

PARTÍCULAS VIRALES PARA USO EN EL TRATAMIENTO DE SINUCLINOPATÍAS TAL COMO ENFERMEDAD DE PARKINSON MEDIANTE TERAPIA GÉNICA

ÁREA TÉCNICO

- 5 La presente descripción se relaciona con una partícula viral que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende un transgén que codifica una glucocerebrosidasa y su uso de la misma en el tratamiento de sinucleinopatías, particularmente enfermedad de Parkinson esporádica mediante terapia génica.

ARTE PREVIO

- 10 La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo imparable caracterizado por la pérdida de neuronas que producen dopamina en un área del cerebro conocida como sustancia negra pars compacta (*Substantia nigra pars compacta*) (SNc). Como resultado de esta pérdida neuronal, se produce una declinación progresiva de los niveles de dopamina en el cerebro. Los niveles de dopamina reducidos inducen una disfunción de los circuitos de los
- 15 ganglios basales, lo que conduce a la aparición de síntomas cardinales típicos de la EP (temblor, rigidez, bradiquinesia e inestabilidad postural). En la actualidad, están disponibles tanto el tratamiento farmacológico (levodopa y agonistas de dopamina) como el quirúrgico (estimulación cerebral profunda), que muestran una alta eficacia para aliviar los síntomas motrices. No obstante, la enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo general
- 20 en donde la SNc se ve afectada primero, pero no limitado a la misma. Los enfoques terapéuticos existentes son meramente un tratamiento sintomático con dopamina, sin ningún efecto en la disminución de la progresión de la enfermedad.

- EP y las sinucleinopatías relacionadas son, por lo general, trastornos cerebrales esporádicos (también conocidos como trastornos idiopáticos; que representan más del 90-95% de los
- 25 pacientes diagnosticados). Solo en una pequeña fracción de los pacientes se han dilucidado antecedentes genéticos (casos familiares). Entre las mutaciones genéticas que han sido implicadas en la aparición de estas sinucleinopatías (LRRK2, SNCA, PARKIN, DJ-1, entre otras), las mutaciones en el gen GBA1 (ubicado en el cromosoma 1 y que codifica una enzima lisosomal conocida como glucocerebrosidasa) son, por lejos, las más numerosas, y, de hecho,
- 30 un vínculo genético directo entre las mutaciones homocigóticas y heterocigóticas de GBA1 y

la incidencia aumentada de EP y demencia con cuerpos de Lewy (DLB, por sus siglas en inglés) ha sido demostrado claramente por Sidransky y colaboradores (Sidransky E, et al. N Engl J Med 2009;361:1651-1661), con un cociente de probabilidades (*odds ratio*) de 5,43 para EP. La asociación de mutaciones en GBA1 y la DLB es aún más fuerte que para la EP (cociente de probabilidades de 8,28). Las mutaciones en GBA1 confieren un riesgo aumentado 20 a 30 veces para el desarrollo de la EP y DLB, mientras que la asociación entre mutaciones en GBA1 y Atrofia Multisistémica (AMS) es aún más controversial. La presencia de tal vínculo directo entre las mutaciones en GBA1 y las sinucleinopatías es el argumento más sólido que vincula el déficit de glucocerebrosidasa (GCasa) con la aparición de la EP y DLB. No obstante, en términos de mecanismos que intervienen en la vía de la GCasa-alfa-sinucleína, la forma en que la degradación, agregación y procesamiento subcelular de alfa-sinucleína y de la actividad GCasa se combinan exactamente entre sí sigue siendo una cuestión abierta en el área con pruebas experimentales limitadas.

Hasta la fecha, se han sugerido tres hipótesis principales que vinculan el déficit de la GCasa con alfa-sinucleína: 1/una ganancia de función por la GCasa mal plegada (por ejemplo, mal plegada debido a la mutación en GBA1) da por resultado su interacción directa con alfa-sinucleína, que en última instancia conduce a la agregación y acumulación de alfa-sinucleína; 2/ una pérdida de función de la GCasa (deficiencia de la GCasa debido a la degradación de la enzima mal plegada) conduce a la acumulación de un sustrato (glucocerebrósido) que a su vez perturba la homeostasis de lípidos y posteriormente afecta el tráfico, elaboración y eliminación de alfa-sinucleína. Esto eventualmente promueve la agregación de alfa-sinucleína y facilita la formación de oligómeros; 3/ un bucle de retroalimentación bidireccional en donde la deficiencia de la GCasa facilita la formación de oligómeros de alfa-sinucleína, conduciendo estos oligómeros a una mayor disminución de la actividad normal de la GCasa, que a su vez promueve la formación de oligómeros adicionales de alfa-sinucleína.

Se ha postulado que entre 5 y 10% de los pacientes con EP tienen una mutación GBA1. Para este subgrupo de pacientes con EP, la presencia de una mutación GBA1 induce una grave pérdida de la función de la GCasa (dejando una actividad residual de la GCasa de no más de 15% de los niveles normales). Esta pérdida de la función de la GCasa desencadena la agregación de alfa-sinucleína (a través de algunos mecanismos desconocidos), lo que finalmente conduce a la muerte neuronal. También cabe señalar que para los pacientes con EP y DLB esporádicas se ha postulado que la agregación de alfa-sinucleína en sí misma (por ejemplo, en ausencia de

mutaciones de GBA1) también puede inducir una pérdida de la función de la GCasa (Gegg ME, et al., Ann Neurol 2012;72:455-463; Murphy KE, et al., Brain 2014;137:834-848; Alcalay RN et al., Brain 2015;138:2648-2658; Parnetti L, et al., Mov Disord 2014;29:1019-1027), aunque la base última de esta asociación ha permanecido esquivada, con muy poca evidencia experimental hasta la fecha.

En otras palabras, la utilidad potencial de aumentar la actividad de la GCasa en sinucleinopatías esporádicas aún no se ha demostrado en investigaciones preclínicas para la administración sistémica de la enzima recombinante.

Se ha estudiado en cierta medida el aumento de la actividad de la GCasa en un intento por reducir la carga de alfa-sinucleína al menos en los pacientes asociados con la mutación GBA1. La suplementación directa de la enzima recombinante GCasa (terapia de reemplazo de la GCasa) ha sido un tratamiento exitoso en la enfermedad de Gaucher (Weinreb NJ, et al., Am J Med 2002;113:112-119; Connock M, et al., Health Technol Assess 2006;10:iii-iv,ix-136). Se ha demostrado que la GCasa recombinante administrada sistémicamente se localiza en el lisosoma y regula positivamente la actividad de la enzima. No obstante, la limitación de este enfoque en el contexto de los trastornos neurodegenerativos es que GCasa puede no cruzar la barrera hematoencefálica en concentraciones significativas para modificar la actividad cerebral de la GCasa. Un enfoque alternativo es la administración intratecal directa de la GCasa recombinante (Brady RO, Yang C, Zhuang Z. J Inher Metab Dis 2013;36:451-454; LeBowitz J. A Proc Natl Acad Sci USA 2015;102:14485-14486). No obstante, sigue habiendo dudas sobre la capacidad de la GCasa administrada intratecalmente para proporcionar un gradiente de concentración suficiente para penetrar profundamente en los tejidos neuronales.

Otros enfoques se han centrado en la acumulación de glucosilceramida como mecanismo patógeno de la EP en portadores de la mutación en GBA1 (Sardi SP, et al., Proc Natl Acad Sci USA 2013;110:3537-3542). La inhibición del sustrato de la GCasa parece reducir los niveles de alfa-sinucleína en las líneas celulares que sobreexpresan sinucleína (Sardi SP, et al., Proc Natl Acad Sci USA 2013;110:3537-3542). Además, miglustat, un inhibidor reversible de la glucosilceramida sintasa, se ha utilizado en el contexto de la enfermedad de Gaucher tipo III, aunque existen preocupaciones sobre su eficacia y su perfil de efectos secundarios. Otros dos inhibidores de glucosilceramida sintasa, eliglustat y venglustat, están en etapa de evaluación en ensayos clínicos de la enfermedad de Gaucher (identificador de ClinicalTrials.gov

NCT00891202) y enfermedad de Parkinson (identificador de ClinicalTrials.gov NCT02906020).

Los chaperones de GCasa también se han utilizado para promover el transporte de GCasa desde ER (por sus siglas en inglés) hasta el lisosoma. La isofagomina fue la chaperona ensayada en primer lugar, aunque los ensayos clínicos de este compuesto en el contexto de la enfermedad de Gaucher no tuvieron éxito probablemente debido a que esta chaperona se une con una afinidad demasiado alta al sitio activo de la GCasa, inhibiendo así la actividad enzimática dentro del lisosoma. Para eludir esta cuestión, se están desarrollando actualmente varios nuevos chaperones moleculares pequeños no inhibidores de la GCasa como posibles agentes neuroprotectores en EP (Mazzuli JR, et al. J Neurosci 2016;36:7693-7706). En la actualidad, el candidato a chaperón molecular de la GCasa pequeño más probable en EP es ambroxol. En ratones, la actividad de las GCasas aumentó con el tratamiento con ambroxol (Migdalska-Richards A, Daly L, Bezard E, Schapira AH. Ann Neurol 2016;80:766-775), y lo mismo ocurre en un primate no humano, pero solo en una dosis más alta (Migdalska-Richards A, Ko WKD, Li Q et al. Synapse 2017;256:e21967). Se están realizando dos ensayos clínicos de fase II de ambroxol en EP (identificadores de ClinicalTrials.gov NCT02941822 y NCT02914366).

Se ha informado terapia genética con GBA1, aunque solo en ratones. La coinyección de vectores virales adeno-asociados (AAV, por sus siglas en inglés) que codifican GBA1 y alfa-sinucleína mutada en ratas impidió la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas (Rocha EM, et al., Neurobiol Dis 2015;82:495-503). Sin embargo, en este estudio no se ha mostrado la utilidad de AAV-GBA1 una vez que la sinucleinopatía ya está desarrollada. Además, se ha informado que el uso de una variante de AAV penetrante de la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés) conocida como AAV9-PHP.B que codifica el gen GBA1 en ratones transgénicos alfa-sinucleína dio lugar a una eliminación casi completa de los agregados de alfa-sinucleína en todo el cerebro de los ratones (Morabito G, y otros, Mol Ther 2017;25:2727-2742). Sin embargo, los autores utilizaron en este estudio un ratón transgénico alfa-sinucleína que carecía del fenotipo adecuado similar a EP. Además, se ha demostrado que AAV9-PHP.B solo funciona en cepas específicas de ratones y que AAV9-PHP-B no atraviesa la barrera hematoencefálica en monos títies.

Sigue siendo necesaria una terapia génica con GBA1 adecuada para tratar la enfermedad de Parkinson esporádica en sujetos humanos

En particular, las terapias modificadoras de la enfermedad para EP esporádica deben estar respaldadas por la prueba de principio de que el aumento de la actividad de la GCasa mediada por virus, induce la eliminación de los agregados de alfa-sinucleína en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNc) tanto en las etapas tempranas como en las avanzadas de la enfermedad, junto con la demostración de que la eliminación impulsada por GCasa de la alfa-sinucleína agregada es neuroprotectora para las neuronas dopaminérgicas e impide el paso transneuronal de alfa-sinucleína (propagación similar a un prion). Además, las terapias modificadoras de la enfermedad para EP esporádica también deben estar respaldadas por la atenuación de los fenómenos proinflamatorios impulsados por microgliales y desencadenados por la agregación de alfa-sinucleína.

La presente invención provee partículas virales para el aumento de la actividad de la GCasa mediada por virus para uso en terapia génica para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson en pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad, donde una sinucleinopatía generalizada está presente en todo el cerebro, en particular en los casos en que la corteza cerebral está comprometida.

RESUMEN

Los inventores han diseñado estrategias terapéuticas que cumplen los requisitos mencionados, como se ha demostrado en los modelos de primates no humanos de la enfermedad de Parkinson esporádica.

Por consiguiente, la presente invención se relaciona con una partícula viral que comprende un constructo de ácido nucleico que incluye un transgén que codifica una glucocerebrosidasa y su uso en el tratamiento de sinucleinopatía mediante terapia génica en un sujeto que lo necesita.

En una forma de realización, dicho transgén comprende a) una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 o b) una secuencia de nucleótidos que codifica glucocerebrosidasa humana en donde la glucocerebrosidasa humana comprende SEQ ID NO: 5, 6, 8, 17 o 18. En formas de realización específicas, dicho constructo de ácido nucleico además comprende un promotor ligado operativamente al transgén que codifica glucocerebrosidasa y en donde dicho promotor permite la expresión de dicho transgén al menos en células neuronales y microgliales de la sustancia negra pars compacta (SNc); y preferiblemente también en células neuronales de otras áreas del cerebro, incluyendo al menos sustancia negra pars compacta, corteza cerebral, amígdala y los núcleos intralaminares

caudados del tálamo. Típicamente, dicho constructo de ácido nucleico puede comprender un transgén que codifica una glucocerebrosidasa bajo el control de un promotor ubicuo, por ejemplo el promotor GusB, en particular un promotor que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20, el promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27, el promotor CAG que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21 o el promotor de la sinapsina humana 1 (hSyn) que comprende o consiste en SEQ ID NO: 13.

En formas de realización específicas, dicha partícula viral incluye proteína de cápside seleccionada entre las partículas virales con diana simultánea en al menos las neuronas y las células microgliales. Más específicamente, dicha partícula viral puede ser seleccionada entre las partículas virales con diana simultánea en al menos las neuronas dopaminérgicas y las células microgliales de la sustancia negra pars compacta.

En ciertas formas de realización, dicha partícula viral es seleccionada entre partículas RAAV, incluyendo preferiblemente proteínas de cápside seleccionadas del grupo que consiste en: serotipos AAV2, AAV5, AAV9, AAV-MNM004, AAV-MNM008, y AAV-TT.

En una forma de realización más específica, dicha partícula viral incluye la proteína de cápside AAV-TT, preferiblemente que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 14 o una secuencia que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14. En una forma de realización preferida, la partícula viral comprende un constructo de ácido nucleico que comprende:

- a) un transgén que codifica una glucocerebrosidasa humana; donde dicho transgén comprende SEQ ID NO: 19 o una secuencia que codifica glucocerebrosidasa humana, donde la glucocerebrosidasa humana comprende SEQ ID NO: 5 o 8;
- b) un promotor ligado operativamente a dicho transgén y en donde dicho promotor preferiblemente permite la expresión de dicho transgén al menos en células neuronales y microgliales de la sustancia negra pars compacta (SNc); en donde dicho promotor es preferiblemente promotor CAG que comprende SEQ ID NO: 9 o 21, o promotor GusB que comprende SEQ ID NO: 2 o 20, o el promotor JeT que comprende SEQ ID NO: 27 o el promotor hSyn que comprende SEQ ID NO: 13;

- c) una secuencia señal de poliadenilación, preferiblemente una secuencia señal de poliadenilación que comprende SEQ ID NO: 28 o 3, preferiblemente SEQ ID NO: 28;

5 en donde dicha partícula viral es una partícula recombinante de un virus adeno-asociado (rAAV), preferiblemente que incluye proteínas de cápside de AAV-TT, y más preferiblemente que comprende SEQ ID NO: 14 o una secuencia que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14; donde dicho constructo de ácido nucleico está comprendido en un vector viral que además comprende una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR, preferiblemente una secuencia 5'ITR y
10 una secuencia 3'ITR de un virus adeno-asociado, más preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR del serotipo AAV2, y en donde cada una de las secuencias 5'ITR y 3'ITR, independientemente, comprenden o consisten en secuencias SEQ ID NO: 15 o 16 o una secuencia que tiene al menos el 80% o al menos el 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16, en donde preferiblemente 5'ITR comprende SEQ ID NO: 15 y 3'ITR comprende SEQ ID
15 NO: 16. En ciertas formas de realización, dicha partícula viral comprende proteína de cápside viral seleccionada entre los serotipos de variantes virales con transporte retrógrado (AAVretro).

Por lo general, dicho AAVretro puede ser capaz de diseminarse de forma retrógrada en la corteza cerebral, preferiblemente al menos hasta la sustancia negra pars compacta y la corteza cerebral después de la inyección parenquimal en los núcleos caudados-putamen de un primate
20 no humano, tal como se determina en un ensayo de diseminación *in vivo*. Ventajosamente, el AAVretro inyectado en los núcleos caudados-putamen de un primate no humano puede ser capaz de diseminarse de forma retrógrada también a otras áreas del cerebro que inervan los núcleos caudados-putamen, incluyendo al menos la sustancia negra pars compacta, la corteza cerebral, la amígdala y los núcleos intralaminares caudados del tálamo. En otro aspecto, la
25 presente descripción se relaciona con un ensayo de diseminación *in vivo* que incluye las siguientes etapas:

- a) inyectar un rAAV de ensayo que comprende GFP (proteína verde fluorescente) que codifica el transgén (rAAV-GFP) mediante inyección intraparenquimatosas de dicho rAAV-GFP en el putamen postcomisural de un primate no humano, y
- 30 b) contar el número de neuronas que expresan GFP en la corteza cerebral, preferiblemente en las áreas del cerebro que inervan los núcleos caudados-putamen, un mes después de la inyección, más particularmente al menos en la sustancia negra

pars compacta, la corteza cerebral, la amígdala y los núcleos intralaminares caudados del tálamo.

5 En otras formas de realización, dicho ensayo de diseminación *in vivo* además comprende una etapa c) de comparar el porcentaje de neuronas marcadas en la corteza cerebral, preferiblemente en las áreas del cerebro que inervan los núcleos caudados-putamen, con un experimento de control realizado con AAV-TT-GFP.

10 En ciertas formas de realización, la partícula viral, de acuerdo con la presente descripción, está seleccionada ventajosamente entre las partículas AAVretro que son capaces de diseminarse en la corteza cerebral, preferiblemente al menos hasta la sustancia negra pars compacta y la corteza cerebral, al menos al mismo nivel que AAV-TT tal como se determina en un ensayo de diseminación *in vivo* como el descrito anteriormente.

15 En formas de realización específicas, dicha proteína de cápside AAVretro está seleccionada entre los siguientes serotipos variantes: AAV-MNM004, AAV-MNM008 y AAV-TT.

En una forma de realización más específica, dicha partícula AAVretro incluye la proteína de cápside del serotipo AAV-TT, preferiblemente que comprende una secuencia SEQ ID NO: 14 o una secuencia que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14.

20 En formas de realización específicas, dicho constructo de ácido nucleico además comprende una secuencia señal de poliadenilación, en particular una secuencia señal de poliadenilación de secuencia SEQ ID NO: 3.

25 En formas de realización específicas, dicho constructo de ácido nucleico está comprendido en un vector viral que además comprende una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR, preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR de un virus adeno-asociado, más preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR del serotipo AAV2 que comprenden o consisten en secuencia SEQ ID NO: 15 y/o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16.

En formas de realización específicas, dicho constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 4 o una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 4.

5 En formas de realización particulares, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia que codifica glucocerebrosidasa humana bajo el control de un promotor, lo que permite la expresión de dicha glucocerebrosidasa humana en al menos tanto en neuronas dopaminérgicas como en células microgliales, y dicha partícula viral es seleccionada entre las partículas virales con diana en al menos las neuronas dopaminérgicas y las células microgliales de la sustancia negra pars compacta, típicamente partículas AAV que incluyen proteínas de cápside
10 seleccionadas del grupo que consiste en serotipos AAV2, AAV5, AAV9, AAV-MNM004, AAV-MNM008 y AAV-TT.

En otro aspecto, la descripción se relaciona con el uso de una partícula viral tal como se describe anteriormente en terapia, preferiblemente en el tratamiento de sinucleinopatía mediante terapia génica en un sujeto que lo necesita.

15 En formas de realización específicas, dicha sinucleinopatía es una sinucleinopatía humana esporádica. En formas de realización particulares, dicha sinucleinopatía no está asociada a al menos una mutación en un gen seleccionado del grupo que consiste en LRRK2, SNCA, VPS35, GCH1, ATXN2, DNAJC13, TMEM230, GIGYF2, HTRA2, RIC3, EIF4G1, UCHL1, CHCHD2, GBA1, PRKN, PINK1, DJ1, ATP13A2, PLA2G6, FBXO7, DNAJC6, SYNJ1,
20 SPG11, VPS13C, PODXL, PTRHD1, RAB39B, DNAJC13, TMEM230, GIGYF2, HTRA2, RIC3, EIF4G1, UCHL1 y CHCHD2.

Preferiblemente, dicha sinucleinopatía es una enfermedad de Parkinson, típicamente enfermedad de Parkinson esporádica.

En formas de realización específicas, cuando se utilizan partículas virales AAVretro de acuerdo
25 con el presente método de tratamiento, dicho sujeto a tratar es seleccionado entre pacientes con etapas avanzadas de sinucleinopatía, típicamente, al menos etapa 3 H-Y de la enfermedad de Parkinson.

Dicho vector viral puede ser administrado preferiblemente a dicho sujeto por vía intraparenquimatosas, más preferiblemente al área del cerebro de la sustancia negra pars
30 compacta y/o a los núcleos caudados-putamen.

En otro aspecto, la descripción también se relaciona con el uso de una partícula viral tal como se describe anteriormente en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher neuronopática.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** es el alineamiento de secuencias de aminoácidos de la secuencia de proteína de cápside AAV-TT con AAV-2.

La **Figura 2** es el alineamiento de secuencias de aminoácidos de la secuencia de proteína de cápside AAV-TT con AAV-9.

La **Figura 3** es un dibujo que resume el enfoque experimental llevado a cabo en ratones.

La **Figura 4** es una imagen de *western blots* que muestra los niveles de proteína para GCasa (panel izquierdo) y alfa-sinucleína (panel derecho) en la SNc izquierda y derecha que recibieron partículas rAAV9-nulas (sin transgénicos) y rAAV9-GBA1 respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de GCasa dio lugar a una reducción de la alfa-sinucleína.

La **Figura 5** es un histograma que muestra una estimación estereológica no sesgadas de la densidad neuronal de las neuronas TH+ en SNc. Los resultados obtenidos mostraron que la eliminación (*clearance*) de alfa-sinucleína con el aumento de la actividad enzimática de la GCasa mediado por AAV-GBA1 indujo un marcado efecto neuroprotector en las neuronas dopaminérgicas.

La **Figura 6** es un dibujo que resume el enfoque experimental realizado en primates no humanos (NHP, por sus siglas en inglés) con rAAV2/9-GBA1 (también referido en el primer ejemplo como rAAV9) (inyectado en la SNc izquierda).

La **Figura 7** muestra secciones coronales del cerebro tomadas a nivel de putamen y núcleos caudados postcomisurales como imágenes representativas de los escaneos de microPET obtenidos con respecto a los NHP que son inyectados con rAAV9-GBA1 en la SNc izquierda.

La **Figura 8** es un histograma que muestra los resultados obtenidos después de la estimación estereológica no sesgada de la densidad de neuronas TH+ en la SNc de 4 NHP inyectados con rAAV9-GBA1 en la SNc izquierda. La cuantificación se ha realizado en un animal. 38,1% de las neuronas de SNc murieron después de 3 meses de administración de rAAV9-SynA53T, en

contraste con 14,9% de muerte neuronal observada en la SNc izquierda (es decir, la tratada con rAAV9-GBA1).

Figura 9: Dibujo que resume el plan experimental realizado.

Figura 10: Fotomicrografías tomadas de secciones coronales del cerebro de ratones a través del estrato y la corteza cerebral que muestran la detección inmunohistoquímica de alfa-sinucleína fosforilada. Se observa una clara reducción de la carga de alfa-sinucleína en el nivel de la corteza cerebral en la corteza cerebral situada ipsilateralmente al cuerpo estriado inyectada con AAV2-retro-GBA1 (promotor GusB). Se observó una clara diferencia en comparación con la corteza cerebral derecha, es decir, el lado del cerebro tratado primero con AAV2-retro-SynA53T y después con AAV2-retro-nulo (promotor GusB). Los datos obtenidos apoyan el uso de vectores virales de propagación retrógrada que codifican el gen GBA1 para el tratamiento de sinucleinopatías diseminadas

La **Figura 11** es un dibujo que resume el enfoque experimental llevado a cabo en primates no humanos (NHP) con rAAV-TT-GBA1 (inyectado en putamen postcomisural izquierdo).

La **Figura 12** muestra secciones coronales del cerebro tomadas a nivel de putamen postcomisural y núcleos caudados como imágenes representativas de los escaneos de microPET obtenidos en relación con los NHP que fueron inyectados con rAAV-TT-GBA1 en el putamen postcomisural (panel superior). En promedio, se observó un aumento del 24,44% en el potencial de unión de ^{11}C -DTBZ en el putamen postcomisural izquierdo (por ejemplo, el que fue inyectado con rAAV-TT-GBA1) (panel inferior).

La **Figura 13** es un histograma que muestra los resultados obtenidos después del recuento automatizado del número de neuronas TH⁺ en SNc de 4 NHP inyectados con rAAV-TT-GBA1 en el putamen postcomisural izquierdo. Se ha realizado la cuantificación en 4 NHP, mostrando que el número total de neuronas TH⁺ en la SNc izquierda era 22,3% mayor que el número de neuronas TH⁺ observadas en la SNc derecha (por ejemplo, la que no fue tratada con la administración intraputamina de rAAV-TT-GBA1). * representa una significación estadística $p < 0,05$

La **Figura 14** es un histograma que muestra los resultados obtenidos después de la medición automática de la densidad óptica (OD, por sus siglas en inglés) para la tinción de TH en el putamen postcomisural izquierdo y derecho de 4 NHP inyectados con rAAV-TT-GBA1 en el

putamen postcomisural izquierdo. La cuantificación mostró que la OD media era 27,42% más baja en el putamen postcomisural derecho que en el izquierdo (este último es el que fue tratado con la administración intraputamina de rAAV-TT-GBA1). *** representa una significación estadística $p < 0,001$.

5 La **Figura 15** es un histograma que muestra los resultados obtenidos tras el recuento automatizado del número de neuronas que expresan alfa-sinucleína en la SNc de 4 NHP inyectados con rAAV-TT-GBA1 en el putamen postcomisural izquierdo. Se ha realizado la cuantificación en 4 NHP, mostrando que el número total de neuronas que expresan alfa-sinucleína en la SNc izquierda era 38,3% inferior al número de neuronas positivas para alfa-sinucleína observado en la SNc derecha (por ejemplo, la que no fue tratada con la administración intraputamina de rAAV-TT-GBA1). * representa la significación estadística $p < 0,05$, ** representa la significación estadística $p < 0,001$, y *** representa la significación estadística $p < 0,001$. ns: no hay significación estadística.

15 La **Figura 16** es un histograma que muestra las diferencias en la comparación entre las neuronas TH+ (barras negras) y a-Syn+ (barras blancas) en SNc izquierda vs. derecha en los animales ensayados. Los porcentajes indican el porcentaje de neuronas a-Syn+ en las neuronas TH+. El porcentaje de neuronas que expresan alfa-sinucleína es consistentemente más bajo en la SNc izquierda (por ejemplo, la localizada ipsilateralmente al putamen postcomisural que fue inyectado con AAV-TT-GBA1) que en la SNc derecha (lado no tratado). Esto demuestra que
20 no solo la supervivencia neuronal en la SNc izquierda es mayor, sino también que menos de aquellas neuronas TH+ supervivientes son a-Syn+.

Figura 17: Placas Rx sagitales que muestran los sitios de inyección de todos los AAV durante la cirugía estereotáxica asistida por ventriculografía.

25 **Figura 18:** Fotomicrografías representativas que muestran los sitios de inyección de todos los AAV.

Figura 19: Dibujos que ilustran los sitios de inyección para todos los animales, junto con la ubicación precisa de las neuronas GFP+ (A: M295 y 296, B: 297 y 298).

30 **Figura 20:** Biodistribución e intensidades estimadas de las neuronas GFP+ en animales M295 (A) y M296 (B) (inyectados con AAV-TT-GFP). Los puntos de tamaño pequeño (etiquetados como "bajos") representan entre 1 y 200 células GFP+; los puntos de tamaño mediano

(etiquetados como "moderados") representan entre 201 y 400 células GFP+, y los puntos de tamaño grande (etiquetados como "altos" representan más de 401 células GFP+.

Figura 21: Biodistribución e intensidades estimadas de las neuronas GFP+ en animales M297 (A) y M298 (B) (inyectados con AAV-9-GFP). Los puntos de tamaño pequeño (etiquetados como "bajos") representan entre 1 y 200 células GFP+; los puntos de tamaño mediano (etiquetados como "moderados") representan entre 201 y 400 células GFP+, y los puntos de tamaño grande (etiquetados como "altos" representan más de 401 células GFP+.

Figura 22: Cuantificación. Histogramas que muestran el número total de neuronas GFP+ para todos los animales.

Figura 23: Cuantificación. Histogramas que muestran el número de neuronas GFP+ para todos los animales en varias regiones de interés. Abreviaturas: Giro cingulado anterior (AcGg), Giro frontal superior (SFG), Giro precentral (PrG), Giro postcentral (PoG), Giro insular (Ing), Complejo centromedio-parafascicular (CM-Pf), Sustancia negra pars compacta (SNc).

Figura 24: Cuantificación. Gráficos que muestran la distribución rostrocaudal de las neuronas GFP+ para todos los animales en varias regiones de interés del hemisferio izquierdo. Abreviaturas: Giro cingulado anterior (AcGg), Giro frontal superior (SFG), Giro precentral (PrG), Giro postcentral (PoG), Giro insular (Ing), Complejo centromedio-parafascicular (CM-Pf), Sustancia negra pars compacta (SNc).

Figura 25: Cuantificación. Gráficos que muestran la distribución rostrocaudal de las neuronas GFP+ para todos los animales en varias regiones de interés del hemisferio derecho. Abreviaturas: Giro cingulado anterior (AcGg), Giro frontal superior (SFG), Giro precentral (PrG), Giro postcentral (PoG), Sustancia negra pars compacta (SNc)

Figura 26: Plan de trabajo de los experimentos realizados.

Figura 27: Escaneos MicroPET con 11C-DTBZ realizados en la línea de base, y 4, 8 y 12 semanas después de la inyección de AAV9-SynA53T. Los valores del potencial de unión del radiotrazador se calcularon a través de regiones de interés que comprenden toda la extensión rostrocaudal del putamen postcomisural (que suele abarcar entre 5 y 9 secciones diferentes).

Figura 28: Histogramas que muestran los valores medios de OD para ambos grupos de animales, así como para cada animal cuando se consideran individualmente. También se incluyeron fotomicrografías representativas tomadas a nivel del putamen postcomisural.

Figura 29: Los gráficos ilustran los cambios observados en la OD a través de la extensión rostrocaudal del putamen postcomisural (desde 0 más rostral a 12 más caudal). Las diferencias de OD al comparar el putamen izquierdo con el derecho (por ejemplo, el lado tratado con vectores que codifican GBA1 frente al lado no tratado, respectivamente) se dibujaron mediante áreas sombreadas (correspondientes a los animales inyectados con AAV-tt-GBA1 o con AAV9-GBA1).

Figura 30: Histogramas que muestran los números de células TH+ para ambos grupos de animales, así como para cada animal cuando se consideran individualmente. Los valores medios de la sustancia negra izquierda versus derecha son estadísticamente significativos cuando se considera cada grupo de animales como un todo. También se incluyeron fotomicrografías representativas tomadas a nivel de la sustancia negra izquierda y derecha para ilustrar de forma más visual los análisis realizados con Aiforia®.

Figura 31: Los gráficos ilustran los cambios observados en los números de células TH+ a través de la extensión rostrocaudal de la sustancia negra (de 0 más rostral a 14 más caudal). Las diferencias observadas al comparar la sustancia negra izquierda con la derecha (por ejemplo, el lado ipsilateral de las inyecciones con vectores que codifican GBA1 versus el lado no inyectado, respectivamente) se dibujaron mediante áreas sombreadas (correspondientes a los animales inyectados con AAV-TT-GBA1 o con AAV9-GBA1).

Figura 32: Histogramas que muestran los números de células α -syn+ para ambos grupos de animales, así como para cada animal cuando se consideran individualmente. Los valores medios de la sustancia negra izquierda versus derecha son estadísticamente significativos cuando se considera cada grupo de animales como un todo. A nivel individual, los animales M280, M282 y M287 (todos tratados con AAV-TT-GBA1) también alcanzaron significación estadística, mientras que el animal M283 no lo hizo. En cuanto a los animales inyectados con AAV9-GBA1, la significación estadística solo se observó en el animal M286. También se incluyeron fotomicrografías representativas tomadas a nivel de la sustancia negra izquierda y derecha para ilustrar de manera más visual los análisis realizados con Aiforia®.

Figura 33: Los gráficos ilustran los cambios observados en los números de células α -syn⁺ a través de la extensión rostrocaudal de la sustancia negra (de 0 más rostral a 12 más caudal). Las diferencias observadas al comparar la sustancia negra izquierda versus la derecha (por ejemplo, el lado ipsilateral de las inyecciones con vectores que codifican GBA1 versus el lado no inyectado, respectivamente) se dibujaron mediante áreas sombreadas (correspondientes a los animales inyectados con AAV-TT-GBA1 o con AAV9-GBA1).

Figura 34: El histograma ilustra las proporciones observadas entre las células TH⁺ y las células α -syn⁺ (respectivamente TH y SYN).

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los inventores han identificado nuevas estrategias terapéuticas para tratar sinucleinopatías mediante terapia génica, y más específicamente enfermedad de Parkinson, en particular la enfermedad de Parkinson esporádica.

Por lo tanto, la descripción se refiere a una partícula viral y su uso en el tratamiento de sinucleinopatía, como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Gaucher neuronopática mediante terapia génica en un sujeto que lo necesita, dicha partícula viral comprende un vector viral o un constructo de ácido nucleico que incluye un transgén que codifica una glucocerebrosidasa.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "partícula viral" se refiere a una partícula viral infecciosa y típicamente defectuosa para la replicación que comprende (i) un vector viral empaquetado dentro de (ii) una cápside y, opcionalmente, (iii) una envoltura lipídica que rodea la cápside.

La expresión "vector viral" se refiere típicamente a la parte de ácido nucleico de la partícula viral tal como se describe en la presente, que está empaquetada en una cápside.

Así, dicho vector viral suele comprender al menos (i) un constructo de ácido nucleico que incluye un transgén y elementos de ácido nucleico adecuados para su expresión en un hospedador tratado con terapia génica, y (ii) la totalidad o una porción de un genoma viral, por ejemplo, repeticiones terminales invertidas de un genoma viral.

Tal como se usa en la presente, la expresión "constructo de ácido nucleico" se refiere a un ácido nucleico que no existe naturalmente resultante del uso de la tecnología de ADN recombinante. Especialmente, un constructo de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que ha sido modificada para contener segmentos de secuencias de ácido nucleico, que se combinan o yuxtaponen de una manera que de otro modo no existiría en la naturaleza.

Tal como se utiliza en la presente, el término "transgén" se refiere a la molécula de ácido nucleico (o ácido nucleico, en definitiva), ADN o ADNc que codifica un producto génico para su uso como principio activo en terapia génica. El producto génico puede ser un ARN, un péptido o una proteína.

Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" o "secuencia de nucleótidos" pueden utilizarse indistintamente para referirse a cualquier molécula compuesta o que comprende nucleótidos monoméricos. Un ácido nucleico puede ser un oligonucleótido o un polinucleótido. Una secuencia de nucleótidos puede ser ADN o ARN. Una secuencia de nucleótidos puede ser modificada químicamente o artificialmente. Las secuencias de nucleótidos incluyen péptidos ácidos nucleicos (PNA, por sus siglas en inglés), morfolinos y ácidos nucleicos bloqueados (LNA, por sus siglas en inglés), así como glicol ácidos nucleicos (GNA, por sus siglas en inglés) y treosa ácido nucleico (TNA, por sus siglas en inglés). Cada una de estas secuencias se distingue del ADN o ARN existente naturalmente por los cambios en la columna vertebral de la molécula. También se pueden utilizar nucleótidos de fosforotioato. Otros análogos de los desoxinucleótidos son los metilfosfonatos, fosforamidatos, fosforoditioatos, fosforamidatos N3'P5' y oligorribonucleótidos fosforotioatos y sus análogos de 2'-O-alilo y los metilfosfonatos de 2'-O-metil-ribonucleótidos que pueden utilizarse en un nucleótido de la invención.

Tal como se usa en la presente, la expresión "repetición terminal invertida (ITR, por sus siglas en inglés)" se refiere a una secuencia de nucleótidos situada en el extremo 5' (5'ITR) y una secuencia de nucleótidos situada en el extremo 3' (3'ITR) de un virus, que contiene secuencias palindrómicas y que pueden doblarse para formar estructuras de horquilla en forma de T que funcionan como cebadores durante el inicio de la replicación de ADN. También son necesarios para la integración del genoma viral en el genoma del hospedador, para el rescate del genoma del hospedador y para la encapsulación del ácido nucleico viral en viriones maduros. Las ITR se requieren en *cis* para la replicación del genoma del vector y su encapsulación en las partículas virales.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "que comprende" no excluye otros elementos. A los efectos de la presente descripción, la expresión "que consiste en" es considerada como la forma de realización preferida de la expresión "que comprende".

5 Tal como se utiliza en la presente, los términos "notablemente", "típicamente" o "particularmente" se utilizan indistintamente para referirse a una alternativa entre varias formas de realización y el término "preferiblemente" se refiere a una forma de realización preferida.

Tal como se utiliza en la presente, SNc es el acrónimo de sustancia negra pars compacta (SNc).

Constructo de ácidos nucleicos de la presente descripción

10 El constructo de ácido nucleico de acuerdo con la presente descripción incluye un transgén y al menos elementos de ácido nucleico adecuados para su expresión en dicho hospedador tratado mediante terapia génica con el vector viral de la descripción.

Por ejemplo, dicho constructo de ácido nucleico comprende un transgén que consiste en la secuencia de codificación de la glucocerebrosidasa y una o más secuencias de control necesarias para la expresión de dicha secuencia de codificación en los tipos de células o tejidos pertinentes.

15 Por lo general, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia codificante y secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificantes de 5') y siguen (secuencias no codificantes de 3') a la secuencia codificante que se requiere para la expresión del producto génico seleccionado. Así, en formas de realización específicas, dicho constructo de ácido nucleico comprende al menos (i) un transgén que codifica una glucocerebrosidasa bajo el control de (ii) un promotor y (iii) una región 3' no traducida que suele contener un sitio de poliadenilación y/o un terminador de transcripción. El constructo de ácido nucleico también puede comprender elementos reguladores adicionales como, por ejemplo, secuencias potenciadoras, intrones, secuencia de microARN dirigida, una secuencia *polylinker* que facilita

20 la inserción de un fragmento de ADN dentro de un vector y/o secuencias señal de empalme.

25

Los constructos específicos de ácido nucleico comprenden un transgén que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 o una porción de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 como se describe a continuación y los vectores o partículas que

comprenden tales constructos específicos de ácido nucleico son también parte de la presente descripción.

El transgén que codifica glucocerebrosidasa

En particular, el constructo de ácido nucleico de acuerdo con la presente descripción comprende un transgén que codifica glucocerebrosidasa, preferiblemente que codifica glucocerebrosidasa humana que comprende SEQ ID NO: 5, 6, 8, 17 o 18, preferiblemente que codifica glucocerebrosidasa humana que comprende SEQ ID NO: 5, 6 u 8 (también conocida como isoforma 1).

Tal como se utiliza en la presente, el término "glucocerebrosidasa" se refiere a β -Glucocerebrosidasa (también llamada β -glucosidasa ácida, D-glucosil-N-acetilsfingosina glucohidrolasa o GCasa), una enzima con actividad de glucosilceramidasa (EC 3.2.1.45) que se necesita para escindir, por hidrólisis, la unión beta-glucosídica del glucocerebrósido químico, un intermediario en el metabolismo de los glicolípidos que abunda en las membranas celulares (en particular en las células de la piel). El término "glucocerebrosidasa" se refiere a la enzima y a cualquier modificación por cotraducción o post-traducción adicionales.

La glucocerebrosidasa humana está codificada naturalmente por el gen GBA1 en el ser humano que genera cinco ARNm alternativamente empalmados los cuales codifican tres isoformas distintas de glucocerebrosidasa (isoforma 1 (SEQ ID NO: 5), isoforma 2 (SEQ ID NO: 17) e isoforma 3 (SEQ ID NO: 18)). Tal como se utiliza en la presente, el término "glucocerebrosidasa" se refiere a las tres isoformas de glucocerebrosidasa. La secuencia de nucleótidos correspondiente a la porción CDS de secuencia codificante de la isoforma 1 del ARNm de GBA1 humano (GeneBank ref. M19285.1:123-1733) está representada por SEQ ID NO: 7.

En formas de realización específicas, dicho constructo de ácido nucleico comprende toda o una porción (al menos 1000, 1100, 1500, 2000, 2500 o al menos 1500 nucleótidos) de una secuencia de ácido nucleico codificante que tiene al menos 70%, 80%, 90%; 95%, 99% o 100% de identidad con la secuencia codificante de una glucocerebrosidasa existente naturalmente o recombinante. Las glucocerebrosidasas naturales incluyen glucocerebrosidasas humanas, de primates, murinas o de otros mamíferos conocidos, típicamente glucocerebrosidasas humanas de SEQ ID NO: 5, 17 o 18.

Ejemplos de glucocerebrosidasa recombinante incluyen imiglucerasa (Cerezyme), velaglucerasa (Vpriv) y taliglucerasa (Elelyso).

En una forma de realización preferida, dicho constructo de ácido nucleico comprende un transgén que codifica glucocerebrosidasa humana, donde dicha glucocerebrosidasa humana comprende SEQ ID NO: 5, 6, 8, 17 o 18, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos tal como se representa con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19, o una variante del transgén que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 75%, al menos 80% o al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo formado por: SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19. Preferiblemente, dicho transgén incluye una porción de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19, por ejemplo, la secuencia optimizada SEQ ID NO: 1, región 58 a 1551 de SEQ ID NO: 7 o 19, región 58 a 1611 de SEQ ID NO: 7 o 19, región 118 a 1611 de SEQ ID NO: 7 o 19. En una forma de realización, dicha variante de transgén que codifica una porción de SEQ ID NO: 5, 6, 8, 17 o 18 o que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 75%, al menos 80% o al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 que tiene sustancialmente la misma actividad de glucocerebrosidasa que la glucocerebrosidasa humana. En particular, una variante del constructo de ácido nucleico codifica una glucocerebrosidasa truncada en donde se han eliminado uno o más residuos aminoácidos.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "identidad de secuencia" o "identidad" se refiere al número de coincidencias (residuos idénticos de ácido nucleico o aminoácidos) en posiciones de un alineamiento de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos. La identidad de secuencia se determina comparando las secuencias cuando están alineadas, a fin de maximizar la superposición e identidad, al tiempo que se reducen al mínimo las brechas (*gaps*) de la secuencia. En particular, la identidad de secuencia puede determinarse utilizando cualquiera de una serie de algoritmos matemáticos de alineamiento global o local, de acuerdo con la longitud de las dos secuencias. Las secuencias de longitudes similares se alinean preferiblemente utilizando un algoritmo de alineamiento global (por ejemplo, el algoritmo de Needleman y Wunsch; Needleman y Wunsch, 1970, J Mol Biol.;48(3):443-53) que alinea las secuencias de forma óptima en toda su longitud, mientras que las secuencias de longitudes sustancialmente diferentes se alinean preferiblemente utilizando un algoritmo de alineamiento local (por

ejemplo, el algoritmo de Smith y Waterman (Smith y Waterman, 1981, J Theor Biol. ;91(2):379-80) o el algoritmo de Altschul (Altschul SF et al., 1997, Nucleic Acids Res.;25(17):3389-402.; Altschul SF et al., 2005, Bioinformatics;21(8):1451-6). El alineamiento a los efectos de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando programas informáticos de acceso público disponibles en sitios web como <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> o <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/>. Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluidos los algoritmos necesarios para lograr el máximo alineamiento en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Para los propósitos de la presente, los valores % de identidad de secuencia de ácido nucleico o aminoácidos se refieren a los valores generados usando el programa de alineamiento de secuencias por pares EMBOSS Needle que crea un alineamiento global óptimo de dos secuencias usando el algoritmo Needleman-Wunsch, en donde todos los parámetros de búsqueda se establecen en valores por defecto, es decir, Matriz de puntuación = BLOSUM62, Brecha abierta = 10, Extensión de la brecha = 0,5, Penalización de la brecha final = falsa, Brecha final abierta = 10 y Extensión de la brecha final = 0,5

El Promotor para uso con constructos de ácido nucleico de la descripción

En una forma de realización, el constructo de ácido nucleico comprende un promotor. Dicho promotor inicia la expresión del transgén al ser introducido en una célula hospedadora.

Tal como se utiliza en la presente, el término "promotor" se refiere a un elemento regulador que dirige la transcripción de un ácido nucleico al que está ligado operativamente. Un promotor puede regular tanto la velocidad como la eficiencia de la transcripción de un ácido nucleico ligado operativamente. Un promotor también puede estar ligado operativamente a otros elementos reguladores que potencian ("potenciadores") o reprimen ("represores") la transcripción de un ácido nucleico dependiente del promotor. Estos elementos reguladores incluyen, sin limitación, los sitios de unión de los factores de transcripción, los sitios de unión de las proteínas represoras y activadoras, y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida por el experto en el arte que actúa directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción a partir del promotor, incluidos, por ejemplo, atenuadores, potenciadores y silenciadores. El promotor se encuentra cerca del sitio de comienzo de la transcripción del gen o la secuencia de codificación a la que está ligado operativamente, en la misma hebra y aguas arriba de la secuencia de ADN (hacia la región 5' de la hebra sentido). Un promotor puede tener

100-1000 pares de bases de longitud. Las posiciones en un promotor se designan en relación con el sitio de comienzo de la transcripción de un gen determinado (es decir, las posiciones aguas arriba son números negativos que cuentan hacia atrás desde -1, por ejemplo -100 es una posición 100 pares de bases aguas arriba).

- 5 Tal como se utiliza en la presente, la expresión "ligado operativamente" se refiere a una ligazón de elementos polinucleótidos (o polipéptidos) en una relación funcional. Un ácido nucleico está "ligado operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o secuencia reguladora de la transcripción está ligado operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia de
- 10 codificación. Ligado operativamente significa que las secuencias de ADN que se ligan son típicamente contiguas; cuando es necesario unir dos regiones codificadoras de proteínas, son contiguas y en marco de lectura.

En una forma de realización particular, el constructo de ácido nucleico de la descripción comprende además un promotor ligado operativamente al transgén que codifica

15 glucocerebrosidasa y en donde dicho promotor dirige la expresión de dicho transgén al menos en neuronas dopaminérgicas y en células microgliales de la sustancia negra pars compacta (SNc), y preferiblemente también en células neuronales de otras áreas del cerebro, incluyendo al menos la sustancia negra pars compacta, la corteza cerebral, la amígdala y los núcleos caudados intralaminares del tálamo.

- 20 Típicamente, tal promotor puede ser un promotor específico del tipo de tejido o célula, o un promotor específico de un órgano, o un promotor específico de múltiples órganos o un promotor sistémico o ubicuo.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "promotor ubicuo" se refiere más específicamente a un promotor que es activo en una variedad de células o tejidos distintos del

25 cerebro, por ejemplo, tanto en las neuronas como en células gliales, más específicamente, al menos en neuronas dopaminérgicas y células microgliales de la sustancia negra pars compacta, y preferiblemente también en células neuronales de otras áreas del cerebro, incluyendo al menos la sustancia negra pars compacta, la corteza cerebral, la amígdala y los núcleos caudados intralaminares del tálamo.

- 30 Ejemplos de promotores adecuados para la expresión del transgén en al menos células neuronales y microgliales de la sustancia negra pars compacta incluyen, sin limitación, el

promotor CMV (Kaplitt 1994, Nat. Genet. 8:148-154), el promotor SV40 (Hamer 1979, Cell 17:725-735), el promotor de beta actina de pollo (CBA) (Miyazaki 1989, Gene 79:269-277), el promotor CAG (Niwa 1991, Gene 108:193-199), el promotor de b-glucuronidasa (GusB) (Shipley 1991, Gene 10:1009-1018), el promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1 α) (Nakai 1998, Blood 91:4600-4607), el promotor del gen de sinapsina 1 humana (hSyn) (Kugler S. et al, Gene Ther. 2003. 10(4):337-47) o el promotor de fosfoglicerato quinasa 1 (PGK1) (Hannan 1993, Gene 130:233-239).

En una forma de realización particular, dicho promotor ubicuo puede estar seleccionado del grupo que consiste en: promotor de ubiquitina C (UbC) humana, preferiblemente de SEQ ID NO: 22 o 23, promotor de fosfoglicerato quinasa 1 (PGK) humana, preferiblemente de SEQ ID NO: 24 y promotor de CBA/CBh humana de SEQ ID NO: 25 o 26.

En una forma de realización, el promotor es el promotor del gen GusB, que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20. En otra forma de realización, el promotor es el promotor CAG, que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21. En otra forma de realización, el promotor es el promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27. En otra forma de realización, el promotor es el promotor hSyn 1 que comprende o consiste en SEQ ID: 13.

Todas estas secuencias promotoras tienen la propiedad de permitir la expresión de dicho transgén en al menos células neuronales y microgliales de la sustancia negra pars compacta.

En una forma de realización preferida, dicho constructo de ácido nucleico incluye el promotor GusB que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20 ligado operativamente a un transgén que codifica una glucocerebrosidasa, típicamente una secuencia de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19. En otra forma de realización, dicho constructo de ácido nucleico incluye el promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27 ligado operativamente a un transgén que codifica una glucocerebrosidasa, típicamente una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19. En otra forma de realización, dicho constructo de ácido nucleico incluye el promotor CAG que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21 ligado operativamente a un transgén que codifica una glucocerebrosidasa, típicamente una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19. En otra forma de realización, dicho constructo de ácido nucleico incluye el promotor hSyn que comprende o consiste en SEQ ID NO: 13 ligado

operativamente a un transgén que codifica una glucocerebrosidasa, típicamente una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19.

En formas de realización específicas, el promotor para el uso en la presente descripción puede ser un promotor químico inducible. Cuando se utiliza en la presente, un promotor químico inducible es un promotor que está regulado por la administración *in vivo* de un inductor químico a dicho sujeto en necesidad del mismo. Ejemplos de promotores inducibles químicos adecuados incluyen, sin limitación, el promotor inducible de tetraciclina/minociclina (Chertano 2003, Neurosci Lett. 352:155-158) o los sistemas inducibles de rapamicina (Sanftner 2006, Mol Ther. 13:167-174).

10 *La Secuencia de poliadenilación para uso con los constructos de ácido nucleico de la descripción*

Cada uno de estos constructos de ácido nucleico puede incluir también una secuencia señal de poliadenilación, junto con o sin otros elementos nucleótidos opcionales. Tal como se utiliza en la presente, la expresión "señal de poliadenilación" o "señal poli(A)" se refiere a una secuencia de reconocimiento específica dentro de la región no traducida de 3' (3' UTR, por sus siglas en inglés) del gen, que se transcribe en la molécula precursora de ARNm y guía la terminación de la transcripción del gen. La señal poli(A) actúa como una señal para la escisión endonucleolítica del ARNm precursor recién formado en su extremo 3', y para la adición a este extremo 3' de un tramo de ARN que consiste solo en bases de adenina (proceso de poliadenilación; cola de poli(A)). La cola de poli(A) es importante para la exportación nuclear, traducción y estabilidad del ARNm. En el contexto de la invención, la señal de poliadenilación es una secuencia de reconocimiento que puede dirigir la poliadenilación de los genes de los mamíferos y/o los genes virales, en las células de mamíferos.

Las señales de poli(A) consisten típicamente en a) una secuencia consenso AAUAAA, que ha demostrado ser necesaria tanto para la escisión del extremo 3' y la poliadenilación del ARN premensajero (pre-ARNm) como para promover la terminación transcripcional aguas abajo, y b) elementos adicionales aguas arriba y aguas debajo de AAUAAA que controlan la eficiencia de la utilización de AAUAAA como señal de poli(A). Existe una considerable variabilidad en estos motivos en los genes de mamíferos.

30 En una forma de realización, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas formas de realización descritas anteriormente o a continuación, la secuencia señal

de poliadenilación del constructo de ácido nucleico de la invención es una secuencia señal de poliadenilación de un gen de mamífero o un gen viral. Señales de poliadenilación adecuadas incluyen, entre otras, una señal de poliadenilación de SV40 temprana, una señal de poliadenilación de SV40 tardía, una señal de poliadenilación de HSV timidina quinasa, una
5 señal de poliadenilación del gen protamina, una señal de poliadenilación del adenovirus 5 E1b, una señal de poliadenilación de crecimiento hormonal, una señal de poliadenilación de PBGD, una señal de poliadenilación diseñada *in silico* (sintética) y lo similar.

En una forma de realización particular, la secuencia señal de poliadenilación del constructo de ácido nucleico es una secuencia señal de poliadenilación basada en el gen de la hormona de
10 crecimiento humana o bovina. En una forma de realización, la secuencia señal de poliadenilación se basa en el gen de la hormona de crecimiento bovina y comprende o consiste en SEQ ID NO: 3. En una forma de realización preferida, la secuencia señal de poliadenilación se basa en el gen de la hormona de crecimiento humana y comprende o consiste en SEQ ID NO: 28.

En formas de realización específicas, el constructo de ácido nucleico, preferiblemente para ser
15 usado de acuerdo con la presente descripción, incluye el promotor GusB que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20 ligado operativamente a la secuencia codificante del gen GBA1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 y la secuencia señal de poliadenilación que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 3, preferiblemente
20 SEQ ID NO: 28.

En formas de realización específicas, el constructo de ácido nucleico, preferiblemente para ser
usado de acuerdo con la presente descripción, incluye el promotor CAG que comprende o
consiste en SEQ ID NO: 9 o 21 ligado operativamente a la secuencia codificante del gen GBA1
seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 y la secuencia señal de
25 poliadenilación que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 3, preferiblemente
SEQ ID NO: 28.

En formas de realización específicas, el constructo de ácido nucleico, preferiblemente para ser
usado de acuerdo con la presente descripción, incluye el promotor hSyn 1 que comprende o
consiste en SEQ ID NO: 13 ligado operativamente a la secuencia codificante del gen GBA1
30 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 y la secuencia señal de

poliadenilación que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 3, preferiblemente SEQ ID NO: 28.

En otras formas de realización específicas, el constructo de ácido nucleico, preferiblemente para ser usado de acuerdo con la presente descripción, incluye el promotor JeT que comprende o
5 consiste en SEQ ID NO: 27 ligado operativamente a la secuencia codificante del gen GBA1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 y la secuencia señal de poliadenilación que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 3, preferiblemente SEQ ID NO: 28.

En otra forma de realización preferida, el constructo de ácido nucleico comprende a) un
10 transgén que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una glucocerebrosidasa humana; donde preferiblemente dicha secuencia de nucleótidos comprende SEQ ID NO: 19 y donde la glucocerebrosidasa humana comprende SEQ ID NO: 5 u 8; b) un promotor ligado operativamente a dicho transgén, donde dicho promotor es preferiblemente i. promotor CAG que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21, o ii. promotor hSyn que comprende o consiste
15 en SEQ ID NO: 13, o iii. promotor GusB que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20, o iv. promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27, o c) una secuencia señal de poliadenilación, preferiblemente una secuencia señal de poliadenilación que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 3, preferiblemente SEQ ID NO: 28.

Vector viral

20 Los vectores virales de la presente descripción típicamente comprenden al menos (i) un constructo de ácido nucleico que incluye un transgén y elementos de ácido nucleico adecuados para su expresión en dicho hospedador tratado mediante terapia génica, y (ii) la totalidad o una porción de un genoma viral, por ejemplo, al menos repeticiones terminales invertidas de un genoma viral.

25 En una forma de realización, el vector viral de acuerdo con la presente descripción comprende un 5'ITR, y un 3'ITR de un virus.

En una forma de realización, el vector viral comprende un 5'ITR y un 3'ITR de un virus seleccionado independientemente del grupo que consiste en parvovirus (en particular los virus adeno-asociados), adenovirus, alfavirus, retrovirus (en particular los retrovirus y lentivirus
30 gama), herpesvirus y SV40; en una forma de realización preferida el virus es un virus adeno-asociado (AAV), un adenovirus (Ad), o un lentivirus.

En una forma de realización, el vector viral comprende una 5'ITR y una 3'ITR de un AAV.

AAV ha suscitado un interés considerable como posible vector para terapia génica en humanos. Entre las propiedades favorables del virus figuran su falta de asociación con cualquier enfermedad humana, su capacidad para infectar tanto a las células que se dividen como a las que no se dividen, y la amplia gama de líneas celulares derivadas de diferentes tejidos que pueden ser infectados. El genoma AAV está compuesto por una molécula lineal de ADN de una sola hebra que contiene 4681 bases (Berns y Bohezky, 1987, *Advances in Virus Research* (Academic Press, Inc.) 32:243-307). El genoma incluye repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, que funcionan en *cis* como orígenes de la replicación del ADN y como señales de empaquetamiento del virus. Las ITR tienen una longitud aproximada de 145 pb.

Las ITR de AAV en los vectores virales de la invención pueden tener una secuencia de nucleótidos de tipo salvaje o pueden estar alterada por la inserción, delección o sustitución de uno o más nucleótidos, típicamente, no más de 5, 4, 3, 2 o 1 inserción, delección o sustitución de nucleótidos en comparación con las ITR de AAV conocidas. El serotipo de las repeticiones terminales invertidas (ITR) del vector AAV puede seleccionarse de cualquier serotipo conocido de AAV humano o no humano.

En formas de realización específicas, el vector viral puede ser realizado utilizando ITR de cualquier serotipo AAV. Las ITR de AAV conocidas incluyen, sin limitación, AAV1, AAV2, AAV3 (incluidos los tipos 3A y 3B), AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino.

En una forma de realización, el constructo de ácido nucleico descrito anteriormente está comprendido en dicho vector viral que además comprende una 5'ITR y una 3'ITR de AAV de serotipo AAV2. En una forma de realización particular, el vector viral comprende una 5'ITR y una 3'ITR de AAV de serotipo AAV2, preferiblemente de SEQ ID NO: 15 y/o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16.

Por lo tanto, en una forma de realización más específica, el vector viral de la descripción, incluye un constructo de ácido nucleico que incluye un promotor GusB de SEQ ID NO: 2 o 20, ligado operativamente a la secuencia de codificación de glucocerebrosidasa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 y dicho vector viral incluye además ITR de AAV que flanquea dicho constructo de ácido nucleico, tal como 5'ITR y 3'ITR de AAV2,

preferiblemente de SEQ ID NO: 15 y/o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16.

En otra forma de realización específica, el vector viral de la descripción incluye un constructo de ácido nucleico que incluye un promotor seleccionado del grupo que consiste en un promotor CAG que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21 ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos de la glucocerebrosidasa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 y dicho vector viral además incluyen ITRs de AAV que flanquean dicho constructo de ácido nucleico, tal como ITR de 5'ITR y 3'ITR de AAV2, preferiblemente de SEQ ID NO: 15 y/o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16.

En otra forma de realización específica, el vector viral de la descripción incluye un constructo de ácido nucleico que incluye un promotor seleccionado del grupo que comprende o consiste en un promotor del gen hSyn 1 de SEQ ID NO: 13 ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos de la glucocerebrosidasa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 y además incluyen ITRs de AAV que flanquean dicho constructo de ácido nucleico, tal como 5'ITR y 3'ITR de AAV2, preferiblemente de SEQ ID NO: 15 y/o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16.

En otra forma de realización específica, el vector viral de la descripción incluye un constructo de ácido nucleico que incluye un promotor seleccionado del grupo que comprende o consiste en un promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27 ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos de la glucocerebrosidasa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 y además incluyen ITRs de AAV que flanquean dicho constructo de ácido nucleico, tal como 5'ITR y 3'ITR de AAV2, preferiblemente de SEQ ID NO: 15 y/o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16.

En una forma de realización particular, el vector viral de la descripción comprende o consiste en SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 4.

En una forma de realización preferida, el vector viral de la descripción incluye un constructo de ácido nucleico que incluye un promotor seleccionado del grupo que comprende o consiste en un i. promotor GusB que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20; o ii. promotor CAG

que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21; o iii. promotor del gen hSyn 1 que comprende o consiste en SEQ ID NO: 13; o iv. promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27, ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos de la glucocerebrosidasa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 y además incluyen ITRs de AAV que
5 flanquean dicho constructo de ácido nucleico, tal como 5'ITR y 3'ITR de AAV2, preferiblemente de SEQ ID NO: 15 y/o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16, en donde más preferiblemente 5'ITR comprende o consiste en SEQ ID NO: 15 y 3'ITR comprende o consiste en SEQ ID NO: 16; y en donde el vector viral de la descripción comprende o consiste en SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene
10 al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 4.

Por otra parte, el vector viral de la descripción puede ser realizado mediante el uso de 5'ITR y/o 3'ITR sintéticas; y también mediante el uso de una 5'ITR y una 3'ITR que provienen de virus de diferente serotipo. Todos los demás genes virales necesarios para la replicación del vector viral pueden proporcionarse en *trans* dentro de las células productoras de virus (células de
15 empaquetamiento) como se describe a continuación. Por lo tanto, su inclusión en el vector viral es opcional.

En una forma de realización, el vector viral comprende una 5'ITR y una 3'ITR de un virus.

Partícula viral

El vector viral, como se ha descrito anteriormente, puede estar empaquetado en una cápside
20 formada por las proteínas de cápside, constituyendo así una partícula viral como se describe en la siguiente sección.

En formas de realización preferidas, la cápside está formada por proteínas de cápside del virus adeno-asociado, en adelante denominada partícula de vector AAV.

Tal como se utiliza en la presente, una partícula de vector AAV comprende al menos 5'ITR y
25 3'ITR de un genoma de AAV y proteínas de cápside de un virus adeno-asociado. La expresión partícula de vector AAV abarca cualquier partícula de vector recombinante AAV (rAAV) o partícula de vectgor mutante AAV obtenida por ingeniería genética de un rAAV conocido.

Las proteínas de la cápside viral de un virus adeno-asociado incluyen proteínas de cápside VP1, VP2 y VP3. Las diferencias entre las secuencias de proteínas de cápside de los distintos
30 serotipos de AAV dan por resultado la utilización de distintos receptores de superficie celular

para la entrada en la célula. En combinación con vías de procesamiento intracelular alternativas, esto da lugar a distintos tropismos tisulares para cada serotipo de AAV.

En una forma de realización particular, una partícula viral AAV de acuerdo con la descripción puede prepararse encapsulando el vector viral de un vector/genoma de AAV derivado de un serotipo particular de AAV en una partícula viral formada por proteínas Cap naturales correspondientes a un AAV del mismo serotipo particular. No obstante, se han desarrollado varias técnicas para modificar y mejorar las propiedades estructurales y funcionales de las partículas virales AAV existentes de forma natural (Bünning H et al. J Gene Med 2008; 10: 717-733). Así, en otra forma de realización, las partículas virales AAV, de acuerdo con la descripción, incluyen el constructo de ácido nucleico que incluye el gen que codifica glucocerebrosidasa flanqueado por ITR(s) de un serotipo de AAV dado empaquetado, por ejemplo, en: a) una partícula viral constituida por proteínas de cápside derivadas del mismo o diferente serotipo de AAV [por ejemplo, ITR de AAV2 y proteínas de cápside de AAV9; ITR de AAV2 y proteínas de cápside de AAV-TT u otras proteínas de cápside de serotipos de AAVretro tal como AAV2-retro, AAVMN004 o AAVMN008; etc.]; b) una partícula viral en mosaico constituida por una mezcla de proteínas de cápside de diferentes serotipos o mutantes de AAV [por ejemplo, ITR de AAV2 con una cápside formada por proteínas de dos o múltiples serotipos de AAV]; c) una partícula viral quimérica constituida por proteínas de cápside que han sido truncadas por intercambio de dominios entre diferentes serotipos o variantes de AAV [por ejemplo, ITR de AAV2 con proteínas de cápside de AAV5 con dominios de AAV3]; o d) una partícula viral direccionada preparada por ingeniería para mostrar dominios de unión selectivos, lo que permite una interacción estricta con los receptores específicos de la célula diana.

La terapia génica basada en AAV con diana en el SNC ya ha sido revisada en Pignataro D, Sucunza D, Rico AJ et al, J Neural Transm 2018;125:575-589. Más concretamente, las partículas AAV pueden seleccionarse y/o manipularse para que tengan diana en al menos células neuronales y microgliales, y en particular en al menos neuronas dopaminérgicas y células microgliales de la sustancia negra pars compacta (SNc) del cerebro.

En formas de realización específicas, ejemplos de serotipo de AAV de las proteínas de cápside para uso de la partícula viral AAV de acuerdo con la presente descripción incluyen AAV2, AAV5, AAV9, AAV2-retro, AAV MNM004, AAV MNM008 y AAV-TT. En formas de realización más preferidas, dicho serotipo de AAV de proteínas de cápside se seleccionan del serotipo AAV9 y AAV-TT.

En una forma de realización particular, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas formas de realización descritas anteriormente o a continuación, la partícula viral es una partícula viral recombinante AAV que comprende un vector viral AAV como se ha descrito anteriormente, que incluye preferiblemente una secuencia de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19, y que comprende las proteínas de cápside de serotipo AAV9 o de serotipo AAV-TT, preferiblemente la proteína de cápside del serotipo AAV-TT que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14.

En otra forma de realización específica, la partícula viral comprende un constructo de ácido nucleico que incluye una secuencia codificante de glucocerebrosidasa humana bajo el control de un promotor, permitiendo dicho promotor la expresión de dicha glucocerebrosidasa humana en al menos tanto neuronas dopaminérgicas como células microgliales, y dicha partícula viral está seleccionada entre partículas virales con diana en al menos neuronas dopaminérgicas y células microgliales de la sustancia negra pars compacta, típicamente partículas AAV que incluyen proteínas de cápside seleccionadas del grupo que consiste en los serotipos AAV2, AAV5, AAV9, AAV2-retro, AAV MNM004, AAV MNM008, o AAV-TT, preferiblemente la proteína de cápside de serotipo AAV-TT que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14.

En una forma de realización más específica, dicha partícula viral recombinante AAV, de acuerdo con la presente descripción, incluye las proteínas de cápside de los serotipos AAV9, AAV2-retro, AAV MNM004, AAV MNM008 o AAV-TT y un vector viral AAV que incluye (i) un constructo de ácido nucleico que comprende un promotor seleccionado del grupo que consiste en: promotor GusB que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20, un promotor CAG que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21, un promotor Jet que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27 y un promotor hSyn que comprende o consiste en SEQ ID NO: 13, ligado operativamente a una secuencia de nucleótidos de glucocerebrosidasa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 y (ii) ITRs de AAV, tales como como 5'ITR y 3'ITR de AAV2 que flanquean dicho constructo de ácido nucleico, preferiblemente 5'ITR y 3'ITR de SEQ ID NO: 15 y/o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16.

En una forma de realización más específica, dicha partícula viral recombinante AAV, de acuerdo con la presente descripción, incluye proteínas de cápside del serotipo AAV-TT que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14 y un vector viral AAV que incluye (i) un constructo de ácido nucleico que comprende un promotor GusB que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20 ligado operativamente a una secuencia de nucleótidos de la glucocerebrosidasa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, 7, 11, 12 y 19 y (ii) ITRs de AAV, tales como 5'ITR y 3'ITR de AAV2, que flanquean dicho constructo de ácido nucleico, preferiblemente 5'ITR y 3'ITR de SEQ ID NO: 15 y/o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16.

En una forma de realización más específica, dicha partícula viral recombinante AAV, de acuerdo con la presente descripción, incluye las proteínas de cápside del serotipo AAV-TT que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14 y un vector viral AAV que incluye (i) un constructo de ácido nucleico que comprende un promotor CAG que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21 ligado operativamente a una secuencia de nucleótidos de la glucocerebrosidasa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, 7, 11, 12 y 19 y (ii) ITRs de AAV, tales como 5'ITR y 3'ITR de AAV2, que flanquean dicho constructo de ácido nucleico, preferiblemente 5'ITR y 3'ITR de SEQ ID NO: 15 y/o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16.

En una forma de realización más específica, dicha partícula viral recombinante AAV de acuerdo con la presente descripción incluye las proteínas de cápside del serotipo AAV-TT que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14 y un vector viral AAV que incluye (i) un constructo de ácido nucleico que comprende el promotor hSyn que comprende o consiste en SEQ ID NO: 13 ligado operativamente a una secuencia de nucleótidos de la glucocerebrosidasa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, 7, 11, 12 y 19 y (ii) ITRs de AAV, tales como 5'ITR y 3'ITR de AAV2, que flanquean dicho constructo de ácido nucleico, preferiblemente 5'ITR y

3'ITR de SEQ ID NO: 15 y/o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16.

En una forma de realización más específica, dicha partícula viral recombinante de AAV de acuerdo con la presente descripción incluye las proteínas de cápside del serotipo AAV-TT que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14 y un vector viral AAV que incluye (i) un constructo de ácido nucleico que comprende el promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27 ligado operativamente a una secuencia de nucleótidos de la glucocerebrosidasa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 y 19 y (ii) ITRs de AAV, tales como 5'ITR y 3'ITR de AAV2, que flanquean dicho constructo de ácido nucleico, preferiblemente 5'ITR y 3'ITR de SEQ ID NO: 15 y/o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16.

En una forma de realización preferida, la partícula viral comprende un constructo de ácido nucleico que comprende:

- a) un transgén que codifica una glucocerebrosidasa humana; en donde dicho transgén comprende SEQ ID NO: 19 o una secuencia que codifica glucocerebrosidasa humana, en donde la glucocerebrosidasa humana comprende SEQ ID NO: 5 u 8;
- b) un promotor ligado operativamente a dicho transgén; en donde dicho promotor es preferiblemente un promotor CAG que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21, o un promotor GusB que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20, o un promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27 o un promotor hSyn que comprende o consiste en SEQ ID NO: 13;
- c) una secuencia señal de poliadenilación, preferiblemente una secuencia señal de poliadenilación que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 3, preferiblemente SEQ ID NO: 28;

en donde dicha partícula viral es una partícula recombinante de virus adeno-asociado (rAAV), preferiblemente que incluye proteínas de cápside del AAV-TT, y más preferiblemente que comprende SEQ ID NO: 14 o una secuencia que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14;

en donde dicho constructo de ácido nucleico está comprendido en un vector viral que además comprende una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR, preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR de un virus adeno-asociado, más preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR del serotipo AAV2, y en donde cada una de las secuencias 5'ITR y 3'ITR, independientemente, comprenden o consisten en secuencias SEQ ID NO: 15 y/o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16, donde preferiblemente 5'ITR comprende SEQ ID NO: 15 y 3'ITR comprende SEQ ID NO: 16.

La construcción de partículas virales AAV recombinantes es generalmente conocida en el arte y ha sido descrita, por ejemplo, en US 5.173.414 y US 5.139.941; WO 92/01070, WO 93/03769, Lebkowski et al. (1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129; y Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801. Las partículas virales con proteínas de cápside del serotipo AAV-TT también han sido descritas en Tordo J, et al., Brain 2018;141:2014-2031.

Partícula viral con transporte retrógrado

En algunas formas de realización, dicha partícula viral de acuerdo con la presente descripción es seleccionada entre los serotipos de variantes virales con transporte retrógrado (AAVretro).

El transporte axonal (a veces también llamado transporte axoplásmico o flujo axoplásmico) se refiere al movimiento de organelas celulares y proteínas desde el cuerpo celular de una neurona dada hacia las terminaciones terminales de los axones (conocido como transporte anterógrado). Tal como se utiliza en la presente, la expresión "transporte retrógrado" se refiere al transporte de partículas en la dirección opuesta, es decir, desde las terminales de los axones hasta los cuerpos de las células parentales. A este respecto, los virus neurotrópicos (siendo el mejor ejemplo los virus de la rabia) típicamente son captados por las terminales de los axones y transportados al cuerpo celular de la neurona aprovechando el transporte retrógrado.

Ejemplos de partículas AAVretro incluyen sin limitación la proteína de cápside, preferiblemente la proteína de cápside de AAV2-retro, AAV-TT, AAV-MNM004 y AAV-MNM008, más preferiblemente la proteína de cápside VP1 de AAV2-retro, AAV-TT, AAV-MNM004 y AAV-MNM008.

La proteína de cápside de AAV2-retro ha sido descrita en WO 2017/218842A1.

También se han diseñado otros tipos variados de cápsides virales modificadas, como AAV-TT, AAV-MNM004 y AAV-MNM008, para transducir las neuronas que inervan la zona en donde se suministra el vector viral a través de la propagación retrógrada del vector viral.

- 5 AAV-MNM004 y AAV-MNM008 se describen, por ejemplo, en Davidsson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Dec 9 2019 doi: 10.1073/pnas.1910061116 y en WO 2019/158619.

La cápside de AAV-TT, también llamada cápside de AAV2 de tipo verdadero, se describe, por ejemplo, en WO 2015/121501. En una forma de realización, la proteína de cápside VP1 de AAV-TT comprende al menos una sustitución de aminoácidos con respecto a la proteína de cápside VP1 de AAV de tipo salvaje en una posición que corresponde a una o más de las siguientes posiciones en una secuencia de proteína de AAV2 (Secuencia de referencia NCBI: YP_680426.1): 125, 151, 162, 312, 457, 492, 499, 533, 546, 548, 585, 588 y/o 593, más particularmente, AAV-TT comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos con respecto a una proteína de cápside VP1 de AAV2 de tipo salvaje (Secuencia de referencia NCBI: YP_680426.1): V125I, V151A, A162S, T205S, N312S, Q457M, S492A, E499D, F533Y, G546D, E548G, R585S, R588T y/o A593S. En una forma de realización particular, AAV-TT comprende cuatro o más mutaciones con respecto a la proteína de cápside VP1 de AAV2 de tipo salvaje en las posiciones 457, 492, 499 y 533.

En otras formas de realización, la cápside del AAV-TT puede provenir de un serotipo AAV distinto de AAV2 y puede derivarse, por ejemplo, de la proteína de cápside de AAV1, AAV3B, AAV-LK03, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 o AAV10. En particular, las posiciones correspondientes a las descritas anteriormente con respecto a AAV2 pueden identificarse fácilmente mediante alineamientos de secuencias, por ejemplo, como se indica en las Figuras 1 y 2. En una forma de realización, la proteína de cápside VP1 de AAV-TT de la descripción comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14.

En formas de realización específicas, dichas partículas virales AAVretro están seleccionadas de acuerdo con la presente descripción entre las que son capaces de diseminarse de forma retrógrada en la corteza cerebral, preferiblemente al menos a la sustancia negra pars compacta

y a la corteza cerebral tras la inyección intraparenquimatosa en los núcleos caudados-putamen de un primate no humano, tal como se determinó en un ensayo de diseminación *in vivo*.

En una forma de realización más específica, dichas partículas virales AAVretro, de acuerdo con la presente descripción, están seleccionadas entre las que son capaces de diseminarse de forma retrógrada en la corteza cerebral, preferiblemente al menos a la sustancia negra pars compacta y a la corteza cerebral tras la inyección intraparenquimatosa en los núcleos caudados-putamen de un primate no humano hasta al menos el mismo nivel que AAV-TT tal como se determinó en un ensayo de diseminación *in vivo*.

Los inventores diseñaron un ensayo de diseminación *in vivo* que permite determinar el rAAV con verdadero transporte retrógrado para su uso en terapias génicas para el tratamiento de sinucleinopatías como las que se describen en la presente, tal como la enfermedad de Parkinson, y compararlo, por ejemplo, con un control positivo tal como rAAV-GFP de AAV-TT.

Una característica importante del ensayo de diseminación es que se trata de un ensayo *in vivo* en primates no humanos en donde se inyectan rAAV en una zona sin la presencia de fibras de pasaje. Por consiguiente, no se puede obtener un falso positivo por fibras de pasaje, es decir, fibras que atraviesan la zona inyectada hacia un destino más distante. En los primates no humanos, los núcleos caudados-putamen son estructuras 100% parenquimatosas y, por lo tanto, no contienen fibras de pasaje. Por lo tanto, ventajosamente se puede comparar y seleccionar un rAAV adecuado con transporte retrógrado de acuerdo con la presente descripción mediante el ensayo de diseminación propuesto.

En una forma de realización preferida, dicha partícula retroviral AAV incluye la proteína de cápside del serotipo AAV-TT que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14 y es capaz de diseminarse en forma retrógrada en la corteza cerebral, preferiblemente al menos a la sustancia negra pars compacta y a la corteza cerebral después de la inyección intraparenquimatosa en los núcleos caudados-putamen de un primate no humano, tal como se determina en un ensayo de diseminación *in vivo*.

En una forma de realización preferida, dicho ensayo de diseminación *in vivo* incluye las siguientes etapas:

- a. inyectar un rAAV de ensayo que comprende un transgén que codifica GFP (rAAV-GFP) mediante la inyección intraparenquimatosa de dicho rAAV-GFP en el putamen postcomisural de un primate no humano,
- b. contar el número de neuronas que expresan GFP en la corteza cerebral, preferiblemente en las áreas del cerebro que inervan los núcleos de putamen-caudado un mes después de la inyección.

El transgén que codifica GFP puede prepararse a partir de ácido nucleico que codifica GFP de SEQ ID NO: 10 o variantes funcionales del mismo con secuencia optimizada o formas truncadas.

- 10 Las neuronas que expresan GFP pueden ser visualizadas mediante manchas de inmunoperoxidasa, usando anticuerpos anti-GFP. Las neuronas que expresan GFP pueden ser contadas ventajosamente de forma automática a lo largo de la corteza cerebral de los primates no humanos inyectados. Se espera que la ubicación preferencial de las neuronas positivas para GFP se produzca en las capas profundas de la corteza cerebral. Además de las zonas corticales,
- 15 las neuronas que expresan GFP también pueden cuantificarse en todas las áreas del cerebro que inervan el putamen postcomisural o los núcleos caudados-putamen inyectados, en particular, al menos, la sustancia negra pars compacta, la amígdala y los núcleos intralaminares caudados.

- En una forma de realización específica, una partícula retroviral AAV de acuerdo con la presente descripción está seleccionada entre aquellas en las que al menos 50%, 60%, 70%, 80% o al
- 20 menos 90% de las neuronas de las capas profundas V-VI de la corteza cerebral que inervan el sitio inyectado están expresando GFP tal como se determina en dicho ensayo de diseminación *in vivo*. En una forma de realización preferida, dicha partícula retroviral AAV incluye la proteína de cápside del serotipo AAV-TT que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%,
 - 25 preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14 y en donde al menos 50%, 60%, 70%, 80% o al menos 90% de las neuronas de las capas profundas V-VI de la corteza cerebral que inervan el sitio inyectado están expresando GFP tal como se determina en dicho ensayo de diseminación *in vivo*.

- En una forma de realización más específica, el ensayo de diseminación se lleva a cabo tal como se describe en los ejemplos.
- 30

En una forma de realización más específica, dicho ensayo de diseminación *in vivo* incluye las siguientes etapas:

- a. inyectar un rAAV de prueba que comprende el transgén GFP mediante la inyección intraparenquimatosa de dicho rAAV-GFP en el putamen postcomisural de un primate no humano,
- b. contar el número de neuronas que expresan GFP en la corteza cerebral, preferiblemente en las áreas del cerebro que inervan los núcleos caudados-putamen, más preferiblemente al menos en la corteza cerebral, la sustancia negra, la amígdala y los núcleos caudados intralaminares un mes después de la inyección,
- c. comparar el porcentaje de neuronas marcadas en la corteza cerebral con un experimento de control realizado con AAV-TT-GFP.

10 En otras formas de realización, dicho AAVretro incluye proteínas de cápside seleccionadas entre los siguientes serotipos variantes: AAV2-retro, AAV-MNM004, AAV-MNM008 y AAV-TT.

En una forma de realización preferida, dicha partícula retroviral AAV incluye la proteína de cápside del serotipo AAV-TT que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 o
 15 secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14.

Hasta 5 etapas de la enfermedad de Parkinson han sido clásicamente definidas por neurólogos (ver <https://www.parkinson.org/Understanding-Parkinsons/What-is-Parkinsons/Stages-of-Parkinsons>). La escala de clasificación clínica más utilizada es la denominada escala Hoehn y
 20 Yahr (H-Y) que clasifica la progresión de la EP en 5 etapas: 1 y 2 representan las etapas tempranas, 2 y 3 las etapas leves y 4 y 5 las etapas avanzadas.

Ventajosamente, las partículas virales con transporte retrógrado permiten que las partículas virales que expresan glucocerebrosidasa se extiendan por las áreas del cerebro con agregados de alfa-sinucleína diseminados en pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad.

25 Por consiguiente, las partículas virales AAVretro, preferiblemente la partícula viral AAVretro que incluye la proteína de cápside del serotipo AAV-TT, que preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 o la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14 serán seleccionadas preferiblemente para uso de acuerdo con la presente
 30 descripción en el tratamiento de pacientes con etapas avanzadas de sinucleinopatía, típicamente, al menos etapa 3 H-Y de la enfermedad de Parkinson.

Un proceso para producir partículas virales

La producción de partículas virales portadoras del vector de expresión viral, como se ha descrito anteriormente, puede realizarse mediante métodos y protocolos convencionales, que son seleccionados teniendo en cuenta las características estructurales elegidas para la forma de
5 realización real de las partículas virales que se van a producir.

En resumen, las partículas virales pueden producirse en una célula hospedadora, más concretamente en una célula específica productora de virus (célula empaquetadora), que se transfecta con el constructo de ácido nucleico o vector viral que se va a empaquetar, en presencia de un vector o virus auxiliar u otro constructo o constructos de ADN.

- 10 La expresión "células empaquetadoras", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una célula o línea celular que puede ser transfectada con un constructo de ácido nucleico o vector viral de la descripción, y proporciona en *trans* todas las funciones que faltan y que son necesarias para la completa replicación y empaquetamiento de un vector viral. Típicamente, las células empaquetadoras expresan de manera constitutiva o inducible una o más de dichas funciones
15 virales faltantes. Dichas células empaquetadoras pueden ser células adherentes o en suspensión.

Típicamente, un proceso de producción de partículas virales comprende las siguientes etapas:

- a) Cultivar en un medio de cultivo una célula empaquetadora que comprende un constructo de ácido nucleico o un vector viral tal como se describe anteriormente; y
- b) Cosechar las partículas virales del sobrenadante a partir del cultivo celular y/o a partir del
20 interior de las células.

- Se pueden utilizar métodos convencionales para producir partículas virales a partir de las partículas virales AAV, que consisten en la cotransfección celular transitoria con un constructo o vector de expresión de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) que lleva el transgén que codifica glucocerebrosidasa; un constructo de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido auxiliar
25 de AAV) que codifica los genes rep y cap, pero no lleva secuencias ITR; y con un tercer constructo de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) que proporciona las funciones adenovirales necesarias para la replicación de AAV. Los genes virales necesarios para la replicación de AAV se denominan en la presente genes auxiliares virales. Típicamente, dichos genes necesarios para la replicación de AAV son genes auxiliares adenovirales, tales como los

ARN de E1A, E1B, E2a, E4 o VA. Preferiblemente, los genes auxiliares adenovirales son del serotipo Ad5 o Ad2.

La producción a gran escala de partículas AAV, de acuerdo con la descripción, también puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la infección de células de insecto con una combinación de baculovirus recombinantes (Urabe et al. Hum. Gene Ther. 2002; 13: 1935-1943). Células SF9 son coinfectadas con dos o tres vectores de baculovirus que expresan, respectivamente, AAV rep, AAV cap y el vector AAV a empaquetar. Los vectores de baculovirus recombinantes proporcionarán las funciones de genes auxiliares virales necesarias para la replicación y/o empaquetado del virus. Smith et al 2009 (Molecular Therapy, vol.17, no.11, págs.. 1888-1896) describen además un sistema de expresión dual de baculovirus para la producción a gran escala de partículas AAV en células de insecto.

Los medios de cultivo adecuados serán conocidos por un experto en la técnica. Los ingredientes que componen tales medios pueden variar dependiendo del tipo de célula a cultivar. Además de la composición de los nutrientes, la osmolaridad y el pH se consideran parámetros importantes de los medios de cultivo. El medio de crecimiento celular comprende una serie de ingredientes bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, fuentes de hidratos de carbono, lípidos, elementos traza (CuSO₄, FeSO₄, Fe(NO₃)₃, ZnSO₄...), estando cada ingrediente presente en una cantidad que soporta el cultivo de una célula *in vitro* (es decir, la supervivencia y el crecimiento de las células). Los ingredientes también pueden incluir diferentes sustancias auxiliares, tal como sustancias buffer (tal como bicarbonato de sodio, Hepes, Tris o buffers de rendimiento similar), estabilizadores de oxidación, estabilizadores para contrarrestar el estrés mecánico, inhibidores de proteasa, factores de crecimiento animal, hidrolizados vegetales, agentes antiaglomerantes, agentes antiespumantes. Las características y la composición de los medios de crecimiento celular varían de acuerdo con los requisitos celulares particulares. Algunos ejemplos de medios de crecimiento celular disponibles en el mercado son: MEM (Minimum Essential Medium), BME (Basal Medium Eagle) DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium), DMEM de Iscoves (Iscove's modification of Dulbecco's Medium), GMEM, RPMI 1640, Leibovitz L-15, McCoy's, Media 199, Ham (Ham's Media) F10 y derivados, Ham F12, DMEM/F12, etc.

Una guía adicional para la construcción y producción de vectores virales para uso de acuerdo con la descripción se puede encontrar en Viral Vectors for Gene Therapy, Methods and Protocols. Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 737. Merten y Al-Rubeai (Eds.); 2011

Human Press (Springer); Genic Therapy. M. Giacca. 2010 Springer-Verlag; Heilbronn R. y Weger S. Viral Vectors for Gene Transfer: Current Status of Gene Therapeutics. En: Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology 197; M. Schäfer-Korting (Ed.). 2010 Springer-Verlag; págs. 143-170; Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols. R.O. Snyder y P. Moulllier (Eds). 2011 Human Press (Springer); Bünning H. et al. Recent developments in adeno-associated virus technology. J. Gene Med. 2008; 10:717-733; Adenovirus: Methods and Protocols. M. Chillón y A. Bosch (Eds.); Tercera Edición. 2014 Human Press (Springer).

La descripción también se relaciona con una célula hospedadora que comprende un constructo de ácido nucleico o un vector viral que codifica glucocerebrosidasa tal como se describe anteriormente. Más particularmente, la célula hospedadora, de acuerdo con la descripción, es una célula específica productora de virus, también denominada célula empaquetadora, la cual es transfectada con el constructo de ácido nucleico o el vector viral como describe anteriormente, en presencia de un vector o virus auxiliar u otros constructos de ADN, y que proporciona en *trans* todas las funciones que faltan y que son necesarias para la completa replicación y empaquetamiento de una partícula viral. Dichas células empaquetadoras pueden ser células adherentes o en suspensión.

Por ejemplo, dichas células empaquetadoras pueden ser células eucariotas tales como células de mamífero, que incluye células de simio, humano, perro y roedor. Ejemplos de células humanas son las células PER.C6 (WO01/38362), MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), células HEK-293 (ATCC CRL-1573), células HeLa (ATCC CCL2) y células pulmonares fetales de rhesus (ATCC CL- 160). Ejemplos de células de primates no humanos son las células Vero (ATCC CCL81), las células COS-1 (ATCC CRL-1650) o las células COS-7 (ATCC CRL-1651). Ejemplos de células de perro son las células MDCK (ATCC CCL-34). Ejemplos de células de roedor son las células de hámster, tales como células BHK21-F, HKCC o células CHO.

Como alternativa a las fuentes mamíferas, las células de empaquetamiento para producir las partículas virales pueden derivarse de fuentes aviares como pollo, pato, ganso, codorniz o faisán. Entre los ejemplos de líneas celulares aviares figuran células madre embrionarias aviares (WO 01/85938 y WO 03/076601), células inmortalizadas de retina de pato (WO 2005/042728) y células derivadas de células madre embrionarias aviares, incluidas células de pollo (WO 2006/108846) o células de pato, tal como la línea celular EB66 (WO 2008/129058 y WO 2008/142124).

En otra forma de realización, las células pueden ser cualquier célula empaquetadora permisiva para infección y replicación de baculovirus. En una forma de realización particular, dichas células son células de insecto, tales como células SF9 (ATCC CRL-1711), células Sf21 (IPLB-Sf21), células MG1 (BTI-TN-MG1) o células High Five™ (BTI-TN-5B1-4).

5 Por consiguiente, en una forma de realización particular, opcionalmente en combinación con una o más características de las diversas formas de realización descritas anteriormente o a continuación, la célula hospedadora comprende:

- un constructo de ácido nucleico o vector viral que comprende un transgén que codifica glucocerebrosidasa tal como se describe anteriormente (por ejemplo, el vector AAV),

10 - un constructo de ácido nucleico, por ejemplo, un plásmido, que codifica los genes rep y/o cap de AAV que no lleva las secuencias ITR; y, opcionalmente,

- un constructo de ácido nucleico, por ejemplo, un plásmido o un virus, que comprende genes auxiliares virales.

15 En otro aspecto, la descripción se relaciona con una célula hospedadora transducida con una partícula viral de la descripción y la expresión "célula hospedadora" tal como se utiliza en la presente se refiere a cualquier línea celular que sea susceptible de infección por un virus de interés, y susceptible de cultivo *in vitro*.

Composiciones farmacéuticas

20 Otro aspecto de la presente descripción se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un constructo de ácido nucleico, un vector viral, una partícula viral o una célula hospedadora de la descripción en combinación con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

25 Tal como se utiliza en la presente, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por un organismo regulador o una farmacopea reconocida, tal como la Farmacopea Europea, para su uso en animales y/o seres humanos. El término "excipiente" se refiere a un diluyente, adyuvante, portador o vehículo con el que se administra el agente terapéutico.

Cualquier portador, diluyente o excipiente adecuado y farmacéuticamente aceptable puede utilizarse en la preparación de una composición farmacéutica (véase, por ejemplo, Remington:

The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, abril de 1997). Las composiciones farmacéuticas típicamente son estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse como soluciones (por ejemplo, solución salina, solución de dextrosa o solución tamponada, u otros fluidos estériles farmacéuticamente aceptables), microemulsiones, liposomas u otra estructura ordenada adecuada para acomodar una alta concentración de producto (por ejemplo, micropartículas o nanopartículas). El portador puede ser un solvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y lo similar), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, es preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tal como manitol, sorbitol o cloruro de sodio.

15 Preferiblemente, dicha composición farmacéutica es formulada como una solución, más preferiblemente como una solución salina opcionalmente tamponada. Compuestos activos suplementarios también pueden ser incorporados en las composiciones farmacéuticas de la invención. Pueden encontrarse guías sobre la administración conjunta de agentes terapéuticos adicionales por ejemplo, en el Compendium of Pharmaceuticals and Specialties (CPS) de la

20 Asociación de Farmacéuticos de Canadá.

En una forma de realización, la composición farmacéutica es una composición adecuada para la administración intraparenquimatosa, intracerebral, intravenosa o intratecal. Estas composiciones farmacéuticas son solo a modo de ejemplo y no limitan las composiciones farmacéuticamente adecuadas para otras vías de administración parenteral y no parenteral. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden ser envasadas en dosis unitarias o en formas multidosis.

25

Usos terapéuticos

La presente invención también proporciona la partícula viral descrita en la presente para uso en terapia.

30 En una forma de realización, una partícula viral para uso en terapia es una partícula viral que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende:

- a) un transgén que codifica glucocerebrosidasa humana; en donde dicho transgén comprende SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 o 19 (preferiblemente SEQ ID NO: 19) o una secuencia que codifica glucocerebrosidasa humana, en donde la glucocerebrosidasa humana comprende SEQ ID NO: 5, 6, 8, 17 o 18 (preferiblemente SEQ ID NO: 5 u 8);
- b) un promotor ligado operativamente a dicho transgén y en donde dicho promotor preferiblemente permite la expresión de dicho transgén al menos en células neuronales y microgliales de la sustancia negra pars compacta (SNc); en donde dicho promotor es preferiblemente un promotor CAG que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21, o un promotor GusB que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20; o un promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27 o un promotor hSyn que comprende o consiste en SEQ ID NO: 13;
- c) una secuencia señal de poliadenilación, preferiblemente una secuencia señal de poliadenilación que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 3, preferiblemente SEQ ID NO: 28;

en donde dicha partícula viral es una partícula recombinante de virus adeno-asociado (rAAV), preferiblemente que incluye proteínas de cápside de AAV-TT, y más preferiblemente que comprende SEQ ID NO: 14 o una secuencia que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14; en donde dicho constructo de ácido nucleico está comprendido en un vector viral que además comprende una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR, preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR de un virus adeno-asociado, más preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR del serotipo AAV2, y en donde cada una de las secuencias 5'ITR y 3'ITR, independientemente, comprenden o consisten en secuencias SEQ ID NO: 15 o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16, en donde preferiblemente 5'ITR comprende SEQ ID NO: 15 y 3'ITR comprende SEQ ID NO: 16.

Utilizando modelos animales de la enfermedad de Parkinson esporádica en ratones y primates no humanos, los inventores descubrieron sorprendentemente que el aumento de la actividad de la glucocerebrosidasa mediada por AAV:

- induce la eliminación de agregados de alfa-sinucleína en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta;
- induce neuroprotección de neuronas dopaminérgicas,

- atenúa fenómenos proinflamatorios impulsados por la microglía y desencadenados por la agregación de alfa-sinucleína, y
- impide el paso transneuronal de alfa-sinucleína (propagación similar a un prión).

Estos resultados proporcionan evidencia sólida de una posible estrategia terapéutica para tratar sinucleinopatías, en particular sinucleinopatías esporádicas, y más específicamente la enfermedad de Parkinson en sujetos humanos.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, se proporciona una partícula viral o vector viral como se describe en la presente para uso en el tratamiento de sinucleinopatía, preferiblemente la enfermedad de Parkinson, y más específicamente la enfermedad de Parkinson esporádica.

En una forma de realización, la partícula viral para uso en el tratamiento de sinucleinopatía, preferiblemente la enfermedad de Parkinson, y más específicamente la enfermedad de Parkinson esporádica, es una partícula viral que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende:

- a) un transgén que codifica glucocerebrosidasa humana; en donde dicho transgén comprende SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 o 19 (preferiblemente SEQ ID NO: 19) o una secuencia que codifica glucocerebrosidasa humana, en donde la glucocerebrosidasa humana comprende SEQ ID NO: 5, 6, 8, 17 o 18 (preferiblemente SEQ ID NO: 5 u 8);
- b) un promotor ligado operativamente a dicho transgén y en donde dicho promotor preferiblemente permite la expresión de dicho transgén al menos en células neuronales y microgliales de la sustancia negra pars compacta (SNc); en donde dicho promotor es preferiblemente un promotor CAG que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21, o un promotor GusB que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20; o un promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27 o un promotor hSyn que comprende o consiste en SEQ ID NO: 13;
- c) una secuencia señal de poliadenilación, preferiblemente una secuencia señal de poliadenilación que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 3, preferiblemente SEQ ID NO: 28;

en donde dicha partícula viral es una partícula recombinante de virus adeno-asociado (rAAV), preferiblemente que incluye proteínas de cápside de AAV-TT, y más preferiblemente que comprende SEQ ID NO: 14 o una secuencia que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad

- con SEQ ID NO: 14; en donde dicho constructo de ácido nucleico está comprendido en un vector viral que además comprende una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR, preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR de un virus adeno-asociado, más preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR del serotipo AAV2, y en donde cada una de las secuencias 5'ITR y 3'ITR, independientemente, comprenden o consisten en secuencias SEQ ID NO: 15 o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16, donde preferiblemente 5'ITR comprende SEQ ID NO: 15 y 3'ITR comprende SEQ ID NO: 16.
- Además, la descripción se refiere a un método para tratar sinucleinopatía, preferiblemente la enfermedad de Parkinson, y más preferiblemente la enfermedad de Parkinson esporádica, en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho método la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula viral o un vector viral como se describe anteriormente.
- En una forma de realización, el método para tratar sinucleinopatía, preferiblemente la enfermedad de Parkinson, y más específicamente la enfermedad de Parkinson esporádica, en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho método la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula viral que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende:
- a) un transgén que codifica glucocerebrosidasa humana; en donde dicho transgén comprende SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 o 19 (preferiblemente SEQ ID NO: 19) o una secuencia que codifica la glucocerebrosidasa humana, en donde la glucocerebrosidasa humana comprende SEQ ID NO: 5, 6, 8, 17 o 18 (preferiblemente SEQ ID NO: 5 u 8);
 - b) un promotor ligado operativamente a dicho transgén y en donde dicho promotor preferiblemente permite la expresión de dicho transgén al menos en las células neuronales y microgliales de la sustancia negra pars compacta (SNc); en donde dicho promotor es preferiblemente un promotor CAG que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21, o un promotor GusB que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20; o un promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27 o un promotor hSyn que comprende o consiste en SEQ ID NO: 13;

- c) una secuencia señal de poliadenilación, preferiblemente una secuencia señal de poliadenilación que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 3, preferiblemente SEQ ID NO: 28;

5 en donde dicha partícula viral es una partícula recombinante de virus adeno-asociado (rAAV), preferiblemente que incluye proteínas de cápside de AAV-TT, y más preferiblemente que comprende SEQ ID NO: 14 o una secuencia que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14; en donde dicho constructo de ácido nucleico está comprendido en un vector viral que además comprende una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR, preferiblemente una secuencia 5'ITR
10 y una secuencia 3'ITR de un virus adeno-asociado, más preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR del serotipo AAV2, y en donde cada una de las secuencias 5'ITR y 3'ITR, independientemente, comprenden o consisten en secuencias SEQ ID NO: 15 o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16, donde preferiblemente 5'ITR comprende SEQ ID NO: 15 y 3'ITR comprende SEQ ID NO: 16.

15 En una forma de realización particular, dicho método comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula viral o vector viral como se describe anteriormente para ser suministrada a neuronas de la corteza cerebral, preferiblemente a neuronas de las capas profundas V-VI de la corteza cerebral, preferiblemente al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o al menos 90% de las neuronas de las capas profundas
20 V-VI de la corteza cerebral que inervan el sitio administrado.

En otra forma de realización particular, dicho método comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula viral o un vector viral, como se describe anteriormente, a ser suministrada a neuronas de las áreas cerebrales que inervan el sitio de inyección, preferiblemente para ser suministrada a neuronas de al menos las áreas cerebrales
25 que inervan los núcleos caudados-putamen, es decir, al menos sustancia negra pars compacta, corteza cerebral, amígdala y núcleos caudados intralaminares del tálamo, preferiblemente a al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o al menos 90% de dichas neuronas.

En otro aspecto, la descripción se relaciona con un constructo de ácido nucleico, vector viral, partícula viral, célula hospedadora o composición farmacéutica tal como se describe
30 anteriormente, para uso como medicamento en un sujeto que lo necesita, y más específicamente, para uso en el tratamiento de sinucleinopatía, preferiblemente la enfermedad de Parkinson, y más específicamente enfermedad de Parkinson esporádica en un sujeto que lo necesita.

En otro aspecto adicional, la descripción se relaciona con el uso de un constructo de ácido nucleico, vector viral, partícula viral, célula hospedadora o composición farmacéutica como se describe anteriormente en la fabricación de un medicamento, preferiblemente para el tratamiento de sinucleinopatía, preferiblemente la enfermedad de Parkinson, y más específicamente la enfermedad de Parkinson esporádica.

El término "sujeto" o "paciente", tal como se utiliza en la presente, se refiere a mamíferos. Las especies de mamíferos que pueden beneficiarse de los métodos de tratamiento descritos incluyen, entre otros, humanos, primates no humanos tal como simios, chimpancés, monos y orangutanes, animales domésticos, incluidos perros y gatos, así como ganado tal como caballos, ganado vacuno, cerdos, ovejas y cabras, u otras especies de mamíferos, incluidos, entre otros, ratones, ratas, conejillos de indias, conejos, hámsteres y lo similar. En una forma de realización particular, dicho sujeto es un neonato, infante o niño.

Tal como se usa en la presente, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere a todo acto destinado a mejorar el estado de salud de los pacientes, tal como terapia, prevención, profilaxis y retraso de la enfermedad. En ciertas formas de realización, dicho término se refiere al mejoramiento o la erradicación de una enfermedad o de los síntomas asociados con una enfermedad. En otras formas de realización, dicho término se refiere a minimizar la propagación o el empeoramiento de la enfermedad como resultado de la administración de uno o más agentes terapéuticos a un sujeto con dicha enfermedad.

Tal como se utiliza en la presente, las sinucleinopatías se refieren a enfermedades en las que el sello neuropatológico está representado por la agregación intracitoplasmática de alfa-sinucleína. En particular, las sinucleinopatías incluyen trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy y la atrofia multisistémica.

Tal como se utiliza en la presente, la enfermedad de Parkinson (EP) se refiere a un trastorno neurodegenerativo progresivo del sistema nervioso central de origen desconocido. En el contexto de la EP, las neuronas productoras de dopamina mueren progresivamente, lo que conduce a una deficiencia cerebral en un neurotransmisor conocido como dopamina. Como resultado de la declinación progresiva de los niveles cerebrales de dopamina, los circuitos cerebrales que controlan la iniciación y la ejecución de los movimientos voluntarios se vuelven disfuncionales, lo que conduce a la aparición de síntomas motores cardinales que caracterizan típicamente a la EP. El diagnóstico inicial suele tener lugar en la sexta década de la vida (65

años de edad, en promedio), y la presentación característica es unilateral y distal. A medida que la enfermedad avanza, afecta a ambos lados del cuerpo (por ejemplo, de forma bilateral) y los síntomas empeoran y se hacen más evidentes con el tiempo. Tras el diagnóstico inicial, la mayoría de los pacientes se enfrentan a un período de tiempo variable (aproximadamente entre 5 y 7 años) en donde la enfermedad se puede controlar farmacológicamente tomando medicamentos tales como diferentes formulaciones de levodopa (un precursor de la dopamina) y/o una amplia variedad de agonistas dopaminérgicos. A medida que la enfermedad avanza, la dosis de medicación aumenta para contrarrestar la imparable pérdida de neuronas dopaminérgicas hasta un punto temporal en donde la EP ya no se puede controlar con terapias de reemplazo de dopamina debido a la aparición de fenómenos de activación y desactivación y a efectos secundarios relacionados con la ingesta crónica de medicación (disquinesia inducida por levodopa). En esta etapa, los pacientes pueden ser tratados con enfoques neuroquirúrgicos funcionales, que consisten en la colocación bilateral de electrodos dentro de los circuitos de los ganglios basales (un procedimiento conocido como estimulación cerebral profunda). Independientemente de las opciones terapéuticas, los enfoques disponibles son meramente sintomáticos, es decir, pueden aliviar los síntomas relacionados con la motricidad sin ningún efecto en las tasas de progresión de la enfermedad. La tríada sintomática típica está formada por temblor (sacudidas), bradiquinesia (lentitud de los movimientos) y rigidez (debido a la rigidez muscular). Además de la tríada típica, a menudo se observan otros pocos síntomas, entre ellos, trastornos de la marcha, disartria (trastornos del habla), dolor, así como una gran cantidad de síntomas no motores (estreñimiento, incontinencia urinaria, trastornos del sueño REM, disfunción olfativa e hipotensión ortostática, entre otros). Los síntomas psiquiátricos también suelen aparecer en paralelo a la progresión de la enfermedad y pueden incluir trastornos de cognición, pensamiento, estado de ánimo y comportamiento. De hecho, se observa demencia a menudo en las etapas tardías de la enfermedad.

El principal sello neuropatológico de la EP está representado por la agregación intracitoplasmática de una proteína mal plegada conocida como alfa-sinucleína. Los agregados de alfa-sinucleína se ven a menudo como estructuras de tipo esferoide llamadas cuerpos de Lewy, así como estructuras neuronales anormales (neuritas de cuerpos de Lewy). La presencia de cuerpos de Lewy dentro de las neuronas dopaminérgicas en un área del cerebro conocida como sustancia negra pars compacta es el criterio de elección para la confirmación neuropatológica de la EP. El diagnóstico de la EP se hace después de una evaluación clínica realizada por neurólogos, equilibrando en conjunto el fenotipo clínico. Paralelamente, los

estudios de neuroimagen con tomografía por emisión de positrones (TEP) utilizando radiotrazador fluoro-dopa (un análogo de la dopamina) también soportan el diagnóstico inicial de la EP y son, de hecho, muy útiles como correlato de neuroimagen de la progresión de la enfermedad a lo largo del tiempo.

- 5 El método anterior es particularmente adecuado para tratar sinucleinopatías esporádicas, en particular la enfermedad de Parkinson esporádica. Tal como se utiliza en la presente, la sinucleinopatía esporádica (también denominada trastorno idiopático) se refiere a la sinucleinopatía que no está asociada a mutaciones genéticas particulares conocidas (caso familiar). Tales mutaciones genéticas conocidas asociadas a sinucleinopatías familiares
- 10 incluyen una mutación en un gen seleccionado del grupo que consiste en LRRK2, SNCA, VPS35, GCH1, ATXN2, DNAJC13, TMEM230, GIGYF2, HTRA2, RIC3, EIF4G1, UCHL1, CHCHD2, GBA1, PRKN, PINK1, DJ1, ATP13A2, PLA2G6, FBXO7, DNAJC6, SYNJ1, SPG11, VPS13C, PODXL, PTRHD1, RAB39B, DNAJC13, TMEM230, GIGYF2, HTRA2, RIC3, EIF4G1, UCHL1 y CHCHD2. Estas mutaciones se describen con más detalle en Lunati
- 15 et al, The genetic landscape of Parkinson's disease, Rev Neurol 2018;174:628-643.

Las sinucleinopatías descritas anteriormente pueden estar asociadas a defectos en el almacenamiento lisosomal, en particular la enfermedad de Gaucher. Así, en otra forma de realización particular, el método anterior también es adecuado para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher neuronopática, más particularmente la enfermedad de Gaucher de tipo

20 II o de tipo III en un sujeto que lo necesita, método que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula viral, un vector viral, una célula hospedadora o una composición farmacéutica como se describe anteriormente.

La enfermedad de Gaucher (GD, por sus siglas en inglés) se refiere a una enfermedad de almacenamiento lisosomal, más específicamente a una esfingolipidosis que se caracteriza por

25 el depósito de glucocerebrósido en las células del sistema macrófago-monocito.

La expresión "enfermedad de almacenamiento lisosomal", tal como se utiliza en la presente, se refiere a las enfermedades genéticas y trastornos metabólicos que resultan de defectos en la función lisosomal. Los trastornos por almacenamiento lisosomal se deben a una disfunción lisosomal que suele ser consecuencia de la deficiencia de una sola enzima necesaria para el

30 metabolismo de lípidos, glicoproteínas o los denominados mucopolisacáridos que induce una acumulación anormal de sustancias en el interior del lisosoma.

La enfermedad de Gaucher es causada por una mutación o mutaciones recesivas en el gen que codifica la enzima glucocerebrosidasa. Diferentes mutaciones en la beta-glucosidasa determinan la actividad remanente de la enzima y, en gran medida, el fenotipo. La enfermedad de Gaucher tiene tres subtipos clínicos comunes, el tipo I no neuronopático, que es la forma más común de la enfermedad, el tipo II neuronopático agudo, también referido en la presente como tipo II, y el tipo III neuronopático crónico, también referido en la presente como tipo III. La enfermedad de Gaucher de tipo II (neuronopático agudo) o III (neuronopático subagudo) se caracteriza por la presencia de una enfermedad neurológica primaria que afecta el sistema nervioso central. La enfermedad de Gaucher de tipo II puede comenzar en cualquier momento de la infancia, ya a los seis meses de nacimiento, y se produce en aproximadamente 1 de cada 100.000 nacidos vivos. Se caracteriza por una grave afectación neurológica del tronco cerebral, asociada a una organomegalia y que generalmente conduce a la muerte antes de los 2 años de edad. Entre los principales síntomas se incluyen agrandamiento del bazo y/o del hígado, convulsiones, mala coordinación, irregularidades esqueléticas, trastornos del movimiento ocular, trastornos sanguíneos, incluida anemia, y problemas respiratorios. La enfermedad de Gaucher de tipo III se produce más tarde en la infancia y adolescencia y tiene una tasa de incidencia de aproximadamente 1 de cada 100.000 nacidos vivos. Los síntomas progresan más lentamente en comparación con el tipo II e incluyen agrandamiento de hígado y bazo, daños cerebrales extensos y progresivos, trastornos de movimiento ocular, espasticidad, convulsiones, rigidez de las extremidades y una capacidad deficiente para succionar y tragar.

En un aspecto adicional, la descripción se refiere a la partícula viral, vector viral, célula hospedadora o composición farmacéutica, tal como se describe anteriormente, para uso como medicamento en un sujeto que lo necesita y, más específicamente, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher neuronopática, más particularmente la enfermedad de Gaucher de tipo II o de tipo III en un sujeto que lo necesita.

En otro aspecto adicional, la descripción se refiere al uso de un constructo de ácido nucleico, vector viral, partícula viral, célula hospedadora o composición farmacéutica como se describe anteriormente en la fabricación de un medicamento, preferiblemente para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher neuronopática, más particularmente la enfermedad de Gaucher de tipo II o tipo III.

En una forma de realización, la partícula viral para uso en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher neuronopática, más particularmente la enfermedad de Gaucher de tipo II o tipo III, es una partícula viral que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende:

- 5 a) un transgén que codifica glucocerebrosidasa humana; en donde dicho transgén comprende SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 o 19 (preferiblemente SEQ ID NO: 19) o una secuencia que codifica glucocerebrosidasa humana, en donde la glucocerebrosidasa humana comprende SEQ ID NO: 5, 6, 8, 17 o 18 (preferiblemente SEQ ID NO: 5 u 8);
 - 10 b) un promotor ligado operativamente a dicho transgén y en donde dicho promotor preferiblemente permite la expresión de dicho transgén al menos en células neuronales y microgliales de la sustancia negra pars compacta (SNc); en donde dicho promotor es preferiblemente un promotor CAG que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21, o un promotor GusB que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20; o un promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27
 - 15 o un promotor hSyn que comprende o consiste en SEQ ID NO: 13;
 - c) una secuencia señal de poliadenilación, preferiblemente una secuencia señal de poliadenilación que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 3, preferiblemente SEQ ID NO: 28;
- en donde dicha partícula viral es una partícula recombinante de virus adeno-asociado (rAAV), preferiblemente que incluye proteínas de cápside de AAV-TT, y más
- 20 preferiblemente que comprende SEQ ID NO: 14 o una secuencia que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14; donde dicho constructo de ácido nucleico está comprendido en un vector viral que además comprende una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR,
- 25 preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR de un virus adeno-asociado, más preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR del serotipo AAV2, y en donde cada una de las secuencias 5'ITR y 3'ITR, independientemente, comprenden o consisten en secuencias SEQ ID NO: 15 o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16, en donde preferiblemente 5'ITR
- 30 comprende SEQ ID NO: 15 y 3'ITR comprende SEQ ID NO: 16.

Además, la descripción se refiere a un método para tratar la enfermedad de Gaucher neuronopática, más particularmente la enfermedad de Gaucher de tipo II o de tipo III, en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método la administración a dicho sujeto de una

cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula viral o vector viral como se describe anteriormente.

En una forma de realización, el método para tratar la enfermedad de Gaucher neuronopática, más particularmente la enfermedad de Gaucher de tipo II o de tipo III, en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho método la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula viral que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende:

- a) un transgén que codifica glucocerebrosidasa humana; en donde dicho transgén comprende SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 o 19 (preferiblemente SEQ ID NO: 19) o una secuencia que codifica glucocerebrosidasa humana, en donde la glucocerebrosidasa humana comprende SEQ ID NO: 5, 6, 8, 17 o 18 (preferiblemente SEQ ID NO: 5 u 8);
- b) un promotor ligado operativamente a dicho transgén y en donde dicho promotor preferiblemente permite la expresión de dicho transgén al menos en células neuronales y microgliales de la sustancia negra pars compacta (SNc); en donde dicho promotor es preferiblemente un promotor CAG que comprende o consiste en SEQ ID NO: 9 o 21, o un promotor GusB que comprende o consiste en SEQ ID NO: 2 o 20; o un promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27 o un promotor hSyn que comprende o consiste en SEQ ID NO: 13;
- c) una secuencia señal de poliadenilación, preferiblemente una secuencia señal de poliadenilación que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 3, preferiblemente SEQ ID NO: 28;

en donde dicha partícula viral es una partícula recombinante de virus adeno-asociado (rAAV), preferiblemente que incluye proteínas de cápside de AAV-TT, y más preferiblemente que comprende SEQ ID NO: 14 o una secuencia que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14; en donde dicho constructo de ácido nucleico está comprendido en un vector viral que además comprende una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR, preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR de un virus adeno-asociado, más preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR del serotipo AAV2, y en donde cada una de las secuencias 5'ITR y 3'ITR, independientemente, comprenden o consisten en secuencias SEQ ID NO: 15 o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16, donde preferiblemente 5'ITR comprende SEQ ID NO: 15 y 3'ITR comprende SEQ ID NO: 16.

Tal como se usa en la presente, "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado terapéutico deseado, tal como uno o más de los siguientes resultados terapéuticos:

- 5 - una reducción significativa de la carga de alfa-sinucleína en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta en dicho sujeto, y preferiblemente también en las neuronas de cualquier otra área cerebral que muestre agregados de alfa-sinucleína,
- 10 - un importante efecto neuroprotector de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta, como lo demuestra la significativa reducción de la muerte de las neuronas positivas para tirosina,
- un importante efecto neuroprotector en las neuronas de cualquier otra área del cerebro que muestre agregados de alfa-sinucleína,
- una disminución significativa de los fenómenos proinflamatorios impulsados por la microglía y desencadenados por la agregación de alfa-sinucleína,
- 15 - un bloqueo significativo del pasaje trans-neuronal tipo príon de alfa-sinucleína.

Tal como se utiliza, el "pasaje trans-neuronal tipo príon de alfa-sinucleína" se refiere a la capacidad de alfa-sinucleína para propagarse desde una terminal de axón neuronal dentro de la siguiente neurona que está inervada por la terminal de axón que expresa alfa-sinucleína.

20 Una reducción significativa de la carga de alfa-sinucleína (por ejemplo, en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta) puede corresponder a una reducción de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o al menos 90% de los agregados de alfa-sinucleína en la zona cerebral correspondiente (por ejemplo, la sustancia negra pars compacta) después de un período mínimo de 4 semanas de tratamiento.

25 En algunas formas de realización, un efecto neuroprotector significativo de las neuronas dopaminérgicas en un paciente tratado puede estimarse como una mejora en la supervivencia neuronal de al menos 10%, 20% o 30% en comparación con los pacientes no tratados después de un período mínimo de 52 semanas (un año) de tratamiento.

30 En otras formas de realización específicas, un tratamiento con un producto de la descripción puede inhibir la progresión o retrasar la aparición, o reducir la gravedad de uno o más síntomas de sinucleinopatías o de la enfermedad de Gaucher neuronopática. Por ejemplo, un tratamiento

puede inhibir la progresión o retrasar la aparición, o reducir la gravedad de uno o más de los siguientes síntomas:

- degeneración de neuronas dopaminérgicas (por ejemplo, en la sustancia negra pars compacta),
- 5 - bradiquinesia
- rigidez muscular
- temblores, temblores en reposo,
- alteraciones del equilibrio y de la marcha
- síntomas neuropsiquiátricos,
- 10 - acumulación de alfa-sinucleína
- acumulación de cuerpos de Lewy
- tasas de progresión de la enfermedad
- puntuaciones obtenidas en escalas clínicas relacionadas con la motricidad
- puntuaciones obtenidas en las pruebas que miden el estado cognitivo
- 15 - niveles de captación de radiotrazadores en escáneres PET de neuroimágenes (medidos como potencial de unión)
- pruebas olfativas
- alteraciones del sueño REM
- síntomas no motrices (estreñimiento, incontinencia urinaria, alteraciones del sueño
- 20 REM, disfunción olfativa e hipotensión ortostática, entre otros)
- disartria y fluidez en el habla
- trastornos de la cognición (incluyendo la progresión a demencia), pensamiento, estado de ánimo y comportamiento

En una forma de realización, se administra al sujeto o al paciente una cantidad efectiva de la

25 partícula viral (o vector viral) como se describe anteriormente por vía intraparenquimatosa, intracerebral, intracerebroventricular (icv), intratecal o intravenosa.

En algunas formas de realización, en el caso de la enfermedad de Parkinson, en particular en el caso de la enfermedad de Parkinson esporádica, la zona diana está representada por cualquier área del cerebro que muestre acumulación de alfa-sinucleína, en particular la sustancia negra

30 pars compacta y la corteza cerebral. Por lo tanto, una cantidad terapéuticamente efectiva de dicha partícula viral o vector viral se administra preferiblemente por vía intraparenquimatosa, más preferiblemente a la zona cerebral de la sustancia negra pars compacta y/o los núcleos

caudados-putamen. En una forma de realización, la vía intraparenquimatosa puede facilitar la administración local preferida a SNc en comparación con otra zona del cerebro.

Tal como se utiliza en la presente, una "administración local preferida a SNc" no significa que todas las partículas virales o vectores virales se administren a SNc, sino que la mayoría, por ejemplo, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70% o al menos 80% (vg) de las partículas virales se administran o a la zona de SNc o a cualquier otra zona del cerebro inervada por las neuronas SNc.

Con la administración en el espacio cerebroespinal, la transducción neuronal depende de la dinámica de la circulación del líquido cefalorraquídeo, por lo que se espera que ocurra (1) en las áreas periventriculares, es decir, en áreas muy cercanas a los ventrículos cerebrales, (2) de forma no específica, es decir, que las neuronas serán transducidas por difusión ya sea desde los ventrículos o desde el espacio subaracnoideo, y se espera que se observe un marcado fuerte en las capas corticales superiores I-IV (por ejemplo, por difusión desde el espacio subaracnoideo) y (3) en áreas cerebrales tales como el cerebelo y el hipocampo que no están conectadas al putamen. La transducción desde el sistema ventricular de neuronas de zonas cerebrales profundas como la sustancia negra sería muy improbable, teniendo en cuenta que la sustancia negra está situada lejos de los ventrículos, por lo que es muy difícil de ser transfectada mediante difusión pasiva.

A diferencia de la administración en el espacio cefalorraquídeo, la administración de un vector viral en los núcleos caudados-putamen presenta varias ventajas, tal como una transducción específica de neuronas situadas en la corteza cerebral, tálamo, amígdala, sustancia negra pars compacta y núcleos del rafe dorsal que inervan el sitio de inyección y la propagación retrógrada específica de los circuitos en las áreas del cerebro conocidas por inervar el putamen, por ejemplo, en la capa V de las zonas corticales que se proyectan hacia el putamen, sin propagación retrógrada a zonas inesperadas (por ejemplo, la falta de transporte retrógrado a zonas conocidas por no inervar el putamen).

Así, la vía intraparenquimatosa puede facilitar la administración local de una partícula viral a los núcleos caudados-putamen, facilitando así la diseminación retrógrada de un transgén a cualquier área del cerebro que inervara el sitio de inyección.

En una forma de realización preferida, se puede administrar una partícula viral al sujeto humano o al paciente por vía intraparenquimatosa a los núcleos caudados-putamen, en un volumen

comprendido dentro de un rango de 50 a 1000 μL , preferiblemente de 200 a 700 μL por putamen, en una concentración comprendida preferiblemente dentro del rango de 10^{13} - 10^{14} vg/mL (vg: genomas virales, por sus siglas en inglés). En una forma de realización particular, dicha partícula viral se administra en un débito de inyección comprendido dentro del rango de 0,5 a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. preferiblemente durante 2 a 6 horas. Un débito de inyección tan alto de la partícula viral aumenta la estabilidad del virus y permite una mejor gestión de los pacientes.

En ciertas formas de realización, dicha partícula viral está seleccionada entre las partículas rAAV, incluyendo preferiblemente las proteínas de cápside seleccionadas del grupo que consiste en: serotipos AAV2, AAV5, AAV9, AAV-MNM004, AAV-MNM008, y AAV-TT.

- 10 En ciertas formas de realización, dicha partícula viral es AAVretro que incluye proteínas de cápside seleccionadas de los siguientes serotipos variantes: AAV2-retro, AAV-MNM004, AAV-MNM008 y AAV-TT.

- 15 En una forma de realización, la partícula AAV-TT puede administrarse al sujeto humano o al paciente por vía intraparenquimatosa a los núcleos caudados-putamen, en un volumen comprendido dentro de un rango de 50 a 1000 μL , preferiblemente de 200 a 700 μL por putamen, en una concentración comprendida preferiblemente dentro el rango de 10^{13} - 10^{14} vg/mL (vg: genomas virales). En una forma de realización particular, dicha partícula viral se administra en un débito de inyección comprendido dentro del rango de 0,5 a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. preferiblemente durante 2 a 6 horas.

- 20 En otra forma de realización, se puede administrar una partícula AAV-9 al sujeto humano o al paciente por vía intraparenquimatosa a los núcleos caudados-putamen, en un volumen comprendido dentro un rango de 50 a 1000 μL , preferiblemente de 200 a 700 μL por putamen, en una concentración comprendida preferiblemente dentro del rango de 10^{13} - 10^{14} vg/mL (vg: genomas virales). En una forma de realización particular, dicha partícula viral se administra en un débito de inyección comprendido dentro del rango de 0,5 a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. preferiblemente durante 2 a 6 horas.

En una forma de realización, la vía intraparenquimatosa puede facilitar la administración local preferida de un AVV a los núcleos caudados-putamen, facilitando así la diseminación retrógrada del transgén GBA1 a cualquier zona del cerebro que inervara el sitio de inyección.

La presente descripción se refiere a una partícula viral, preferiblemente una partícula AAV que comprende el transgén GBA1, de acuerdo con la presente descripción, para uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa tal como sinucleinopatías, en donde dicha partícula viral se administra por vía intraparenquimatosa a los núcleos caudados-putamen.

- 5 En una forma de realización preferida, una partícula viral AAV de acuerdo con la descripción puede administrarse al sujeto humano o al paciente para el tratamiento de sinucleinopatías, tal como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Gaucher neuronopática, por vía intraparenquimatosa a los núcleos caudados-putamen, en un volumen comprendido dentro de un rango de 50 a 1000 μL , preferiblemente de 200 a 700 μL por putamen, en una concentración
10 comprendida preferiblemente dentro del rango de 10^{13} - 10^{14} vg/mL (vg: genomas virales). En una forma de realización particular, dicha partícula viral se administra en un débito de inyección comprendido dentro del rango de 0,5 a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. preferiblemente durante 2 a 6 horas.

- En una forma de realización particular, un AAV-TT de acuerdo con la presente descripción puede administrarse al sujeto o paciente humano para el tratamiento de sinucleinopatías, tal
15 como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Gaucher neuronopática por vía intraparenquimatosa a los núcleos caudados-putamen.

- Dicha partícula AAV-TT de acuerdo con la descripción puede administrarse al sujeto o paciente humano para el tratamiento de sinucleinopatías, tal como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Gaucher neuronopática por vía intraparenquimatosa hasta los núcleos caudados-
20 putamen, en un volumen comprendido en un rango de 50 a 1000 μL , preferiblemente de 200 a 700 μL por putamen, en una concentración comprendida preferiblemente en el rango de 10^{13} - 10^{14} vg/mL (vg: genomas virales). En una forma de realización particular, dicha partícula viral se administra en un débito de inyección comprendido dentro del rango de 0,5 a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. preferiblemente durante 2 a 6 horas.

- 25 En una forma de realización preferida, se proporciona una partícula recombinante del virus adeno-asociado (rAAV) que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende un transgén que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 7 11, 12 y 19 o una secuencia de nucleótidos que codifica glucocerebrosidasa humana que comprende SEQ ID NO: 5, 6, 8, 17 o 18, en donde dicho constructo de ácido
30 nucleico comprende además un promotor ligado operativamente a dicho transgén, en donde dicha partícula rAAV incluye proteínas de cápside AAV-TT que comprenden una secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o una secuencia que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14, para uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa tal como sinucleinopatías, preferiblemente la enfermedad de Gaucher (tal como la enfermedad de Gaucher neuronopática) o EP (tal como EP esporádica), en donde dicha partícula rAAV se administra por vía intraparenquimatosamente a los núcleos caudados-putamen, preferiblemente en un volumen comprendido en un rango de 50 a 1000 μ L, preferiblemente de 200 a 700 μ L por putamen, a una concentración comprendida preferiblemente en el rango de 10^{13} - 10^{14} vg/mL (vg: genomas virales). En una forma de realización particular, dicha partícula viral se administra en un débito de inyección comprendido dentro del rango de 0,5 a 5 μ L/min. preferiblemente durante 2 a 6 horas.

En forma de realización preferida adicional, la presente descripción se relaciona con una partícula viral que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende:

- a) un transgén que codifica glucocerebrosidasa humana; en donde dicho transgén comprende SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 o 19 (preferiblemente SEQ ID NO: 19) o una secuencia que codifica glucocerebrosidasa humana, en donde la glucocerebrosidasa humana comprende SEQ ID NO: 5, 6, 8, 17 o 18 (preferiblemente SEQ ID NO: 5 u 8);
- b) un promotor ligado operativamente a dicho transgén y en donde dicho promotor preferiblemente permite la expresión de dicho transgén al menos en células neuronales y microgliales de la sustancia negra pars compacta (SNc); en donde dicho promotor es preferiblemente un promotor CAG que comprende SEQ ID NO: 9 o 21, o un promotor GusB que comprende SEQ ID NO: 2 o 20, o un promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27 o un promotor hSyn que comprende SEQ ID NO: 13;
- c) una secuencia señal de poliadenilación, preferiblemente una secuencia señal de poliadenilación que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 3, preferiblemente SEQ ID NO: 28;

en donde dicha partícula viral es una partícula recombinante de virus adeno-asociado (rAAV), preferiblemente que incluye proteínas de cápside de AAV-TT, y más preferiblemente que comprende SEQ ID NO: 14 o una secuencia que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14;

en donde dicho constructo de ácido nucleico está comprendido en un vector viral que además comprende una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR, preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR de un virus adeno-asociado, más preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR del serotipo AAV2, y en donde cada una de las secuencias 5'ITR y 3'ITR, independientemente, comprenden o consisten en secuencias SEQ ID NO: 15 o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16, en donde preferiblemente 5'ITR comprende SEQ ID NO: 15 y 3'ITR comprende SEQ ID NO: 16; en donde dicha partícula viral se utiliza para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa tal como sinucleinopatías, preferiblemente la enfermedad de Gaucher (como la enfermedad de Gaucher neuronopática) o EP (tal como EP esporádica), en donde dicha partícula rAAV se administra por vía intraparenquimatosa a los núcleos caudados-putamen, preferiblemente en un volumen comprendido dentro de un rango de 50 a 1000 μ L, preferiblemente 200 a 700 μ L por putamen, a una concentración comprendida preferiblemente dentro del rango de 10^{13} - 10^{14} vg/mL (vg: genomas virales).

En una forma de realización particular, dicha partícula viral es administrada en un débito de inyección comprendido dentro del rango de 0,5 a 5 μ L/min. preferiblemente durante 2 a 6 horas.

Además, en una forma de realización adicional preferida, se proporciona un método para tratar sinucleinopatías, preferiblemente la enfermedad de Gaucher (como la enfermedad de Gaucher neuronopática) o EP (tal como EP esporádica) a un sujeto que lo necesita, dicho método comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula viral que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende:

- a) un transgén que codifica glucocerebrosidasa humana; en donde dicho transgén comprende SEQ ID NO: 1, 7, 11, 12 o 19 (preferiblemente SEQ ID NO: 19) o una secuencia que codifica glucocerebrosidasa humana, en donde la glucocerebrosidasa humana comprende SEQ ID NO: 5, 6, 8, 17 o 18 (preferiblemente SEQ ID NO: 5 u 8);
- b) un promotor ligado operativamente a dicho transgén y en donde dicho promotor preferiblemente permite la expresión de dicho transgén al menos en células neuronales y microgliales de la sustancia negra pars compacta (SNc); en donde dicho promotor es preferiblemente un promotor CAG que comprende SEQ ID NO: 9 o 21, o un promotor GusB que comprende SEQ ID NO: 2 o 20 o un

promotor JeT que comprende o consiste en SEQ ID NO: 27 o un promotor hSyn que comprende SEQ ID NO: 13;

- c) una secuencia señal de poliadenilación, preferiblemente una secuencia señal de poliadenilación que comprende o consiste en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 3, preferiblemente SEQ ID NO: 28;

en donde dicha partícula viral es una partícula recombinante de virus adeno-asociado (rAAV), preferiblemente que incluye proteínas de cápside de AAV-TT, y más preferiblemente que comprende SEQ ID NO: 14 o una secuencia que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, preferiblemente 98,5%, más preferiblemente 99% o 99,5% de identidad con SEQ ID NO: 14; en donde dicho constructo de ácido nucleico está comprendido en un vector viral que además comprende una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR, preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR de un virus adeno-asociado, más preferiblemente una secuencia 5'ITR y una secuencia 3'ITR del serotipo AAV2, y en donde cada una de las secuencias 5'ITR y 3'ITR, independientemente, comprenden o consisten en secuencias SEQ ID NO: 15 o 16 o una secuencia que tiene al menos 80% o al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 15 y/o 16, en donde preferiblemente 5'ITR comprende SEQ ID NO: 15 y 3'ITR comprende SEQ ID NO: 16; en donde dicha partícula de rAAV se administra por vía intraparenquimatosamente a los núcleos caudados-putamen, preferiblemente en un volumen comprendido dentro de un rango de 50 a 1000 μ L, preferiblemente 200 a 700 μ L por putamen, a una concentración comprendida preferiblemente en el rango de 10^{13} - 10^{14} vg/mL (vg: genomas virales).

En una forma de realización particular, dicha partícula viral es administrada en un débito de inyección comprendido dentro del rango de 0,5 a 5 μ L/min. preferiblemente durante 2 a 6 horas. En otra forma de realización, un AAV-9 de acuerdo con la presente descripción puede ser administrado al sujeto humano o al paciente para el tratamiento de sinucleinopatías, tal como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Gaucher neuronopática, por vía intraparenquimatosamente a los núcleos caudados-putamen.

Dicha partícula AAV-9 de acuerdo con la descripción puede administrarse al sujeto humano o al paciente para el tratamiento de sinucleinopatías, como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Gaucher neuronopática por vía intraparenquimatosamente hasta los núcleos caudados-putamen, en un volumen comprendido dentro de un rango de 50 a 1000 μ L, preferiblemente de 200 a 700 μ L por putamen, en una concentración comprendida preferiblemente en el rango de 10^{13} - 10^{14} vg/mL (vg: genomas virales). En una forma de realización particular, dicha partícula

viral se administra en un débito de inyección comprendido dentro del rango de 0,5 a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. preferiblemente durante 2 a 6 horas.

La cantidad terapéuticamente efectiva del producto de la descripción, o la composición farmacéutica que lo comprende, puede variar según factores como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del producto o de la composición farmacéutica para provocar una respuesta deseada en el individuo. Los regímenes de dosis pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

Una cantidad terapéuticamente efectiva es también típicamente aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del producto o composición farmacéutica es superado por los efectos terapéuticos beneficiosos.

En el caso de un sujeto determinado, los regímenes de dosis específicos pueden ajustarse a lo largo del tiempo según las necesidades individuales y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Los rangos de dosis establecidos en la presente son solo a modo de ejemplo y no limitan los rangos de dosis que pueden ser seleccionados por los médicos.

En una forma de realización, una partícula viral AAV de acuerdo con la descripción puede administrarse al sujeto humano o al paciente para el tratamiento de sinucleinopatías, tal como la enfermedad de Parkinson esporádica o la enfermedad de Gaucher neuronopática, en una cantidad o dosis comprendida dentro del rango de 10^8 - 10^{14} vg/kg (vg: genomas virales; kg: peso corporal del sujeto o paciente). En una forma de realización más particular, la partícula viral AAV se administra en una cantidad comprendida dentro del rango de 10^9 - 10^{13} vg/kg. En una forma de realización más particular, la partícula viral del AAV se administra en una dosis de al menos 10^{10} - 10^{12} vg/kg en un sujeto humano.

Además, pueden administrarse múltiples dosis de dichas partículas virales a un sujeto humano de manera simultánea o secuencial, en particular para asegurar una distribución homogénea del vector en la zona de suministro, por ejemplo, los núcleos de la sustancia negra pars compacta y/o los núcleos caudado-putamen. Típicamente, pueden administrarse 3, 4, 5 o más inyecciones de una dosis de partículas virales al mismo tiempo en la zona de suministro, por ejemplo, la sustancia negra pars compacta y/o los núcleos caudados-putamen de un sujeto humano, por ejemplo, por vía intraparenquimatosa.

Kit

En otro aspecto, la descripción se refiere además a un kit que comprende un constructo de ácido nucleico, vector viral, célula hospedadora, partícula viral o composición farmacéutica tal como se describe anteriormente en uno o más contenedores. El kit puede incluir instrucciones o materiales de embalaje que describen cómo administrar a un paciente el constructo de ácido nucleico, vector viral, partícula viral, célula hospedadora o composición farmacéutica contenida en el kit. Los recipientes del kit pueden ser de cualquier material adecuado, por ejemplo, vidrio, plástico, metal, etc., y de cualquier tamaño, forma o configuración apropiados. En ciertas formas de realización, los kits pueden incluir una o más ampollas o jeringas que contienen los productos de la invención en una forma líquida o de solución adecuadas.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo ilustrativo y no pretenden ser limitantes de la presente descripción.

EJEMPLOS

Ensayo de diseminación *in vivo* para ensayar y comparar AAV con transporte retrógrado

Se preparó un rAAV-GFP de ensayo utilizando métodos estándar para producir rAAV. El rAAV-GFP de ensayo utilizó un constructo de ácido nucleico con una secuencia de codificación de GFP como el transgén bajo el control del promotor CAG, y con ITRs de AAV2, estando dicho constructo de ácido nucleico empaquetado con proteínas de cápside del serotipo AAV para ser ensayado en cuanto a su propiedad de transporte retrógrado.

El ensayo de diseminación *in vivo* incluyó una primera etapa de inyección de dicho rAAV-GFP de ensayo mediante inyección intraparenquimatosa de dicho rAAV-GFP en el putamen postcomisural de un primate no humano.

Luego, el ensayo incluyó una etapa de recuento del número de neuronas que expresan GFP en la corteza cerebral, sustancia negra, amígdala y núcleos intralaminares caudados un mes después de la inyección. El recuento de células se realizó aprovechando Aiforia™, una toma de imágenes digitales de portaobjetos completos y un algoritmo de redes neuronales convolucionales profundas (CNN, por sus siglas en inglés) diseñado para el recuento automático no sesgado de células teñidas por inmunoperoxidasa en muestras de tejido cerebral (Penttinen et al., European Journal of Neuroscience 2018; 48:2354-2361).

Las neuronas que expresan GFP se visualizaron mediante manchas de inmunoperoxidasa, usando anticuerpos anti-GFP. Las neuronas que expresan GFP fueron automáticamente contadas en todo el cerebro de los primates no humanos inyectados. Una ubicación preferencial de las neuronas positivas a la GFP ocurrió en las capas profundas de la corteza cerebral (por ejemplo, las capas V y VI), como se ilustra en las figuras 20 y 23. Además de las áreas corticales, se cuantificaron las neuronas que expresan GFP en todas las áreas cerebrales que inervan el putamen postcomisural inyectado, en particular la sustancia negra pars compacta, amígdala y núcleos caudados intralaminares (figuras 20 y 23).

1. Estudios en ratones:

Se inyectaron ratones de tipo salvaje ($n = 11$) bilateralmente en SNc mediante cirugía estereotáxica con AAV serotipo 9 recombinante que codifica la forma mutada de alfa-sinucleína humana bajo control de un promotor de sinapsina neurona-específico (rAAV2/9-SynA53T). Cada SNc recibió 1,0 microlitros de $1,36 \times 10^{13}$ de la suspensión viral. Una vez que los procesos neurodegenerativos ya estaban en curso, pero antes de alcanzar un punto de no retorno (por ejemplo, 4 semanas después del suministro de rAAV2/9-SynA53T), se suministró dentro de la SNc derecha un AAV9 recombinante que codifica para el gen GBA1 bajo el control de un promotor constitutivo GusB (denominado indistintamente en los ejemplos y figuras como rAAV9-GBA1 o rAAV2/9-GBA1). (1,0 microlitros de $1,25 \times 10^{13}$ de la suspensión viral), junto con un rAAV9 control vacío que no codifica para ningún transgén (denominado indistintamente en los ejemplos y figuras como rAAV9-nulo o r-AAV2/9-nulo) inyectado en la SNc izquierda. Cuatro semanas más tarde (por ejemplo, ocho semanas después del suministro inicial de rAAV2/9-SynA53T), se sacrificaron los animales y se procesaron para el análisis neuropatológico. El plan experimental realizado se resume a continuación (Figura 3).

El análisis de Western Blot (véase la Figura 4) realizado en una cohorte adicional de 5 ratones mostró (i) una mayor expresión de los niveles de la proteína GCasa en la SNc derecha (por ejemplo, la que fue inyectada con rAAV2/9-GBA1) y (ii) una clara reducción de los niveles de proteína alfa-sinucleína en la SNc derecha.

Datos neuropatológicos:

El análisis neuropatológico en profundidad realizado reveló que (1) el aumento de GCasa mediado por rAAV2/9-GBA1 dio como resultado una eliminación (*clearance*) casi completa de alfa-sinucleína (datos no mostrados). (2) la eliminación (*clearance*) de alfa-sinucleína

también comprende formas fosforiladas (por ejemplo, agregados) de alfa-sinucleína, junto con un evidente efecto neuroprotector ejercido sobre las neuronas dopaminérgicas en consonancia con el aumento de los niveles de expresión de la GCasa (datos no mostrados). (3) La estimación estereológica no sesgada de la densidad de neuronas positivas para tirosina en la SNc mostró una diferencia estadísticamente muy significativa al comparar la SNc izquierda versus la SNc derecha. En un seguimiento de 8 semanas después del suministro de rAAV2/9-SynA53T en la SNc izquierda, se observó aproximadamente un 55% de muerte neuronal, en contraste con un 24% de muerte neuronal que se observó en la SNc derecha, es decir, la tratada con rAAV2/9-GBA1 (Figura 5). (4) Los fenómenos pro-inflamatorios impulsados por microgliales se atenuaron en la SNc derecha al administrar rAAV2/9-GBA1. Tan pronto como las neuronas dopaminérgicas comenzaron a expresar alfa-sinucleína, las células microgliales cambiaron de fenotipo y envolvieron a las neuronas que expresaban alfa-sinucleína, probablemente en un intento de aislar estas neuronas del entorno. Este cambio en el fenotipo morfológico de las células microgliales se revierte a la morfología normal con el aumento de la GCasa mediada por AAV (Datos no mostrados). El análisis de los fenotipos microgliales mediante la comparación de los lados tratados frente a los no tratados de la SNc se ha llevado a cabo utilizando anticuerpos contra la molécula 1 adaptadora de unión a calcio ionizado (Iba1), una proteína de unión a calcio específica de microglías y macrófagos que está implicada en el fruncido (*ruffling*) de la membrana y la fagocitosis en la microglía activada.

El conjunto de los datos obtenidos sugiere un efecto terapéutico positivo de AAV2/9-GBA1, incluso considerando que este vector terapéutico es del mismo serotipo que el utilizado con propósitos de modelos de enfermedades. En otras palabras, el efecto terapéutico obtenido no se ve afectado por una inyección previa de un vector viral con el mismo serotipo.

2. Estudios en primates no humanos (NHP, por sus siglas en inglés) con rAAV2/9-GBA1:

Los primates no humanos de tipo salvaje (*Macaca fascicularis*, n = 4) se inyectaron bilateralmente en la mitad caudada de la SNc mediante cirugía estereotáxica con un AAV de serotipo 9 recombinante que codifica para la forma mutada de alfa-sinucleína humana bajo el control de un promotor de sinapsina neurona-específico (rAAV2/9-SynA53T). Cada SNc recibió dos depósitos de 5,0 microlitros cada uno de $1,36 \times 10^{13}$ de la suspensión viral, espaciados 2 mm en dirección rostrocaudal en un intento de cubrir toda la extensión de la SNc caudada. Una vez que los procesos neurodegenerativos ya estaban en curso, pero antes de llegar a un punto de no retorno (por ejemplo, 4 semanas después del suministro de rAAV2/9-

SynA53T), se suministró dentro de la SNc izquierda un AAV9 recombinante que codifica para el gen GBA1 bajo el control de un promotor constitutivo GusB (rAAV2/9-GBA1) (1,0 microlitro de $1,25 \times 10^{13}$ de la suspensión viral), junto con un rAAV9 de control vacío que no codifica para ningún transgén (r-AAV2/9-nulo) inyectado en la SNc derecha. 8 semanas después (por ejemplo, 12 semanas después del suministro inicial de rAAV2/9-SynA53T), se sacrificaron los animales y se procesaron para el análisis neuropatológico. El plan experimental realizado se resume a continuación (Figura 6).

Estudios microPET de neuroimagen:

Se llevaron a cabo estudios MicroPET en todos los animales a intervalos regulares, que comprendían un escaneo en la línea de base, seguido de escaneos consecutivos realizados uno, dos y tres meses después de la entrega bilateral de rAAV2/9-SynA53T en la SNc (por ejemplo, uno y dos meses después de la inyección de los vectores virales rAAV2/9-GBA1 y rAAV2/9-nulo). El radiotrazador elegido para estos experimentos fue la 11c-dihidrorotrabenzina, un ligando selectivo de VMAT2 que permite la adquisición de imágenes nítidas con alta reproducibilidad. Los resultados obtenidos mostraron que el potencial de unión del radiotrazador medido en el putamen postcomisural izquierdo es mayor que el observado en el putamen postcomisural derecho (como se muestra en la Figura 7).

Datos neuropatológicos:

El análisis neuropatológico realizado reveló que (1) el aumento mediado por rAAV2/9-GBA1 de GCasa reduce la carga de alfa-sinucleína y ejerce una significativa neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas (TH+) en la SNc, junto con una innervación preservada del putamen postcomisural caudado localizado ipsilateralmente a la SNc izquierda inyectada con el rAAV2/9-GBA1, como se muestra en las secciones coronales del cerebro de NHP tomadas a nivel del putamen postcomisural y los núcleos caudados y el mesencéfalo, con manchas inmunohistoquímicas para tirosina hidroxilasa (datos no mostrados). (2) la estimación estereológica no sesgada de la densidad de las neuronas positivas para tirosina en la SNc mostró una diferencia estadísticamente muy significativa cuando se comparó la SNc izquierda con la derecha. En un seguimiento de 12 semanas posteriores al suministro de rAAV2/9-SynA53T en la SNc derecha, se observó aproximadamente un 39% de muerte neuronal, en contraste con un 15% de muerte neuronal que se observó en la SNc izquierda, es decir, la tratada con rAAV2/9-GBA1 (Figura 8). (3) Se observó una propagación transneuronal similar a prion de alfa-

sinucleína mutada en varias áreas cerebrales de la corteza frontal derecha, donde se observó una cantidad moderada de neuronas piramidales que expresaban alfa-sinucleína después de 3 meses posteriores al suministro de rAAV2/9-SynA53T. Lo más importante es que el aumento de la actividad de GCasa en la SNc izquierda, mediada por AAV, redujo la carga de alfa-sinucleína, impidiendo así la propagación transneuronal de alfa-sinucleína. En particular, la detección inmunohistoquímica de alfa-sinucleína muestra que tres meses de sobreexpresión de alfa-sinucleína mutada mediada por el AAV dio lugar a la propagación transneuronal de los agregados de alfa-sinucleína. Con el suministro de rAAV2/9-SynA53T en la SNc derecha, se observó una alta densidad de fibras positivas para sinucleína que corrían a través del haz cerebral anterior medio, lo que dio lugar a la aparición de un número moderado de neuronas piramidales que mostraban una inmunorreactividad de alfa-sinucleína a lo largo de varias áreas cerebrales de la corteza frontal. Por el contrario, después de dos meses de aumento de la actividad de la GCasa en la SNc izquierda, mediada por AAV, la densidad de las fibras positivas para sinucleína observadas viajando a través del haz cerebral anterior medio se redujo claramente y, de hecho, nunca se observaron neuronas marcadas de segundo orden en la corteza frontal (datos no mostrados). (4) Los fenómenos pro-inflamatorios impulsados por microglía se atenuaron en la SNc izquierda, es decir, la tratada con rAAV2/9-GBA1 (datos no mostrados). El análisis de los fenotipos microgliales mediante la comparación de los lados tratados versus no tratados de la SNc se ha llevado a cabo utilizando anticuerpos contra el complejo de histocompatibilidad mayor clase II (MHC-II), un marcador específico para fenotipos microgliales activados (por ejemplo, las células microgliales en reposo carecen de expresión de MHC-II).

Como se mencionó en los estudios con ratones, los datos de los primates no humanos sugieren un efecto terapéutico positivo de AAV2/9-GBA1, incluso teniendo en cuenta que este vector terapéutico es del mismo serotipo que el utilizado con propósito de modelado de enfermedades. En otras palabras, el efecto terapéutico obtenido no se ve afectado por una inyección previa de un virus vector con el mismo serotipo.

3. La diseminación retrógrada de la GCasa dio por resultado la eliminación de alfa-sinucleína fosforilada en toda la corteza cerebral en ratones

Se ha postulado que la alfa-sinucleína podría progresar a través de los circuitos cerebrales de una manera similar a un prion. Este fenómeno explica el curso clínico de la enfermedad, caracterizada inicialmente por síntomas motrices como resultado de los agregados de alfa-

sinucleína localizados en la SNc, progresando posteriormente a síntomas no motrices (demencia y síntomas neuropsiquiátricos) como resultado de la presencia de una sinucleinopatía progresiva que afecta a otras áreas cerebrales distintas de la SNc, en particular la corteza cerebral. A este respecto, cabe señalar que esta sinucleinopatía progresiva, cuando afecta la

5 corteza cerebral, es la principal fuerza impulsora que sostiene la aparición de síntomas de demencia y neuropsiquiátricos en etapas avanzadas de la EP y, por lo tanto, al diseñar alternativas terapéuticas modificadoras de la enfermedad, sería clave encontrar una forma hacer diana con precisión en una sinucleinopatía tan extendida. En otras palabras, teniendo en cuenta que los pacientes con EP en etapas avanzadas de la enfermedad presentarán una sinucleinopatía

10 generalizada a lo largo de varias áreas del cerebro -en particular, la corteza cerebral, entre otras- existe aún una necesidad de encontrar nuevas vías terapéuticas para un producto con amplia difusión en las áreas cerebrales a tratar.

Lo mismo aplica a las sinucleinopatías distintas de la EP, como la DLB, donde el principal sello neuropatológico está representado por la presencia de cuerpos y neuronas de Lewy en la corteza

15 cerebral.

En general, en la actualidad la principal necesidad médica no satisfecha es desarrollar estrategias modificadoras de la enfermedad para EP y las sinucleinopatías relacionadas, con el fin de ralentizar -o incluso idealmente detener- el imparable curso progresivo de estos devastadores trastornos cerebrales. Por lo tanto, cualquier enfoque terapéutico que tenga éxito

20 debería ser preferiblemente eficaz para llevar a cabo la eliminación (*clearance*) de alfa-sinucleína de todo el cerebro, en particular cuando se trata de pacientes con EP en etapas avanzadas de la enfermedad, ya que estos pacientes son los que más probablemente se beneficiarán de los tratamientos destinados a minimizar las tasas de progresión de la enfermedad.

Por lo tanto, los inventores ensayaron primero si las partículas variantes de AAV con transporte retrógrado podrían diseminarse eficientemente desde el área inyectada al área distante, incluyendo en particular áreas corticales.

25

Se inyectaron ratones de tipo salvaje bilateralmente en el estriado mediante cirugía estereotáxica con un AAV2-retro recombinante que codifica para la forma mutada de alfa-sinucleína humana bajo el control de un promotor neuroespecífico de sinapsina (rAAV2retro-SynA53T). Cada estriado recibió 2,0 microlitros de $3,71 \times 10^{12}$ vp/ml de la suspensión viral,

30

para generar además una sinucleinopatía ampliamente diseminada en todas las áreas corticales cerebrales que inervan los estratos inyectados. Cuatro semanas más tarde, se suministró en el estriado izquierdo (2,0 microlitros; $3,71 \times 10^{12}$ vp/ml de la suspensión viral) un AAV2-retro recombinante que codifica para el gen GBA1 bajo el control de un promotor constitutivo GusB (rAAV2retro-GBA1) junto con un rAAV2-retro control vacío que no codifica para ningún transgén (rAAV2-retro-nulo) inyectado en el estriado derecho. Cuatro semanas después (por ejemplo, ocho semanas después del suministro inicial de rAAV2retro-SynA53T), se sacrificaron los animales y se procesaron para el análisis neuropatológico. El plan experimental realizado se resume a continuación (Figura 9).

10 Datos neuropatológicos:

El análisis realizado reveló que el aumento de GCasa mediado por AAV2retro-GBA1 dio como resultado una eliminación (*clearance*) casi completa de la alfa-sinucleína fosforilada en toda la corteza cerebral a nivel del hemisferio cerebral izquierdo (por ejemplo, el situado ipsilateralmente al estriado, que fue inyectado primero con rAAV2retro-SynA53T y después con rAAV2retro-GBA1). Por el contrario, dentro una cantidad de áreas corticales del hemisferio cerebral derecho persiste una sinucleinopatía evidente (por ejemplo, la situada ipsilateralmente al estriado en que se inyectó primero con rAAV2retro-SynA53T y luego con el vector de control rAAV2retro-nulo) (Figura 10).

4. Estudios en primates no humanos (NHP) con rAAV-TT-GBA1:

20 Primates no humanos de tipo salvaje (*Macaca fascicularis*, $n = 4$) fueron inyectados bilateralmente en la mitad caudada de la SNc mediante cirugía estereotáctica con un AAV de serotipo 9 recombinante que codifica la forma mutada de la alfa-sinucleína humana bajo el control de un promotor de sinapsina neurona-específico (rAAV2/9-SynA53T). Cada SNc recibió dos depósitos de 5,0 microlitros cada uno de $1,36 \times 10^{13}$ de la suspensión viral, espaciados 2 mm en dirección rostrocaudal en un intento de cubrir toda la extensión de la SNc caudada. Una vez que los procesos neurodegenerativos ya estaban en curso, pero antes de alcanzar un punto de no retorno (por ejemplo, 4 semanas después del suministro de rAAV2/9-SynA53T), se suministró un AAV-TT recombinante que codifica para el gen GBA1 bajo el control de un promotor constitutivo CAG (rAAV-TT-GBA1) en el putamen postcomisural izquierdo (2 x 10 microlitros de 1×10^{13} de la suspensión viral). Las inyecciones a presión se lograron en pulsos de 0,5 μ L/min. En el primate no humano el débito se ajusta al rango inferior.

Sin embargo, en los ensayos con humanos la alta velocidad de inyección permite la estabilidad del virus, y una mejor gestión de los pacientes y el débito puede variar entre 0,5 μ L y 5 μ L/min. 8 semanas más tarde (por ejemplo, 12 semanas después del suministro inicial del rAAV2/9-SynA53T), se sacrificaron los animales y se procesaron para el análisis neuropatológico. El plan experimental realizado se resume a continuación (Figura 11).

Estudios microPET de neuroimagen:

Se llevaron a cabo estudios MicroPET en todos los animales a intervalos regulares, que comprendían un escaneo en la línea de base, seguida de escaneos consecutivos realizados uno, dos y tres meses después del suministro de rAAV2/9-SynA53T (por ejemplo, uno y dos meses después de la inyección del vector viral rAAV-TT-GBA1). El radiotrazador elegido para estos experimentos fue la 11c-dihidrotetrabenazina (11C-DTBZ), un ligando selectivo de VMAT2 que permite la adquisición de imágenes nítidas con alta reproducibilidad. Los resultados obtenidos mostraron que el potencial de unión del radiotrazador medido en el putamen postcomisural izquierdo era un 24,44% mayor que el observado 1,5 meses antes del suministro de rAAV-TT-GBA1. Los resultados obtenidos se ilustran a continuación en la Figura 12.

Datos neuropatológicos:

El análisis neuropatológico realizado reveló que (1) el aumento mediado por rAAV-TT-GBA1 de la GCasa reduce la carga de alfa-sinucleína y ejerce una significativa neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas (TH+) en la SNc, junto con una intervención preservada del putamen postcomisural caudado localizado ipsilateralmente a la SNc izquierda inyectada con rAAV2/9-GBA1, como se muestra en las secciones coronales del cerebro de NHP tomadas a nivel del putamen postcomisural y los núcleos caudados y el mesencéfalo, con manchas inmunohistoquímicas para tirosina hidroxilasa (datos no mostrados). (2) el recuento automatizado del número de neuronas positivas a tirosina en la SNc mostró una diferencia estadísticamente muy significativa cuando se comparó la SNc izquierda versus la derecha. Tras un seguimiento de 12 semanas después del suministro de rAAV2/9-SynA53T en la SNc izquierda y derecha (por ejemplo, dos meses después del suministro de rAAV-TT-GBA1 en el putamen izquierdo postcomisural), se encontró que el número total de neuronas positivas para tirosina en la SNc izquierda era 22,3% mayor que el número de neuronas positivas para tirosina en la SNc derecha (por ejemplo, la que no fue tratada con el suministro intraputamina de rAAV-TT-GBA1) (Figura 13). La medición automática de la densidad óptica (DO) para la

tinción de TH en el putamen postcomisural izquierdo y derecho de 4 NHPs inyectados con rAAV-TT-GBA1 en el putamen postcomisural izquierdo mostró que la media de DO era 27,42% más baja en el putamen postcomisural derecho que en el izquierdo (siendo este último el que se trató con la administración intraputamina de rAAV-TT-GBA1) (Figura 14). (3)

5 Además, el recuento automatizado del número de neuronas positivas para alfa-sinucleína en la SNc mostró una diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó la SNc izquierda versus la derecha. Tras un seguimiento de 9 semanas después del suministro de rAAV2/9-SynA53T en la SNc izquierda y derecha (por ejemplo, 1,5 meses después del suministro de rAAV-TT-GBA1 en el putamen izquierdo postcomisural), se determinó que el número total de
10 neuronas que expresaban alfa-sinucleína en la SNc izquierda era 48,33 % inferior al número de neuronas positivas para alfa-sinucleína en la SNc derecha (por ejemplo, la que no fue tratada con la administración intraputamina de rAAV-TT-GBA1) (Figura 15).

El porcentaje de neuronas que expresan alfa-sinucleína es consistentemente menor en la SNc izquierda (por ejemplo, la situada ipsilateralmente al putamen postcomisural inyectado con
15 AAV-TT-GBA1) que en la SNc derecha (lado no tratado) (Figura 16).

Como se mencionó en los estudios con ratones, los datos de los primates no humanos sugieren un efecto terapéutico positivo de rAAV-TT-GBA1.

5. Biodistribución y rendimiento comparativo de AAV-TT-GFP y AAV9-GFP en el cerebro de un primate no humano

20 5.1 Experimentos realizados

Se inyectaron hasta cuatro primates macho adultos de *Macaca fascicularis* (peso corporal entre 3,0 y 3,4 Kg) con 5 µl de AAV-TT-GFP (1×10^{13} vg/mL; 2 animales) o con 5 µl de AAV9-GFP (1×10^{13} vg/mL; 2 animales). Ambos AAV codificaban para GFP bajo el control de un promotor CAG.

25 Los AAV se administraron mediante cirugía estereotáxica asistida por ventriculografía aprovechando una jeringa de Hamilton. Las inyecciones a presión se lograron en pulsos de 0,5 µL/min. En el primate no humano el débito se ajustó al rango más bajo. Sin embargo, en los ensayos con humanos la alta velocidad de inyección permite la estabilidad del virus, y una mejor gestión de los pacientes y el débito puede variar entre 0,5 µL y 5µL/min. Una vez que se
30 completó la administración de AAV, la aguja de inyección se dejó en su lugar durante 10

minutos adicionales para minimizar el reflujo de AAV a través del tracto de inyección (Figura 17). Justo antes de la cirugía, se recogieron muestras de fluidos corporales (sangre y LCR) y se almacenaron a -80°C.

Los animales fueron sacrificados un mes después del suministro del AAV por medio de perfusión intracardiaca. Antes del sacrificio, se recogieron muestras de fluidos corporales (sangre y LCR) y se almacenaron a -80°C. Las perfusiones consistían en una solución salina de Ringer seguida de una solución tamponada de paraformaldehído (3.000 ml/animal) y de 1.000 ml de una solución crioprotectora hecha de glicerina 10% y DMSO 1% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,3.

Durante la perfusión con la solución de Ringer, se tomaron muestras de tejido fresco (por ejemplo, sin fijar) de varios órganos periféricos, entre ellos corazón, pulmón, hígado, bazo, páncreas, riñón, testículos y músculo estriado. Las muestras se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80°C.

Una vez completada la perfusión, se extrajo el cerebro del cráneo y se prepararon bloques cerebrales de aproximadamente 1 cm de ancho que se almacenaron en una solución crioprotectora compuesta por glicerina 20% y DMSO 2% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,3 (se eliminó la materia pía de todos los bloques cerebrales). Se obtuvieron muestras de órganos periféricos fijos (corazón, pulmón, hígado, bazo, páncreas, riñón, testículos, ganglios retroperitoneales, glándula pineal y músculo estriado) y se embebieron en parafina.

Después de un mínimo de 48 h en la solución crioprotectora, se prepararon 10 series de secciones coronales de cerebro congeladas (40 µm de espesor) en un micrótopo de deslizamiento y se recogieron en la solución crioprotectora. Se procesó una serie entera de secciones (por ejemplo, que comprende cada sección décima del cerebro de mono) para la detección de GFP por inmunoperoxidasa aprovechando un anticuerpo policlonal primario producido en conejo. Con la incubación con una IgG de cabra anti-conejo biotinilada, las secciones se incubaron con un kit ABC y finalmente se tiñeron con una solución de H₂O₂-DAB. Una vez que se completó la tinción, las secciones flotantes libres se montaron en portaobjetos de microscopio, se secaron al aire durante la noche y se cubrieron con Entellan. Las secciones teñidas fueron escaneadas usando un escáner de diapositivas Aperio CS2 (Leica) y procesadas usando un software dedicado.

5.2 Resultados

El marcado con AAV-TT-GFP o con AAV9-GFP solo se encontró en todos los territorios cerebrales conocidos por inervar el putamen postcomisural, mientras que no se observó ni una sola neurona marcada en los territorios cerebrales que no inervaban el sitio de inyección (por ejemplo, hipocampo, cerebelo, etc.). Además, el marcado retrógrado obtenido era de morfología "similar a la de Golgi", es decir, el marcado neuronal no se limitaba a la célula somata y, de hecho, se extendía a las dendritas distales, en particular en lugares de toda la corteza cerebral. Cabe señalar también que a veces incluso son visibles pequeños procesos dendríticos tales como espinas dendríticas.

Eventos en el sitio de inyección

Ambas inyecciones de AAV-TT-GFP fueron exactas y correctamente ubicadas dentro de los límites del putamen postcomisural. Los tamaños obtenidos en los sitios de inyección fueron consistentemente más pequeños para AAV-TT-GFP que para AAV9-GFP, cubriendo 28,01% y 21,83% en los animales M295 y M296 (inyectados con AAV-TT-GFP), mientras que en los animales inyectados con AAV9-GFP (M297 y M298), 32,46% y 55,86% del putamen postcomisural estaba comprendido dentro de los sitios de inyección, respectivamente (Figura 18). Ambas inyecciones con AAV-TT-GFP mostraron una falta total de captación de AAV a través del tracto de inyección (por ejemplo, ambas son inyecciones muy limpias). En cambio, las inyecciones realizadas con AAV9-GFP mostraron una captación de moderada a alta a través del tracto de inyección, lo que significa que es muy probable que los resultados obtenidos estén contaminados por un etiquetado falso positivo (probablemente particularmente notorio en los territorios corticales) debido a la captación de AAV9-GFP por los tractos de materia blanca situados por encima del putamen postcomisural. Los problemas relacionados con los resultados falsos positivos se ilustran en la Figura 19. Además, el suministro de AAV9-GFP en el animal M297 se ha extendido más allá de los límites del putamen postcomisural, y también incluye una parte sustancial del globo pálido externo (*Globus Palidus*, GPe).

La potencia de la propagación retrógrada

Tanto el número total como las intensidades observadas de las neuronas marcadas de modo retrógrado están directamente relacionados con la extensión de los sitios de inyección. En otras palabras, se espera un mayor número de neuronas GFP+ en los sitios de inyección que cubren territorios más grandes del putamen postcomisural. A este respecto, y además de proporcionar una cuantificación precisa del número de neuronas observadas en cada región de interés, este

número final debe corregirse en función de la extensión del área del putamen postcomisural que está cubierta el sitio de inyección. El número de neuronas se proporciona sobre la base de la cuantificación hecha con Aiforia® (etiquetada como datos "brutos" y "corregidos"). En un intento por comparar adecuadamente el rendimiento de AAV-TT versus AAV9, los datos brutos obtenidos deben normalizarse teniendo en cuenta la extensión del sitio de inyección. En consecuencia, se calculó un factor de corrección basado en el tamaño del sitio de inyección para estimar adecuadamente la propagación retrógrada prevista de cada AAV. Los factores de corrección fueron x3,57 para M295, x4,58 para M296, x3,08 para M297 y x1,79 para M298. Los factores de corrección se utilizaron para generar los datos mostrados en las Figuras 20-25.

10 *Áreas del cerebro que muestran el marcado más fuerte*

En todos los animales (AAV-TT-GFP y AAV9-GFP), el marcado más fuerte se observó en el giro frontal superior y en el giro precentral (Figura 20-21). Otras zonas corticales que muestran consistentemente neuronas GFP+ (aunque en menor medida) son la corteza cingulada anterior, el giro postcentral y el giro insular. Se observó un escaso marcado neuronal en el giro frontal medio, giro frontal inferior, corteza frontal orbital (territorios orbitales frontal, lateral y medial), giro temporal superior, medio e inferior, así como en el lóbulo parietal superior y giro supramarginal. Además, se encontraron consistentemente neuronas GFP+ en la corteza contralateral como representaciones especulares de la corteza ipsilateral (que obviamente contiene un número mucho menor de neuronas GFP+). Los resultados son totalmente consistentes con lo que se esperaba y, de hecho, muy relevantes, teniendo en cuenta que con el suministro de AAV en el putamen postcomisural (los territorios del putamen relacionados con la motricidad), el marcado más fuerte se observó tanto en el giro frontal precentral como en el superior (giro cortical que contiene la corteza motriz primaria y el área motriz suplementaria, respectivamente). En lo que respecta al marcado subcortical, dos estructuras son particularmente pertinentes, a saber, la sustancia negra pars compacta (SNc) y el complejo centromediano-parafascicularis (CM-Pf). Además, la cantidad de neuronas GFP+ observadas en CM-Pf es muy impresionante, aunque es de esperar, teniendo en cuenta que el complejo talámico del CM-Pf es la principal fuente de proyecciones talamostriatales. Además de CM-Pf, también se encontró un escaso marcado en los núcleos talámicos ventral anterior, ventral lateral y ventral posteromedial, los núcleos centrolateral y paracentral intralaminares y el núcleo del rafe dorsal (un pequeño núcleo del tronco encefálico que se sabe es la principal fuente de proyecciones serotoninérgicas al putamen). Además, el maercado observado a nivel del

complejo amigdaloides es inferior al previsto inicialmente para ambos tipos de AVV. Aunque el complejo amigdaloides se ha considerado a menudo como otra fuente de aferentes al putamen (junto con la corteza, tálamo y sustancia negra), los datos obtenidos con AAV-TT y con AAV9 sugieren claramente que la importancia de esta vía anatómica probablemente se haya sobrestimado en estudios anatómicos anteriores.

Sistemas de aferentes estriadas

Aunque el presente estudio no se diseñó con ese fin, la cuantificación realizada permite estimar numéricamente el "peso" de cada uno de los diferentes sistemas de aferentes estriadas, a saber, las vías corticoestriada (ipsi- y contralateral), talamoestriada y nigroestriada. Los datos obtenidos mostraron que las proyecciones corticoestriadas ipsilaterales son, por mucho, las más abundantes (69,37% del total de aferentes estriadas en promedio), seguidas de las neuronas corticoestriadas-proyectoras contralaterales (15,99% del total de aferentes estriadas), luego las proyecciones nigroestriadas (7,99% en promedio) y, por último, las proyecciones talamoestriadas derivadas del complejo talámico centromedio-parafascicular (6,67%). A este respecto, cabe señalar también que, aunque la vía corticoestriada contralateral se ha despreciado a menudo en la mayoría de los estudios que tratan sobre la función y la disfunción de los ganglios basales, esta proyección representa aproximadamente hasta el 16% del total de aferentes estriadas, un porcentaje claramente superior a los relacionados con las proyecciones talamoestriadas y nigroestriadas.

Los resultados obtenidos soportaron un rendimiento superior de AAV-TT-GFP en comparación con AAV9-GFP. Una profunda comparación de los resultados mostró que AAV-TT es un mejor candidato que AAV9. AAV-TT presenta algunas ventajas importantes, en particular cuando se trata de una mayor "potencia" en términos de propagación retrógrada, junto con la falta de captación a través del tracto de inyección. El uso de AAV-TT presenta una completa ausencia de falsos positivos.

6. Comparación del rendimiento de AAV-TT-GBA1 vs. AAV9-GBA1

6.1 Experimentos realizados

Se inyectaron primates no humanos de tipo salvaje (*Macaca fascicularis*, n = 8) (peso corporal entre 4,3 y 10,4 kg) en la sustancia negra pars compacta izquierda y derecha mediante cirugía estereotáxica con AAV2/9-SynA53T. Cada SNc recibió dos depósitos de 5,0 microlitros cada

uno de $1,26 \times 10^{12}$ vg/mL de la suspensión viral, espaciados 1 mm en la dirección rostrocaudal en un intento de cubrir toda la extensión de la SNc caudal (por ejemplo, un total de 4 inyecciones/animal).

6 semanas después del suministro de AAV2/9-SynA53T, un AAV-TT recombinante que codifica para el gen GBA1 bajo el control de un promotor constitutivo CAG (AAV-TT-GBA1) fue suministrado dentro del putamen postcomisural izquierdo (2×10 microlitros de 1×10^{13} vg/mL de la suspensión viral; 4 animales, inyecciones espaciadas 1 mm entre sí en dirección rostrocaudal). 8 semanas después (por ejemplo, 12 semanas después del suministro inicial de AAV2/9-SynA53T), se sacrificaron los animales y se procesaron para el análisis neuropatológico. El plan experimental realizado se resume en la Figura 26. Los AAV se administraron mediante cirugía estereotáxica asistida por ventriculografía aprovechando una jeringa de Hamilton. Las inyecciones a presión se lograron en pulsos de $0,5 \mu\text{L}/\text{min}$. En el primate no humano el débito se ajusta al rango más bajo. Sin embargo, en los ensayos con humanos la alta velocidad de inyección permite la estabilidad del virus, y una mejor gestión de los pacientes y el débito puede variar entre $0,5 \mu\text{L}$ y $5 \mu\text{L}/\text{min}$. Una vez que se completó la administración de AAV, la aguja de inyección se dejó en su lugar durante 10 minutos adicionales para minimizar el reflujo del AAV a través del tracto de inyección.

Se recogieron muestras de fluidos corporales (sangre y LCR) en la línea de base (por ejemplo, antes de las cirugías con AAV9-SynA53T), antes del suministro de los vectores que codifican GBA1 y en el sacrificio.

Se realizaron escaneos microPET con el radiotrazador ^{11}C -dihidrotrabenazina (^{11}C -DTBZ) en la línea de base y a las 4, 8 y 12 semanas posteriores a la inyección de AAV9-SynA53T.

Los animales fueron sacrificados 12 semanas después del suministro de AAV9-SynA53T (por ejemplo, 6 semanas después de la inyección de AAV-TT-GBA1 o AAV9-GBA1) mediante perfusión intracardiaca. Antes del sacrificio, se recogieron muestras de fluidos corporales (sangre y LCR) y se almacenaron a -80°C . Las perfusiones consistían en una solución salina de Ringer seguida de una solución tamponada de paraformaldehído ($3.000 \text{ ml}/\text{animal}$) y de 1.000 ml de una solución crioprotectora hecha de glicerina 10% y DMSO 1% en tampón fosfato $0,1 \text{ M}$, pH 7,3.

Durante la perfusión con la solución de Ringer, se tomaron muestras de tejido fresco (por ejemplo, sin fijar) de varios órganos periféricos, entre ellos corazón, pulmón, hígado, bazo,

páncreas, riñón, testículos y músculo estriado. Las muestras se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80°C.

Una vez completada la perfusión, se retiraron los cerebros de los cráneos y se prepararon bloques cerebrales de aproximadamente 1 cm de ancho que se almacenaron en una solución crioprotectora hecha de glicerina 20% y DMSO 2% en tampón fosfato de 0,1 M, pH 7,3 (se retiró la materia pía de todos los bloques cerebrales). Se obtuvieron muestras de órganos periféricos fijos (corazón, pulmón, hígado, bazo, páncreas, riñón, testículos, ganglios retroperitoneales, glándula pineal y músculo estriado) y se embebieron en parafina (se enviaron a MOTAC).

Tras un mínimo de 48 h en la solución crioprotectora, se hicieron 10 series de secciones coronales de cerebro congeladas (40 µm de espesor) en un micrótomos de deslizamiento y se recogieron en la solución crioprotectora. Se procesó una serie completa de secciones (por ejemplo, que comprendía cada sección 10 del cerebro del mono) para la detección de la tirosina hidroxilasa (TH) mediante inmunoperoxidasa, aprovechando un anticuerpo policlonal primario producido en cabra. Con la incubación con una IgG anti-cabra de burro biotinilada, las secciones se incubaron con un kit ABC y finalmente se tiñeron con una solución de H₂O₂-DAB. Además, otra serie completa de secciones fue procesada para la detección de alfa-sinucleína (α-syn) mediante inmunoperoxidasa aprovechando un anticuerpo monoclonal primario producido en ratón. Tras la incubación con una IgG anti-ratón de burro biotinilada, las secciones se incubaron con un kit ABC y finalmente se tiñeron con una solución de H₂O₂-DAB. Una vez que las tinciones se completaron, las secciones flotantes libres se montaron en portaobjetos de microscopio, se secaron al aire durante la noche y se cubrieron con Entellan. Las secciones teñidas fueron escaneadas usando un escáner de portaobjetos Aperio CS2 (Leica) y procesadas usando un software dedicado.

6.2 Resultados

Se comparó el rendimiento de AAV-TT-GBA1 vs. AAV9-GBA1 para la eliminación (*clearance*) de alfa-sinucleína, así como el potencial efecto neuroprotector del aumento de la GCasa y la remoción de alfa-sinucleína en las neuronas dopaminérgicas con proyección nigroestriada.

Estudios microPET de neuroimagen

Se realizaron escaneos MicroPET con 11C-DTBZ en la línea de base, y 4, 8 y 12 semanas después de la inyección de AAV9-SynA53T. Se calcularon los valores del potencial de unión del radiotrazador a través de las regiones de interés que comprenden toda la extensión rostrocaudal del putamen postcomisural (que suele abarcar entre 5 y 9 secciones diferentes) (Figura 27).

En los animales inyectados con AAV-TT-GBA1, hay una leve mejora en la unión del radiotrazador a las 6 semanas post-suministro de AAV-TT-GBA1 (por ejemplo, 12 semanas post-inyección de AAV9-SynA53T) en comparación con los valores de unión a las 2 semanas de AAV-TT-GBA1 (por ejemplo, solo 6 semanas después de la inyección de AAV9-SynA53T). Los incrementos observados son de 1% (M282), 15% (M280), 22% (M287) y 53% (M283). Cuando se comparan con los valores de unión en la línea de base (por ejemplo, antes de la inducción de la sinucleinopatía), los valores obtenidos para todos los animales se mantuvieron por debajo de los niveles de línea de base (-22% en M280, -24% en M287, -25% en M282 y -32% en M283). Los valores obtenidos para el putamen postcomisural derecho (lado no inyectado) siguieron siendo aproximadamente similares a la línea de base para los animales M280 y M282, mientras que se observó una disminución moderada en los animales M283 y M287.

En cuanto a los animales a los que se les inyectó AAV9-GBA1, los niveles más altos de captación de radiotrazadores se observaron en los animales M281, M284 y M285, sin ningún efecto evidente en el animal M286. Los valores de M281 no son sorprendentes, teniendo en cuenta que a este animal no se le inyectó apropiadamente el AAV9-SynA53T (sustancia negra izquierda y derecha mal dirigida). Aunque M281, M284 y M285 alcanzaron finalmente niveles aproximadamente similares al final del período de seguimiento en comparación con la línea de base, también cabe señalar que también se observaron aumentos similares en el putamen derecho para los mismos animales.

Inervación nigroestriada (densidades ópticas)

Al explicar por qué las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta son tan vulnerables a morir en el contexto de la enfermedad de Parkinson, se ha formulado la hipótesis de que la arquitectura única de las arborizaciones axonales grandes y complejas de las proyecciones nigroestriadas (Matsuda et al, J. Neurosci. ene 2009; 14 29(2): 444-453) pone a las neuronas dopaminérgicas bajo un presupuesto energético tan alto que las hace

particularmente susceptibles a los factores que contribuyen a la muerte celular (Bolam y Pissadaki, *Mov Disord.* oct 2012;27(12):1478-83). De hecho, cabe señalar que, aunque el volumen del estriado ha aumentado aproximadamente 300 veces a partir de las ratas (19,9 mm³) hasta los seres humanos (6.280 mm³), el número de neuronas dopaminérgicas solo ha
5 aumentado 32. En resumen, cuando se trata de estudios neuroprotectores, hasta qué punto se ha preservado la vía nigroestriada merece una gran atención.

Para estos propósitos, se tiñeron de 10 a 12 secciones coronales rostrocaudales igualmente espaciadas que cubrían toda la extensión del putamen postcomisural para la TH y se analizaron
10 más a fondo en cuanto a la densidad óptica (DO). Los datos obtenidos comparando los valores de DO para los niveles de putamen postcomisural izquierdo y derecho se ilustran en las Figuras 28 y 29.

Las diferencias en la densidad óptica izquierda y derecha que reflejan el beneficio terapéutico fueron consistentemente encontradas como más altas a través de toda la extensión rostrocaudal del putamen postcomisural en animales inyectados con AAV-TT-GBA1 que en animales
15 inyectados con AAV9-GBA1.

Efecto neuroprotector de AAV que codifica GBA1 para las neuronas dopaminérgicas

Uno de los principales objetivos de los estudios realizados fue evaluar hasta qué punto el aumento de la GCasa impulsado por AAV podría ejercer un efecto neuroprotector de las neuronas dopaminérgicas, nigroestriadas-proyectoras. Para ello, se analizaron hasta 14
20 secciones coronales teñidas para TH y que cubrían toda la extensión rostrocaudal de la sustancia negra para el recuento de células dopaminérgicas. El análisis se llevó a cabo utilizando el algoritmo de aprendizaje profundo Aiforia®. Los datos obtenidos se ilustran en las Figuras 30 y 31.

Las diferencias entre la izquierda y la derecha que reflejan el beneficio terapéutico fueron
25 consistentemente encontradas como más altas en los animales inyectados con AAV-TT-GBA1 que en los animales inyectados con AAV9-GBA1. De hecho, el beneficio terapéutico de AAV-TT-GBA1 se mantiene a través de la mayor parte de la extensión rostrocaudal de la sustancia negra.

Efecto de AAV que codifica GBA1 para la eliminación (clearance) de alfa-sinucleína

Para evaluar en qué medida la mejora de la actividad de la GCasa mediada por AVV era eficiente para llevar a cabo una notable eliminación (*clearance*) de alfa-sinucleína, se utilizaron 14 secciones coronales teñidas para α -syn y que comprendían toda la extensión rostrocaudal de la sustancia negra izquierda y derecha. El análisis se realizó con Aiforia®. Los datos obtenidos se ilustran en las Figuras 32 y 33.

Las diferencias entre la izquierda y la derecha que reflejan el beneficio terapéutico fueron consistentemente encontradas como mucho más altas en los animales inyectados con AAV-TT-GBA1 que en los animales inyectados con AAV9-GBA1. De hecho, el beneficio terapéutico de AAV-TT-GBA1 se mantiene a través de la mayor parte de la extensión rostrocaudal de la sustancia negra. De hecho, también cabe señalar que el efecto de AAV9-GBA1 en la eliminación (*clearance*) de alfa-sinucleína resultó ser mínimo -si es que lo había- en todos los animales (el animal M281 no se consideró para el análisis debido al mal direccionamiento quirúrgico con AAV9-SynA53T).

Proporciones TH+ / α -syn+

En un intento por evaluar la extensión global de la sinucleinopatía inducida con AAV9-SynA53T, la Figura 34 ilustra las proporciones observadas entre las células TH+ y las células α -syn+. A partir de los datos obtenidos se puede concluir que la sinucleinopatía inducida tuvo un alcance moderado.

Estos datos soportan claramente un rendimiento superior de AAV-TT-GBA1 vs. AAV9-GBA1 en términos de (1) mejor preservación de la innervación nigroestriada, (2) mejor efecto neuroprotector para las neuronas dopaminérgicas y (3) mejor eficacia para la eliminación (*clearance*) de alfa-sinucleína.

7. Secuencias para uso en la práctica de la invención

A continuación, se describen las secuencias para uso en la práctica de la invención (lista no limitante):

SEQ ID NO: 1: Secuencia de nucleótidos que codifican GBA1 humano:

ATGGCTGGCAGTCTTACAGGTCTCCTGCTCCTGCAAGCTGTCTCTTGGGCTTCTGGGGCCAGGCCCTG
TATCCCCAAATCCTTTGGATACTCATCTGTGGTGTGTGTTTGTAAATGCCACTTATTGTGATAGCTTTG

ACCCCCCACCTTTCTGCACTGGGCACCTTTTCAAGGTATGAATCTACCAGGTCTGGGAGGAGGATG
 GAGCTGAGTATGGGGCCCATCCAAGCAAACCATACTGGCACTGGCTTGCTGCTGACACTGCAACCTGA
 ACAGAAAGTTCCAGAAAGTGAAGGGCTTTGGAGGAGCCATGACTGATGCTGCTGCCCTCAATATTTTGG
 CCCTGAGCCCCCTGCTCAGAAATCTCCTTTTGAAATCATACTTCTCTGAGGAGGGAATTGGATACAAT
 5 ATCATCAGGGTGCCAATGGCCTCATGTGACTTTAGTATTAGGACTTACACCTATGCTGATACCCCTGA
 TGATTTCCAGCTGCATAACTTCTCATTGCCTGAGGAGGATACCAAATTGAAGATCCCACTCATTACACA
 GGGCCCTGCAACTGGCTCAGAGACCAGTGTCAATTGCTGGCCTCCCCCTGGACCTCCCCAACTTGGCTC
 AAAACCAATGGGGCTGTCAATGGTAAGGGCTCTCTTAAGGGGCAGCCTGGAGACATTTACCATCAGAC
 CTGGGCCAGGTATTTTGTGAAGTTCCTGGATGCTTATGCTGAGCACAAATTGCAATTTTGGGCTGTTA
 10 CAGCTGAGAATGAACCCTCTGCAGGACTGCTGTCTGGCTATCCTTTCCAGTGCCTGGGCTTTACCCCT
 GAGCATCAGAGGGATTTTATTGCCAGGGACCTGGGACCTACTCTTGCCAATAGCACACACCATAATGT
 GAGGCTTCTGATGCTTGATGACCAGAGACTTCTGCTGCCACACTGGGCCAAGGTTGTCCTGACAGATC
 CTGAGGCTGCCAAGTATGTTTATGGGATTGCTGTGCACTGGTATCTGGACTTCCTTGCTCCAGCTAAG
 GCCACCCTGGGAGAAACACACAGGTTGTTTCCCAATACAATGCTTTTTTGATCAGAGGCCTGTGTGGG
 15 CAGTAAATTTTGGGAGCAGTCTGTTAGGCTGGGGAGCTGGGATAGAGGAATGCAATACTCCCATTCTA
 TCATCACCAATCTGCTCTACCATGTGGTGGGGTGGACTGACTGGAACCTTGCCCTTAACCCTGAGGGT
 GGCCCCAATTGGGTCAGGAATTTTGTGGATAGTCCCATCATTGTGGATATCACCAAGGACACATTCTA
 TAAGCAACCAATGTTCTATCACCTGGGTCACTTTAGTAAGTTTATCCCTGAGGGGTCCCAGAGGGTGG
 GACTGGTGGCTTCCCAGAAGAATGATCTGGATGCTGTGGCCCTGATGCACCCTGATGGCAGTGCTGTG
 20 GTTGTGTTCTCAATAGAAGCTCTAAAGATGTGCCCTTGACCATCAAAGATCCAGCTGTGGGATTTCT
 GGAAACAATTTCCCCTGGTTATAGCATCCACACTTACCTTTGGAGAAGGCAGTGA

SEQ ID NO:2 : secuencia de nucleótidos del promotor nGUSB

ATTCTGCTGGGAAAAGCAAGTGGAGGTGCTCCTTGAAGAAACAGGGGGATCCCACCGATCTCAGGGG
 25 TTCTGTTCTGGCCTGCGGCCCTGGATCGTCCAGCCTGGGTGCGGGTGGGGAGCAGACCTCGCCCTTAT
 CGGCTGGGGCTGAGGGTGAGGGTCCCGTTTCCCCAAAGGCCTAGCCTGGGGTTCCAGCCACAAGCCCT
 ACCGGGCAGCGCCCGGCCCGCCCTCCAGGCCTGGCACTCGTCCTCAACCAAGATGGCGCGGATGGC
 TTCAGGCGCATCACGACACCGGCGCGTCACGCGACCCGCCCTACGGGCACCTCCCGCGCTTTTCTTAG
 CGCCGAGACGGTGGCCGAGCGGGGACCGGGAAGCATGGCCCGGGCT

30

SEQ ID NO:3 : señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina (BGH)

GCCCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAA
 GGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA
 35 TTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATG
 CACT

SEQ ID NO:4 : secuencia de nucleótidos pAAV.nGUSB.GBA1

TCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGT
CTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCTGGGG
CTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGC
5 ACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAA
GGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATT
AAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCG
GTACCTCGCGAATGCATCTAGAGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGA
CCAAAGGTCGCCCCAGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG
10 AGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGGAGGGGTGGAGTCGTGACAGATCTGAATTCCTGCTGGG
AAAAGCAAGTGAGGTGCTCCTTGAAGAAACAGGGGGATCCCACCGATCTCAGGGGTCTCTGTTCTGGC
CTGCGGCCCTGGATCGTCCAGCCTGGGTGCGGGTGGGGAGCAGACCTCGCCCTTATCGGCTGGGGCTG
AGGGTGAGGGTCCCGTTTTCCCCAAAGGCCTAGCCTGGGGTTCAGCCACAAGCCCTACCGGGCAGCGC
CCGGCCCCGCCCCCTCAGGCCTGGCACTCGTCTCAACCAAGATGGCGCGGATGGCTTCAGGCGCATC
15 ACGACACCGGCGCGTCACGCGACCCGCCCTACGGGCACCTCCCGCGCTTTTCTTAGCGCCGCAGACGG
TGGCCGAGCGGGGGACCGGAAGCATGGCCCCGGGCTGCAGCTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGT
GTATAATGTGTTAACTACTGATTCTAATTGTTTCTCTCTTTTAGATTCCAACCTTTGGAACCTCAATT
CAGCCACCATGGCTGGCAGTCTTACAGGTCTCCTGCTCCTGCAAGCTGTCTCTTGGGCTTCTGGGGCC
AGGCCCTGTATCCCCAAATCCTTTGGATACTCATCTGTGGTGTGTGTTTGTAAATGCCACTTATTGTGA
20 TAGCTTTGACCCCCCACCTTTCTGCACTGGGCACCTTTTCAAGGTATGAATCTACCAGGTCTGGGA
GGAGGATGGAGCTGAGTATGGGGCCCATCCAAGCAAACCATACTGGCACTGGCTTGCTGCTGACACTG
CAACCTGAACAGAAGTTCCAGAAAGTGAAGGGCTTTGGAGGAGCCATGACTGATGCTGCTGCCCTCAA
TATTTTGGCCCTGAGCCCCCCTGCTCAGAATCTCCTTTTGAAATCATACTTCTCTGAGGAGGGAATTG
GATACAATATCATCAGGGTGCCAAATGGCCTCATGTGACTTTAGTATTAGGACTTACACCTATGCTGAT
25 ACCCCTGATGATTTCCAGCTGCATAACTTCTCATTGCCTGAGGAGGATACCAAATTGAAGATCCCCT
CATTCACAGGGCCCTGCAACTGGCTCAGAGACCAGTGTCAATTGCTGGCCTCCCCCTGGACCTCCCCAA
CTTGGCTCAAACCAATGGGGCTGTCAATGGTAAGGGCTCTCTTAAGGGGCAGCCTGGAGACATTTAC
CATCAGACCTGGGCCAGGTATTTTGTGAAGTTCCTGGATGCTTATGCTGAGCACAAATTGCAATTTTG
GGCTGTTACAGCTGAGAATGAACCCTCTGCAGGACTGCTGTCTGGCTATCCTTTCCAGTGCCTGGGCT
30 TTACCCCTGAGCATCAGAGGGATTTCAATTGCCAGGGACCTGGGACCTACTCTTGCCAATAGCACACAC
CATAATGTGAGGCTTCTGATGCTTGATGACCAGAGACTTCTGCTGCCACACTGGGCCAAGGTTGTCTCT
GACAGATCCTGAGGCTGCCAAGTATGTTTCATGGGATTGCTGTGCACTGGTATCTGGACTTCCTTGCTC
CAGCTAAGGCCACCCCTGGGAGAAACACACAGGTTGTTTCCAATACAATGCTTTTTGCATCAGAGGCC
TGTGTGGGCAGTAAATTTTGGGAGCAGTCTGTTAGGCTGGGGAGCTGGGATAGAGGAATGCAATACTC
35 CCATTCTATCATCACCAATCTGCTCTACCATGTGGTGGGGTGGACTGACTGGAACCTTGCCCTTAACC
CTGAGGGTGGCCCCAATTGGGTGAGGAATTTTGTGGATAGTCCCATCATTGTGGATATCACCAAGGAC
ACATTCTATAAGCAACCAATGTTCTATCACCTGGGTCACTTTAGTAAGTTTATCCCTGAGGGGTCCCA

GAGGGTGGGACTGGTGGCTTCCCAGAAGAATGATCTGGATGCTGTGGCCCTGATGCACCCTGATGGCA
 GTGCTGTGGTTGTTGTTCTCAATAGAAGCTCTAAAGATGTGCCCTTGACCATCAAAGATCCAGCTGTG
 GGATTTCTGGAAACAATTTCCCCTGGTTATAGCATCCACACTTACCTTTGGAGAAGGCAGTGAAAATG
 AAGGCCTGATAATTGCACCACCAGGCCTGATAGGCCCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT
 5 TGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAATGA
 GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA
 AGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCACTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCT
 CACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGC
 GAGCGCGCAGAGAGGGATCTAGATATCGGATCCCGGGCCCGTCTGACTGCAGAGGCCTGCATGCAAGCT
 10 TGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATA
 CGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT
 GCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCG
 CGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC
 GTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
 15 TAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGC
 TGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGG
 CGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGT
 TCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATA
 GCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
 20 CCCGTTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
 CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
 AGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
 AAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGG
 TGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT
 25 TTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCA
 AAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGA
 GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTT
 GTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGC
 CCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCC
 30 AGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTT
 GCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGC
 ATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGT
 TACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTA
 AGTTGGCCGAGTGTTTCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCC
 35 GTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACC
 GAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCA
 TCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATG

TAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAA
AACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCT
TCCTTTTTCATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT
ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGA
5 AACCATATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

SEQ ID NO:5 Secuencia de aminoácidos de glucocerebrosidasa humana sin secuencia peptídica señal (como codificada por SEQ ID NO:1)

ARPCIPKSFYSSVVCVCNATYCDSDPPTFPALGTFSRYESTRSGRMELSMGPIQANHTGTGLLLT
LQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDIFSIRTYTYA
10 DTPDDFQLHNFSLEEDTKLKIPLIHRALQLAQRVSLLASPWTSPWLKTNGAVNGKGSLSKGQPGDI
YHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANST
HHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGI AVHWYLDLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASE
ACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDSPPIIVDITK
DTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGS AVVVVLNRSSKDVPLTIKDPA
15 VGLETISPGYSIHTYLWRRQ

SEQ ID NO:6 secuencia completa de aminoácidos de glucocerebrosidasa humana que incluye péptido señal corto (como codificada SEQ ID NO:1)

MAGSLTGLLLLQAVSWASGARPCIPKSFYSSVVCVCNATYCDSDPPTFPALGTFSRYESTRSGRM
ELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLSYFSEEGIGYN
20 IIRVPMASCDIFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLEEDTKLKIPLIHRALQLAQRVSLLASPWTSPWL
KTNGAVNGKGSLSKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTP
EHQRFIARDLGPTLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGI AVHWYLDLAPAK
ATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEG
GPNWVRNFVDSPPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGS AV
25 VVVVLNRSSKDVPLTIKDPAVGLETISPGYSIHTYLWRRQ

SEQ ID NO:7 secuencia de nucleótidos completa de la secuencia que codifica el gen GBA1 humano (tipo salvaje)

ARNm de glucocerebrosidasa humana, cds completa, GenBank: M19285.1

>M19285.1:123-1733 ARNm de glucocerebrosidasa humana, cds completa

30 ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCTGG
CAGCCTCACAGTTTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCTGGGCATCAGGTGCCCCGCCCTGCATCCCTA

AAAGCTTCGGCTACAGCTCGGTGGTGTGTGTCTGCAATGCCACATACTGTGACTCCTTTGACCCCCCG
 ACCTTTCCTGCCCTTGGTACCTTCAGCCGCTATGAGAGTACACGCAGTGGGCGACGGATGGAGCTGAG
 TATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGCACAGGCCTGCTACTGACCCTGCAGCCAGAACAGAAGT
 TCCAGAAAGTGAAGGGATTTGGAGGGGCCATGACAGATGCTGCTGCTCTCAACATCCTTGCCCTGTCA
 5 CCCCCTGCCCAAATTTGCTACTTAAATCGTACTTCTCTGAAGAAGGAATCGGATATAACATCATCCG
 GGTACCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCATCCGCACCTACACCTATGCAGACACCCCTGATGATTTCC
 AGTTGCACAACTTCAGCCTCCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAAGATACCCCTGATTCACCGAGCCCTG
 CAGTTGGCCAGCGTCCCGTTTCACTCCTTGCCAGCCCCTGGACATCACCCACTTGCGTCAAGACCAA
 TGGAGCGGTGAATGGGAAGGGGTCACTCAAGGGACAGCCCGGAGACATCTACCACCAGACCTGGGCCA
 10 GATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCTGAGCACAAAGTTACAGTTCTGGGCAGTGACAGCTGAA
 AATGAGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGTGGATACCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGAACATCA
 GCGAGACTTCATTGCCCGTGACCTAGGTCCTACCCTCGCCAAAGTACTCACCACAATGTCCGCCTAC
 TCATGCTGGATGACCAACGCTTGCTGCTGCCCCACTGGGCAAAGGTGGTACTGACAGACCCAGAAGCA
 GCTAAATATGTTTCATGGCATTGCTGTACATTGGTACCTGGACTTTCTGGCTCCAGCCAAAGCCACCCT
 15 AGGGGAGACACACCGCCTGTTCCCCAACACCATGCTCTTTGCCTCAGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGT
 TCTGGGAGCAGAGTGTGCGGCTAGGCTCCTGGGATCGAGGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACG
 AACCTCCTGTACCATGTGGTTCGGCTGGACCGACTGGAACCTTGCCCTGAACCCCGAAGGAGGACCCAA
 TTGGGTGCGTAACTTTGTGACAGTCCCATCATTGTAGACATCACCAGGACACGTTTTACAAACAGC
 CCATGTTCTACCACCTTGCCCACTTCAGCAAGTTCATTCTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGGTT
 20 GCCAGTCAGAAGAACGACCTGGACGCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTCGT
 GCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGTGCCTCTTACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCCTGGAGACAA
 TCTCACCTGGCTACTCCATTACACCTACCTGTGGCATCGCCAGTGA

**SEQ ID NO:8 secuencia completa de aminoácidos de glucocerebrosidasa humana que
 incluye péptido señal largo (referencia NCBI: NP_001005742.1, precursor de isoforma 1
 25 de glucosilceramidasa ácida lisosomal)**

MEFSSPSREECPKPLSRVSI MAGSLTG LLLLQAVSWASGARPCIPKSF GYSSVVCV NATYCD SFDPP
 TFPALGTF SRYESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALS
 PPAQNLLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRAL
 QLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGS LKGQPGDIYHQ TWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAE
 30 NEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQ RDFIARDLGPTLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEA
 AKYVHGI AVHWYLD FLAPAKATLGETHRLFPNTMLF ASEACVGSKFWEQSVRLG SWDRGMQYSHSIIT
 NLLYHVVGWTDWNLALNPEGGP NWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQ RVGLV
 ASQKNDLDAVALMHPDGS AVVVVLNRSSKDVPLTIK DPAVG FLETISP GYSIHTYLWRRQ

SEQ ID NO:9 secuencia de nucleótidos del promotor CAG

ctagttattaatagtaataattacgggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttaca
 taacttacggtaaattggcccgcttggtgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgac
 gtatgttcccatagtaacgccaatagggaactttccattgacgtcaatgggtggagtatTTTtacggtaaa
 ctgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggt
 5 aaatggcccgctggcattatgccaggtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatcta
 cgtattagtcacgcgtattaccatggtcgaggtgagccccacgttctgcttcactctccccatctccc
 cccctccccaccccccaattttgtattttatttttttaattttttgtgcagcgatgggggcgggg
 gggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgagggcggggcggggcgagggcgagagg
 tgcgggcggcagccaatcagagcggcgctccgaaagtTTCcttttatggcgaggcggcggcgggc
 10 ggccctataaaaaagcgaagcgcgggcgggcg

SEQ ID NO: 10 secuencia de nucleótidos que codifica GFP

Atggtgagcaagggcgaggagctgttcaccgggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgt
 aaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctga
 agttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccttggcccacctcgtgaccacctgacctacggc
 15 gtgcagtgtcttcagcgtacccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgccga
 aggctacgtccaggagcgacccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagaccgcgcccaggtga
 agttcgagggcgacaccttgggtgaaccgcacgcagctgaaggcgacgcacttcaaggaggacggcaac
 atcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaa
 gaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgacc
 20 actaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgcacaacctacctgagcacc
 cagtcgcccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatgggtcctgctggagttcgtgaccgc
 cgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagtga

SEQ ID NO: 11 secuencia de nucleótidos que codifica GBA1 humano (secuencia optimizada IDT)

atggagttctcatctccctcacgagaagaatgtccgaaacctctttcaagagtaagcatcatggccgg
 cagcttgaccggtcttttgttgttgaggccgtgtcctgggcctcaggtgctaggccatgcattccta
 aatccttcggctatagtagcgtggtttgcgtctgcaacgccacatactgtgacagtttcgatccacct
 accttcccagcgtgggtaccttctcacgggtatgaatcaacgcgatcaggcgcgagaatggaactttc
 aatggggccaatccaagctaaccacacgggaacgggtcttctgctgacgctccaaccggaacaaaagt
 30 tccaaaaggtaaaaggctttggaggtgcgatgactgatgccgcagcactcaacatcctggcgctctca
 ccgcccgcacaaaatttgcgtgttgaagagttatttctcagaagaagggatcggttacaacatcatacg
 ggtcccgatggcgagctgtgacttttctataagaacatataacctatgcgggatacggccgacgatttcc
 aacttcataatttttagtctgcctgaggaagacacaaagttgaagataccgctgatacacagagcattg
 cagcttgctcaacgaccggtcagcttgcttgccagcccatggacaagtccaacatggcttaagaccaa

tggcgcggttaatggcaagggatccctgaagggccagccgggagacatctatcatcaaacttgggcgc
 ggtatTTTTgtcaagttcttggacgcctacgctgagcacaaactgcagttctgggccgttaccgccgaa
 aatgaaccatccgccgactgcttttctggctaccctttccaatgtcttggctttacgcctgaacacca
 aagagacttcattgctcgggaccttggtecaacgctcgcgaacagtaactcatcataatgtacgactct
 5 tgatgctcgatgaccagcgactgttgcttccacattgggccaaaggtagttctgaccgaccccgaagcc
 gctaaatacgtccacggcattgctgtccattggtaccttgactttttggctcccgc aaaagccactct
 ggggtgaaacacacagactctttccaaacacgatgcttttcgcatacagaagcctgcgtcgggaagtaaat
 tttgggaacagtcagtaaggttgggtagttgggatcgcgggatgcaatatagtcatagcattattacc
 aacttgctttatcacgtcgttgggtggacagattggaacctcgcgttgaatcctgaaggcgccctaa
 10 ttgggtaagaaactttgttgattcacctattatcgctcgacataaccaaggacacattctacaagcaac
 cgatgttctatcaccttgggcatttcagtaaattcataccagagggcagccagcgcgctcgggttggtg
 gcctctcaaaaaaacgatttggatgcggctcgtctgatgcacccgacgggagcgcgagtagtcgttgt
 ccttaaccgaagctccaaggatgtaccctcacgattaaggaccctgctgtcgggttccttgaaacta
 taagtcccggctatagttatcatacttatctcttgagaagacagtga

15 **SEQ ID NO: 12 secuencia de nucleótidos que codifica GBA1 humano (secuencia optimizada GenScript)**

ATGGAGTTTTCAAGCCCCTCACGGGAAGAGTGCCCTAAGCCCCTGTACGGGTCTCAATTATGGCCGG
 GAGCCTGACTGGCCTGCTGCTGCTGCAGGCCGTGAGCTGGGCATCAGGAGCCAGGCCTTGCATCCCAA
 AGTCTTTCGGCTACAGCTCCGTGGTGTGCGTGTGCAACGCCACCTATTGTGACTCCTTCGATCCCCCT
 20 ACCTTTCCCGCCCTGGGCACATTTTCTAGATACGAGTCTACACGCAGCGGCCGAGAATGGAGCTGAG
 CATGGGCCCTATCCAGGCCAATCACACCGGAACAGGCCTGCTGCTGACCCTGCAGCCAGAGCAGAAGT
 TCCAGAAGGTGAAGGGCTTTGGAGGAGCAATGACAGACGCAGCCGCCCTGAACATCCTGGCCCTGTCC
 CCACCCGCCCAGAATCTGCTGCTGAAGTCCTACTTCTCTGAGGAGGGCATCGGCTATAACATCATCCG
 GGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTTTCCATCAGAACCTACACATATGCCGATACCCCTGACGATTTCC
 25 AGCTGCACAATTTTTCCCTGCCAGAGGAGGATACAAAGCTGAAGATCCCCCTGATCCACCGGGCCCTG
 CAGCTGGCACAGCGGCCCGTGAGCCTGCTGGCCAGCCCCTGGACCTCCCCTACATGGCTGAAGACCAA
 CGGCGCCGTGAATGGCAAGGGCTCTCTGAAGGGACAGCCAGGCGACATCTACCACCAGACATGGGCCA
 GATATTTTCGTGAAGTTTCTGGATGCCTACGCCGAGCACAAAGCTGCAGTTCTGGGCCGTGACCGCAGAG
 AACGAGCCTTCTGCCGGCCTGCTGAGCGGCTATCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTTACACCTGAGCACCA
 30 GCGGGACTTTATCGCCAGAGATCTGGGCCCAACCCTGGCCAACTCCACACACCACAATGTGAGGCTGC
 TGATGCTGGACGATCAGCGCCTGCTGCTGCCTCACTGGGCCAAGGTGGTGTGACCGACCCAGAGGCC
 GCCAAGTACGTGCACGGCATCGCCGTGCACTGGTATCTGGATTTCTTGGCACCAGCAAAGGCCACCCT
 GGGAGAGACACACCGGCTGTTCCCTAACACCATGCTGTTTGCCAGCGAGGCCTGCGTGGGCTCCAAGT
 TTTGGGAGCAGTCCGTGAGGCTGGGATCTTGGGACAGGGGCATGCAGTACTCCCACTCTATCATCACC
 35 AATCTGCTGTATCACGTGGTGGGCTGGACAGACTGGAACCTGGCCCTGAATCCAGAGGGCGGCCCAA
 CTGGGTGAGAAATTTTCGTGGATAGCCCCATCATCGTGGACATCACCAAGGATACATTCTACAAGCAGC

CAATGTTTTATCACCTGGGCCACTTCTCTAAGTTTATCCCAGAGGGCAGCCAGAGGGTGGGCCTGGTG
GCCAGCCAGAAGAACGACCTGGATGCCGTGGCCCTGATGCACCCTGATGGCTCCGCCGTGGTGGTGGT
GCTGAATCGCTCTAGCAAGGACGTGCCTCTGACCATCAAGGATCCAGCCGTGGGCTTCCTGGAGACTA
TTTCCCCCGGCTATTCAATTCATACCTATCTGTGGAGAAGGCAGTGA

5 SEQ ID NO: 13 secuencia de nucleótidos del promotor hSyn (ref. NCBI NG_008437.1)

AGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCGACC
CACTGGACAAGCACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAAC
AGGATGCGGCGAGGCGCGTGCCTGAGCAGCTTCCAGCACCAGCGGACAGTGCCTTCGCCCCGCCTGG
CGGCGCGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCCTCGCCGGTCCCCCGAAACTC
10 CCCTTCCCGGCCACCTTGGTTCGCGTCCGCGCCGCCGCGGCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGC
GAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGCGCACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGC
GGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG

SEQ ID NO: 14 secuencia de aminoácidos de la proteína de cápside de AAV-TT

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEA
15 DAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEPV
KTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKSGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLTNTMA
SGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
FGYSTPWGYFDFNRHFCHFSRPDWQRLINNNWGRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTV
QVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN
20 FTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRN
WLPGPCYRQQRVSKTAADNNNSDYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKYFPQSGVLI
FGKQDSGKTNVNIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQSGNTQAATSDVNTQGVLPGMVWQDRDVY
LQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPANPSTTFSAKFASFITQYSTGQVSV
EIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

25 SEQ ID NO: 15 secuencia de nucleótidos de ITR Flip de AAV2

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCC
GGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA
GGGGTTCCT

SEQ ID NO: 16 secuencia de nucleótidos de ITR Flop de AAV2

30 AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGA
CCAAAGGTCGCCCACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG
AGTGGCCAA

SEQ ID NO: 17: secuencia de aminoácidos de isoforma 2 de GBA1 humano (ref. NCBI NP_001165282.1)

MELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQVKVGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFSEEGIGY
NIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLEEDTKLKIPLIHRALQLAQRVSLASPWTSPTW
5 LKTNGAVNGKGSLSKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFT
PEHQRDFIARDLGPTLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPAAKYVHGIAVHWYLDLFLAPA
KATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPE
GGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQVRGLVASQKNDLDAVALMHPDGSA
VVVVLNRSSKDVPLTIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ

SEQ ID NO: 18: secuencia de aminoácidos de isoforma 3 de GBA1 humano (ref. NCBI NP_001165283.1)

MEFSSPSREECPKPLSRVSIAGSLTGLLLLQAVSWASGARPCIPKSFGYSSVVCVCNATYCDSDPDP
TFPALGTFSRYESTRSGRMELSMGPIQANHTGTGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHN
FSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRVSLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGSLSKGQPGDIYHQTWARYFV
15 KFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRDFIARDLGPTLANSTHHNVRLMLD
DQRLLLPHWAKVVLTDPAAKYVHGIAVHWYLDLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQS
VRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYH
LGHFSKFIPEGSQVRGLVASQKNDLDAVALMHPDGSAVVVVLNRSSKDVPLTIKDPAVGFLETISPGY
SIHTYLWRRQ

SEQ ID NO: 19: secuencia de nucleótidos completa de la secuencia que codifica el gen GBA1 humano

atggagttttcaagtccttccagagaggaatgtcccaagcctttgagtagggtaagcatcatggctgg
cagcctcacaggattgcttctacttcaggcagtgctcgtgggcatcaggtgccgccccctgcatcccta
25 aaagcttcggctacagctcgggtggtgtgtgtcgtgcaatgccacatactgtgactcctttgacccccg
acctttcctgccccttggtaccttcagccgctatgagagtagacacgcagtgggcgacggatggagctgag
tatgggggcccattccaggctaatacacacgggcacaggcctgctactgaccctgcagccagaacagaagt
tccagaaagtgaagggtttggaggggcatgacagatgctgctgctctcaacatccttgccctgtca
ccccctgccccaaaatttgctacttaaatcgtacttctctgaagaaggaatcggatataacatcatccg
30 ggtacccatggccagctgtgacttctccatccgcacctacacctatgcagacacccctgatgatttcc
agttgcacaacttcagcctcccagaggaagataccaagctcaagataccccctgattccaccgagccctg
cagttggcccagcgtcccgtttcactccttgccagccccctggacatcaccacttggtcaagaccaa
tggagcggatgaatgggaaggggtcactcaagggaacagcccgagacatctaccaccagacctgggcca
gatactttgtgaagttcctggatgcctatgctgagcacaagttacagttctgggcagtgacagctgaa
35 aatgagccttctgctgggctggtgagtgatacccccttccagtgccctgggcttcaccctgaacatca
gagagacttcattgcccgtgacctaggtcctaccctcgccaacagtactcaccacaatgtccgcctac
tcatgctggatgaccaacgcttgctgctgccccactgggcaaaggtggtactgacagaccagaagca
gctaaatatgttcattggtcattgctgtacattggtacctggactttctggctccagccaaagccacct
aggggagacacaccgctgttccccaaacacatgctctttgcctcagaggcctgtgtgggctccaagt
40 tctgggagcagagtggtgctgtaggtcctgggatcgaggatgcagtagcagccacagcatcatcacg
aacctcctgtaccatgtggctcggtggaccgactggaaccttgccctgaacccgaaggaggacccaa
ttgggtgcgtaactttgtcgacagtcctcatcattgtagacatcaccaaggacagttttacaaacagc
ccatgttctaccaccttgggccacttcagcaagttcattcctgagggctcccagagagtggggctggtt

gccagtcagaagaacgacctggacgcagtggcactgatgcatcccgatggctctgctgttggtcg
gctaaaccgctcctctaaggatgtgcctcttaccatcaaggatcctgctgtgggcttcctggagaca
tctcacctggctactccattcacacctacctgtggcgctgccagtga

5 SEQ ID NO:20 : secuencia de nucleótidos #2 del promotor nGUSB

10 ATTCCTGCTGGGAAAAGCAAGTGGAGGTGCTCCTTGAAGAAACAGGGGGATCCCACCGATCTCAGGGG
TTCTGTTCTGGCCTGCGGCCCTGGATCGTCCAGCCTGGGTGCGGGTGGGGAGCAGACCTCGCCCTTAT
CGGCTGGGGCTGAGGGTGAGGGTCCC GTTTCCCCAAAGGCCTAGCCTGGGGTTCCAGCCACAAGCCCT
ACCGGGCAGCGCCCGGCCCGCCCTCCAGGCCTGGCACTCGTCTCAACCAAGATGGCGCGGATGGC
TTCAGGCGCATCACGACACCGGCGCGTCACGCGACCCGCCCTACGGGCACCTCCCGCGCTTTTCTTAG
CGCCGCAGACGGTGGCCGAGCGGGGGACCGGGAAGC

SEQ ID NO:21 secuencia de nucleótidos #2 de promotor CAG

ctagttattaatagtaaatcaattacggggctattagttcatagcccatatatggaggttccgcgttac
taacttacggtaaataggccgcctggtgacgcgcccaacgacccccgccattgacgtcaataatgac
gtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaa
15 ctgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggt
aaatggccgcctggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatcta
cgtattagtcacgtcattaccatggctcaggtgagccccacgttctgttccactctccccatctccc
ccccctccccaccccccaattttgtattttatttttttaattatttttgtgcagcgatgggggcgggg
ggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgagggcggggcggggcgaggcggagagg
20 tgcgggcggcagccaatcagagcggcgcgtccgaaagtttccttttatggcgaggcggcggcgggc
ggccctataaaaaagcgaagcgcgcgcgggcgggagtcgctgcgacgctgccttcgccccgtgccccg
ctccgcgcgcctcgcgccgcgcccgccccggctctgactgacgcggttactcccacaggtgagcgggc
gggacggcccttctcctcgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggccttgtttcttttctgtgg
ctgctgtaaagccttgaggggctccgggagggccctttgtgcgggggggagcggctcggggggtgcgt
25 gcgtgtgtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggcccgcgctgcgccggcggtgtgagcgctgcgggc
gcggcgcggggctttgtgcgtccgcagtggtgcgcgaggggagcgcgccggggggcggtgccccgcgg
tgcggggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcaggggg
tgtgggcgcggcggtcgggctgtaacccccccctgcacccccctccccgagttgctgagcacggcccc
gcttcgggtgcggggctcgtacggggcgtggcgcggggctcgccgtgcggggcggggggtggcgga
30 ggtgggggtgcggggcgggggcggggcccgcctcgggcccgggagggctcgggggaggggcgcggcgggc
cccgagcgccggcggtgtcgaggcgggcgagccgcagccattgccttttatggtaatcgtgcgag
agggcgcagggacttcctttgtccaaatctgtgcggagccgaaatctgggaggcgccgcgcacccc
ctctagcgggcgcggggcggaagcgggtgcggcgccggcaggaaggaaatgggcggggagggccttcgtg
cgtcgccgcgcgcgtcccttctccctctccagcctcggggctgtccgcggggggagggctgcctt
35 cgggggggagcggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgacggcggtctctagagcctctgctaa
ccatgttcatgccttcttcttttttccctacag

SEQ ID NO:22 secuencia de nucleótidos de versión corta del promotor de Ubiquitina humana C (UbC)

40 ggctccgcgcgcgggttttggcgctcccgcgggcgccccctcctcacggcgagcgctgccacgtca
gacgaagggcgcagcgagcgtcctgatccttcgcccggacgctcaggacagcgcccgtgctcata
agactcggccttagaacccagtatcagcagaaggacatcttaggacgggacttggtgactctaggg
cactgggttttctttccagagagcggaacaggcgaggaaaagtagtcccttctcggcgattctgcggag
ggatctccgtggggcgggtgaacgccgatgattatataaggacgcgcgggtgtggcacagctagtcc
gtcgcagccgggatttggtcgcggttcttggttgatcgctgtgatcgtcacttggt

SEQ ID NO:23 secuencia de nucleótidos de versión larga de promotor de Ubiquitina humana C (UbC)

ccggaggcgcgggcccaaaaccgcgaggggcgcccggggggaggagtgccgctcgcgacggtgcagt
ctgcttcccgcgtcgctcgcaggactaggaaggcgggcctgcgagtcctgtcgccgggcgacgagtat
tctgagccggaatcttggggtcatagtcgtcttctgtataaatcctgccctgaaccactgagatccc
gtgaccaaagaaaggtctctcgccttgtccgctccttttcatcaggggaagagccgctaagacgcctc
cctagaggcaccccgccacttgcggctactaatatattcctgcgcggccacacggtgtcgatcaagg
cagcgtcggccctaaaccagcgccaagaacaaacacctagcgacactagcagtgaaaccactcatcgc
ccgacgacccgaccggccccgaaagcacccggcgcccgggcgagccaccctgccttcgcacacctctct
ggcggttcccgcacatcagaccagcgctcgttccaacgggacttgacccccaacccccctcgcgtcg
ttttaccgcccgcacaaggggtcagaacttaccttctgcgaacactccgcccgcactccagcaacttgg
ttccaccccccggtaccacccgcggttcttgggttccagaactccggaagcgattacgccctttcgaga
ataagcccactctaccgcaccccggtgtagaccctgggactgcacttcaaacagtgcactgcactctt
gagccaaacagcagacaacgccccgcggtcaataccgccacggcaaccggtcacgtgggcatggaaa
ccctcgcgcgcgggagcagcacagcactgcagtgaggcaagacaaccgaatattacgtcccacccccggt
ggacggccatccacacgccatccgaaaagaggcagcgtcctgcgtcccaagcccgatcccatccgag
aggacttagctgtccgcggcctggagaccactcccctccctattcactccgcagtcaaagaaaccagc
caaaatacatggatagaagaattcatcgacttcgaggccaaaacttgatacgcgagccccaaccgctc
acacaaaacacttcaaaaaatccgtggaaaactttacattagtaaacccagttatacattaaaagtca
caatctgatcatttaacaggcgatttaagaccggcaaaaaccgaaaaaacaatctg

SEQ ID NO:24 secuencia de nucleótidos del promotor de fosfoglicerato quinasa 1 (PGK)

Gacccctctctccagccactaagccagttgctccctcggtgcagggctgcacgcgaggcctccgaacg
tcttacgccttgtggcgcgcccgctccttgtcccgggtgtgatggcggggtgtggggcgaggcggtgg
cggggaagggccggcgacgagagccgcgcgggacgactcgtcggcgataaccggtgtcgggtagcgcc
agccgcgcgacggtaacgagggaccgcgacagggcagcgtcccatgatcactctgcacgccgaaggc
aaacagtgacggccggtgcggcgcttggcggtccttgggaagggtgaatccccgcctcgtccttcgcag
cgcccccccggggtgttcccatcgccgcttctaggccactgcgacgcttgctgcacttcttacacgc
tctgggtcccagccgcggcgacgcaaagggccttgggtgcgggtctcgtcggcgagggacgcgtttgg
gtcccgcaggaaccttttccgcgttgggggttgggg

SEQ ID NO:25 secuencia de nucleótidos del promotor #1 de CBA/CBh

AGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCGTAAGGTCATGTACTGGGCATAATGCCAGGCGGGCCATTTA
CCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATGATACACTTGATGTACTGCCAAGTGGGCAGT
TTACCGTAAATACTCCACCCATTGACGTCAATGGAAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACATACG
TCATTATTGACGTCAATGGGCGGGGGTCGTTGGGCGGTCAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAGTTAT

GTAACGCGGAACTCCATATATGGGCTATGAACTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAACCACGTTC
 TGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATT
 TTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGG
 GGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTAT
 GGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGAACTGAAAAACCAGAAAGT
 TAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCTTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCC
 TCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCT

SEQ ID NO:26 secuencia de nucleótidos del promotor #2 de CBA/CBh

AGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCGTAAGGTCATGTACTGGGCATAATGCCAGGCGGGCCATTTA
 CCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATGATACACTTGATGTACTGCCAAGTGGGCAGT
 5 TTACCGTAAATACTCCACCCATTGACGTCAATGGAAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACATACG
 TCATTATTGACGTCAATGGGCGGGGGTCGTTGGGCGGTCAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAGTTAT
 GTAACGCGGAACTCCATATATGGGCTATGAACTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAACCACGTTC
 TGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATT
 TTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGG
 10 GGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTAT
 GGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTT
 CGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCA
 CAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCAAGAGGTAAGGGTTTAAGGGAT
 GGTGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACCTGTTTTACAGGCCTGAAATCACTTGGTTTTAGGTT
 15 GG

SEQ ID NO:27 secuencia de nucleótidos del promotor JeT

GAATTCGGGCGGAGTTAGGGCGGAGCCAATCAGCGTGCGCCGTTCCGAAAGTTGCCTTTTATGGCTGG
 GCGGAGAATGGGCGGTGAACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCCGGGTGTGGCACAGCTAGTTCCGT
 20 CGCAGCCGGGATTTGGGTCGCGGTTCTTGTTTGTGGATCCCTGTGATCGTCACTTGACA

SEQ ID NO:28 secuencia de nucleótidos de poliA de hormona de crecimiento humano

ACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCC
 25 ACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTAT
 GGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCT
 ATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAA
 GCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATT
 TTTGTTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAATCTCAGG

TGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTC
CTTCTGATTTTGTAGGTAACCACGTGCGGACCGA

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FUNDACION PARA LA INVESTIGACION MEDICA APLICADA
 CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED DEL ÁREA DE
 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS M.P CIBERNED

<120> PARTÍCULAS VIRALES PARA USO EN EL TRATAMIENTO DE SINUCLEINOPATÍAS
 TALES COMO ENFERMEDADES DE PARKINSON
 MEDIANTE TERAPIA GÉNICA

<130> P4891AR00

<150> EP19382706

<151> 2019-08-12

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1551

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1
 atggctggca gtcttacagg tctcctgctc ctgcaagctg tctcttgggc ttctggggcc 60
 aggccttgta tccccaaatc ctttggtatc tcatctgtgg tgtgtgtttg taatgccact 120
 tattgtgata gctttgacct cccaccttt cctgcactgg gcaccttttc aaggatatgaa 180
 tctaccaggt ctgggaggag gatggagctg agtatggggc ccatccaagc aaaccatact 240
 ggactggct tgctgctgac actgcaacct gaacagaagt tccagaaagt gaagggcttt 300
 ggaggagcca tgactgatgc tgctgccctc aatatttttg ccctgagccc ccctgctcag 360
 aatctccttt tgaaatcata cttctctgag gaggggaattg gatacaatat catcagggtg 420
 ccaatggcct catgtgactt tagtattagg acttacacct atgctgatac ccctgatgat 480
 ttccagctgc ataacttctc attgcctgag gaggatacca aattgaagat cccactcatt 540
 cacaggggcc tgcaactggc tcagagacca gtgtcattgc tggcctcccc ctggacctcc 600
 ccaacttggc tcaaaaccaa tggggctgtc aatggtaagg gctctcttaa ggggcagcct 660
 ggagacattt accatcagac ctggggcagg tattttgtga agttcctgga tgcttatgct 720
 gagcaciaat tgcaattttg ggctgttaca gctgagaatg aaccctctgc aggactgctg 780
 tctggctatc ctttccagt cctgggcttt acccctgagc atcagaggga tttcattgcc 840
 agggacctgg gacctactct tgccaatagc acacaccata atgtgaggct tctgatgctt 900
 gatgaccaga gacttctgct gccacactgg gccaaagggtg tcctgacaga tcctgaggct 960
 gccaaagtatg ttcattggat tgctgtgcac tggatatctg acttccttgc tccagctaag 1020
 gccaccctgg gagaaacaca caggttggtt cccaatacaa tgctttttgc atcagaggcc 1080

tgtgtgggca gtaaattttg ggagcagtct gttaggctgg ggagctggga tagagggaatg	1140
caatactccc attctatcat caccaatctg ctctaccatg tgggtggggtg gactgactgg	1200
aaccttgccc ttaaccctga ggggtggcccc aattgggtca ggaattttgt ggatagtccc	1260
atcattgtgg atatcaccaa ggacacattc tataagcaac caatgttcta tcacctgggt	1320
cacttttagta agtttatccc tgaggggtcc cagaggggtg gactgggtggc ttcccagaag	1380
aatgatctgg atgctgtggc cctgatgcac cctgatggca gtgctgtggg tgttgttctc	1440
aatagaagct ctaaagatgt gcccttgacc atcaaagatc cagctgtggg atttctggaa	1500
acaatttccc ctggttatag catccacact tacctttgga gaaggcagtg a	1551

<210> 2
 <211> 388
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 2	
attcctgctg ggaaaagcaa gtggaggtgc tccttgaaga aacaggggga tcccaccgat	60
ctcaggggtt ctgttctggc ctgcggccct ggatcgtcca gcctgggtcg gggtagggag	120
cagacctcgc ccttatcggc tggggctgag ggtgagggtc ccgtttcccc aaaggcctag	180
cctgggggttc cagccacaag ccctaccggg cagcgcccg ccccgcccc ccaggcctgg	240
cactcgtcct caaccaagat ggcggggatg gcttcaggcg catcacgaca ccggcgcgtc	300
acgcgacccg ccctacgggc acctcccgcg cttttcttag cgccgcagac ggtggccgag	360
cgggggaccg ggaagcatgg cccgggct	388

<210> 3
 <211> 208
 <212> ADN
 <213> Bos taurus

<400> 3	
gccctgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ccttccttga	60
ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt	120
gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg	180
attgggaaga caatagcagg catgcact	208

<210> 4
 <211> 5295
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo Recombinante

<400> 4

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccc gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcggggc tcttcgctat	300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcggg acctcgcgaa	420
tgcattctaga ggccactccc tctctgcgcg ctgcctcgt cactgaggcc gggcgaccaa	480
aggtcgcccc acgccccggc tttgccccgg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag	540
agggagtggc caactccatc actaggggtt cctggagggg tggagtcgtg acagatctga	600
attcctgctg ggaaaagcaa gtggaggtgc tccttgaaga aacaggggga tcccaccgat	660
ctcaggggtt ctgttctggc ctgcgccct ggatcgtcca gcctgggtcg ggggtggggag	720
cagacctcgc ccttatcggc tggggctgag ggtgagggtc ccgtttcccc aaaggcctag	780
cctgggggtt cagccacaag ccctaccggg cagcgccccg ccccgccccct ccaggcctgg	840
cactcgtcct caaccaagat ggcgcggtat gcttcaggcg catcacgaca ccggcgcgtc	900
acgcgacccg ccctacgggc acctccccg cttttcttag cgccgcagac ggtggccgag	960
cgggggaccg ggaagcatgg cccgggctgc agctctaagg taaatataaa atttttaagt	1020
gtataatgtg ttaaactact gattctaatt gtttctctct tttagattcc aacctttgga	1080
actcaattca gccaccatgg ctggcagtct tacagggtct ctgctcctgc aagctgtctc	1140
ttgggcttct ggggccaggc cctgtatccc caaatccttt ggatactcat ctgtggtgtg	1200
tgtttgtaat gccacttatt gtgatagctt tgaccccccc acctttcctg cactgggcac	1260
cttttcaagg tatgaatcta ccaggctctg gaggaggatg gagctgagta tggggcccat	1320
ccaagcaaac catactggca ctggcttgct gctgacactg caacctgaac agaagttcca	1380
gaaagtgaag ggctttggag gagccatgac tgatgctgct gccctcaata ttttggccct	1440
gagccccct gctcagaatc tccttttgaa atcatacttc tctgaggagg gaattggata	1500
caatatcatc aggggtgcaa tggcctcatg tgactttagt attaggactt acacctatgc	1560
tgatacccct gatgatattc agctgcataa cttctcattg cctgaggagg ataccaaatt	1620
gaagatccca ctcatcaca gggccctgca actggctcag agaccagtgt cattgctggc	1680
ctccccctgg acctccccaa cttggctcaa aaccaatggg gctgtcaatg gtaagggctc	1740
tcttaagggg cagcctggag acatttacca tcagacctgg gccaggtatt ttgtgaagtt	1800

cctggatgct tatgctgagc acaaattgca attttgggct gttacagctg agaatgaacc	1860
ctctgcagga ctgctgtctg gctatccttt ccagtgcctg ggctttaccc ctgagcatca	1920
gagggatttc attgccaggg acctgggacc tactcttgcc aatagcacac accataatgt	1980
gaggcttctg atgcttgatg accagagact tctgctgcca cactgggcca aggttgtcct	2040
gacagatcct gaggctgcca agtatgttca tgggattgct gtgcactggg atctggactt	2100
ccttgctcca gctaaggcca ccctgggaga aacacacagg ttgtttccca atacaatgct	2160
ttttgcatca gaggcctgtg tgggcagtaa attttgggag cagtctgtta ggctggggag	2220
ctgggataga ggaatgcaat actcccatc tatcatcacc aatctgctct accatgtggg	2280
ggggtggact gactggaacc ttgcccttaa ccctgagggg ggccccaatt gggtcaggaa	2340
ttttgtggat agtcccatca ttgtggatat caccaaggac acattctata agcaaccaat	2400
gttctatcac ctgggtcact ttagtaagtt tatccctgag ggggtcccaga ggggtgggact	2460
gggtggcttcc cagaagaatg atctggatgc tgtggccctg atgcaccctg atggcagtg	2520
tgtgggttgtt gttctcaata gaagctctaa agatgtgccc ttgaccatca aagatccagc	2580
tgtgggattt ctggaaacaa tttcccctgg ttatagcatc cacacttacc tttggagaag	2640
gcagtgaaaa tgaaggcctg ataattgcac caccaggcct gataggccct gtgccttcta	2700
gttgccagcc atctgttgtt tgccccctcc ccgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcca	2760
ctcccactgt cttttcctaa taaaatgagg aaattgcac gcattgtctg agtaggtgtc	2820
attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata	2880
gcaggcatgc actagtccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga ggccgggcga	2940
ccaaaggctg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcg	3000
agagagggat ctagatatcg gatcccgggc ccgtcgactg cagaggcctg catgcaagct	3060
tggcgtaatc atggatcatg ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac	3120
acaacatacg agccggaagc ataaagtgt aagcctgggg tgcctaata gtagactaac	3180
tcacattaat tgcgttgcg tcactgccc ctttcagtc gggaaacctg tcgtgccagc	3240
tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gagggggtt gcgtattggg cgctcttccg	3300
cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc	3360
actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt	3420
gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc	3480
ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa	3540
acccgacagg actataaaga taccaggcgt tttcccctgg aagctccctc gtgcgctctc	3600
ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg	3660

cgcttttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcggt cgctccaagc 3720
 tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 3780
 gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca 3840
 ggattagcag agcgaggtat gtaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 3900
 acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg 3960
 gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt 4020
 ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct 4080
 tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggtt ttgggtcatga 4140
 gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa 4200
 tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac 4260
 ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga 4320
 taactacgat acgggagggc ttaccatctg gcccagtgct tgcaatgata ccgcgagacc 4380
 cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca 4440
 gaagtgggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattggtgc cgggaagcta 4500
 gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg 4560
 tgggtgtcacg ctcgctggtt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc 4620
 gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcccttcggt cctccgatcg 4680
 ttgtcagaag taagtggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt 4740
 ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt 4800
 cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgta atacgggata 4860
 ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc 4920
 gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac 4980
 ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa 5040
 ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct 5100
 tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat 5160
 ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc 5220
 cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca 5280
 cgaggccctt tcgtc 5295

<210> 5
 <211> 497
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
100 105 110

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
115 120 125

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
130 135 140

His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
145 150 155 160

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
165 170 175

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
180 185 190

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
195 200 205

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
210 215 220

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu

225					230					235					240
Leu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Phe	Gln	Cys	Leu	Gly	Phe	Thr	Pro	Glu	His	Gln
				245					250					255	
Arg	Asp	Phe	Ile	Ala	Arg	Asp	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Ala	Asn	Ser	Thr
			260					265					270		
His	His	Asn	Val	Arg	Leu	Leu	Met	Leu	Asp	Asp	Gln	Arg	Leu	Leu	Leu
		275					280					285			
Pro	His	Trp	Ala	Lys	Val	Val	Leu	Thr	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Lys	Tyr
	290					295					300				
Val	His	Gly	Ile	Ala	Val	His	Trp	Tyr	Leu	Asp	Phe	Leu	Ala	Pro	Ala
305					310					315					320
Lys	Ala	Thr	Leu	Gly	Glu	Thr	His	Arg	Leu	Phe	Pro	Asn	Thr	Met	Leu
				325					330					335	
Phe	Ala	Ser	Glu	Ala	Cys	Val	Gly	Ser	Lys	Phe	Trp	Glu	Gln	Ser	Val
			340					345					350		
Arg	Leu	Gly	Ser	Trp	Asp	Arg	Gly	Met	Gln	Tyr	Ser	His	Ser	Ile	Ile
		355					360					365			
Thr	Asn	Leu	Leu	Tyr	His	Val	Val	Gly	Trp	Thr	Asp	Trp	Asn	Leu	Ala
	370					375					380				
Leu	Asn	Pro	Glu	Gly	Gly	Pro	Asn	Trp	Val	Arg	Asn	Phe	Val	Asp	Ser
385					390					395					400
Pro	Ile	Ile	Val	Asp	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Phe	Tyr	Lys	Gln	Pro	Met
				405					410					415	
Phe	Tyr	His	Leu	Gly	His	Phe	Ser	Lys	Phe	Ile	Pro	Glu	Gly	Ser	Gln
			420					425					430		
Arg	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Ser	Gln	Lys	Asn	Asp	Leu	Asp	Ala	Val	Ala
		435					440					445			
Leu	Met	His	Pro	Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Val	Val	Leu	Asn	Arg	Ser
	450					455					460				
Ser	Lys	Asp	Val	Pro	Leu	Thr	Ile	Lys	Asp	Pro	Ala	Val	Gly	Phe	Leu
465					470					475					480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
485 490 495

Gln

<210> 6
<211> 516
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

Met Ala Gly Ser Leu Thr Gly Leu Leu Leu Leu Gln Ala Val Ser Trp
1 5 10 15

Ala Ser Gly Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser
20 25 30

Val Val Cys Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro
35 40 45

Thr Phe Pro Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser
50 55 60

Gly Arg Arg Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr
65 70 75 80

Gly Thr Gly Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys
85 90 95

Val Lys Gly Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile
100 105 110

Leu Ala Leu Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe
115 120 125

Ser Glu Glu Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser
130 135 140

Cys Asp Phe Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp
145 150 155 160

Phe Gln Leu His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys
165 170 175

Ile Pro Leu Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser
 180 185 190

Leu Leu Ala Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly
 195 200 205

Ala Val Asn Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr
 210 215 220

His Gln Thr Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala
 225 230 235 240

Glu His Lys Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser
 245 250 255

Ala Gly Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro
 260 265 270

Glu His Gln Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala
 275 280 285

Asn Ser Thr His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg
 290 295 300

Leu Leu Leu Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala
 305 310 315 320

Ala Lys Tyr Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu
 325 330 335

Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn
 340 345 350

Thr Met Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu
 355 360 365

Gln Ser Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His
 370 375 380

Ser Ile Ile Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp
 385 390 395 400

Asn Leu Ala Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe
 405 410 415

Val Asp Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys

420 425 430
 Gln Pro Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu
 435 440 445
 Gly Ser Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp
 450 455 460
 Ala Val Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu
 465 470 475 480
 Asn Arg Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val
 485 490 495
 Gly Phe Leu Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu
 500 505 510
 Trp Arg Arg Gln
 515

<210> 7
 <211> 1611
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 atggagtttt caagtccttc cagagaggaa tgtccaagc ctttgagtag ggtaagcatc 60
 atggctggca gcctcacagg ttgcttcta cttcaggcag tgctcgtgggc atcaggtgcc 120
 cgccccgca tccctaaaag cttcggctac agctcgggtg tggtgtgtctg caatgccaca 180
 tactgtgact ctttgaccc cccgacctt cctgcccttg gtaccttcag ccgctatgag 240
 agtacacgca gtgggcgacg gatggagctg agtatggggc ccatccaggc taatcacacg 300
 ggcacaggcc tgctactgac cctgcagcca gaacagaagt tccagaaagt gaagggattt 360
 ggagggggcca tgacagatgc tgctgctctc aacatccttg ccctgtcacc ccctgcccac 420
 aatttgctac ttaaatacgta cttctctgaa gaaggaatcg gatataacat catccgggta 480
 cccatggcca gctgtgactt ctccatccgc acctacacct atgcagacac ccctgatgat 540
 ttccagttgc acaacttcag cctcccagag gaagatacca agctcaagat acccctgatt 600
 caccgagccc tgcagttggc ccagcgtccc gtttcactcc ttgccagccc ctggacatca 660
 ccacttggc tcaagaccaa tggagcgggtg aatgggaagg ggtcactcaa gggacagccc 720
 ggagacatct accaccagac ctgggcccaga tactttgtga agttcctgga tgcctatgct 780
 gagcacaagt tacagttctg ggcagtgaca gctgaaaatg agccttctgc tgggctgttg 840

```

agtggatacc ccttccagtg cctgggcttc acccctgaac atcagcgaga cttcattgcc      900
cgtgacctag gtcctaccct cgccaacagt actcaccaca atgtccgcct actcatgctg      960
gatgaccaac gcttgcctgt gcccactgg gcaaagggtg tactgacaga cccagaagca     1020
gctaaatatg ttcattggcat tgctgtacat tggtagctgg actttctggc tccagccaaa     1080
gccaccctag gggagacaca ccgcctgttc cccaacacca tgctctttgc ctcagaggcc     1140
tgtgtgggct ccaagttctg ggagcagagt gtgcggctag gtccttggga tcgaggggatg     1200
cagtacagcc acagcatcat cacgaacctc ctgtaccatg tggtcggctg gaccgactgg     1260
aaccttgccc tgaaccccgga aggaggacct aattgggtgc gtaactttgt cgacagtccc     1320
atcattgtag acatcaccaa ggacacgttt taaaacagc ccatgttcta ccaccttggc     1380
catttcagca agttcattcc tgagggctcc cagagagtgg ggctgggtgc cagtcagaag     1440
aacgacctgg acgcagtggc actgatgcat cccgatggct ctgctgttgt ggctgtgcta     1500
aaccgctcct ctaaggatgt gcctcttacc atcaaggatc ctgctgtggg cttcctggag     1560
acaatctcac ctggctactc cattcacacc tacctgtggc atcgccagtg a              1611

```

```

<210> 8
<211> 536
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```
<400> 8
```

```

Met Glu Phe Ser Ser Pro Ser Arg Glu Glu Cys Pro Lys Pro Leu Ser
1              5              10              15

```

```

Arg Val Ser Ile Met Ala Gly Ser Leu Thr Gly Leu Leu Leu Leu Gln
          20              25              30

```

```

Ala Val Ser Trp Ala Ser Gly Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe
          35              40              45

```

```

Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser
50              55              60

```

```

Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu
65              70              75              80

```

```

Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln
          85              90              95

```

```

Ala Asn His Thr Gly Thr Gly Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln
100              105              110

```

Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala
 115 120 125
 Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu
 130 135 140
 Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val
 145 150 155 160
 Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp
 165 170 175
 Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp
 180 185 190
 Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln
 195 200 205
 Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu
 210 215 220
 Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro
 225 230 235 240
 Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu
 245 250 255
 Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu
 260 265 270
 Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu
 275 280 285
 Gly Phe Thr Pro Glu His Gln Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly
 290 295 300
 Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu
 305 310 315 320
 Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr
 325 330 335
 Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr
 340 345 350

Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg
 355 360 365

Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser
 370 375 380

Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met
 385 390 395 400

Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly
 405 410 415

Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp
 420 425 430

Val Arg Asn Phe Val Asp Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp
 435 440 445

Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys
 450 455 460

Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys
 465 470 475 480

Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val
 485 490 495

Val Val Val Leu Asn Arg Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys
 500 505 510

Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile
 515 520 525

His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg Gln
 530 535

<210> 9
 <211> 644
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo Recombinante

<400> 9
 ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc 60
 gcgttacata acttacggta aatggccgcg ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat 120

tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc	180
aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc	240
caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggcc cgcctggcat tatgcccagt	300
acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgtatta	360
ccatggtcga ggtgagcccc acgttctgct tcaactctccc catctcccc cctccccac	420
ccccaatttt gtatttattt attttttaat tattttgtgc agcgatgggg gcgggggggg	480
ggggggggcg cgcgccaggc ggggcggggc ggggcgaggg gcggggcggg gcgaggcgga	540
gaggtgcggc ggcagccaat cagagcggcg cgctccgaaa gtttcctttt atggcgaggg	600
ggcggcggcg gcggccctat aaaaagcgaa gcgcgcggcg ggcg	644

<210> 10
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Aequorea victoria

<400> 10	
atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
ctcgtgacca ccctgacctt cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
cagcagcact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
tacctgagca ccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc	660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaagtga	720

<210> 11
 <211> 1611
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica GBA1 humano (secuencia IDT optimizada)

<400> 11	
atggagttct catctccctc acgagaagaa tgtccgaaac ctctttcaag agtaagcatc	60

atggccggca gcttgaccgg tcttttgttg ttgcaggccg tgtcctgggc ctgaggtgct	120
aggccatgca ttcctaaatc cttcggctat agtagcgtgg tttgcgtctg caacgccaca	180
tactgtgaca gtttcgatcc acctaccttc ccagcgtgg gtaccttctc acggtatgaa	240
tcaacgcgat cagggcgcag aatggaactt tcaatggggc caatccaagc taaccacacg	300
ggaacgggtc ttctgctgac gctccaaccg gaacaaaagt tccaaaaggt aaaaggcttt	360
ggaggtgcca tgactgatgc cgcagcactc aacatcctgg cgctctcacc gccggcacia	420
aatttgctgt tgaagagtta tttctcagaa gaagggatcg gttacaacat cataggggtc	480
ccgatggcga gctgtgactt ttctataaga acatatacct atgcggatac gcccgacgat	540
ttccaacttc ataatttttag tctgcctgag gaagacacia agttgaagat accgctgata	600
cacagagcat tgcagcttgc tcaacgaccg gtcagcttgc ttgccagccc atggacaagt	660
ccaacatggc ttaagaccaa tggcgcgggt aatggcaagg gatccctgaa gggccagccg	720
ggagacatct atcatcaaac ttgggcgcgg tattttgtca agttcttgga cgcctacgct	780
gagcaciaaac tgcagttctg ggccgttacc gccgaaaatg aaccatccgc cggactgctt	840
tctggctacc ctttccaatg tcttggcttt acgcctgaac accaaagaga cttcattgct	900
cgggaccttg gtccaacgct cgcgaacagt actcatcata atgtacgact cttgatgctc	960
gatgaccagc gactgttgct tccacattgg gccaaaggtag ttctgaccga ccccgaggcc	1020
gctaaatacg tccacggcat tgctgtccat tggtagcttg actttttggc tcccgcaaaa	1080
gccactctgg gtgaaacaca cagactcttt ccaaacacga tgcttttcgc atcagaagcc	1140
tgcgtcggaa gtaaattttg ggaacagtca gtaaggttgg gtagttggga tcgcgggatg	1200
caatatagtc atagcattat taccaacttg ctttatcacg tcgttgggtg gacagattgg	1260
aacctcgcgt tgaatcctga agggggccct aattgggtaa gaaactttgt tgattcacct	1320
attatcgtcg acataaccaa ggacacattc tacaagcaac cgatgttcta tcacctggg	1380
catttcagta aattcatacc agagggcagc cagcgcgtcg ggttggtagc ctctcaaaaa	1440
aacgatttgg atgcggtcgc tctgatgcat ccgacggga gcgcagtagt cgttgtcctt	1500
aaccgaagct ccaaggatgt acccctcacg attaaggacc ctgctgtcgg gttccttgaa	1560
actataagtc ccggctatag tattcatact tatctctgga gaagacagtg a	1611

<210> 12
 <211> 1611
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica GBA1 humano (secuencia GenScript optimizada)

<400> 12

```

atggagtttt caagcccctc acgggaagag tgccctaagc ccctgtcacg ggtctcaatt      60
atggccggga gcctgactgg cctgctgctg ctgcaggccg tgagctgggc atcaggagcc      120
aggccttgca tcccaaagtc ttctggctac agctccgtgg tgtgcgtgtg caacgccacc      180
tattgtgact ccttcgatcc ccctaccttt cccgccctgg gcacattttc tagatacgag      240
tctacacgca gcggccggag aatggagctg agcatggggc ctatccaggc caatcacacc      300
ggaacaggcc tgctgctgac cctgcagcca gagcagaagt tccagaaggt gaagggtttt      360
ggaggagcaa tgacagacgc agccgccctg aacatcctgg ccctgtcccc acccgcccag      420
aatctgctgc tgaagtccta cttctctgag gagggcatcg gctataacat catccgggtg      480
cccatggcca gctgcgactt ttccatcaga acctacacat atgccgatac ccctgacgat      540
ttccagctgc acaatttttc cctgccagag gaggatacaa agctgaagat cccctgatc      600
caccggggccc tgcagctggc acagcggccc gtgagcctgc tggccagccc ctggacctcc      660
cctacatggc tgaagaccaa cggcgccgtg aatggcaagg gctctctgaa gggacagcca      720
ggcgacatct accaccagac atggggcaga tatttcgtga agtttctgga tgcctacgcc      780
gagcacaagc tgcagttctg ggccgtgacc gcagagaacg agccttctgc cggcctgctg      840
agcggctatc ccttccagtg cctgggcttt acacctgagc accagcggga ctttatcgcc      900
agagatctgg gcccaaccct ggccaactcc acacaccaca atgtgaggct gctgatgctg      960
gacgatcagc gcctgctgct gcctcactgg gccaaagtgg tgctgaccga ccagagggcc      1020
gccaaagtacg tgcacggcat cgccgtgcac tggatatctg atttcctggc accagcaaag      1080
gccaccctgg gagagacaca cgggctgttc cctaacacca tgctgtttgc cagcgaggcc      1140
tgctgtgggt ccaagttttg ggagcagtcc gtgaggctgg gatcttgga caggggcatg      1200
cagtactccc actctatcat caccaatctg ctgtatcacg tgggtgggctg gacagactgg      1260
aacctggccc tgaatccaga gggcgggccc aactgggtga gaaatttcgt ggatagcccc      1320
atcatcgtgg acatcaccaa ggatacatc tacaagcagc caatgtttta tcacctgggc      1380
cacttctcta agtttatccc agagggcagc cagaggggtg gcctggtggc cagccagaag      1440
aacgacctgg atgccgtggc cctgatgcac cctgatggct ccgccgtggg ggtggtgctg      1500
aatcgctcta gcaaggacgt gcctctgacc atcaaggatc cagccgtggg cttcctggag      1560
actatttccc ccggctattc aattcatacc tatctgtgga gaaggcagtg a      1611

```

<210> 13

<211> 448

<212> ADN
 <213> homo sapiens

<400> 13
 agtgcaagtg ggttttagga ccaggatgag gcgggggtggg ggtgcctacc tgacgaccga 60
 ccccgaccca ctggacaagc acccaacccc cattccccaa attgcgcatc ccctatcaga 120
 gagggggagg ggaaacagga tgcggcgagg cgcgtgcgca ctgccagctt cagcaccgcg 180
 gacagtgcct tcgccccgc ctggcggcgc gcgccaccgc cgcctcagca ctgaaggcgc 240
 gctgacgtca ctgcgcggtc ccccgcaaac tccccttccc ggccaccttg gtcgcgtccg 300
 cgccgccgcc ggcccagccg gaccgcacca cgcgaggcgc gagatagggg ggcacgggcg 360
 cgaccatctg cgctgcggcg ccggcgactc agcgtgcct cagtctgcgg tgggcagcgg 420
 aggagtcgtg tcgtgcctga gagcgag 448

<210> 14
 <211> 735
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> proteína cápside de AAV TT

<400> 14

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
 20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80

Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Ile Leu Glu Pro
 115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140

Pro Val Glu His Ser Pro Ala Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160

Lys Ser Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175

Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
 180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Ser Gly Ser Gly
 195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
 210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270

Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
 275 280 285

Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
 290 295 300

Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
 305 310 315 320

Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
 325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 340 345 350

Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365

Val	Phe	Met	Val	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asn	Gly	Ser	370	375	380	
Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro	Ser	385	390	395	400
Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Thr	Phe	Ser	Tyr	Thr	Phe	Glu	405	410	415	
Asp	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	Asp	Arg	420	425	430	
Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Arg	Thr	435	440	445	
Asn	Thr	Pro	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Met	Ser	Arg	Leu	Gln	Phe	Ser	Gln	450	455	460	
Ala	Gly	Ala	Ser	Asp	Ile	Arg	Asp	Gln	Ser	Arg	Asn	Trp	Leu	Pro	Gly	465	470	475	480
Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Lys	Thr	Ala	Ala	Asp	Asn	Asn	485	490	495	
Asn	Ser	Asp	Tyr	Ser	Trp	Thr	Gly	Ala	Thr	Lys	Tyr	His	Leu	Asn	Gly	500	505	510	
Arg	Asp	Ser	Leu	Val	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	Asp	515	520	525	
Asp	Glu	Glu	Lys	Tyr	Phe	Pro	Gln	Ser	Gly	Val	Leu	Ile	Phe	Gly	Lys	530	535	540	
Gln	Asp	Ser	Gly	Lys	Thr	Asn	Val	Asp	Ile	Glu	Lys	Val	Met	Ile	Thr	545	550	555	560
Asp	Glu	Glu	Glu	Ile	Arg	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Gln	Tyr	565	570	575	
Gly	Ser	Val	Ser	Thr	Asn	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Thr	Gln	Ala	Ala	Thr	580	585	590	
Ser	Asp	Val	Asn	Thr	Gln	Gly	Val	Leu	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln	Asp	595	600	605	

Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
610 615 620

Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
625 630 635 640

His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
645 650 655

Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln
660 665 670

Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys
675 680 685

Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr
690 695 700

Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr
705 710 715 720

Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 15
<211> 145
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ITR flip de AAV2

<400> 15
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcct 145

<210> 16
<211> 145
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ITR flop de AAV2

<400> 16
aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgcag agagggagtg gccaa

145

<210> 17
<211> 449
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 17

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
20 25 30

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
35 40 45

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
50 55 60

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
65 70 75 80

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
85 90 95

His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
100 105 110

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
115 120 125

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
130 135 140

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
145 150 155 160

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
165 170 175

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
180 185 190

Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
195 200 205

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
 210 215 220

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
 225 230 235 240

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
 245 250 255

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala
 260 265 270

Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
 275 280 285

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
 290 295 300

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 305 310 315 320

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 325 330 335

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 340 345 350

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 355 360 365

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 370 375 380

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 385 390 395 400

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 405 410 415

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 420 425 430

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 435 440 445

Gln

<210> 18
<211> 449
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 18

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
20 25 30

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
35 40 45

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
50 55 60

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
65 70 75 80

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
85 90 95

His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
100 105 110

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
115 120 125

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
130 135 140

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
145 150 155 160

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
165 170 175

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
180 185 190

Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
195 200 205

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
 210 215 220

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
 225 230 235 240

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
 245 250 255

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala
 260 265 270

Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
 275 280 285

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
 290 295 300

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 305 310 315 320

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 325 330 335

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 340 345 350

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 355 360 365

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 370 375 380

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 385 390 395 400

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 405 410 415

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 420 425 430

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 435 440 445

Gln

<210> 19
<211> 1611
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> variante del gen GBA1 humano

<400> 19
atggagtttt caagtccttc cagagaggaa tgtcccaagc ctttgagtag ggtaagcatc 60
atggctggca gcctcacagg attgcttcta cttcaggcag tgtcgtgggc atcagggtgcc 120
cgccccctgca tccctaaaag cttcgggtac agctcgggtgg tgtgtgtctg caatgccaca 180
tactgtgact cctttgaccc cccgaccttt cctgccccttg gtaccttcag ccgctatgag 240
agtacacgca gtgggcgacg gatggagctg agtatggggc ccatccaggc taatcacacg 300
ggcacaggcc tgctactgac cctgcagcca gaacagaagt tccagaaagt gaagggattt 360
ggagggggcca tgacagatgc tgctgctctc aacatccttg ccctgtcacc ccctgccc aa 420
aatttgctac ttaaatacgta cttctctgaa gaaggaatcg gatataacat catccgggta 480
cccatggcca gctgtgactt ctccatccgc acctacacct atgcagacac ccctgatgat 540
ttccagttgc acaacttcag cctcccagag gaagatacca agctcaagat acccctgatt 600
caccgagccc tgcagttggc ccagcgtccc gtttctactcc ttgccagccc ctggacatca 660
cccacttggc tcaagaccaa tggagcgggtg aatgggaagg ggtcactcaa gggacagccc 720
ggagacatct accaccagac ctggggccaga tactttgtga agttcctgga tgcctatgct 780
gagcacaagt tacagttctg ggcagtgaca gctgaaaatg agccttctgc tgggctgttg 840
agtggatacc ctttccagtg cctgggcttc acccctgaac atcagcgaga cttcattgcc 900
cgtgacctag gtccctacct cgccaacagt actcaccaca atgtccgcct actcatgctg 960
gatgaccaac gcttgctgct gcccacttg gcaaagggtgg tactgacaga ccagaaagca 1020
gctaaatatg ttcattggcat tgctgtacat tggtaacctg actttctggc tccagccaaa 1080
gccaccctag gggagacaca ccgcctgttc cccaacacca tgctctttgc ctgagaggcc 1140
tgtgtgggct ccaagttctg ggagcagagt gtgcggctag gctcctggga tcgagggatg 1200
cagtacagcc acagcatcat cacgaacctc ctgtaccatg tggtcggctg gaccgactgg 1260
aaccttgccc tgaaccccgga aggaggaccc aattgggtgc gtaactttgt cgacagtccc 1320
atcattgtag acatcaccaa ggacacgttt taaaacagc ccatgttcta ccaccttggc 1380
cattcagca agttcattcc tgagggctcc cagagagtgg ggctgggtgc cagtcagaag 1440

aacgacctgg acgcagtggc actgatgcat cccgatggct ctgctgttgt ggtcgtgcta 1500
aaccgctcct ctaaggatgt gcctcttacc atcaaggatc ctgctgtggg cttcctggag 1560
acaatctcac ctggctactc cattcacacc tacctgtggc gtcgccagtg a 1611

<210> 20
<211> 376
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> promotor nGUSB #2

<400> 20
attcctgctg ggaaaagcaa gtggaggtgc tccttgaaga aacaggggga tcccaccgat 60
ctcagggggt ctgttctggc ctgcggccct ggatcgtcca gcctgggtcg ggggtggggag 120
cagacctcgc ctttatcggc tggggctgag ggtgagggtc ccgtttcccc aaaggcctag 180
cctgggggttc cagccacaag ccctaccggg cagcgcccg ccccgcccct ccaggcctgg 240
cactcgtcct caaccaagat ggcgcggatg gcttcaggcg catcacgaca ccggcgcgtc 300
acgcgacctg ccctacgggc acctcccgcg cttttcttag cgccgcagac ggtggccgag 360
cgggggacct ggaagc 376

<210> 21
<211> 1663
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> promotor CAG #2

<400> 21
ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc 60
gcgttacata acttacggta aatggcccg cttggctgacc gcccaacgac ccccgcccat 120
tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc 180
aatgggtgga gtattttacgg taaactgcc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc 240
caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgctggcat tatgccagtg 300
acatgacctt atgggacttt cttacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta 360
ccatggtcga ggtgagcccc acgttctgct tcaactctcc catctcccc cctccccac 420
ccccaatttt gtattttattt attttttaat tattttgtgc agcgatgggg gcgggggggg 480
ggggggggcg cgcgccaggc ggggcggggc ggggcgaggg gcggggcggg gcgaggcgga 540
gaggtgcggc ggcagccaat cagagcggcg cgctccgaaa gtttcctttt atggcgaggg 600

ggcggcgggcg gcgccctat aaaaagcgaa ggcgcggcg ggcgggagtc gctgcgacgc	660
tgccttcgcc ccgtgccccg ctccgcgcgc gcctcgcgc gcccgccccg gctctgactg	720
accgcgttac tcccacaggt gagcgggcg gacggccctt ctctccggg ctgtaattag	780
cgcttggttt aatgacggct tgtttctttt ctgtggctgc gtgaaagcct tgaggggctc	840
cgggagggcc ctttgtgcgg gggggagcgg ctcggggggt gcgtgcgtgt gtgtgtgcgt	900
ggggagcgcc gcgtgcggcc cgcgctgcc ggcggctgtg agcgtgcgg gcgcggcgcg	960
gggctttgtg cgctccgcag tgtgcgcgag gggagcgcgg ccggggggcg tgccccgcgg	1020
tgcggggggg gctgcgagg gaacaaaggc tgcgtgcgg gtgtgtgcgt ggggggggtga	1080
gcagggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg taacccccct ctgcaccccc ctccccgagt	1140
tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtacg gggcgtggcg cggggctcgc	1200
cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgcgggc ggggcggggc cgcctcgggc	1260
cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcg cccccggag gccggcggt gtcgagggcg	1320
ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg gacttccttt	1380
gtcccaaate tgtgcggagc cgaaatctgg gaggcgcgc cgcaccccct ctacggggcg	1440
cggggcgaag cgggtgcggc ccggcaggaa ggaaatgggc ggggagggcc ttcgtgcgtc	1500
gccgcgcgc cgtecccttc tccctctcca gcctcggggc tgtccgcggg gggacggctg	1560
ccttcggggg ggacggggca gggcggggtt cggcttctgg cgtgtgaccg gcggctctag	1620
agcctctgct aaccatgttc atgccttctt ctttttcta cag	1663

<210> 22
 <211> 400
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> versión corta del promotor de Ubiquitina C (UbC) humana

<400> 22	
ggcctccgcg ccgggttttg ggcctcccg cgggcgcccc cctcctcacg gcgagcgctg	60
ccacgtcaga cgaagggcgc agcgagcgtc ctgaccttc gcccgagc ctcaggacag	120
cggcccgtg ctcataagac tcggccttag aacccagta tcagcagaag gacattttag	180
gacgggactt gggtgactct agggcactgg ttttctttcc agagagcgga acaggcgagg	240
aaaagtagtc cttctcggc gattctgcgg agggatctcc gtggggcggt gaacgccgat	300
gattatataa ggacgcgcc ggtgtggcac agctagtctc gtcgcagccg ggatttgggt	360
cgcggttctt gtttgtggat cgctgtgatc gtcacttgg	400

<210> 23
 <211> 1212
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> versión larga del promotor de Ubiquitina C (UbC) humana

<400> 23
 ccggaggcgc ggcccaaac cgcgaggggc gcccgcgggg ggaggagtgc cgctcgcgac 60
 ggtgcagtct gcttcccgcg tcgctcgcag gactaggaag gcgggcctgc gagtcctgtc 120
 gccgggcgac gagtattctg agccggaatc ttgggggtcat agtcgtcttc ctgtaaaatc 180
 ctgccctgaa cccactgaga tcccgtagacc aaaagaaagg tctctcgctt tgtccgctcc 240
 ttttcatcag ggaagagccg ctaagacgcc tccctagagg caccgccca cttgaggcta 300
 ctaatatatt cctgcgcggc ccacaccgtg tcgatcaagg cagcgtcggc cctaaaccca 360
 gcgccaagaa caaacaccta gcgacactag cagtgaacca ctcatcgccc gacgaccgga 420
 ccggccccga aagcaccggc ggcccggcga gccaccctgc cttcgcacac ctctctggcg 480
 gttcccgaca tcagaccag gcgctcgttc caacgggact tgacccccaa cccccctgc 540
 gtcgttttac cgccgacaag ggctcagaac ttaccttctg cgaacactcc gcccgacact 600
 ccagcaactt tgttccaccc ccggtaccac ccgcggttct tgggttccag aactccggaa 660
 gcgattacgc ctttctgaga ataagcccac tctaccgcac ccggtggtag acccctggga 720
 ctgcacttca aacagtgact gacctcttga gccaaacagc agacaacgcc cccgccgtca 780
 ataccgccac ggcaaccgt cactgtgggca tggaaacctt cgcgcgcggg agcagcacag 840
 cactgcagtg ggcaagacaa ccgaatatta cgtcccaccc cgggtggacgg ccatccacac 900
 gccatccgaa aagaggcagc gtcttcggtc ccaagcccgg atcccatccg agaggactta 960
 gctgtccgcg gcctggagac cactcccctc cctattcact ccgcagtcaa agaaaccagc 1020
 caaaatacat ggatagaaga attcatcgac ttcgaggcca aaacttgata cgcgagcccc 1080
 aaccgctcac aaaaaacact tcaaaaaatc cgtggaaaac ttacattag taaaccagc 1140
 tatacattaa aagtcacaat ctgatcattt aacaggcgat ttaagaccgg caaaaaccga 1200
 aaaaacaatc tg 1212

<210> 24
 <211> 511
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> promotor de fosfoglicerato quinasa 1 (PGK)

<400> 24

gacccctctc tccagccact aagccagttg ctccctcggc tgacggctgc acgcgaggcc	60
tccgaacgtc ttacgccttg tggcgcgccc gtccctgtcc cgggtgtgat ggcgggggtgt	120
ggggcgagg gcggtggcgg gaagggccgg cgacgagagc cgcgcgggac gactcgtcgg	180
cgataaccgg tgtcgggtag cgccagccgc ggcacggtaa cgagggaccg cgacaggcag	240
acgtcccat gatcactctg cacgccgaag gcaaacagtg caggccgtgc ggcgcttggc	300
gttccttgga agggctgaat cccgcctcg tccctcgcag cgccccccg ggtgttccca	360
tcgccgcttc taggcccact ggcacgcttg cctgcacttc ttacacgtc tgggtcccag	420
ccgcgcgac gcaaagggcc ttggtgcggg tctcgtcggc gcagggacgc gtttgggtcc	480
cgacggaacc ttttcgcgt tggggttggg g	511

<210> 25
 <211> 741
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> promotor de CBA/CBh

<400> 25	
agatgtactg ccaagtagga aagtcccgta aggtcatgta ctgggcataa tgccaggcgg	60
gccatttacc gtcattgacg tcaatagggg gcgtacttgg catatgatac acttgatgta	120
ctgccaagtg ggcagtttac cgtaaatact ccacccattg acgtcaatgg aaagtcccta	180
ttggcgttac tatgggaaca tacgtcatta ttgacgtcaa tgggcggggg tcgttgggcg	240
gtcagccagg cgggccatth accgtaagtt atgtaacgcg gaactccata tatgggctat	300
gaactaatga cccgtaatt gattactatt aaccacgttc tgcttcactc tccccatctc	360
ccccccctcc ccacccccaa ttttgtatth atttatthtt taattatthtt gtgcagcgat	420
gggggcgggg gggggggggg cgcgcgccag gcggggcggg gcggggcgag ggcggggcg	480
gggcgaggcg gagaggtgcg gcggcagcca atcagagcgg cgcgctccga aagtttcctt	540
ttatggcgag gcggcgggcg cggcggccct ataaaaagcg aagcgcgcg cggaactgaa	600
aaaccagaaa gttaactggt aagtttagtc ttttgtctt ttatttcagg tcctgggtgt	660
gcaaatacaa gaactgctcc tcagtggatg ttgcctttac ttctaggcct gtacggaagt	720
gttacttctg ctctaaaagc t	741

<210> 26
 <211> 818
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> promotor de CBA/CBh

<400> 26

```
agatgtactg ccaagtagga aagtcccgta aggtcatgta ctgggcataa tgccaggcgg      60
gccatttacc gtcattgacg tcaatagggg gcgacttgg catatgatac acttgatgta      120
ctgccaagtg ggcagtttac cgtaaatact ccacccattg acgtcaatgg aaagtcccta      180
ttggcgttac tatgggaaca tacgtcatta ttgacgtcaa tgggcggggg tcgttgggcg      240
gtcagccagg cgggccatth accgtaagtt atgtaacgcg gaactccata tatgggctat      300
gaactaatga ccccgtaatt gattactatt aaccacgttc tgcttcactc tccccatctc      360
ccccccctcc ccacccccaa ttttgtatth atthatttht taattattth gtgcagcgat      420
gggggcgggg gggggggggg cgcgcgccag gcggggcggg gcggggcgag gggcgggcg      480
gggcgaggcg gagaggtgcg gcggcagcca atcagagcgg cgcgctccga aagtttcctt      540
ttatggcgag gcggcgggcg cggcgggcct ataaaaagcg aagcgcgcgg cggggagtcg      600
ctgcgttgcc ttgcgccgt gcccgctcc gcgcgcctc gcgcgcgcg ccccggtct      660
gactgaccgc gttactccca caggtgagcg ggcgggacgg cccttctcct ccgggctgta      720
attagcaaga ggtaaggggt taagggatgg ttgggtgggt ggggtattaat gtttaattac      780
ctgttttaca ggctgaaat cacttggtth taggttgg      818
```

<210> 27

<211> 195

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos del promotor JeT

<400> 27

```
gaattcgggc ggagttaggc cggagccaat cagcgtgcgc cgttccgaaa gttgccttht      60
atggctgggc ggagaatggg cgggtgaacgc cgatgattat ataaggacgc gccgggtgtg      120
gcacagctag ttccgtcgca gccgggattt gggtcgcggg tcttgthtgt ggatccctgt      180
gatcgtcact tgaca      195
```

<210> 28

<211> 510

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la hormona de crecimiento humana poliA

<400> 28

```
acgggtggca tccctgtgac ccctccccag tgctctcct gccctggaa gttgccactc      60
```

cagtgccac cagccttgtc ctaataaaat taagttgcat cattttgtct gactaggtgt	120
ccttctataa tattatgggg tggagggggg tggtatggag caaggggcaa gttgggaaga	180
caacctgtag ggctgcggg gtctattggg aaccaagctg gagtgcagtg gcacaatctt	240
ggctcactgc aatctccgcc tctggggttc aagcgattct cctgcctcag cctcccgagt	300
tgttgggatt ccaggcatgc atgaccaggc tcagctaatt ttgtttttt tggtagagac	360
ggggtttcac catattggcc aggctgggtct ccaactccta atctcaggtg atctaccac	420
cttggcctcc caaattgctg ggattacagg cgtgaaccac tgctcccttc cctgtccttc	480
tgattttgta ggtaaccacg tgcggaccga	510