrementos mayores en la actividad enzimática que el tipo silvestre y la versión 1. Véase la Figura 7B.

Ejemplo 15: Administración intravenosa de AAV9-CAG-omGALNS, AAV8-CAG-omGALNS o AAV8-hAAT-omGALNS a ratones con MPSIVA

Una dosis total de 1×10^{12} genomas de vector de AAV9-CAG-omGALNS, 1×10^{12} genomas de vector de AAV8-CAG-omGALNS o 1×10^{11} genomas de vector de vectores AAV8-hAAT-omGALNS se inyectaron a través de la vena de la cola de animales con MPSIVA de 3-4 semanas de vida en un volumen total de 200 μ l. Cuatro y seis meses después de la administración del vector, los animales se sacrificaron y se recogieron muestras para análisis adicional.

Seis meses después del tratamiento con AAV, la actividad enzimática de GALNS en el hígado, el fémur, el tejido adiposo y el suero de animales tratados con MPSIVA se normalizó, alcanzando valores similares o incluso superiores que los observados en animales sanos. Véase la Figura 8, 9 y 10. La restauración de la actividad de GALNS condujo a una normalización completa de la acumulación de sustrato característica de la enfermedad en hígado y suero, tal como se indica por concentraciones similares de queratán sulfato en controles tipo silvestre y ratones *Galns*^{-/-} tratados. Véase la Figura 11.

Las administraciones intravenosas de los diferentes vectores a la corriente sanguínea somete a transducción principalmente el hígado entre otros tejidos y órganos (Ruzo y col., 2012). Por consiguiente, la actividad de GALNS en el hígado de ratones con MPSIVA machos tratados con los diferentes vectores era de aproximadamente 25 veces mayor que la observada en animales sanos. Véase la Figura 8A, 9A y 10A.

Cuando se sobreexpresan en el hígado, las proteínas lisosomales solubles son eficazmente secretadas a la corriente sanguínea, convirtiendo este órgano en una fuente de enzima circulante (Ruzo y col., 2012). En el suero de ratones con MPSIVA tratados, la actividad de GALNS alcanzó un pico alrededor del mes 3 después de la inyección y después se estabilizó a largo plazo con

valores que oscilaban de 20 a 50 veces mayores que en las camadas de tipo silvestre. Véase la Figura 8D, 9D y 10D. Cuando la eficacia somática de la terapia se evaluó a través de la cuantificación del contenido de GAG en suero e hígado, se observó una normalización completa de los niveles de KS circulantes y hepáticos. Véase la Figura 11.

Cuatro meses después de la administración de AAV, las placas de crecimiento epifisario tibial de ratones tratados con MPSIVA mostraron claramente una reducción de la acumulación de GAG intracelular indicada por la presencia de depósitos de GAG intracelulares múltiples. Véase la Figura 12.

Los animales tratados con AAV también mostraron una normalización completa de la acumulación de GAG en glándulas lagrimales indicadas por la ausencia de depósitos de GAG intracelulares. Véase la Figura 13B. Asimismo, la cuantificación de la intensidad de señal del área GAG positiva en las secciones de epitelio córneo teñidas con tinción coloidal de Mowry, reveló una reducción en el % de depósito de GAG sobre la superficie del epitelio córneo en ratones *Galns*^{-/-} tratados con AAV9-CAG-omGALNS o AAV8-hAAT-omGALNS sobre valores documentados en ratones deficientes en GALNS. Véase la Figura 13A.

El análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión del giro dentado y la amígdala de ratones macho de 7 meses de vida reveló la presencia de grandes vacuolas que contenían sustancia electroluminosa en el citoplasma de células de ratones deficientes en GALNS no tratados. Estas células se identificaron como macrófagos perivasculares en el giro dentado o células gliales perineuronales y células endoteliales en la amígdala. Estas vesículas, las cuales parecían ser lisosomas rellenos con material de almacenamiento, estaban completamente ausentes en muestras de animales sanos de tipo silvestre o *Galns*^{-/-} tratados con AAV9-CAG-omGALNS, confirmando la restauración del tamaño normal del compartimento lisosomal después de la transferencia génica. Véase la Figura 14.