

## GENOTERAPIA PARA EL TRATAMIENTO DE LA MUCOPOLISACARIDOSIS III A

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- [0001] La mucopolisacaridosis tipo IIIa (MPS IIIa, MPS IIIA, o síndrome de Sanfilippo tipo A), es un trastorno hereditario autosómico recesivo causado por la deficiencia de la enzima N-sulfoglucosamina sulfhidrolasa (SGSH), que participa en el catabolismo lisosomal de los glicosaminoglicanos (GAG) heparán sulfato. Esta deficiencia conduce a la acumulación intracelular de heparán sulfato no degradado, así como de gangliósidos GM2 y GM3 en el sistema nervioso central, causando disfunción neuronal y neuroinflamación. La enfermedad se manifiesta primero como un retraso cognitivo en torno a los 3 años de edad, seguido de un comportamiento anormal hiperactivo y agresivo. La evolución de la enfermedad conduce a una pérdida de las funciones motoras y neurológicas durante la primera década y a la muerte a una edad promedio de 15 años.
- [0002] Se usan medicamentos para aliviar los síntomas (como anticonvulsivos para las convulsiones) y mejorar la calidad de vida. El trasplante de células madre hematopoyéticas no parece mejorar significativamente el deterioro neuropsicológico. Se dispone de enzimas recombinantes para las deficiencias de la MPS III, pero los ensayos de terapia de sustitución enzimática (ERT) no han sido favorables para mejorar el pronóstico porque las enzimas no son capaces de ingresar en el sistema nervioso central. Véase, por ejemplo, Germaine L Defendi. Genetics of Mucopolysaccharidosis Type III. Medscape. 21 de marzo de 2014. Los cambios en la dieta no previenen la evolución de la enfermedad, pero limitar la leche, el azúcar y los productos lácteos ha ayudado a algunas personas que tienen mucosidad excesiva.
- [0003] Se han descrito varios enfoques de genoterapia con potencial para el tratamiento eficaz de la MPS IIIA. Sin embargo, las construcciones actuales no han logrado el nivel deseado de efecto terapéutico y no existe un tratamiento estándar o cura para el tratamiento del síndrome de Sanfilippo. En la técnica existe una necesidad continua de composiciones y métodos para el tratamiento eficaz de la MPS IIIA.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

**[0004]** Se proporciona en este documento un virus adenoasociado recombinante (rAAV) terapéutico e incapaz de replicarse que comprende una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una N-sulfoglicosamina sulfohidrolasa humana (hSGSH) funcional y una secuencia reguladora que dirige la expresión de esta en una célula diana. En un aspecto proporcionado en este documento es un rAAV que comprende cápside virus adenoasociado (AAV) y un genoma de vector, en donde el genoma de vector comprende una repetición terminal invertida (ITR) 5' de AAV, un casete de expresión y una 3' ITR de AAV, en donde el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico genéticamente modificada que codifica una N-sulfoglicosamina sulfohidrolasa humana (hSGSH) funcional, en donde la secuencia codificante de hSGSH comprende una secuencia peptídica señal y una secuencia codificante de hSGSH madura, en donde la codificación de la hSGSH madura tiene la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de SEQ ID NO: 16 o una secuencia de ácido nucleico que es (a) al menos 85 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 23; o (b) al menos 99 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 23 en donde la secuencia codificante de hSGSH está enlazada operativamente a secuencias de control reguladoras que dirigen la expresión de la hSGSH en una célula. En determinadas modalidades, el rAAV comprende la secuencia codificante de hSGSH madura de la SEQ ID NO: 22 que codifica SEQ ID NO: 23 (hSGSH.A482Y-E488V). En determinadas modalidades, la secuencia peptídica señal es una secuencia señal nativa que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 31 o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 32. En determinadas modalidades, el péptido señal es un péptido señal exógeno, en donde la secuencia peptídica señal es una secuencia señal BiP que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 29 o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 30. En determinadas modalidades, la hSHSH tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 18 o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 19. En determinadas modalidades, la hSHSH tiene la secuencia de ácido

nucleico de la SEQ ID NO: 24 o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 25. En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH que comprende la secuencia señal BiP en el extremo amino de la hSGSH madura (extremo 5' de la secuencia codificante de hSGSH madura) y el péptido vIGF2 en el extremo carboxi de la hSGSH madura (en el extremo 3' de la secuencia codificante de hSGSH madura) y tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 20 o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 21. En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 26 o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 27. En algunas modalidades, las secuencias reguladoras comprenden además uno o más de un promotor CB7, una secuencia Kozak, un intrón, un potenciador, una señal TATA y una secuencia señal de poliadenilación (poliA), opcionalmente en donde las secuencias reguladoras comprenden además un elemento WPRE.

**[0005]** En determinadas modalidades, el genoma de vector tiene la secuencia de ácido nucleico (i) CB7.Cl.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.rBG (SEQ ID NO: 3); (ii) CB7.Cl.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.WPRE.rBG (SEQ ID NO: 7); (iii) CB7.Cl.hSGSHcoV1.rBG (SEQ ID NO: 10); (iv) CB7.Cl.hSGSHcoV1-4xmiR183.rBG (SEQ ID NO: 13); (v) CB7.Cl.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.WPRE.4xmiR182.rBG (SEQ ID NO: 40); (vi) CB7.Cl.BIP.hSGSHcov1(A482Y-E488V).vIGF2.WPRE.4xmiR183.rBG (SEQ ID NO: 1); o (vii) CB7.Cl.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.WPRE.4xmiR182.4xmiR183.rBG (SEQ ID of SEQ ID NO: 14 o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta. En determinadas modalidades, la cápside es una cápside AAVhu68, una cápside AAVhu95 o una cápside AAVrh91.

**[0006]** En otro aspecto, se proporciona en este documento una composición y composición farmacéutica que comprende un rAAV o un vector como se describe en este documento y un medio de suspensión acuoso. En determinadas modalidades, el rAAV o la composición de este es para usar en el tratamiento de la Mucopolisacaridosis III A (MPS IIIA o síndrome de Sanfilippo tipo A) y/o mejorar la marcha o la movilidad, reducir

los temblores, reducir los espasmos, mejorar la postura, o reducir la evolución de la pérdida de visión en un sujeto que lo necesite.

**[0007]** En otro aspecto, se proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene MPS IIIA, o mejorar los síntomas de MPS IIIA, o retrasar la evolución de MPS IIIA. El método  
 5 comprende administrar una cantidad eficaz de un rAAV o un vector según se describe en este documento a un sujeto que lo necesite. En determinadas modalidades, se formula una suspensión para administración intravenosa, administración intratecal, administración intracisterna magna o administración intracerebroventricular. En determinadas modalidades, la suspensión se formula para administración a una dosis de  
 10  $1 \times 10^9$  GC por gramo de masa cerebral a aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  GC por gramo de masa cerebral.

**[0008]** En determinadas modalidades, se proporciona en este documento una molécula de ácido nucleico que comprende un casete de expresión seleccionado de las SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11 y 14. En determinadas modalidades, la molécula de ácido nucleico es un  
 15 plásmido. En determinadas modalidades, se proporciona una célula de empaquetamiento que comprende el casete de expresión, el genoma de vector o el plásmido.

**[0009]** Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

20 **[0010]** La FIG. 1A muestra varias construcciones de hSGSH diseñadas, que comprenden la secuencia codificante de SGSH madura natural (WT), y además comprenden la secuencia señal endógena o la secuencia señal de proteína inmunoglobulina de unión (BiP), enlazador, péptido vIGF2 (es decir, péptido que se une a CI-MPR), y/o secuencia de escisión lisosomal.

25 **[0011]** La FIG. 1B muestra los niveles de expresión de SGSH secretada en el medio de células HEK293 a los 3 días después de la transfección, analizados mediante inmunoelectrotransferencia.

**[0012]** La FIG. 1C muestra los niveles de expresión de SGSH cuantificados (del análisis de inmunoelectrotransferencia; FIG. 1B), representados como niveles de secreción de SGSH normalizados.

**[0013]** La FIG. 2A muestra los niveles de expresión de SGSH secretada en el medio de células HEK293 a los 4 días después de la transfección, analizados mediante inmunoelectrotransferencia.

**[0014]** La FIG. 2B muestra los niveles de expresión de SGSH cuantificados (del análisis de inmunoelectrotransferencia; FIG. 2A), representados como niveles de secreción de SGSH normalizados.

**[0015]** La FIG. 2C muestra una representación esquemática de la secuencia codificante de SGSH madura modificada genéticamente para usar en construcciones que comprenden secuencia señal de BiP y péptido vIGF2.

**[0016]** La FIG. 3A muestra la actividad enzimática de SGSH a partir de muestras de suero recolectadas de ratones administrados con AAVhu68.hSGSH ( $1 \times 10^{10}$  GC o  $1 \times 10^{11}$  GC) el día 7 del estudio.

**[0017]** La FIG. 3B muestra la actividad enzimática de SGSH a partir de muestras de suero recolectadas de ratones administrados con AAVhu68.hSGSH ( $1 \times 10^{11}$  GC o  $1 \times 10^{11}$  GC) el día 28 del estudio.

**[0018]** La FIG. 4A muestra la actividad enzimática de SGSH a partir de muestras de tejido hepático homogeneizado recolectadas de ratones administrados con  $1 \times 10^{10}$  GC o  $1 \times 10^{11}$  GC.

**[0019]** La FIG. 4B muestra la actividad enzimática de SGSH a partir de muestras de tejido cerebral homogeneizado recolectadas de ratones administrados con  $1 \times 10^{10}$  GC o  $1 \times 10^{11}$  GC.

**[0020]** La FIG. 5A muestra niveles de expresión de SGSH según se analizaron a partir de muestras de tejido hepático homogeneizado de ratones administrados con AAVhu68.hSGSH a dosis de  $1 \times 10^{10}$  GC y  $1 \times 10^{11}$  GC.

**[0021]** La FIG. 5B muestra los niveles de expresión cuantificados de SGSH según se analizaron mediante inmunoelectrotransferencia (mostrados en la FIG. 5A).

**[0022]** La FIG. 6A muestra la expresión y cuantificación de SGSH en la corteza tras la administración de AAVhu68.hSGSH con WPRE. La FIG. 6B muestra la expresión y cuantificación de SGSH en el cerebelo tras la administración de AAVhu68.hSGSH con WPRE. La FIG. 6C muestra la expresión y cuantificación de SGSH en el hipocampo tras la administración de AAVhu68.hSGSH con WPRE. La FIG. 6D muestra la expresión y cuantificación de SGSH en el tronco encefálico tras la administración de AAVhu68.hSGSH con WPRE.

**[0023]** La FIG. 7A muestra resultados de la concentración de proteínas de SGSH, representados como ng/g según se analizaron a partir de muestras de tejido hepático recolectadas de ratones a los que se les administró con AAVhu68.hSGSH a dosis de  $1 \times 10^{10}$  GC a  $1 \times 10^{11}$  GC.

**[0024]** La FIG. 7B muestra la correlación entre la actividad enzimática de SGSH (según se midió usando el ensayo de fluorescencia) y el ensayo de péptido señal realizado en muestras de hígado recolectadas de ratones administrados con dosis altas de AAVhu68.hSGSH (FIG. 7A;  $1 \times 10^{11}$  GC).

**[0025]** Las FIGS. 8A a 8F muestran el análisis de límites definidos de la reducción del compartimento lisosomal como se examinó mediante la cuantificación de LAMP1 utilizando inmunofluorescencia y análisis histoquímico en ratones MPS IIIA SGSH KO administrados a una dosis baja ( $1 \times 10^{10}$ ) de AAVhu68.hSGSH. Grupo 1 (G1) = AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1; G2 = AAVhu68.CB7.BIP-hSGSHcoV1; G3 = AAVhu68.CB7.BIP-hSGSHcoV1-vIGF2; G4 = AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1; G5 = AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 – vIGF2; G6 = controles PBS ratones KO; G7 = controles PBS ratones WT. La FIG. 8A muestra el tamaño promedio de las células LAMP1-positivas ( $\mu\text{m}^2$ ) en el cerebelo. La FIG. 8B muestra el porcentaje de área LAMP1 en el cerebelo. La FIG. 8C muestra el tamaño promedio de las células LAMP1-positivas ( $\mu\text{m}^2$ ) en el tronco encefálico. La FIG. 8D muestra el porcentaje de área LAMP1 en el tronco encefálico. La FIG. 8E muestra el tamaño promedio de las células LAMP1-positivas ( $\mu\text{m}^2$ ) en la corteza. La FIG. 8F muestra el porcentaje de área LAMP1 en la corteza.

**[0026]** Las FIGS. 9A a 9F muestran el análisis de límites definidos de la reducción del compartimento lisosomal como se examinó mediante la cuantificación de LAMP1 utilizando inmunofluorescencia y análisis histoquímico en ratones MPS IIIA SGSH KO administrados a una dosis baja ( $1 \times 10^{11}$ ) de AAVhu68.hSGSH. G6 y G7 similares a la FIG. 8 (controles PBS KO y WT); G8 = AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1; G11 = AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) ; G12 = AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 – vIGF2. La FIG. 9A muestra el tamaño promedio de las células LAMP1-positivas ( $\mu\text{m}^2$ ) en el cerebelo. La FIG. 9B muestra el porcentaje de área LAMP1 en el cerebelo. La FIG. 9C muestra el tamaño promedio de las células LAMP1-positivas ( $\mu\text{m}^2$ ) en el tronco encefálico. La FIG. 9D muestra el porcentaje de área LAMP1 en el tronco encefálico. La FIG. 9E muestra el tamaño promedio de las células LAMP1-positivas ( $\mu\text{m}^2$ ) en la corteza. La FIG. 9F muestra el porcentaje de área LAMP1 en la corteza. La FIG. 9H muestra el porcentaje de área LAMP1 en la corteza para G1, G2 y G3, como se define en las FIGS. 8A-8F, a una dosis de  $2 \times 10^{10}$  GC en ratones de 2-3 meses de edad, medido a 1 mes usando la prueba de Mann-Whitney. La FIG. 9I muestra el porcentaje de área LAMP-1 en el cerebelo para G1, G2 y G3, a una dosis de  $2 \times 10^{10}$  GC en ratones de 2-3 meses de edad, medido a 1 mes usando la prueba de Mann-Whitney. La FIG. 9J muestra el porcentaje de área LAMP-1 en el hipocampo para G1, G2 y G3 a una dosis de  $2 \times 10^{10}$  GC en ratones de 2-3 meses de edad, medido a 1 mes usando la prueba de Mann-Whitney.

**[0027]** Las FIGS. 10A a 10C muestran la actividad de SGSH y la reducción de GAG en el cerebro de ratones machos y hembras. La FIG. 10A muestra la actividad de la SGSH en el cerebro, representada como actividad (nmol/ml/h). La FIG. 10B muestra la actividad de la SGSH en el cerebro, representada como logaritmo de la actividad. La FIG. 10C muestra los niveles de GAG en el cerebro representados como ng GAG(HS) por mg de proteína.

**[0028]** Las FIGS. 11A a 11C muestran la actividad de SGSH en la reducción de GAG en la médula espinal de ratones machos y hembras. La FIG. 11A muestra la actividad de la SGSH en la médula espinal representada como actividad (nmol/ml/h). La FIG. 11B muestra la actividad de la SGSH en la médula espinal representada como logaritmo de

la actividad. La FIG. 11C muestra los niveles de GAG en la médula espinal representada como ng GAG(HS) por mg de proteína.

**[0029]** Las FIGS. 12A a 12C muestran la actividad de SGSH en la reducción de GAG en el hígado de ratones machos y hembras. La FIG. 12A muestra la actividad de la SGSH en el hígado, representada como actividad (nmol/ml/h). La FIG. 12B muestra la actividad de la SGSH en el hígado representada como logaritmo de la actividad. La FIG. 12C muestra los niveles de GAG en el hígado representados como ng GAG(HS) por mg de proteína.

**[0030]** La FIG. 13A muestra la actividad de la SGSH en suero representada como actividad (nmol/ml/h) según se midió en el día 7 posterior a la inyección ICV. La FIG. 13B muestra la actividad de la SGSH en suero representada como logaritmo de la actividad (nmol/ml/h) en el día 7 posterior a la inyección ICV. La FIG. 13C muestra los niveles de actividad de SGSH en plasma representados como actividad (nmol/ml/h) según se midió al mes posterior a la inyección ICV. La FIG. 13D muestra los niveles de actividad de SGSH en plasma representados como logaritmo de la actividad (nmol/ml/h) según se midió al mes posterior a la inyección ICV.

**[0031]** La FIG. 14A muestra los niveles de GM3 total en cerebro de ratón representados como pmol GM3 por mg de proteína. La FIG. 14B muestra los niveles de GM3 total en cerebro de ratón representados como escala logarítmica de pmol GM3 por mg de proteína.

**[0032]** La FIG. 15A muestra los niveles de actividad de referencia de la SGSH en secciones cerebrales de NHP no tratadas, representados como nmol/mg/h, medidos en médula, cerebelo, tálamo y corteza frontal. La FIG. 15B muestra los niveles de actividad de referencia de la SGSH en secciones de médula espinal de NHP no tratadas, representados como nmol/mg/h, según se midió en secciones cervicales, torácicas, lumbares y de ganglios de la raíz dorsal (DRG) cervicales, lumbares y torácicos de la médula espinal.

**[0033]** Las FIGS. 15C a 15E muestran la axonopatía tras la administración de AAVhu68.hSGSH, AAVrh91.hSGSH, o AAVhu68hSGSH con un péptido modificado genéticamente. La FIG. 15C muestra el promedio de necrosis de los ganglios de la raíz

dorsal (DRG). La FIG. 15D muestra el promedio de axonopatía de la médula espinal. La FIG. 15E muestra el promedio de axonopatía del nervio mediano.

**[0034]** La FIG. 16 muestra los niveles de expresión del transgén SGSH, representados como AFU (800/700 nm), en neuroesferas tratadas con AAV.hSGSH que comprenden la construcción WT SGSH, la construcción SGSH modificada genéticamente o la construcción SGSH modificada genéticamente que comprende además el elemento WPRE en el genoma de vector AAV a varias MOI.

**[0035]** La FIG. 17A muestra la actividad de SGSH en el cerebro de ratón tratado. La FIG. 17B muestra los niveles de GAG (HS) en el cerebro. La FIG. 17C muestra GM3 total en cerebro de ratón. Estos resultados muestran que la adición de WPRE al candidato modificado genéticamente rescata la expresión a niveles similares a los de la construcción WT y permite una depuración de almacenamiento comparable o mejor.

**[0036]** La FIG. 18A muestra la actividad de SGSH en tejido cerebral de cerebelo de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2 (AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE). La FIG. 18B muestra la actividad de SGSH en tejido cerebral de médula de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2 (AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE). La FIG. 18C muestra la actividad de SGSH en tejido cerebral de corteza frontal de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2 (AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE). La FIG. 18D muestra la actividad de SGSH en tejido cerebral de tálamo de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2 (AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE).

**[0037]** La FIG. 19A muestra la actividad de SGSH en la sección de médula espinal (SC cervical) de cerebelo de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2 (AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE). La FIG. 19B muestra

la actividad de SGSH en la sección de médula espinal (SC torácica) de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2 (AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE). La FIG. 19C muestra la actividad de SGSH en la sección de médula

5 espinal (SC lumbar) de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2 (AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE).

**[0038]** La FIG. 20A muestra la actividad de SGSH en plasma de NHP tratado. La FIG. 20B muestra la actividad de SGSH en CSF tratado.

10 **[0039]** La FIG. 21A muestra el título total de IgG anti-hSGSH en plasma de NHP. La FIG. 21B muestra el título total de anti-hSGSH en CSF.

**[0040]** La FIG. 22A muestra resultados de la velocidad de conducción nerviosa (NCV), representada como NP (polarización nerviosa en Amp) en el nervio mediano izquierdo. La FIG. 22B muestra resultados de la velocidad de conducción nerviosa (NCV),

15 representada como NP (polarización nerviosa en Amp) en el nervio mediano derecho. La FIG. 22C muestra resultados de la velocidad de conducción nerviosa (NCV), representada como velocidad en el nervio mediano izquierdo. La FIG. 22D muestra resultados de la velocidad de conducción nerviosa (NCV), representada como velocidad en el nervio mediano derecho.

20 **[0041]** La FIG. 23 muestra suero Nfl en NHP tratados, lo que demuestra que el Nfl suero se alinea con la gravedad de la axonopatía histopatológica.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

**[0042]** En este documento se proporcionan composiciones y métodos de composiciones útiles para el tratamiento de la Mucopolisacaridosis tipo IIIa (MPS IIIA) y/o para aliviar los

25 síntomas de la MPS IIIA. Estas composiciones comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una N-sulfoglucosamina sulfhidrolasa humana (hSGSH) funcional y una secuencia reguladora que dirige la expresión de esta en una célula diana, en donde la secuencia codificante de hSGSH comprende una secuencia peptídica señal y una secuencia codificante de hSGSH madura, en donde la codificación de hSGSH madura

tiene la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de SEQ ID NO: 16 o una secuencia de ácido nucleico que es (a) al menos 85 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 23; o (b) al menos 99 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 23.

**[0043]** En una modalidad, las composiciones y métodos descritos en este documento comprenden secuencias de ácido nucleico, casetes de expresión, vectores, virus recombinantes, otras composiciones y métodos para la expresión de una hSGSH funcional. En otra modalidad, las composiciones y métodos descritos en este documento comprenden secuencias de ácido nucleico, casetes de expresión, vectores, virus recombinantes, células hospedadoras, otras composiciones y métodos para la producción de una composición que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una SGSH humana funcional. En incluso otra modalidad, las composiciones y métodos descritos en este documento comprenden secuencias de ácido nucleico, casetes de expresión, vectores, virus recombinantes, otras composiciones y métodos para la administración de la secuencia de ácido nucleico que codifica una hSGSH funcional a un sujeto para el tratamiento de MPS IIIA. En una modalidad, las composiciones y métodos descritos en este documento son útiles para proporcionar un nivel terapéutico de SGSH en el sistema nervioso central (CNS). De manera adicional o alternativa, las composiciones y métodos descritos en este documento son útiles para proporcionar niveles terapéuticos de SGSH en la periferia, como, por ejemplo, sangre, hígado, riñón o sistema nervioso periférico. En determinadas modalidades, un método basado en un vector viral adenoasociado (AAV) descrito en este documento proporciona una nueva opción de tratamiento, ayudando a restaurar una función deseada de SGSH, a aliviar un síntoma asociado con MPS IIIA, a mejorar biomarcadores relacionados con MPS IIIA, o a facilitar otro(s) tratamiento(s) para MPS IIIA, proporcionando expresión de la proteína SGSH en un sujeto que lo necesita.

**[0044]** Tal como se usa en este documento, el término “un nivel terapéutico” significa una actividad enzimática de al menos aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 %, o al menos 100 %.

aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 100 %, más de 100 %, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces o aproximadamente 5 veces de un control sano. En este documento se describen ensayos adecuados para medir la actividad enzimática de la SGSH. En algunas modalidades, tales niveles terapéuticos de SGSH pueden dar como resultado el alivio de los síntomas relacionados con la MPS III-A; la mejora de los biomarcadores de la enfermedad relacionados con la MPS IIIA; o la facilitación de otro(s) tratamiento(s) para la MPS IIIA, por ejemplo, niveles de GAG en el líquido cefalorraquídeo (CSF), suero, orina y/u otras muestras biológicas; la prevención del deterioro neurocognitivo; la reversión de ciertos síntomas relacionados con la MPS IIIA y/o la prevención de la evolución de ciertos síntomas relacionados con la MPS IIIA; o cualquier combinación de estos.

**[0045]** Como se usa en este documento, “un control sano” se refiere a un sujeto o una muestra biológica de este, en donde el sujeto no tiene un trastorno de MPS IIIA. El control sano puede ser de un sujeto. En otra modalidad, el control sano es un conjunto de múltiples sujetos.

**[0046]** Tal como se usa en este documento, el término “muestra biológica” se refiere a cualquier célula, fluido biológico o tejido. Las muestras adecuadas para usar en esta invención pueden incluir, entre otros, sangre, leucocitos, fibroblastos, suero, orina, plasma, saliva, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico y células de la piel. Dichas muestras pueden diluirse además con solución salina, amortiguador o un diluyente fisiológicamente aceptable. De manera alternativa, dichas muestras se concentran por medios convencionales.

**[0047]** Con respecto a la descripción de estas invenciones, en otra modalidad se pretende que cada una de las composiciones descritas en este documento sea útil en los métodos de la invención. Además, también se pretende que cada una de las composiciones descritas en este documento como útiles en los métodos sea, en otra modalidad, en sí misma una modalidad de la invención.

**[0048]** A menos que se defina lo contrario en la presente memoria descriptiva, los términos técnicos y científicos que se usan en este documento tienen el mismo significado que entienden normalmente los expertos en la técnica relacionadas con la presente invención y por referencia a textos publicados, que proporcionan a un experto en la técnica una guía general de muchos de los términos utilizados en esta solicitud.

**[0049]** Como se usa en este documento, “enfermedad”, “trastorno” y “afección” son Mucopolisacaridosis tipo IIIA (MPSIIIA, MPS IIIA, MPS IIIa, también conocida como síndrome de Sanfilippo tipo A o enfermedad de Sanfilippo tipo A).

**[0050]** Tal como se usa en este documento, el término “síntoma(s) relacionado(s) con MPS IIIA” o “síntoma(s)” se refiere a síntoma(s) encontrados en pacientes con MPS IIIA, así como en modelos animales de MPS IIIA. Dichos síntomas incluyen, entre otros, retraso en el habla; dificultad en las interacciones sociales y la comunicación; trastornos del sueño; discapacidad intelectual progresiva y pérdida de habilidades previamente adquiridas (regresión del desarrollo); convulsiones y trastornos del movimiento; cabeza grande; hígado ligeramente agrandado (hepatomegalia leve); una bolsa blanda alrededor del ombligo (hernia umbilical) o en la parte inferior del abdomen (hernia inguinal); baja estatura, rigidez articular, disostosis múltiple leve, anomalías esqueléticas múltiples; diarrea crónica; infecciones recurrentes de las vías respiratorias superiores; infecciones recurrentes del oído; discapacidad auditiva; problemas de visión; hipertrofia septal asimétrica; rasgos faciales toscos; cabello áspero; bóveda craneal densa; disostosis múltiple; anomalía del crecimiento; excreción de heparán sulfato en orina; acumulación de GAG en el líquido cefalorraquídeo (CSF), suero, orina y/o cualquier otra muestra biológica; expresión anormal y/o actividad enzimática de N-acetil-alfa-D-glucosaminidasa (NAGLU) o N-sulfoglicosamina sulfohidrolasa (IDUA); acumulación de GM2 y GM3; actividad modificada de las enzimas lisosomales; acumulación de colesterol libre no esterificado en el CNS; respuesta inflamatoria en el CNS y los tejidos esqueléticos; crecimiento excesivo de vello (hirsutismo); hiperactividad; vértebras toracolumbares ovoides; esplenomegalia; sinofrosis; costillas engrosadas; hernias; y marcha tambaleante y errática.

**[0051]** Por “paciente” o “sujeto”, tal como se usa en este documento, se entiende un ser humano, macho o hembra, perros y modelos animales utilizados para la investigación clínica. En una modalidad, el sujeto de estos métodos y composiciones es un ser humano diagnosticado con MPS IIIA. En determinadas modalidades, el sujeto humano de estos métodos y composiciones es un prenatal, un recién nacido, un lactante menor, un lactante mayor, un niño de preescolar, un niño de primaria, un adolescente, un adulto joven o un adulto. En otra modalidad, el sujeto de estos métodos y composiciones es un paciente pediátrico con MPS IIIA.

**[0052]** El examen clínico y los análisis de orina (el exceso de mucopolisacáridos se excreta en la orina) son los primeros pasos en el diagnóstico de una enfermedad MPS. Los ensayos enzimáticos que miden los niveles de actividad enzimática en la sangre, las células de la piel o una variedad de células también se usan para proporcionar un diagnóstico definitivo de MPS IIIA. Existen diversas pruebas genéticas que detectan una mutación de la SGSH asociada con la MPS IIIA. Véase, por ejemplo, [ncbi.nlm.nih.gov/gtr/conditions/-C0086647/](http://ncbi.nlm.nih.gov/gtr/conditions/-C0086647/);

[ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?term=C0086647\[DISCUI\]](http://ncbi.nlm.nih.gov/gtr/all/tests/?term=C0086647[DISCUI]). El diagnóstico prenatal mediante amniocentesis y muestreo de vellosidades coriónicas puede verificar si un feto está afectado por el trastorno. El asesoramiento genético puede ayudar a los padres con antecedentes familiares de mucopolisacaridosis a determinar si son portadores del gen mutado que causa los trastornos. Véase, por ejemplo, A Guide to Understanding MPS III, National MPS Society, 2008, [mpsociety.org/learn/diseases/mps-iii/](http://mpsociety.org/learn/diseases/mps-iii/).

#### N-sulfoglicosamina sulfohidrolasa (SGSH)

**[0053]** En este documento, los términos “N-sulfoglicosamina sulfohidrolasa” y “SGSH” se usan indistintamente con heparán-N-sulfatasa, HNS. La invención incluye cualquier variante de la proteína SGSH expresada a partir de las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en este documento, o un fragmento funcional de estas, que restaura una función deseada, mejora un síntoma, mejora los síntomas asociados con un biomarcador

relacionado con MPS IIIA, o facilita otro(s) tratamiento(s) para la MPS IIIA cuando se administra en una composición o mediante un método como el proporcionado en este documento. Ejemplos de un biomarcador adecuado para MPSIII incluyen el descrito en WO 2017/136533, que se incorpora en este documento mediante referencia.

- 5 **[0054]** Tal como se usa en este documento, el término “SGSH funcional” se refiere a una enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de la SGSH humana natural (nativa) de longitud completa (como se muestra en la SEQ ID NO: 36 y número de acceso UniProtKB: P51688), una variante de esta, un mutante de esta con una sustitución conservadora de aminoácidos, un fragmento de esta, una longitud completa o un fragmento de cualquier
- 10 combinación de la variante y el mutante con una sustitución conservadora de aminoácidos, que proporciona al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente
- 15 80 %, al menos aproximadamente 90 %, o aproximadamente el mismo, o superior a 100 % del nivel de actividad biológica de la SGSH humana normal. La SGSH natural (nativa) de longitud completa (SEQ ID NO: 36) comprende un péptido señal (o líder) nativo y una hSGSH madura (SEQ ID NO: 17). En algunas modalidades, una SGSH funcional se refiere a una proteína natural con la secuencia de SEQ ID NO: 36. En determinadas
- 20 modalidades, una hSGSH funcional comprende una secuencia líder nativa. En determinadas modalidades, una hSGSH funcional comprende una secuencia líder exógena. En determinadas modalidades, una hSGSH funcional comprende una secuencia líder exógena que es una secuencia líder BIP exógena de proteína de unión de cadena pesada de inmunoglobulina humana (BiP o Bip). Véase también,
- 25 WO2012/071422 A2 y patente estadounidense núm. 9.279.007, que se incorporan a este documento mediante referencia. En determinadas modalidades, la hSGSH funcional comprende además un péptido que permite la endocitosis, en donde el péptido se une a CI-MPR. En determinadas modalidades, el péptido que se une a CI-MPR es un péptido vIGF2. En determinadas modalidades, una hSGSH funcional es una proteína de fusión
- 30 que comprende una secuencia peptídica líder exógena que es la secuencia líder BIP, una

hSGSH madura y un péptido vIGF2 conectado mediante un enlazador. En determinadas modalidades, la hSGSH funcional comprende hSGSH madura que tiene al menos una o más mutaciones que mejoran la estabilidad y/o la expresión de la hSGSH en la célula (es decir, cambios estabilizadores de residuos de aminoácidos). En determinadas modalidades, una hSGSH funcional es una proteína de fusión que comprende una secuencia peptídica líder exógena que es la secuencia líder BIP, una hSGSH madura que comprende cambios estabilizadores de residuos de aminoácidos A482Y y E488V y un péptido vIGF2 conectado mediante un enlazador.

**[0055]** Tal como se usa en este documento, la “sustitución conservadora de aminoácidos”

o “sustituciones conservadoras de aminoácidos” se refiere a un cambio, reemplazo o sustitución de un aminoácido por un aminoácido diferente con propiedades bioquímicas similares (por ejemplo, carga, hidrofobicidad y tamaño), que es conocido por los profesionales de la técnica. Véase también, por ejemplo, FRENCH et al. What is a conservative substitution? *Journal of Molecular Evolution*, Marzo 1983, Volumen 19, Edición 2, págs. 171–175 y YAMPOLSKY et al. The Exchangeability of Amino Acids in Proteins, *Genetics*. Ago 2005; 170(4): 1459–1472, cada una de las cuales se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

**[0056]** En determinadas modalidades, una SGSH funcional es una variante de SGSH que incluye A482Y que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 con una tirosina (Tyr, Y) en el aminoácido 488 en lugar de alanina (Ala, A) en la natural; y E488V, que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 con una valina (Val, V) en el aminoácido 488 en lugar de ácido glutámico (Glu, E) en la natural. Ejemplos adicionales de variantes de SGSH pueden incluir las predichas por herramientas bioinformáticas disponibles para un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Ugrinov KG et al. A multiparametric computational algorithm for comprehensive assessment of genetic mutations in mucopolysaccharidosis type IIIA (Sanfilippo syndrome). *PLoS One*. 25 Mar 2015;10(3):e0121511. doi: 10.1371/journal.pone.0121511. eCollection 2015, que se incorpora en este documento mediante referencia en su totalidad.

**[0057]** En determinadas modalidades, una hSGSH funcional se refiere a una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, en donde la secuencia de aminoácidos comprende

un péptido líder exógeno y una secuencia codificante de hSGSH madura. En determinadas modalidades, la hSGSH madura comprende además cambios estabilizadores de residuos de aminoácidos y/o sustituciones en A482Y y E488V, por ejemplo, SEQ ID NO: 23. En determinadas modalidades, una hSGSH funcional se refiere a una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, en donde la hSGSH funcional comprende un péptido líder exógeno y una hSGSH madura que comprende cambios estabilizadores de aminoácidos A482Y y E488V.

**[0058]** En determinadas modalidades, una hSGSH funcional se refiere a una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, en donde la secuencia de aminoácidos comprende un péptido líder exógeno, una hSGSH madura y un péptido vIGF2. En determinadas modalidades, una hSGSH funcional se refiere a una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, en donde la secuencia de aminoácidos comprende un péptido líder exógeno, una hSGSH madura que comprende cambios estabilizadores de aminoácidos A482Y y E488V, y un péptido vIGF2.

**[0059]** Existe una variedad de ensayos para medir los niveles de expresión y actividad de la SGSH por métodos convencionales. Véase, por ejemplo, [ncbi\\_nlm\\_nih\\_gov/gtr/all/tests/?term=C0086647\[DISCU\]&filter=method:12;testtype:clinical](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/term=C0086647[DISCU]&filter=method:12;testtype:clinical); Karpova EA et al, A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease type A (MPS IIIA). *J Inherit Metab Dis.* 1996;19(3):278-85; Tardieu M et al, Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. *Hum Gene Ther.* Jun 2014;25(6):506-16. doi: 10.1089/hum.2013.238. Epub 5 May 2014; Whyte LS et al, Variables influencing fluorimetric N-sulfoglucosamine sulfohydrolase (SGSH) activity measurement in brain homogenates. *Mol Genet Metab Rep.* 22 Oct 2015;5:60-62. doi: 10.1016/j.ymgmr.2015.10.005. eCollection 2015 Dic; Hopwood JJ et al. Diagnosis of Sanfilippo type A syndrome by estimation of sulfamidase activity using a radiolabelled tetrasaccharide substrate. *Clin Chim Acta.* 18 Ago 1982;123(3):241-50; cada uno de los cuales se incorpora mediante referencia en este documento en sus totalidades.

## Ácido nucleico

**[0060]** En un aspecto, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína SGSH funcional. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico es una  
5 secuencia codificante modificada genéticamente, en donde la secuencia codificante de hSGSH funcional comprende una secuencia peptídica señal y una secuencia codificante de hSGSH madura, en donde la secuencia codificante de hSGSH madura tiene la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de SEQ ID NO: 16 o una secuencia de ácido nucleico que es (a) al menos 85 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 23; o (b) al  
10 menos 99 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 23. En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH madura 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 16 es la SEQ ID NO: 22 que codifica SEQ ID NO: 23 (hSGSH.A482Y.E488V). En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH madura es SEQ ID NO: 16. En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH madura que es al menos  
15 aproximadamente 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 16, que codifica la SEQ ID NO: 23.

**[0061]** En un aspecto, la secuencia codificante de SGSH es una secuencia modificada genéticamente. En una modalidad, la secuencia modificada genéticamente es útil para mejorar la producción, transcripción, expresión o seguridad en un sujeto. En otra modalidad, la secuencia modificada genéticamente es útil para aumentar la eficacia de  
20 las composiciones terapéuticas o el tratamiento resultantes. En otra modalidad, la secuencia modificada genéticamente es útil para aumentar la eficacia de la proteína SGSH funcional que se expresa, pero también puede permitir una dosis más baja de un reactivo terapéutico que suministra la proteína funcional para aumentar la seguridad. En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH está modificada  
25 genéticamente y codifica para una proteína SGSH funcional que comprende los cambios estabilizadores de aminoácidos A482Y y E488V.

**[0062]** En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH funcional comprende una secuencia peptídica señal que se ubica en el 5' de la secuencia codificante de hSGSH madura. En determinadas modalidades, el péptido señal está en

el extremo amino (extremo N) de la hSGSH madura. En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH funcional comprende una secuencia peptídica señal que es una secuencia peptídica señal nativa. En determinadas modalidades, el péptido señal nativo comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 31, o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a esta, que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32.

**[0063]** En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH funcional comprende una secuencia peptídica señal que es una secuencia peptídica señal exógena. En determinadas modalidades, el péptido señal exógeno es un péptido señal BIP. En determinadas modalidades, el péptido señal exógeno que es péptido BIP comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 29, o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a esta, que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30.

**[0064]** En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH funcional comprende además un péptido vIGF2 conectado mediante un enlazador. En determinadas modalidades, el péptido vIGF2 comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 33, o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 34. En determinadas modalidades, el péptido vIGF2 se conecta mediante un enlazador al extremo carboxi (extremo C) de la hSGSH madura. En determinadas modalidades, la secuencia codificante del péptido vIGF2 que comprende un enlazador se ubica en el 3' de la secuencia codificante de hSGSH madura.

**[0065]** En un aspecto, la secuencia codificante de hSGSH funcional es una secuencia modificada genéticamente que comprende, de 5' a 3', una secuencia codificante de péptido señal y una secuencia codificante de hSGSH madura. En algunas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH funcional es una secuencia modificada genéticamente que comprende, de 5' a 3', una secuencia codificante de péptido señal y una secuencia codificante de hSGSH madura que comprende cambios estabilizadores de aminoácidos A48Y y E488V. En otro aspecto, la secuencia codificante de hSGSH funcional es una secuencia modificada genéticamente que comprende, de 5' a 3', una secuencia codificante de péptido señal, una secuencia codificante de hSGSH madura, y

una secuencia codificante de vIGF2 que comprende un enlazador. En algunas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH funcional es una secuencia modificada genéticamente que comprende, de 5' a 3', una secuencia codificante de péptido señal, una secuencia codificante de hSGSH madura que comprende cambios estabilizadores de aminoácidos A48Y y E488V, y una secuencia codificante de vIGF2 que comprende un enlazador.

**[0066]** En una modalidad se proporciona una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 35, en donde la secuencia comprende la secuencia señal nativa y codifica una hSGSH funcional (hSGSH; SEQ ID NO: 36). En una modalidad se proporciona en este documento una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente de la SEQ ID NO: 35, o una secuencia de ácido nucleico al menos aproximadamente 99 % idéntica a esta, que codifica una hSGSH funcional. En otra modalidad, la secuencia codificante de hSGSH es al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % idéntica a SEQ ID NO: 35, en donde la secuencia codifica una hSGSH funcional.

**[0067]** En una modalidad se proporciona una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 18, en donde la secuencia comprende la secuencia señal BIP y codifica una hSGSH funcional (BIP.hSGSH; SEQ ID NO: 19). En una modalidad se proporciona en este documento una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente de la SEQ ID NO: 18, o una secuencia de ácido nucleico al menos aproximadamente 99 % idéntica a esta, que codifica una hSGSH funcional. En otra modalidad, la secuencia codificante de SGSH es al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % idéntica a SEQ ID NO: 18, en donde la secuencia codifica una hSGSH funcional.

**[0068]** En una modalidad se proporciona una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 20, en donde la secuencia comprende la secuencia señal BIP y codifica una hSGSH funcional que es una hSGSH de fusión (BIP.hSGSH.vIGF2; SEQ ID NO: 21). En una modalidad se proporciona

en este documento una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente de la SEQ ID NO: 20, o una secuencia de ácido nucleico al menos aproximadamente 99 % idéntica a esta, que codifica una hSGSH funcional. En otra modalidad, la secuencia codificante de SGSH es al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % idéntica a SEQ ID NO: 20, en donde la secuencia codifica una hSGSH funcional.

**[0069]** En una modalidad se proporciona una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 24, en donde la secuencia comprende una secuencia señal BIP y codifica una hSGSH funcional que comprende cambios estabilizadores de aminoácidos A482Y y E488V (BIP.hSGSH.A488Y.E488V; SEQ ID NO: 25). En una modalidad se proporciona en este documento una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente de la SEQ ID NO: 24, o una secuencia de ácido nucleico al menos aproximadamente 99 % idéntica a esta, que codifica una hSGSH funcional. En otra modalidad, la secuencia codificante de SGSH es al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % idéntica a SEQ ID NO: 24, en donde la secuencia codifica una hSGSH funcional.

**[0070]** En una modalidad se proporciona una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 26, en donde la secuencia comprende una secuencia señal BIP y codifica una hSGSH funcional que es una hSGSH de fusión que comprende cambios estabilizadores de aminoácidos A482Y y E488V (BIP.hSGSH.A488Y.E488V.vIGF2; SEQ ID NO: 27). En una modalidad se proporciona en este documento una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente de la SEQ ID NO: 26, o una secuencia de ácido nucleico al menos aproximadamente 99 % idéntica a esta, que codifica una hSGSH funcional. En otra modalidad, la secuencia codificante de SGSH es al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % idéntica a SEQ ID NO: 26, en donde la secuencia codifica una hSGSH funcional.

**[0071]** Un “ácido nucleico”, tal como se describe en este documento, puede ser ARN, ADN o una modificación de estos, y puede ser de cadena simple o doble, y puede seleccionarse, por ejemplo, de un grupo que incluye ácido nucleico que codifica una proteína de interés, oligonucleótidos, análogos de ácido nucleico, por ejemplo, ácido péptido-nucleico (PNA), PNA pseudocomplementario (pc-PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), etc. Un nucleótido se refiere a un ribonucleótido, desoxinucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido (por ejemplo, un oligómero de ácido nucleico peptídico). El experto apreciará que las variantes funcionales de estas moléculas de ácido nucleico también forman parte de la presente invención. Las variantes funcionales son secuencias de ácido nucleico que pueden traducirse directamente, usando el código genético estándar, para proporcionar una secuencia de aminoácidos idéntica a la traducida a partir de las moléculas de ácido nucleico originales. Tales secuencias de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, entre otras, secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas, por ejemplo, que actúan como represores transcripcionales, moléculas antisentido, ribozimas, pequeñas secuencias de ácido nucleico inhibitoras, por ejemplo, entre otros, ARNi, ARNi<sub>hc</sub>, ARN<sub>pi</sub>, micro ARNi (mARNi), oligonucleótidos antisentido, etc.

**[0072]** En determinadas modalidades, las moléculas de ácido nucleico que codifican una SGSH humana (hSGSH) funcional, y otras construcciones abarcadas por la presente invención y útiles para generar casetes de expresión y genomas de vector pueden modificarse genéticamente para su expresión en células de levadura, células de insecto o células de mamífero, tales como células humanas. Los métodos son conocidos y se han descrito previamente (por ejemplo, WO 96/09378). Una secuencia se considera modificada genéticamente si al menos un codón no preferido, en comparación con una secuencia natural, se sustituye por un codón que es más preferido. En este documento, un codón no preferido es un codón que se usa con menos frecuencia en un organismo que otro codón que codifica para el mismo aminoácido, y un codón que es más preferido es un codón que se usa con más frecuencia en un organismo que un codón no preferido. La frecuencia de uso de un codón para un organismo específico puede encontrarse en tablas de frecuencia de codones, como en [kazusa.jp/codon](http://kazusa.jp/codon). Preferiblemente, más de un

codón no preferido, preferiblemente la mayoría o todos los codones no preferidos, se sustituyen por codones que son más preferidos. Preferiblemente, los codones usados con más frecuencia en un organismo se emplean en una secuencia modificada genéticamente. La sustitución por codones preferidos generalmente conduce a una mayor expresión. Un experto entenderá también que numerosas moléculas de ácido nucleico diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. También se entiende que las personas expertas pueden, utilizando técnicas de rutina, hacer sustituciones de nucleótidos que no afecten a la secuencia de aminoácidos codificada por las moléculas de ácido nucleico para reflejar el uso de codones de cualquier organismo hospedador particular en el que se expresen los polipéptidos. Por lo tanto, a menos que se especifique lo contrario, una “secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos” incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas, unas de otras, y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de ácido nucleico pueden clonarse utilizando técnicas rutinarias de biología molecular, o generarse de novo mediante síntesis de ADN, que puede realizarse utilizando procedimientos rutinarios por empresas de servicios con rubro en el campo de la síntesis de ADN y/o la clonación molecular (por ejemplo, GeneArt, GenScript, Life Technologies, Eurofins).

**[0073]** Por “modificado genéticamente” se entiende que las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína SGSH funcional descrita en este documento y se colocan en cualquier elemento genético adecuado, por ejemplo, ADN desnudo, fago, transposón, cósmido, episoma, etc., que transfiere las secuencias de SGSH transportadas en este a una célula hospedadora, por ejemplo, para generar sistemas de administración no viral (por ejemplo, sistemas basados en ARN, ADN desnudo o similares), o para generar vectores virales en una célula hospedadora de empaquetamiento, y/o para su administración a una célula hospedadora en un sujeto. En una modalidad, el elemento genético es un vector. En una modalidad, el elemento genético es un plásmido. Los métodos utilizados para fabricar tales construcciones modificadas genéticamente son conocidos por los expertos en la técnica en la manipulación de ácidos nucleicos e incluyen diseño por ingeniería genética, diseño por ingeniería recombinante y técnicas

de síntesis. Véase, por ejemplo, Green y Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

**[0074]** Las expresiones "porcentaje (%)" de identidad", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje idéntico" en el contexto de 5 secuencias de ácido nucleico se refieren a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia. La longitud de la comparación de la identidad de secuencia puede ser sobre la longitud completa del genoma y se desea la longitud completa de una secuencia codificante de genes o un fragmento de al menos aproximadamente 500 a 5000 nucleótidos. Sin embargo, también puede ser conveniente 10 la identidad entre fragmentos más pequeños, por ejemplo, de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, generalmente de al menos aproximadamente 20 a 24 nucleótidos, al menos aproximadamente 28 a 32 nucleótidos, al menos aproximadamente 36 o más nucleótidos.

**[0075]** El porcentaje de identidad se puede determinar fácilmente para secuencias de 15 aminoácidos en la longitud completa de una proteína, polipéptido, aproximadamente 32 aminoácidos, aproximadamente 330 aminoácidos, o un fragmento de péptido de este, o las secuencias codificantes correspondientes de la secuencia de ácido nucleico. Un fragmento de aminoácido adecuado puede tener una longitud de al menos aproximadamente 8 aminoácidos, y puede tener hasta aproximadamente 700 20 aminoácidos. Por lo general, cuando se hace referencia a "identidad", "homología" o "similitud" entre dos secuencias diferentes, "identidad", "homología" o "similitud" se determina con referencia a secuencias "alineadas". Las secuencias "alineadas" o "alineaciones" se refieren a múltiples secuencias de ácido nucleico o secuencias de proteínas (aminoácidos), que a menudo contienen correcciones para aminoácidos o 25 bases faltantes o adicionales en comparación con una secuencia de referencia.

**[0076]** Las alineaciones se realizan mediante el uso de cualquiera de una variedad de programas de alineación de secuencias múltiples disponibles para el público o en el comercio. Los programas de alineación de secuencia están disponibles para secuencias de aminoácidos, por ejemplo, los programas "Clustal X", "Clustal Omega", "MAP", "PIMA", 30 "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" y "Match-Box". En general, cualquiera de estos

programas se usa con la configuración predeterminada, aunque un experto en la técnica puede modificar esta configuración según sea necesario. De manera alternativa, un experto en la técnica puede utilizar otro algoritmo o programa informático que proporcione al menos el nivel de identidad o alineación igual al proporcionado por los algoritmos y programas a los que se hace referencia. Véase, por ejemplo, J. D. Thomson et al., Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

**[0077]** También están disponibles múltiples programas de alineación de secuencia para secuencias de ácido nucleico. Los ejemplos de dichos programas incluyen "Clustal W", "Clustal Omega", "CAP Sequence Assembly", "BLAST", "MAP" y "MEME", a los que se accede a través de servidores web en Internet. Otras fuentes para dichos programas son conocidas por los expertos en la técnica. Alternativamente, también se utilizan las utilidades Vector NTI. Además, existe una serie de algoritmos conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencia de nucleótidos, incluidos los contenidos en los programas descritos anteriormente. Como otro ejemplo, las secuencias de polinucleótidos se pueden comparar mediante Fasta<sup>TM</sup>, un programa en GCG versión 6.1. Fasta<sup>TM</sup> proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre la secuencia de indagación y la secuencia de búsqueda. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias de ácido nucleico se puede determinar mediante el uso de Fasta<sup>TM</sup> con sus parámetros predeterminados (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de calificación) como se proporciona en GCG versión 6.1, incorporado en este documento por referencia.

**[0078]** Tal como se usa en este documento, "una función deseada" se refiere a una actividad enzimática de SGSH de al menos aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %,

aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 100 % de un control sano.

- [0079]** Tal como se usan en este documento, las frases “aliviar un síntoma”, “mejorar un síntoma” o cualquier variante gramatical de estas, se refieren a la reversión de un síntoma relacionado con MPS IIIA, a la disminución o prevención de la evolución de un síntoma relacionado con MPS IIIA. En una modalidad, el alivio o mejora se refiere al número total de síntomas en un paciente tras la administración de la(s) composición(es) descrita(s) o el uso del método descrito, que se reduce en aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % en comparación con antes de la administración o uso. En otra modalidad, el alivio o mejora se refiere a la gravedad o evolución de un síntoma tras la administración de la(s) composición(es) descrita(s) o el uso del método descrito, que se reduce en aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % en comparación con antes de la administración o uso.
- [0080]** Debe entenderse que las composiciones en la proteína SGSH funcional y la secuencia codificante de SGSH descritas en este documento pretenden aplicarse a otras composiciones, regímenes, aspectos, modalidades y métodos descritos en la memoria descriptiva.

## 25 Casete de expresión y genoma de vector

**[0081]** En este documento se proporciona un vector de genoterapia que comprende un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente que comprende secuencias codificantes para hSGSH enlazadas

operativamente a secuencias reguladoras que dirigen su expresión. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende

[0082] Como se usa en este documento, un "casete de expresión" se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico biológicamente útil (por ejemplo, un cADN de gen que codifica una proteína, enzima u otro producto génico útil, ARNm, etc.) y secuencias reguladoras enlazadas operativamente a este que dirigen o modulan la transcripción, traducción y/o expresión de la secuencia de ácido nucleico y su producto génico. Como se usa en este documento, las secuencias "enlazadas operativamente" incluyen tanto las secuencias reguladoras que son contiguas o no contiguas a la secuencia de ácido nucleico y secuencias reguladoras que actúan en la secuencia de ácido nucleico cis o trans. Por lo general, tales secuencias reguladoras incluyen, por ejemplo, uno o más de un promotor, un potenciador, un intrón, una secuencia de Kozak, una secuencia de poliadenilación y una señal TATA. El casete de expresión puede contener secuencias reguladoras secuencia arriba (5' a) de la secuencia génica, por ejemplo, uno o más de un promotor, un potenciador, un intrón, etc., y uno o más de un potenciador o secuencias reguladoras secuencia abajo (3' a) de una secuencia génica, por ejemplo, la región no traducida 3' (UTR 3') que comprende un sitio de poliadenilación, entre otros elementos. En determinadas modalidades, las secuencias reguladoras están enlazadas operativamente a la secuencia de ácido nucleico de un producto génico, en donde las secuencias reguladoras están separadas de la secuencia de ácido nucleico de un producto génico por secuencias de ácido nucleico intermedias, es decir, regiones no traducidas 5' (UTR 5'). En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende la secuencia de ácido nucleico de uno o más de los productos génicos. En algunas modalidades, el casete de expresión puede ser un casete de expresión monocistrónico o bicistrónico. En otras modalidades, la expresión "transgén" se refiere a una o más secuencias de ADN de una fuente exógena que se insertan en una célula diana. Por lo general, tal casete de expresión para generar un vector viral contiene la secuencia codificante para el producto génico descrito en este documento flanqueada por señales empaquetadoras del genoma viral y otras secuencias de control de expresión tales como las descritas en este

documento. En determinadas modalidades, un genoma de vector puede contener dos o más casetes de expresión.

**[0083]** El término “exógeno” utilizado para describir una secuencia de ácido nucleico o una proteína significa que el ácido nucleico o la proteína no se encuentran de forma natural en la posición en la que se encuentran en un cromosoma o en una célula hospedadora. Una secuencia de ácido nucleico exógena también se refiere a una secuencia derivada e insertada en la misma célula hospedadora o sujeto, pero que está presente en un estado no natural, por ejemplo, un número de copias diferente, o bajo el control de elementos reguladores diferentes.

**[0084]** El término “heterólogo”, como se usa en este documento para describir una secuencia de ácido nucleico o una proteína significa que el ácido nucleico o la proteína se derivaron de un organismo diferente o de una especie diferente del mismo organismo con respecto a la célula hospedadora o al sujeto en el cual están expresados. El término “heterólogo”, cuando se usa en referencia a una proteína o un ácido nucleico en un plásmido, un casete de expresión o un vector, indica que la proteína o el ácido nucleico está presente en otra secuencia o subsecuencia en la cual la proteína o el ácido nucleico en cuestión no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza.

**[0085]** En una modalidad, la secuencia reguladora comprende un promotor. En una modalidad, el promotor es un promotor de  $\beta$ -actina de pollo (CB). En otra modalidad, el promotor es el promotor CB7, que es un híbrido de un potenciador inmediato temprano de citomegalovirus (CMV IE) y el promotor de  $\beta$ -actina de pollo (un promotor CB7). En determinadas modalidades, el promotor CB7 comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 44. En otra modalidad, un promotor adecuado puede incluir, entre otros, un promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1 alfa) (véase, por ejemplo, Kim DW. et al., Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. Gene. 16 Jul 1990;91(2):217-23), un promotor de sinapsina 1 (véase, por ejemplo, Kügler S et al, Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. Gene Ther. Feb 2003;10(4):337-47), un promotor de enolasa específica de neuronas (NSE) (véase, por ejemplo, Kim J et al, Involvement of

cholesterol-rich lipid rafts in interleukin-6-induced neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells. *Endocrinology*. Feb 2004;145(2):613-9. Epub, 16 Oct 2003), o un promotor CB6 (véase, por ejemplo, Large-Scale Production of Adeno-Associated Viral Vector Serotype-9 Carrying the Human Survival Motor Neuron Gene, *Mol Biotechnol*. Ene 2016;58(1):30-6. doi: 10.1007/s12033-015-9899-5).

**[0086]** En determinadas modalidades, puede incluirse una secuencia promotora adicional o alternativa como parte de las secuencias de control de la expresión (secuencias reguladoras), por ejemplo, ubicada entre la secuencia 5' ITR seleccionada y la secuencia codificante. En los vectores descritos en este documento, se pueden usar promotores constitutivos, promotores regulables [véanse, por ejemplo, WO 2011/126808 y WO 2013/04943], promotores específicos de tejido o un promotor que responde a estímulos fisiológicos. Los promotores se pueden seleccionar de diferentes fuentes, por ejemplo, potenciador/promotor inmediato-temprano de citomegalovirus (CMV) humano, potenciador/promotor temprano de SV40, promotor de polimovirus de JC, promotores de la proteína básica de mielina (MBP) o proteína ácida fibrilar glial (GFAP), promotor asociado con latencia (LAP) del virus del herpes simple (HSV-1), promotor de repetición terminal (LTR) del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotor específico de neuronas (NSE), promotor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), hSYN, promotor de la hormona que concentra melanina (MCH), CBA, promotor de metaloproteína de matriz (MPP), y promotor de beta-actina de pollo.

**[0087]** En una modalidad, el casete de expresión está diseñado para la expresión y secreción en un sujeto humano. En una modalidad, el casete de expresión está diseñado para la expresión en el sistema nervioso central (CNS), incluyendo el líquido cefalorraquídeo y el cerebro. En otra modalidad, el casete de expresión es útil para la expresión tanto en el CNS como en el hígado. Pueden seleccionarse promotores adecuados, incluidos, entre otros, un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido o un promotor inducible/regulador. Un ejemplo de un promotor constitutivo es el promotor de beta-actina de pollo. Se han descrito diversos promotores de beta-actina de pollo solos, o en combinación con diversos elementos potenciadores (por ejemplo, CB7 es un promotor de beta-actina de pollo con elementos potenciadores de citomegalovirus;

un promotor CAG, que incluye el promotor, el primer exón y el primer intrón de beta-actina de pollo, y el aceptor de empalme del gen de beta-globina de conejo; un promotor CBh, SJ Gray et al, Hu Gene Ther, Sep 2011; 22(9): 1143-1153). Los ejemplos de promotores específicos de tejido son bien conocidos para el hígado (albúmina, Miyatake et al., (1997) J. Virol., 71:5124 32; promotor del núcleo del virus de la hepatitis B, Sandig et al., (1996) Gene Ther., 3:1002 9; alfa fetoproteína (AFP), Arbuthnot et al., (1996) Hum. Gene Ther., 7:1503 14), neurona (como el promotor de la enolasa específica de neurona (NSE), Andersen et al., (1993) Cell. Mol. Neurobiol., 13:503 15; gen de la cadena ligera de neurofilamentos, Piccioli et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 88:5611 5; y el gen vgf específico de neuronas, Piccioli et al., (1995) Neuron, 15:373 84), y otros tejidos. De manera alternativa, puede seleccionarse un promotor regulable. Véase, por ejemplo, WO 2011/126808B2, incorporado por referencia en este documento.

**[0088]** Además de un promotor, un vector puede contener una o más secuencias de inicio de la transcripción apropiadas, secuencias de terminación de la transcripción, secuencias potenciadoras, señales de procesamiento de ARN eficaces, tales como señales de empalme y poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan ARNm citoplasmático, por ejemplo, WPRE; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (es decir, secuencia de consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de las proteínas; y, cuando se desee, secuencias que potencian la secreción del producto codificado.

**[0089]** En una modalidad, la secuencia reguladora comprende además un potenciador. En una modalidad, la secuencia reguladora comprende un potenciador. En otra modalidad, las secuencias reguladoras contienen dos o más potenciadores de expresión. Estos potenciadores pueden ser los mismos o pueden ser diferentes. Por ejemplo, un potenciador puede incluir un potenciador Alpha mic/bik o un potenciador CMV. Este potenciador puede estar presente en dos copias que se encuentran adyacentes entre sí. De manera alternativa, las copias dobles del potenciador pueden estar separadas por una o más secuencias.

**[0090]** En una modalidad, la secuencia reguladora comprende además un intrón. En otra modalidad, el intrón es un intrón de beta-actina de pollo. En determinadas modalidades, el intrón de beta-actina de pollo comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID

NO: 45. En determinadas modalidades, el intrón es un intrón quimérico (CI): un intrón híbrido que consiste en un donante de empalme de beta-globina humana y elementos aceptores de empalme de inmunoglobulina G (IgG). Otros intrones adecuados incluyen los conocidos en la técnica, por ejemplo, tales como se describen en WO 2011/126808.

- 5 Otros intrones adecuados incluyen los conocidos en la técnica, pueden ser un intrón de  $\beta$ -globulina humana, y/o un intrón Promega® disponible comercialmente, y los descritos en WO 2011/126808.

**[0091]** En una modalidad, la secuencia reguladora comprende además un señal de poliadenilación (poliA). Los ejemplos de secuencias de poliA adecuadas incluyen, por  
 10 ejemplo, poliA de globina de conejo, SV40, SV50, hormona de crecimiento bovina (bGH), hormona de crecimiento humana y poliA sintéticas. Opcionalmente, se pueden seleccionar una o más secuencias para estabilizar el ARNm. En determinadas modalidades, la poliA es una poliA de globina beta de conejo (globina polya de conejo o rBG). Véase, por ejemplo, WO 2014/151341. En determinadas modalidades, la poliA de  
 15 globina beta de conejo comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 46. En determinadas modalidades, puede incluirse en un casete de expresión una secuencia de poliadenilación de hormona de crecimiento humana (hGH), un poliA de SV40 o un poliA sintético.

**[0092]** En determinadas modalidades, los casetes de expresión proporcionados pueden  
 20 incluir uno o más potenciadores de la expresión, como el elemento regulador postranscripcional de los virus de la hepatitis de marmota (WPRE), humana (HPRE), ardilla terrestre (GPRE) o ardilla terrestre ártica (AGSPRE); o un elemento regulador postranscripcional sintético. Estos elementos potenciadores de la expresión son particularmente ventajosos cuando se colocan en una 3'UTR y pueden aumentar  
 25 significativamente la estabilidad del ARNm y/o el rendimiento proteico. En determinadas modalidades, los casetes de expresión proporcionados incluyen una secuencia reguladora que es un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) o una variante de este. Las secuencias WPRE adecuadas se proporcionan en los genomas de vector descritos en este documento y son conocidas en  
 30 la técnica (por ejemplo, como las descritas en las patentes estadounidenses núm.

6.136.597, 6.287.814 y 7.419.829, que se incorporan por referencia). En determinadas modalidades, el WPRE es una variante que ha sido mutada para eliminar la expresión de la proteína X del virus de la hepatitis B de la marmota (WHX), incluidas, por ejemplo, mutaciones en el codón de inicio del gen WHX. Véase también Kingsman S.M.,

5 Mitrophanous K., & Olsen J.C. (2005), Potential Oncogene Activity of the Woodchuck Hepatitis Post-Transcriptional Regulatory Element (Wpre)." Gene Ther. 12(1):3-4; y Zanta-Boussif M.A., Charrier S., Brice-Ouzet A., Martin S., Opolon P., Thrasher A.J., Hope T.J., & Galy A. (2009), Validation of a Mutated Pre Sequence Allowing High and Sustained Transgene Expression While Abrogating Whv-X Protein Synthesis: Application to the

10 Gene Therapy of Was, Gene Ther. 16(5):605-19, ambos se incorporan en este documento mediante referencia en sus totalidades. En otras modalidades, los potenciadores se seleccionan a partir de una fuente no viral. En determinadas modalidades, la secuencia WPRE está presente. En determinadas modalidades, la WPRE comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 43.

15 **[0093]** En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia codificante de hSGSH y puede incluir otras secuencias reguladoras de esta. Las secuencias reguladoras necesarias están enlazadas operativamente a la secuencia codificante de hSGSH de manera que permite su transcripción, traducción y/o expresión en la célula diana.

20 **[0094]** En determinadas modalidades, la célula diana puede ser una célula del sistema nervioso central. En determinadas modalidades, la célula diana es una o más de una neurona excitatoria, una neurona inhibitoria, una célula glial, una célula de la corteza, una célula de la corteza frontal, una célula de la corteza cerebral, una célula de la médula espinal. En determinadas modalidades, la célula diana es una célula del sistema nervioso

25 periférico (PNS), por ejemplo, una célula de la retina. También pueden elegirse como células diana otras células distintas de las del sistema nervioso, como un monocito, un linfocito B, un linfocito T, una célula NK, una célula de ganglio linfático, una célula de amígdala, una célula mesenquimatosa de médula ósea, una célula madre, una célula madre de médula ósea, una célula de corazón, una célula de epitelio, una célula de

30 esófago, una célula de estómago, una célula de corte fetal, una célula de colon, una

célula de recto, una célula de hígado, una célula de riñón, una célula de pulmón, una célula de glándula salival, una célula de tiroides, una célula suprarrenal, una célula de mama, una célula de páncreas, una célula de islote de Langerhans, una célula de vesícula biliar, una célula de próstata, una célula de vejiga urinaria, una célula de piel, una célula de útero, una célula de cuello uterino, una célula de testículo, o cualquier otra célula que exprese una enzima de SGSH funcional en un sujeto sin MPSIIIA.

**[0095]** En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende el promotor CB7 - opcionalmente, secuencia de intrón de beta actina de pollo - secuencia codificante de hSGSH - poliA de beta-globina de conejo. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende el promotor CB7 - opcionalmente, secuencia de intrón de beta actina de pollo - secuencia codificante de hSGSH que comprende péptido líder exógeno BIP - poliA de beta-globina de conejo. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende el promotor CB7 - opcionalmente, secuencia de intrón de beta actina de pollo - secuencia codificante de hSGSH que comprende péptido líder exógeno BIP en 5' con respecto a la secuencia codificante de hSGSH y péptido vIGF2 en 3' con respecto a la secuencia codificante de hSGSH - poliA de beta-globina de conejo. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende el promotor CB7 - opcionalmente, secuencia de intrón de beta actina de pollo - secuencia codificante de hSGSH que comprende péptido líder exógeno BIP en 5' con respecto a la secuencia codificante de hSGSH y péptido vIGF2 en 3' con respecto a la secuencia codificante de hSGSH - opcionalmente WPRE - poliA de beta-globina de conejo. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende el promotor CB7 - opcionalmente, secuencia de intrón de beta actina de pollo - secuencia codificante de hSGSH que comprende péptido líder exógeno BIP en 5' con respecto a la secuencia codificante de hSGSH y péptido vIGF2 en 3' con respecto a la secuencia codificante de hSGSH, opcionalmente en donde hSGSH comprende cambios estabilizadores de aminoácidos A482Y y E488V (hSGSH.A482Y-E488V) - opcionalmente WPRE - poliA de beta-globina de conejo.

**[0096]** En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende el promotor CB7 (SEQ ID NO: 44) – opcionalmente secuencia de intrón de beta actina de pollo (SEQ

ID NO: 45) – secuencia codificante de hSGSH que comprende el péptido líder exógeno BIP en 5' con respecto a la secuencia codificante de hSGSH y péptido vIGF2 en 3' con respecto a la secuencia codificante de hSGSH – opcionalmente WPRE (SEQ ID NO: 43) – poliA de beta-globina de conejo (SEQ ID NO: 46). En determinadas modalidades, el

5 casete de expresión comprende el promotor CB7 (SEQ ID NO: 44) – opcionalmente secuencia de intrón de beta actina de pollo (SEQ ID NO: 45) – secuencia codificante de hSGSH (opcionalmente hSGSH.A482Y-E488V) que comprende el péptido líder exógeno BIP en 5' con respecto a la secuencia codificante de hSGSH y péptido vIGF2 en 3' con respecto a la secuencia codificante de hSGSH – opcionalmente WPRE (SEQ ID NO: 43)

10 – poliA de beta-globina de conejo (SEQ ID NO: 46). En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8.

**[0097]** En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4 (CB7.Cl.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al

15 menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 11 (CB7.Cl.hSGSHcoV1.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico de

20 SEQ ID NO: 8 (CB7.Cl.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.WPRE.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta.

**[0098]** Debe entenderse que las composiciones en el casete de expresión descritas en este documento pretenden aplicarse a otras composiciones, regímenes, aspectos,

25 modalidades y métodos descritos en la memoria descriptiva..

#### miARN

**[0099]** En determinadas modalidades, además de la secuencia codificante de hSGSH, puede incluirse otra secuencia codificante no-AAV, por ejemplo, un péptido, polipéptido, proteína, molécula de ARN funcional (por ejemplo, miARN, inhibidor de miARN) u otro

producto génico, de interés. Los productos génicos útiles pueden incluir miARN. Los miARN y otros ácidos nucleicos pequeños interferentes regulan la expresión génica mediante la escisión/degradación del transcripto de ARN o la represión de la traducción del ARN mensajero (mARN) diana. Los miARN se expresan de forma nativa, por lo  
 5 general como 19-25 productos de ARN finales no traducidos. Los miARN exhiben su actividad mediante interacciones específicas de la secuencia con las regiones no traducidas (UTR) 3' de ARNm diana. Estos miARN expresados de manera endógena forman precursores de horquilla que se procesan posteriormente en dúplex de miARN y además en una molécula de miARN monocatenario "maduro". Este miARN maduro guía  
 10 un complejo de múltiples proteínas, miRISC, que identifica el sitio diana, por ejemplo, en las regiones 3' UTR, de mARN diana en función de su complementariedad con el miARN maduro.

**[00100]** Como se usa en este documento, una "secuencia diana de miARN" es una secuencia ubicada en la cadena positiva del ADN (5' a 3') y es al menos parcialmente  
 15 complementaria a una secuencia de miARN, incluida la secuencia original de miARN. La secuencia diana de miARN es exógena con respecto a la región no traducida del producto transgénico codificado y está diseñada para ser diana específica de miARN en células en las que se desea la represión de la expresión del transgén. El término "secuencia diana del grupo miR183" se refiere a una secuencia diana que responde a uno o varios  
 20 miembros del grupo miR183 (alternativamente denominado familia), incluidos los miRs-183 y -182 (como se describe en Dambal, S. et al. Nucleic Acids Res 43:7173-7188, 2015, que se incorpora en este documento mediante referencia). Sin querer estar limitado por la teoría, el ARN mensajero (ARNm) para el transgén (que codifica el producto génico) está presente en un tipo celular al que se administra el casete de expresión que contiene  
 25 el miARN, de tal manera que la unión específica del miARN a las secuencias diana de miARN 3' UTR da como resultado el silenciamiento y la escisión del ARNm, reduciendo o eliminando así la expresión del transgén solo en las células que expresan el miARN.

**[00101]** Típicamente, la secuencia diana de miARN tiene una longitud de al menos 7 nucleótidos a aproximadamente 28 nucleótidos, de al menos 8 nucleótidos a  
 30 aproximadamente 28 nucleótidos, de 7 nucleótidos a 28 nucleótidos, de 8 nucleótidos a

- 18 nucleótidos, de 12 nucleótidos a 28 nucleótidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 26 nucleótidos, de aproximadamente 22 nucleótidos, de aproximadamente 24 nucleótidos o de aproximadamente 26 nucleótidos, y contiene al menos una región consecutiva (por ejemplo, 7 u 8 nucleótidos) que es complementaria a la secuencia original de miARN. En determinadas modalidades, la secuencia diana comprende una secuencia con complementariedad exacta (100 %) o complementariedad parcial con la secuencia original de miARN con algunos emparejamientos incorrectos. En determinadas modalidades, la secuencia diana comprende al menos 7 a 8 nucleótidos que son 100 % complementarios a la secuencia original de miARN. En determinadas modalidades, la secuencia diana consiste en una secuencia que es 100 % complementaria a la secuencia original de miARN. En determinadas modalidades, la secuencia diana contiene múltiples copias (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más copias) de la secuencia que es 100 % complementaria a la secuencia original. En determinadas modalidades, la región de 100 % de complementariedad comprende al menos 30 % de la longitud de la secuencia diana. En determinadas modalidades, el resto de la secuencia diana tiene al menos de aproximadamente 80 % a aproximadamente 99 % de complementariedad con el miARN. En determinadas modalidades, en un casete de expresión que contiene una cadena positiva de ADN, la secuencia diana de miARN es el complemento inverso del miARN.
- 20 **[00102]** En determinadas modalidades, la secuencia diana de miARN para la al menos primera y/o al menos segunda secuencia diana de miARN para la cadena positiva de ARNm o ADN del casete de expresión se selecciona de (i) AGTGAATTCTACCAGTGCCATA (miR183, SEQ ID NO: 28); (ii) AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA (miR182, SEQ ID NO: 47).
- 25 **[00103]** En determinadas modalidades, el genoma de vector o casete de expresión contiene al menos una secuencia diana de miARN que es una secuencia diana de miR-183. En determinadas modalidades, el genoma de vector o casete de expresión contiene una secuencia diana de miR-183 que incluye AGTGAATTCTACCAGTGCCATA (SEQ ID NO: 28), donde la secuencia complementaria a la secuencia original de miR-183 está subrayada. En determinadas modalidades, el genoma de vector o casete de expresión
- 30

contiene más de una copia (por ejemplo, dos o tres copias) de una secuencia que es 100 % complementaria a la secuencia original de miR-183. En determinadas modalidades, el genoma de vector o casete de expresión contiene 4 copias de una secuencia que es 100 % complementaria a la secuencia original de miR-183. En
   
 5 determinadas modalidades, una secuencia diana de miR-183 tiene de aproximadamente 7 nucleótidos a aproximadamente 28 nucleótidos de longitud e incluye al menos una región que es al menos 100 % complementaria a la secuencia original de miR-183. En determinadas modalidades, una secuencia diana de miR-183 contiene una secuencia con complementariedad parcial a SEQ ID NO: 28 y, por lo tanto, cuando se alinea con
   
 10 SEQ ID NO: 28, existen uno o más emparejamientos incorrectos. En determinadas modalidades, una secuencia diana de miR-183 comprende una secuencia que tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 emparejamientos incorrectos cuando se alinea con SEQ ID NO: 28, donde los emparejamientos incorrectos pueden ser no contiguos. En determinadas modalidades, una secuencia diana de miR-183 incluye una región de 100 %
   
 15 de complementariedad que también comprende al menos 30 % de la longitud de la secuencia diana de miR-183. En determinadas modalidades, la región de 100 % de complementariedad incluye una secuencia con 100 % de complementariedad con la secuencia original de miR-183. En determinadas modalidades, el resto de una secuencia diana de miR-183 tiene de al menos aproximadamente 80 % a aproximadamente 99 %
   
 20 de complementariedad con miR-183. En determinadas modalidades, el casete de expresión o genoma de vector incluye una secuencia diana de miR-183 que comprende una SEQ ID NO: 28 truncada, es decir, una secuencia que carece de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos en alguno o en ambos extremos 5' o 3' de SEQ ID NO: 28. En determinadas modalidades, el casete de expresión o genoma de vector comprende
   
 25 un transgén y una secuencia diana de miR-183. En incluso otras modalidades, el casete de expresión o genoma de vector comprende al menos dos, tres o cuatro secuencias diana de miR-183.

**[00104]** En determinadas modalidades, el genoma de vector o casete de expresión contiene al menos una secuencia diana de miARN que es una secuencia diana de miR-
   
 30 182. En determinadas modalidades, el genoma de vector o casete de expresión contiene

una secuencia diana de miR-182 que incluye AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA (SEQ ID NO: 47). En determinadas modalidades, el genoma de vector o casete de expresión contiene más de una copia (por ejemplo, dos o tres copias) de una secuencia que es 100 % complementaria a la secuencia original de miR-182. En determinadas modalidades, una secuencia diana de miR-182 tiene de aproximadamente 7 nucleótidos a aproximadamente 28 nucleótidos de longitud e incluye al menos una región que es al menos 100 % complementaria a la secuencia original de miR-182. En determinadas modalidades, una secuencia diana de miR-182 contiene una secuencia con complementariedad parcial a SEQ ID NO: 47 y, por lo tanto, cuando se alinea con SEQ ID NO: 47, existen uno o más emparejamientos incorrectos. En determinadas modalidades, una secuencia diana de miR-183 comprende una secuencia que tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 emparejamientos incorrectos cuando se alinea con SEQ ID NO: 47, donde los emparejamientos incorrectos pueden ser no contiguos. En determinadas modalidades, una secuencia diana de miR-182 incluye una región de 100 % de complementariedad que también comprende al menos 30 % de la longitud de la secuencia diana de miR-182. En determinadas modalidades, la región de 100 % de complementariedad incluye una secuencia con 100 % de complementariedad con la secuencia original de miR-182. En determinadas modalidades, el resto de una secuencia diana de miR-182 tiene de al menos aproximadamente 80 % a aproximadamente 99 % de complementariedad con miR-182. En determinadas modalidades, el casete de expresión o genoma de vector incluye una secuencia diana de miR-182 que comprende una SEQ ID NO: 47 truncada, es decir, una secuencia que carece de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos en alguno o en ambos extremos 5' o 3' de SEQ ID NO: 47. En determinadas modalidades, el casete de expresión o genoma de vector comprende un transgén y una secuencia diana de miR-182. En incluso otras modalidades, el casete de expresión o genoma de vector comprende al menos dos, tres o cuatro secuencias diana de miR-182.

**[00105]** La expresión "repeticiones en tándem" se utiliza en este documento para referirse a la presencia de dos o más secuencias diana de miARN consecutivas. Estas secuencias diana de miARN pueden ser continuas, es decir, ubicadas directamente una

después de la otra, de modo que el extremo 3' de una esté directamente corriente arriba del extremo 5' de la siguiente sin espacios intermedios, o viceversa. En otra modalidad, dos o más de las secuencias diana de miARN están separadas por una secuencia espaciadora corta.

- 5 **[00106]** Como se usa en este documento, un "espaciador" es cualquier secuencia de ácido nucleico seleccionada, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud que está ubicada entre dos o más secuencias diana de miARN consecutivas. En determinadas modalidades, el espaciador tiene de 1 a 8 nucleótidos de longitud, de 2 a 7 nucleótidos de longitud, de 3 a 6 nucleótidos de longitud, cuatro nucleótidos de longitud, de 4 a 9 nucleótidos, de 3 a 7 nucleótidos, o valores más altos. De manera adecuada, un espaciador es una secuencia no codificante. En determinadas modalidades, el espaciador puede tener cuatro (4) nucleótidos. En determinadas modalidades, el espaciador es GGAT. En determinadas modalidades, el espaciador tiene seis (6) nucleótidos. En determinadas modalidades, el espaciador es CACGTG o GCATGC. En 15 determinadas modalidades, el espaciador se selecciona independientemente de uno o más de (A) GGAT; (B) CACGTG; (C) GCATGC; (D) GCGGCCGC; (E) CGAT; (F) ATCGGT; y/o (G) TCAC.

- [00107]** En determinadas modalidades, las repeticiones en tándem contienen dos, tres, cuatro o más de la misma secuencia diana de miARN. En determinadas modalidades, 20 las repeticiones en tándem contienen al menos dos secuencias diana de miARN diferentes, al menos tres secuencias diana de miARN diferentes o al menos cuatro secuencias diana de miARN diferentes, etc. En determinadas modalidades, las repeticiones en tándem pueden contener dos o tres de la misma secuencia diana miARN y una cuarta secuencia diana miARN que es diferente.

- 25 **[00108]** En determinadas modalidades, puede haber al menos dos conjuntos diferentes de repeticiones en tándem en el casete de expresión. Por ejemplo, una UTR 3' puede contener una repetición en tándem inmediatamente corriente abajo del transgén, las secuencias de UTR, y dos o más repeticiones en tándem más cercanas al extremo 3' de la UTR. En otro ejemplo, la UTR 5' puede contener una, dos o más secuencias diana

de miARN. En otro ejemplo, el 3' puede contener repeticiones en tándem y la 5' UTR puede contener al menos una secuencia diana de miARN.

**[00109]** En determinadas modalidades, el casete de expresión contiene dos, tres, cuatro o más repeticiones en tándem que comienzan dentro de aproximadamente 0 a 20 nucleótidos del codón de detención para el transgén. En determinadas modalidades, el casete de expresión contiene dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más repeticiones en tándem que comienzan entre aproximadamente 0 y 20 nucleótidos del codón de parada para el transgén. En otras modalidades, el casete de expresión contiene las repeticiones en tándem de miARN de al menos 100 a aproximadamente 4000 nucleótidos del codón de parada para el transgén. Las secuencias de miARN diana pueden seleccionarse de la SEQ ID NO: 28, y/o la SEQ ID NO: 47.

**[00110]** En determinadas modalidades, el genoma de vector comprende además al menos una, al menos dos, al menos tres o preferiblemente al menos cuatro repeticiones en tándem de secuencias diana de miARN específicas del ganglio de la raíz dorsal (drg).

En determinadas modalidades, el genoma de vector comprende además al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete o preferiblemente al menos ocho repeticiones en tándem de secuencias diana de miARN específicas del ganglio de la raíz dorsal (drg). Véase, por ejemplo, PCT/US19/67872, presentada el 20 de diciembre de 2019 y publicada ahora como WO 2020/132455. Véase, también, la solicitud de patente provisional estadounidense núm. 63/023.593, presentada el 12 de mayo de 2020; la solicitud de patente provisional estadounidense núm. 63/038.488, presentada el 12 de junio de 2020; la solicitud de patente provisional estadounidense núm. 63/043.562, presentada el 24 de junio de 2020; y la solicitud de patente provisional estadounidense núm. 63/079.299, presentada el 24 de junio de 2020, y la solicitud de patente provisional estadounidense núm. 63/079.299, presentada el 16 de septiembre de 2020, y la solicitud de patente provisional estadounidense núm. 63/152.042, presentada el 22 de febrero de 2021, y la solicitud de patente internacional núm. PCT/US21/32003 que se incorporan a este documento mediante referencia.

**[00111]** En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende al menos ocho secuencias de anulación de diana de miARN drg. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende al menos ocho secuencias de anulación de diana de miARN drg que comprenden miR182 y miR183. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende al menos ocho secuencias de anulación de diana de miARN drg, en donde el al menos primero, al menos segundo, al menos tercero y al menos cuarto miARN es la secuencia miR182, y el al menos quinto, al menos sexto, al menos séptimo y al menos octavo miARN es la secuencia miR183. En determinadas modalidades, el casete de expresión o el genoma de vector comprende al menos 8 secuencias de anulación de diana de miARN drg, en donde el al menos primero, al menos segundo, al menos tercero y al menos cuarto miARN es la secuencia miR183, y el al menos quinto, al menos sexto, al menos séptimo y al menos octavo miARN es la secuencia miR182.

**[00112]** En determinadas modalidades, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que tiene un casete de expresión que comprende una secuencia codificante de hSGSH como se define en este documento, cuatro secuencias miR182, cuatro secuencias miR183, y otras secuencias reguladoras adecuadas enlazadas operativamente a la secuencia codificante de SGSH. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de marco de lectura abierto (ORF) (por ejemplo, ORF que comprende la secuencia codificante de hSGSH enlazada operativamente a secuencias reguladoras de control), y secuencias de anulación de diana de DRG. En determinadas modalidades, las secuencias de anulación de diana de DRG están situadas 5' con respecto a la secuencia codificante. En determinadas modalidades, las secuencias de anulación de diana de DRG están situadas 3' con respecto a la secuencia codificante.

**[00113]** En determinadas modalidades, las secuencias reguladoras comprenden un promotor CB7. En determinadas modalidades, las secuencias reguladoras comprenden uno o más intrones, uno o más potenciadores y una poliA. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende un promotor CB7 - opcionalmente secuencia de intrón de beta actina de pollo - secuencia codificante de hSGSH - al menos cuatro copias de miARN182 - al menos 4 copias de miR183 - poliA de beta-globina de conejo. En

determinadas modalidades, el casete de expresión comprende el promotor CB7 - opcionalmente la secuencia de intrón de beta actina de pollo - la secuencia codificante de hSGSH que comprende el péptido líder exógeno BIP - al menos cuatro copias de miARN182 - al menos 4 copias de miR183 - poliA de beta-globina de conejo. En

5 determinadas modalidades, el casete de expresión comprende el promotor CB7 - opcionalmente la secuencia de intrón de beta actina de pollo - la secuencia codificante de hSGSH que comprende el péptido líder exógeno BIP en 5' con respecto a la secuencia codificante de hSGSH y el péptido vIGF2 en 3' con respecto a la secuencia codificante de hSGSH - al menos cuatro copias de miARN182 - al menos 4 copias de miR183 - poliA

10 de beta-globina de conejo. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 37.

**[00114]** En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende el promotor CB7 - opcionalmente la secuencia de intrón de beta actina de pollo - la secuencia codificante de hSGSH que es una secuencia codificante natural - al menos

15 cuatro copias de miARN182 - poliA de beta-globina de conejo. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende el promotor CB7 - opcionalmente secuencia de intrón de beta actina de pollo - secuencia codificante de hSGSH que es una secuencia codificante natural - al menos 4 copias de miR183 - poliA de beta-globina de conejo. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende el promotor

20 CB7 - opcionalmente la secuencia de intrón de beta actina de pollo - la secuencia codificante de hSGSH que es una secuencia codificante natural - al menos cuatro copias de miARN182 - al menos 4 copias de miR183 - poliA de beta-globina de conejo. En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH natural que comprende el péptido señal nativo y la hSGSH madura comprende la SEQ ID NO: SEQ ID NO: 60.

25 **[00115]** En determinadas modalidades, el casete de expresión se refiere a la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2, 38, 41 En determinadas modalidades, el casete de expresión se refiere a la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2, que codifica para hSGSH, y que comprende 4 repeticiones en tándem de miARN183 (miR183; SEQ ID NO: 28). En determinadas modalidades, el casete de expresión se refiere a la

30 molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 41, que codifica para hSGSH, y que

comprende 4 repeticiones en tándem de miARN182 (miR182; SEQ ID NO: 48). En determinadas modalidades, el casete de expresión se refiere a la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 38, que codifica para hSGSH, y que comprende 4 repeticiones en tándem de miARN182 (miR182; SEQ ID NO: 48) y 4 repeticiones en tándem de miARN183 (miR183; SEQ ID NO: 28).

**[00116]** En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 14 (CB7.CI.hSGSHcoV1-4xmiR183.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta, y/o valores intermedios. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 41 (CB7.CI.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.WPRE.4xmiR182.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta, y/o valores intermedios. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 (CB7.CI.BIP.hSGSHcov1(A482Y-E488V).vIGF2.WPRE.4xmiR183.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta, y/o valores intermedios. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 38 (CB7.CI.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.WPRE.4xmiR182.4xmiR183.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta, y/o valores intermedios.

#### Vector

**[00117]** En un aspecto, en este documento se proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una N-sulfoglicosamina sulfhidrolasa humana (hSGSH) funcional y una secuencia reguladora que dirige la expresión de esta en una célula diana, en donde la secuencia codificante de hSGSH comprende una secuencia peptídica señal y una secuencia codificante de hSGSH madura. En una modalidad, la secuencia codificante de hSGSH

madura es SEQ ID NO: 16, que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17. En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH madura es una secuencia al menos aproximadamente 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 16 y que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH madura es una secuencia al menos aproximadamente 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 16 y que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23. En otra modalidad, la secuencia codificante de hSGSH madura es al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 16 que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23. En incluso otra modalidad, la secuencia codificante de hSGSH madura es la SEQ ID NO: 22, o una secuencia al menos aproximadamente 99 % idéntica a esta, que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

**[00118]** En determinadas modalidades, el vector comprende una secuencia codificante de hSGSH que comprende una secuencia peptídica líder nativa y una secuencia codificante de hSGSH madura, en donde la secuencia codificante de hSGSH madura se selecciona de SEQ ID NO: 16 o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta, o la SEQ ID NO: 22 o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a esta. En determinadas modalidades, el vector comprende una secuencia codificante de hSGSH que comprende una secuencia peptídica líder exógena y una secuencia codificante de hSGSH madura, en donde la secuencia codificante de hSGSH madura se selecciona de SEQ ID NO: 16 o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta, o la SEQ ID NO: 22 o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a esta.

**[00119]** En determinadas modalidades, el vector comprende una secuencia codificante de hSGSH que comprende una secuencia peptídica líder nativa y una secuencia codificante de hSGSH madura, en donde la secuencia codificante de hSGSH es la SEQ ID NO: 35 o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta. En determinadas modalidades, el vector comprende una secuencia codificante de hSGSH que comprende una secuencia peptídica líder exógena y una secuencia codificante de hSGSH madura, en donde la secuencia codificante de hSGSH es la SEQ ID NO: 18 o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta. En determinadas modalidades, el vector comprende una secuencia codificante de hSGSH que comprende una secuencia peptídica líder exógena

y una secuencia codificante de hSGSH madura que comprende cambios estabilizadores de residuos de aminoácidos A482Y y E488V, en donde la secuencia codificante de hSGSH es SEQ ID NO: 24 o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.

**[00120]** En otras modalidades, el vector comprende una secuencia codificante de

5 hSGSH que comprende una secuencia peptídica líder exógena, una secuencia codificante de hSGSH madura, una secuencia enlazadora y una secuencia de péptido vIGF2, en donde la secuencia codificante de hSGSH es SEQ ID NO: 20 o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta. En otras modalidades, el vector comprende una secuencia codificante de hSGSH que comprende una secuencia peptídica líder exógena, una  
10 secuencia codificante de hSGSH madura que comprende cambios estabilizadores de residuos de aminoácidos A482Y y E488V, una secuencia enlazadora y una secuencia de péptido vIGF2, en donde la secuencia codificante de hSGSH es SEQ ID NO: 26 o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.

**[00121]** Un “vector”, como se usa en este documento, es un resto biológico o

15 químico que comprende una secuencia de ácido nucleico que puede introducirse en una célula diana adecuada para la replicación o la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico. Los ejemplos de un vector incluyen, entre otros, un virus recombinante, un plásmido, lipoplejos, un polymersoma, poliplejos, un dendrímero, un conjugado de péptidos de penetración celular (CPP), una partícula magnética, o una nanopartícula. En  
20 una modalidad, un vector es una molécula de ácido nucleico que tienen un ácido nucleico exógeno o heterólogo modificado genéticamente que codifica una SGSH funcional, que luego puede introducirse en una célula diana apropiada. Tales vectores preferentemente tienen uno o más orígenes de replicación, y uno o más sitios en los que puede insertarse el ADN recombinante. Los vectores a menudo tienen medios por los cuales pueden  
25 seleccionarse células con vectores con respecto a aquellas que no los tienen, por ejemplo, codifican genes resistentes a fármacos. Los vectores comunes incluyen plásmidos, genomas virales y “cromosomas artificiales”. Los métodos convencionales de generación, producción, caracterización o cuantificación de los vectores están disponibles para los expertos en la técnica.

**[00122]** En una modalidad, el vector es un plásmido no viral que comprende un casete de expresión descrito en este, por ejemplo, "ADN desnudo", "ADN de plásmido desnudo", ARN desnudo, y ARNm; acoplado con diversas composiciones y nanopartículas que incluyen, por ejemplo, micelas, liposomas, composiciones de lípidos catiónicos-ácidos nucleicos, composiciones de poliglicanos y otros polímeros, conjugados de lípidos y/o ácidos nucleicos a base de colesterol, y otras construcciones tales como se describen en este documento. Véase, por ejemplo, X. Su et al., Mol. Pharmaceutics, 2011, 8 (3), páginas 774–787; publicación web: 21 de marzo de 2011; WO2013/182683, WO 2010/053572 y WO 2012/170930, todos los cuales se incorporan en este documento por referencia.

**[00123]** En determinadas modalidades, el vector descrito en este documento es un "virus incapaz de replicarse" o un "vector viral", que se refiere a una partícula viral sintética o artificial en la que un casete de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica la SGSH está empaquetado en una cápside o envoltura viral, donde cualquier secuencia genómica viral también empaquetada dentro de la cápside o envoltura viral es incapaz de replicarse; es decir, no pueden generar viriones progenie pero conservan la capacidad de infectar células diana. En una modalidad, el genoma de vector viral no incluye genes que codifican las enzimas requeridas para replicarse (el genoma puede modificarse genéticamente para que sea "gutless", es decir, para que contenga solo la secuencia de ácido nucleico que codifica SGSH flanqueada por las señales requeridas para la amplificación y el empaquetamiento del genoma artificial), pero estos genes pueden suministrarse durante la producción. Por lo tanto, se considera seguro su uso en genoterapia, ya que la replicación e infección mediante viriones de progenie no puede ocurrir excepto en presencia de la enzima viral requerida para la replicación.

**[00124]** Tal como se usa en este documento, un vector de virus recombinante es un virus adenoasociado (AAV), un adenovirus, un bocavirus, un AAV/bocavirus híbrido, un virus del herpes simple o un lentivirus.

**[00125]** Tal como se usa en este documento, la expresión "célula hospedadora" puede referirse a la línea celular de empaquetamiento en la que se produce un vector

(por ejemplo, un AAV recombinante). Una célula hospedadora puede ser una célula procariota o eucariota (por ejemplo, de humano, insecto o levadura) que contiene ADN exógeno o heterólogo que se ha introducido en la célula por cualquier medio, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, microinyección, transformación, infección viral, transfección, administración de liposomas, técnicas de fusión de membrana, pélets recubiertos de ADN de alta velocidad, infección viral y fusión de protoplastos. Los ejemplos de células hospedadoras pueden incluir, entre otras, una célula aislada, un cultivo celular, una célula de *Escherichia coli*, una célula de levadura, una célula humana, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula no mamífera, una célula de insecto, una célula HEK-293, una célula de hígado, una célula de riñón, una célula del sistema nervioso central, una neurona, una célula glial o una célula madre.

**[00126]** Tal como se usa en este documento, la expresión “célula diana” se refiere a cualquier célula diana en la cual se desea la expresión de la SGSH funcional. En determinadas modalidades, el término “célula diana” pretende hacer referencia a las células del sujeto que recibe tratamiento para MPS IIIA. Los ejemplos de células diana pueden incluir, entre otras, una célula de hígado, una célula de riñón, una célula del sistema nervioso central, una neurona, una célula glial y una célula madre. En determinadas modalidades, el vector se administra a una célula diana ex vivo. En determinadas modalidades, el vector se administra a la célula diana in vivo.

**[00127]** Debe entenderse que las composiciones en el vector descritas en este documento pretenden aplicarse a otras composiciones, regímenes, aspectos, modalidades y métodos descritos en la memoria descriptiva..

#### Virus adenoasociado recombinante (rAAV)

**[00128]** Se proporciona en este documento un virus adenoasociado recombinante (rAAV) útil para tratar Mucopolisacaridosis III A (MPS IIIA). El rAAV comprende (a) una cápside de AAV; y (b) un genoma de vector empaquetado en la cápside de AAV de (a). De forma adecuada, la cápside de AAV seleccionada se dirige a las células que se van a tratar. En determinadas modalidades, la cápside es del subtipo F. Sin embargo, en

determinadas modalidades, puede seleccionarse otra fuente de cápside de AAV, es decir, subtipo A. En determinadas modalidades, la cápside de AAV es la cápside AAVhu68. En determinadas modalidades, la cápside de AAV es la cápside AAVrh91. En determinadas modalidades, la cápside de AAV es la cápside AAVhu95. En determinadas modalidades, la cápside de AAV es la cápside AAVhu96. El genoma de vector comprende una repetición terminal invertida (ITR) 5' de AAV, una secuencia de ácido nucleico modificada genéticamente que codifica una hSGSH funcional como se describe en este documento, una secuencia reguladora que dirige la expresión de la hSGSH funcional en una célula diana, y una 3' ITR de AAV.

**[00129]** Como se usa en este documento, el término "genoma de vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se empaqueta en una cápside viral, por ejemplo, una cápside de AAV, y que se puede administrar a una célula hospedadora o una célula en un paciente. En determinadas modalidades, el genoma de vector comprende secuencias de repetición terminal (por ejemplo, secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV) necesarias para empaquetar el genoma de vector en la cápside en los extremos 5' y 3' y que contienen entre ellos un casete de expresión que comprende el gen MECP2 descrito en este documento enlazado operativamente a secuencias que dirigen la expresión de este.

**[00130]** Las secuencias de AAV del vector generalmente comprenden las secuencias de repetición terminal invertida (ITR) 5' y 3' de actuación cis (véase, por ejemplo, B. J. Carter, en "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, págs. 155 168 (1990)). Las secuencias de ITR tienen aproximadamente 145 pares de bases (bp) de longitud. Preferentemente, se usan sustancialmente todas las secuencias que codifican las ITR en la molécula, aunque es permisible algún grado de modificación menor de estas secuencias. La capacidad de modificar estas secuencias de ITR se encuentra dentro de la técnica. (Véase, por ejemplo, textos tales como Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2.º ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989); y K. Fisher et al., J. Virol., 70:520 532 (1996)). Un ejemplo de tal molécula empleada en la presente invención es un plásmido "de actuación cis" que contiene el transgén, en el que la secuencia del transgén seleccionada y los elementos reguladores

asociados están flanqueados por las secuencias 5' y 3' AAV ITR. En una modalidad, las ITR son de un AAV diferente al que suministra una cápside. En una modalidad, las secuencias de ITR son de AAV2. Se ha descrito una versión acortada de la ITR 5', denominada  $\Delta$ ITR, en la que se eliminan la secuencia D y el sitio de resolución terminal (trs). En determinadas modalidades, el genoma de vector (por ejemplo, de un plásmido) incluye una ITR acortada de AAV2 de 130 pares de bases, en donde se suprimen los elementos A externos. La ITR acortada puede revertir la longitud natural de 145 pares de bases durante la amplificación de ADN de vector usando el elemento A interno como una plantilla y empaquetándose en la cápside para formar la partícula viral. En otras modalidades, se usan las ITR 5' y 3' de AAV de longitud completa. Sin embargo, se pueden seleccionar ITR de otras fuentes de AAV. Cuando la fuente de las ITR es de AAV2 y la cápside de AAV es de otra fuente de AAV, el vector resultante puede denominarse pseudotipificado. Sin embargo, pueden ser adecuadas otras configuraciones de estos elementos.

**[00131]** En un aspecto, el rAAV es para usar en el tratamiento de Mucopolisacaridosis III A (MPS IIIA). En una modalidad, el rAAV comprende un genoma de vector que comprende 5' AAV ITR, un casete de expresión y una 3' AAV ITR, en donde el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico genéticamente modificada que codifica para una hSGSH funcional, en donde la secuencia codificante de hSGSH funcional comprende una secuencia peptídica señal y una secuencia codificante de hSGSH madura, en donde la codificación de hSGSH madura tiene la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de SEQ ID NO: 16 o una secuencia de ácido nucleico que es (a) al menos 85 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 23; o (b) al menos 99 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 23, y en donde la secuencia codificante de hSGSH está enlazada operativamente a secuencias de control reguladoras que dirigen la expresión de la hSGSH en una célula. En determinadas modalidades, el rAAV comprende un casete de expresión que comprende una secuencia codificante de hSGSH madura 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 16 que codifica la SEQ ID NO: 22, y que codifica la SEQ ID NO: 23 (hSGSH.A482Y.E488V). En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hSGSH madura es SEQ ID NO: 16. En determinadas modalidades, la

secuencia codificante de hSGSH madura que es al menos aproximadamente 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 16, que codifica la SEQ ID NO: 23.

**[00132]** En determinadas modalidades, las secuencias reguladoras comprenden un promotor específico del CNS, por ejemplo, el promotor de la sinaspina humana (hSyn), un promotor constitutivo, por ejemplo, CB7, CBh o un promotor regulable. En determinadas modalidades, los elementos reguladores comprenden uno o más de una secuencia de Kozak, una señal TATA, un intrón, un potenciador y una secuencia de poliadenilación.

**[00133]** En determinadas modalidades, el genoma de vector comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3 (CB7.CI.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta. En determinadas modalidades, el genoma de vector comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7 (CB7.CI.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.WPRE.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta. En determinadas modalidades, el genoma de vector comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 10 (CB7.CI.hSGSHcoV1.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta. En determinadas modalidades, el genoma de vector comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 13 (CB7.CI.hSGSHcoV1-4xmiR183.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta. En determinadas modalidades, el genoma de vector comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 40 (CB7.CI.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.WPRE.4xmiR182.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta. En determinadas modalidades, el genoma de vector comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 (CB7.CI.BIP.hSGSHcov1(A482Y-E488V).vIGF2.WPRE.4xmiR183.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta. En determinadas modalidades, el genoma de vector comprende

una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 37 (CB7.CI.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.WPRE.4xmiR182.4xmiR183.rBG) o una secuencia al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 a al menos 100 % idéntica a esta.

5 **[00134]** En determinadas modalidades la cápside de AAV de subtipo F se selecciona de una cápside AAVhu68 [Véase, por ejemplo, US2020/0056159; PCT/US21/55436; SEQ ID NO: 48 y 49 para la secuencia de ácido nucleico; SEQ ID NO: 50 para la secuencia de aminoácidos], una cápside AAVhu95 [Véase, por ejemplo, solicitud provisional estadounidense núm. 63/251.599, presentada el 2 de octubre de  
10 2021 y PCT/US2022/077315, presentada el 30 de septiembre de 2022; SEQ ID NO: 54 y 55 (secuencia de ácido nucleico hu95) y la SEQ ID NO: 56 (secuencia de aminoácidos hu95), o una cápside AAVhu96 [Véase, por ejemplo, solicitud provisional estadounidense núm. 63/251.599, presentada el 2 de octubre de 2021 y PCT/US2022/077315, presentada el 30 de septiembre de 2022; SEQ ID NO: 57 y 58 (secuencia de ácido  
15 nucleico hu96) y la SEQ ID NO: 59 (secuencia de aminoácidos hu96). En determinadas modalidades, la cápside de AAV es una cápside del subtipo A, tal como la cápside AAVrh91 (secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 51 y 52; secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53). Véase, PCT/US20/030266, presentado el 29 de abril de 2020, ahora publicada como WO2020/223231, que se incorpora por referencia en este documento y  
20 la solicitud internacional núm. PCT/US21/45945, presentada el 13 de agosto de 2021, que se incorporan a este documento mediante referencia.

**[00135]** En determinadas modalidades, la cápside de AAV para las composiciones y métodos descritos en este documento se elige en función de la célula diana. En determinadas modalidades, la cápside de AAV transduce una célula del CNS y/o una  
25 célula del PNS. En determinadas modalidades, puede elegirse otra cápside de AAV. La cápside de AAV se selecciona de una cápside cy02, una cápside rh43, una cápside AAV8, una cápside rh01, una cápside AAV9, una cápside rh8, una cápside rh10, una cápside bb01, una cápside hu37, una cápside rh02, una cápside rh20, una cápside rh39, una cápside rh64, una cápside AAV6, una cápside AAV1, una cápside hu44, una cápside  
30 hu48, una cápside cy05, una cápside hu11, una cápside hu32, una cápside pi2, o una

variación de estas. En determinadas modalidades, la cápside de AAV es una cápside del subtipo F, como la cápside AAV9, cápside AAVhu68, cápside hu31, cápside hu32, o una variación de estas. Véase, por ejemplo, WO 2005/033321, publicada el 14 de abril de 2015, WO 2018/160582, y US 2015/0079038, cada una de los cuales se incorpora en este documento mediante referencia en sus totalidades. En determinadas modalidades, la cápside de AAV es una cápside que no es del subtipo F, por ejemplo una cápside del subtipo A, B, C, D o E. En determinadas modalidades, la cápside que no es del subtipo F es un AAV1 o una variación de esta. En determinadas modalidades, la cápside de AAV transduce una célula diana distinta de las células del sistema nervioso. En determinadas modalidades, la cápside de AAV es una cápside del subtipo A (por ejemplo, AAV1, AAV6, AAVrh91), una cápside del subtipo B (por ejemplo, AAV 2), una cápside del subtipo C (por ejemplo, hu53), una cápside del subtipo D (por ejemplo, AAV7), o una cápside del subtipo E (por ejemplo, rh10).

**[00136]** Un rAAV se compone de una cápside de AAV y un genoma de vector. Una cápside de AAV es un ensamblaje de una población heterogénea de vp1, una población heterogénea de vp2 y una población heterogénea de proteínas vp3. Como se usa en este documento cuando se usa para referirse a proteínas de la cápside de vp, el término "heterogéneo" o cualquier variación gramatical de este, se refiere a una población que consiste en elementos que no son iguales, por ejemplo, que tienen monómeros (proteínas) vp1, vp2 o vp3 con diferentes secuencias de aminoácidos modificadas.

**[00137]** Como se usa en este documento cuando se usa para referirse a proteínas de la cápside de vp, el término "heterogéneo" o cualquier variación gramatical de este, se refiere a una población que consiste en elementos que no son iguales, por ejemplo, que tienen monómeros (proteínas) vp1, vp2 o vp3 con diferentes secuencias de aminoácidos modificadas. El término "población heterogénea", como se usa en relación con las proteínas vp1, vp2 y vp3 (alternativamente denominadas isoformas), se refiere a las diferencias en la secuencia de aminoácidos de las proteínas vp1, vp2 y vp3 dentro de una cápside. La cápside de AAV contiene subpoblaciones dentro de las proteínas vp1, dentro de las proteínas vp2 y dentro de las proteínas vp3 que tienen modificaciones de los residuos de aminoácidos previstos. Como mínimo, estas subpoblaciones incluyen

ciertos residuos de asparagina (N o Asn) desamidados. Por ejemplo, ciertas subpoblaciones comprenden al menos una, dos, tres o cuatro posiciones de asparaginas (N) altamente desamidadas en pares de asparagina-glicina y, opcionalmente, comprenden además otros aminoácidos desamidados, en donde la desamidación da como resultado un cambio de aminoácido y otras modificaciones opcionales.

**[00138]** En determinadas modalidades, se proporcionan cápsides de AAV que tienen una población heterogénea de isoformas de cápside de AAV (es decir, VP1, VP2, VP3) que contienen múltiples posiciones de "NG" altamente desamidadas. En determinadas modalidades, las posiciones altamente desamidadas están en las ubicaciones identificadas más adelante, con referencia a la secuencia de aminoácidos de VP1 de longitud completa prevista. En otras modalidades, el gen de la cápside se modifica de manera que el "NG" al que se hace referencia se elimina y un "NG" mutante se diseña por ingeniería genética en otra posición.

**[00139]** En determinadas modalidades, la cápside de AAV es una cápside AAVhu68, o una cápside AAVrh91. En determinadas modalidades, la cápside AAVhu68 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50. En determinadas modalidades, la cápside AAVhu68 comprende: (i) proteínas AAVhu68 vp1, proteínas AAVhu68 vp2, y proteínas AAVhu68 vp3 producidas a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 50; o (ii) poblaciones heterogéneas de las proteínas AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 y AAVhu68 vp3, en donde las subpoblaciones de las proteínas AAVhu68 vp1, AAVhu68 vp2 y AAV hu68 vp3 comprenden al menos de 50 % a 100 % de asparaginas desamidadas (N) en pares asparagina - glicina en cada una de las posiciones 57, 329, 452, 512, en relación con los aminoácidos de la SEQ ID NO: 50, en donde las asparaginas desamidadas se desamidan a ácido aspártico, ácido isoaspártico, un par ácido aspártico/ácido isoaspártico con interconversión o combinaciones de estos, según se determine usando espectrometría de masas. En determinadas modalidades, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína AAVhu68 vp1 es la SEQ ID NO: 48 o una secuencia al menos 80 % a al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 48 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; opcionalmente en donde la secuencia de ácido nucleico es al menos de 80 % a 97 % idéntica a la SEQ ID NO: 48. En

determinadas modalidades, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína AAVhu68 vp1 es la SEQ ID NO: 49 o una secuencia al menos 80 % a al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 49 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; opcionalmente en donde la secuencia de ácido nucleico es al menos de 80 % a 97 % idéntica a la SEQ ID NO: 49.

**[00140]** Como se usa en este documento, los términos "célula diana" y "tejido diana" pueden referirse a cualquier célula o tejido que esté destinado a ser transducido por el vector de AAV sujeto. El término puede referirse a uno o más: músculo, hígado, pulmón, epitelio de las vías respiratorias, sistema nervioso central, neuronas, ojo (células oculares) o corazón.

**[00141]** Además, se proporciona en este documento un sistema de producción de rAAV útil para producir un rAAV como se describe en este documento. El sistema de producción comprende un cultivo celular que comprende (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de cápside de AAV; (b) el genoma de vector; y (c) suficientes funciones AAV rep y funciones auxiliares para permitir el empaquetamiento del genoma de vector en la cápside de AAV. En determinadas modalidades, el genoma de vector es las SEQ ID NO: 3, 7, 10, 13, 40, 1, o 37. En determinadas modalidades, el cultivo celular es un cultivo celular de riñón embrionario humano 293. En determinadas modalidades, el AAV rep es de un AAV diferente. En determinadas modalidades, en donde el AAV rep es de AAV2. En determinadas modalidades, la secuencia codificante de AAV rep y los genes cap están en la misma molécula de ácido nucleico, en donde hay opcionalmente un espaciador entre la secuencia rep y el gen cap.

**[00142]** Para usar en la producción de un vector viral de AAV (por ejemplo, un AAV recombinante (r)), los genomas de vector se pueden transportar en cualquier vector adecuado, por ejemplo, un plásmido, que se le administra a una célula hospedadora. Los plásmidos útiles en esta invención pueden modificarse genéticamente de manera que sean adecuados para la replicación y el empaquetamiento in vitro en células procariotas, células de insectos, células de mamíferos, entre otras. Se conocen técnicas de transfección y células hospedadoras empaquetadoras adecuadas y/o un experto en la técnica puede diseñarlas fácilmente.

**[00143]** En determinadas modalidades, un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido)

útil en la producción de rAAV comprende un genoma de vector que comprende una 5' ITR, la secuencia promotora CB7, el intrón de beta actina de pollo, una secuencia Kozak, la secuencia codificante BIP.hSGSH.vIGF2, una secuencia rBG poliA, y una 3' ITR. En

5 determinadas modalidades, un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) útil en la producción de rAAV comprende un genoma de vector que comprende una 5' ITR, la secuencia promotora CB7, el intrón de beta actina de pollo, una secuencia Kozak, la secuencia codificante BIP.hSGSH.A482Y.E488V.vIGF2, una secuencia rBG poliA, y una 3' ITR. En determinadas modalidades, un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) útil

10 en la producción de rAAV comprende un genoma de vector que comprende una 5' ITR, la secuencia promotora CB7, el intrón de beta actina de pollo, una secuencia Kozak, la secuencia codificante BIP.hSGSH.A482Y.E488V.vIGF2, al menos 4 repeticiones en tándem miR182, una secuencia rBG poliA, y una 3' ITR. En determinadas modalidades, un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) útil en la producción de rAAV comprende

15 un genoma de vector que comprende una 5' ITR, la secuencia promotora CB7, el intrón de beta actina de pollo, una secuencia Kozak, la secuencia codificante BIP.hSGSH.A482Y.E488V.vIGF2, al menos 4 repeticiones en tándem miR183, una secuencia rBG poliA, y una 3' ITR. En determinadas modalidades, un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) útil en la producción de rAAV comprende un genoma de vector que

20 comprende una 5' ITR, la secuencia promotora CB7, el intrón de beta actina de pollo, una secuencia Kozak, la secuencia codificante BIP.hSGSH.A482Y.E488V.vIGF2, al menos 4 repeticiones en tándem miR182, al menos cuatro repeticiones en tándem miR183, una secuencia rBG poliA, y una 3' ITR.

**[00144]** Los métodos para generar y aislar AAV adecuados para usar como vectores

25 se conocen en la técnica. Véase, en general, por ejemplo, Grieger & Samulski, 2005, Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications, Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 99: 119-145; Buning et al., 2008, Recent developments in adeno-associated virus vector technology, J. Gene Med. 10:717-733; y las referencias citadas más adelante, cada una de los cuales se incorpora en este

30 documento mediante referencia en sus totalidades. Como se usa en este documento, el

vector de genoterapia se refiere a un rAAV descrito en este documento, que es adecuada para usar en el tratamiento de un paciente. Para empaquetar un gen en viriones, las ITR son los únicos componentes de AAV necesarios en cis en la misma construcción que la molécula de ácido nucleico que contiene el gen. Los genes cap y rep se pueden suministrar en trans.

**[00145]** En determinadas modalidades, el proceso de fabricación del rAAV comprende el método descrito en la solicitud de patente provisional estadounidense núm. 63/371.597, presentada el 16 de agosto de 2022, y la solicitud de patente provisional estadounidense núm. 63/371.592, presentada el 16 de agosto de 2022, que se incorporan en este documento mediante referencia en sus totalidades.

**[00146]** En una modalidad, el elemento genético seleccionado puede administrarse a una célula empaquetadora de AAV mediante cualquier método adecuado, que incluye transfección, electroporación, administración de liposomas, técnicas de fusión de membrana, pélets recubiertos con ADN de alta velocidad, infección viral y fusión de protoplastos. También se pueden fabricar células empaquetadoras de AAV estables. Los métodos usados para fabricar tales construcciones son conocidos por los expertos en las técnicas de manipulación de ácidos nucleicos e incluyen ingeniería genética, ingeniería genética recombinante y técnicas de síntesis. Véase, por ejemplo., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

**[00147]** El término “AAV intermedio” o “vector de AAV intermedio” se refiere a una cápside rAAV ensamblada que carece de las secuencias genómicas deseadas empaquetadas en esta. Estas también pueden denominarse cápside “vacía”. Tal cápside puede no contener secuencias genómicas detectables de un casete de expresión, o solo secuencias genómicas empaquetadas parcialmente que son insuficientes para lograr la expresión del producto génico. Estas cápsides vacías no son funcionales para transferir el gen de interés a una célula hospedadora.

**[00148]** El virus adenoasociado (AAV) recombinante descrito en este documento puede generarse mediante técnicas conocidas. Véanse, por ejemplo, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. Tal método implica cultivar una

célula hospedadora que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside de AAV; un gen rep funcional; un casete de expresión compuesto por, como mínimo, repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV y un transgén; y suficientes funciones auxiliares para permitir el empaquetamiento del casete de expresión en la proteína de la cápside de AAV. Se han descrito métodos para generar la cápside, secuencias codificantes de esta y métodos para la producción de vectores virales de rAAV. Véase, por ejemplo, Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 100 (10), 6081-6086 (2003) y US 2013/0045186A1.

**[00149]** En una modalidad, se proporciona un cultivo celular de producción útil para producir un AAV recombinante con una cápside seleccionada de AAVhu68, AAVrh91, AAVhu95 o AAVhu96. Tal cultivo celular contiene un ácido nucleico que expresa la proteína de la cápside AAVhu68 en la célula hospedadora (por ejemplo, SEQ ID NO: 48 o la SEQ ID NO: 49; una molécula de ácido nucleico adecuada para empaquetarse en la cápside de AAVhu68, por ejemplo, un genoma de vector que contiene las ITR de AAV y una secuencia de ácido nucleico no de AAV que codifica un gen enlazado operativamente a secuencias reguladoras que dirigen la expresión del gen en una célula hospedadora; y suficientes funciones AAV rep y funciones auxiliares de adenovirus para permitir el empaquetamiento del genoma de vector en la cápside AAVhu68 o AAVrh91 recombinante (por ejemplo, SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 52), cápside AAVhu95 (por ejemplo, SEQ ID NO: 54 o SEQ ID NO: 55), cápside AAVhu96 (por ejemplo, SEQ ID NO: 57 o SEQ ID NO: 58). En una modalidad, el cultivo celular está compuesto por células de mamífero (por ejemplo, células 293 de riñón embrionario humano, entre otras) o células de insecto (por ejemplo, células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9)). En determinadas modalidades, el baculovirus proporciona las funciones auxiliares necesarias para empaquetar el genoma de vector en la cápside recombinante AAVhu68, AAVrh91, AAVhu95 o AAVhu96.

**[00150]** Opcionalmente, las funciones rep son proporcionadas por un AAV distinto del AAV2, seleccionado para complementar la fuente de las ITR.

**[00151]** En una modalidad, las células se elaboran en una suspensión o un cultivo celular adecuado (por ejemplo, HEK 293 o Sf9). Los métodos para fabricar los vectores

de genoterapia descritos en este documento incluyen métodos conocidos en la técnica tales como la generación de ADN plasmídico utilizado para la producción de los vectores de genoterapia, la generación de los vectores y la purificación de los vectores. En algunas modalidades, el vector de genoterapia es un vector de AAV y los plásmidos generados son un plásmido cis de AAV que codifica el genoma de vector AAV y el gen de interés, un plásmido trans de AAV que contiene genes rep y cap de AAV y un plásmido auxiliar de adenovirus. El proceso de generación de vectores puede incluir pasos del método tales como el inicio del cultivo celular, el paso de células, la siembra de células, la transfección de células con el ADN plasmídico, el intercambio de medio posterior a la transfección a medio libre de suero y la recolección de células que contienen el vector y medios de cultivo. Las células que contienen el vector y los medios de cultivo recolectados se denominan en este documento recolección de células crudas. En incluso otro sistema, los vectores de genoterapia se introducen en células de insectos mediante infección con vectores a base de baculovirus. En general, se pueden encontrar reseñas de estos sistemas de producción en, por ejemplo, Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adenovirus associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production", Human Gene Therapy 20:922-929, cuyo contenido se incorpora en este documento mediante referencia en su totalidad. Los métodos de fabricación y uso de estos y otros sistemas de producción de AAV también se describen en las siguientes patentes estadounidenses, el contenido de cada una de las cuales se incorpora en este documento por referencia en su totalidad: patentes estadounidenses núm. 5.139.941; 5.741.683; 6.057.152; 6.204.059; 6.268.213; 6.491.907; 6.660.514; 6.951.753; 7.094.604; 7.172.893; 7.201.898; 7.229.823; y 7.439.065.

**[00152]** La recolección de células crudas puede, por lo tanto, estar sujeta a procesamiento adicional que incluye la concentración de la recolección de vector, diafiltración de la recolección de vector, microfluidización de la recolección de vector, digestión de nucleasa de la recolección de vector, filtración de intermedio microfluidizado, purificación de crudo mediante cromatografía, purificación de crudo mediante ultracentrifugación, intercambio de amortiguador mediante filtración de flujo tangencial y/o formulación y filtración para preparar el vector a granel. Se utiliza una purificación

mediante cromatografía de afinidad seguida de una cromatografía de resina de intercambio aniónico para purificar el producto farmacológico de vector y eliminar las cápsides vacías. Estos métodos se describen con más detalle en WO2017/160360, presentado el 9 de diciembre de 2016, titulado "Scalable Purification Method for AAV9",  
5 que se incorpora por referencia. Métodos de purificación para AAV8, WO2017/100676, presentada el 9 de diciembre de 2016, y rh10, WO2017/100704, presentada el 9 de diciembre de 2016, titulada "Scalable Purification Method for AAVrh10", también presentada el 11 de diciembre de 2015, y para AAV1, WO2017/100674, presentada el 9 de diciembre de 2016 para "Scalable Purification Method for AAV1", presentada el 11 de  
10 diciembre de 2015, que se incorporan por referencia en este documento. Pueden seleccionarse otros métodos adecuados.

**[00153]** Para calcular el contenido de partículas vacías y completas, se grafican volúmenes de banda de VP3 para una muestra seleccionada (por ejemplo, en ejemplos en este documento, una preparación purificada con gradiente de iodixanol donde la  
15 cantidad de copias de genoma (GC) = cantidad de partículas) en función de partículas de GC cargadas. La ecuación lineal resultante ( $y = mx + c$ ) se usa para calcular la cantidad de partículas en los volúmenes de banda de los picos del artículo de prueba. La cantidad cargada de partículas (pt) por 20  $\mu$ L se multiplica luego por 50 para obtener las partículas (pt)/ml. Pt/ml dividido por GC/ml proporciona la relación de partículas con respecto a  
20 copias del genoma (pt/GC). Pt/ml-GC/ml proporciona pt/ml vacías. Pt/ml vacías divididas por pt/ml y x 100 proporciona el porcentaje de partículas vacías.

**[00154]** Generalmente, en la técnica se conocen métodos para analizar cápsides vacías y partículas de vector de AAV con genomas empaquetados. Véase, por ejemplo, Grimm et al., Gene Therapy (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., Molec. Ther. (2003)  
25 7:122-128. Para evaluar la cápside desnaturalizada, los métodos incluyen someter la reserva de AAV tratada a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, que consiste en cualquier gel capaz de separar las tres proteínas de la cápside, por ejemplo, un gel de gradiente que contiene 3-8 % de tris-acetato en el amortiguador, luego hacer correr el gel hasta que el material de muestra se separe y transferir el gel a membranas de nylon o  
30 nitrocelulosa, preferentemente nylon. Los anticuerpos anti-cápside de AAV se usan luego

como anticuerpos primarios que se unen a las proteínas de la cápside desnaturalizada, preferentemente, un anticuerpo monoclonal anti-cápside de AAV, con máxima preferencia, el anticuerpo monoclonal B1 anti-AAV-2 (Wobus et al., J. Virol. (2000) 74:9281-9293). Luego se usa un anticuerpo secundario, uno que se fija al anticuerpo

5   primario y contiene un medio para detectar la fijación con el anticuerpo primario, con mayor preferencia, un anticuerpo anti-IgG que contiene una molécula de detección unida de manera covalente a este, con máxima preferencia, un anticuerpo de oveja anti-IgG de

10   ratón ligado de manera covalente a peroxidasa de rábano picante. Se usa un método para detectar la unión para determinar de manera semicuantitativa la unión entre los anticuerpos primarios y secundarios, preferentemente, un método de detección capaz de

15   detectar emisiones de isótopos radioactivos, radiación electromagnética o cambios colorimétricos, con máxima preferencia, un kit de detección de quimioluminiscencia. Por ejemplo, para SDS-PAGE, se pueden tomar muestras de fracciones de columna y calentarlas en un amortiguador de carga SDS-PAGE que contenga un agente reductor

20   (por ejemplo, DTT) y se resolvieron proteínas de la cápside en geles de poliacrilamida de gradiente profundos (por ejemplo, Novex). La tinción con plata se puede realizar con SilverXpress (Invitrogen, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante u otro método de tinción adecuado, es decir, tinciones SYPRO ruby o coomassie. En una

25   modalidad, la concentración de genomas del vector (vg) de AAV en fracciones de columna se puede medir mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR). Las muestras se diluyen y se digieren con DNasa I (u otra nucleasa adecuada) para eliminar el ADN exógeno. Después de la inactivación de la nucleasa, las muestras se diluyen y se amplifican adicionalmente con cebadores y una sonda fluorogénica TaqMan™ específica para la secuencia de ADN entre los cebadores. La cantidad de ciclos necesarios para

alcanzar un nivel definido de fluorescencia (umbral de ciclo, Ct) se mide para cada muestra en un sistema de detección de secuencias Applied Biosystems Prism 7700. Se emplea ADN plasmídico que contiene secuencias idénticas a la contenida en el vector de AAV para generar una curva estándar en la reacción de Q-PCR. Se utilizan los valores de umbral de ciclo (Ct) obtenidos de las muestras para determinar el título del genoma

de vector al normalizarlo al valor de Ct de la curva estándar del plásmido. También se pueden utilizar ensayos de punto final en función de la PCR digital.

**[00155]** En un aspecto, se usa un método de q-PCR optimizado que utiliza una serina proteasa de amplio espectro, por ejemplo, proteinasa K (tal como está disponible en el comercio a través de Qiagen). Más particularmente, el ensayo de título del genoma de qPCR optimizado es similar a un ensayo estándar, excepto que, después de la digestión con DNasa I, las muestras se diluyen con amortiguador de proteinasa K y se tratan con proteinasa K, y luego inactivación por calor. De manera adecuada, las muestras se diluyen con amortiguador de proteinasa K en una cantidad igual al tamaño de la muestra. El amortiguador de proteinasa K puede concentrarse 2 veces o más. Generalmente, el tratamiento con proteinasa K es de aproximadamente 0,2 mg/ml, pero puede variar de 0,1 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml. La etapa de tratamiento se realiza generalmente a aproximadamente 55°C durante aproximadamente 15 minutos, pero puede realizarse a una temperatura más baja (por ejemplo, de aproximadamente 37°C a aproximadamente 50°C) durante un período de tiempo más largo (por ejemplo, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 30 minutos), o una temperatura más alta (por ejemplo, hasta aproximadamente 60°C) durante un período de tiempo más corto (por ejemplo, de aproximadamente 5 a 10 minutos). De manera similar, la inactivación por calor es generalmente a aproximadamente 95°C durante aproximadamente 15 minutos, pero la temperatura puede reducirse (por ejemplo, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90°C) y el tiempo puede prolongarse (por ejemplo, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 30 minutos). Las muestras se diluyen luego (por ejemplo, 1000 veces) y se someten a análisis TaqMan como se describe en el ensayo estándar.

**[00156]** Adicional, o alternativamente, se puede usar PCR digital en gotas (ddPCR). Por ejemplo, se han descrito métodos para determinar los títulos del genoma de vector de AAV monocatenario y autocomplementario mediante ddPCR. Véase, por ejemplo, M. Lock et al., *Hu Gene Therapy Methods*, Hum Gene Ther Methods. Abr 2014; 25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 14 Feb 2014.

**[00157]** En resumen, el método para separar partículas de rAAVhu68 (o AAVrh91, AAVhu95 o AAVhu96) que tienen secuencias genómicas empaquetadas de intermedios de AAVhu68 (o AAVrh91 o AAVhu95 o AAVhu96) deficientes en genoma comprende someter una suspensión que comprende partículas virales de AAVhu68 (o AAVrh91) 5 recombinantes e intermedios de cápside AAVhu68 (o AAVrh91 o AVhu95 o AAVhu96) a cromatografía líquida de rendimiento rápido, en donde las partículas virales AAVhu68 (o AAVrh91 o AAVhu95 o AAVhu96) y los intermedios de AAVhu68 se unen a una resina de intercambio aniónico fuerte equilibrada a un pH de aproximadamente 10,2 (o aproximadamente 9,8 para AAVrh91), y se someten a un gradiente salino mientras se 10 controla la absorbancia ultravioleta del eluido a aproximadamente 260 nanómetros (nm) y aproximadamente 280 nm. Aunque es menos óptimo para rAAVhu68 y AAVrh91, el pH puede estar en el rango de aproximadamente 10 a 10,4. En este método, las cápsides completas de AAV se recolectan de una fracción que se eluye cuando la relación A260/A280 alcanza un punto de inflexión. En un ejemplo, para el paso de cromatografía 15 de afinidad, el producto diafiltrado se puede aplicar a una resina de afinidad (Life Technologies) que captura el serotipo de AAV de manera eficiente. En estas condiciones iónicas, un porcentaje significativo de ADN celular residual y proteínas fluye a través de la columna, mientras que las partículas de AAV se capturan de manera eficiente.

**[00158]** El rAAV.hSGSH (por ejemplo, rAAV.BIP.hSGSH o rAAV.BIP.hSGSH.vIGF2, 20 o rAAV.BIP.hSGSH.A482Y.E488V o rAAV.BIP.hSGSH.A482Y.E488V.vIGF2) se suspende en una composición compatible fisiológicamente adecuada (por ejemplo, una solución salina amortiguada). Esta composición puede congelarse para su almacenamiento, luego descongelarse y opcionalmente diluirse con un diluyente adecuado. De manera alternativa, el vector puede prepararse como una composición que 25 sea adecuada para su administración a un paciente sin pasar por las etapas de congelación y descongelación.

**[00159]** Como se usa en este documento, el término "subtipo", en relación a grupos de AAV, se refiere a grupos de AAV filogenéticamente relacionados entre sí según se determina mediante un algoritmo Neighbor-Joining mediante un valor de remuestreo de 30 al menos 75 % (de al menos 1000 réplicas) y una medición de distancia de corrección de

Poisson no mayor de 0,05, en función de la alineación de la secuencia de aminoácidos de vp1 de AAV. El algoritmo Neighbor-Joining se describió en la literatura. Véase, por ejemplo, M. Nei y S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics* (Oxford University Press, Nueva York (2000)). Hay disponibles programas informáticos que se pueden usar para implementar este algoritmo. Por ejemplo, el programa MEGA v2.1 implementa el método Nei-Gojobori modificado. Mediante estas técnicas y programas informáticos, y la secuencia de una proteína de la cápside vp1 de AAV, un experto en la técnica puede determinar si un AAV seleccionado está contenido en uno de los subtipos identificados en este documento, en otro subtipo o fuera de estos subtipos. Véase, por ejemplo, G Gao, et al, *J Virol*, Jun 2004; 78(10): 6381-6388, que identifica los subtipos A, B, C, D, E y F y proporciona secuencias de ácido nucleico de un AAV novedoso, números de acceso a GenBank AY530553 a AY530629. Véase también WO 2005/033321.

**[00160]** Como se usa en este documento, el término "título de NAb" es una medida de la cantidad de anticuerpo neutralizante (por ejemplo, Nab anti-AAV) que se produce que neutraliza el efecto fisiológico de su epítipo diana (por ejemplo, un AAV). Los títulos de NAb anti-AAV pueden medirse de la manera descrita en, por ejemplo, Calcedo, R., et al., *Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. Journal of Infectious Diseases*, 2009. 199(3): págs. 381-390, que se incorpora por referencia en este documento.

**[00161]** La abreviatura "sc" se refiere a autocomplementario. "AAV autocomplementario" se refiere a una construcción en el que una región codificante transportada por una secuencia de ácido nucleico de AAV recombinante se diseñó para formar una plantilla de ADN bicatenario intramolecular. Tras la infección, en lugar de esperar la síntesis mediada por células de la segunda cadena, las dos mitades complementarias de scAAV se asociarán para formar una unidad de ADN bicatenario (ADNbc) que está lista para la replicación y transcripción inmediatas. Véase, por ejemplo, D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Therapy* (Ago 2001), volumen 8, número 16, páginas 1248-1254. Los AAV autocomplementarios se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses núm. 6,596,535; 7,125,717;

y 7,456,683, cada una de las cuales se incorpora en este documento mediante referencia en sus totalidades.

**[00162]** Un “vector viral” o “virus incapaz de replicarse” se refiere a una partícula viral sintética o artificial en la cual un casete de expresión que contiene un gen de interés está empaquetado en una cápside o envoltura viral, donde cualquier secuencia genómica viral empaquetada también dentro de la cápside o envoltura viral es incapaz de replicarse; es decir, no puede generar viriones de progenie, pero retiene la capacidad de infectar células diana. En una modalidad, el genoma de vector viral no incluye genes que codifican las enzimas requeridas para replicarse (el genoma se puede diseñar por ingeniería genética para que sea “gutless”, conteniendo solo el gen de interés flanqueado por las señales requeridas para la amplificación y empaquetamiento del genoma), pero estos genes pueden suministrarse durante la producción. Por lo tanto, se considera seguro su uso en genoterapia, ya que la replicación e infección mediante viriones de progenie no puede ocurrir excepto en presencia de la enzima viral requerida para la replicación.

**[00163]** Tal como se usan en este documento, los términos “rAAV” y “AAV artificial” usados indistintamente, significan, entre otras cosas, un AAV que comprende una proteína de cápside y un genoma de vector empaquetado en este, en donde el genoma de vector comprende un ácido nucleico heterólogo al AAV. En una modalidad, la proteína de la cápside es una cápside no natural. Dicha cápside artificial puede generarse mediante cualquier técnica adecuada con el uso de una secuencia de AAV seleccionada (por ejemplo, un fragmento de una proteína de cápside vp1) en combinación con secuencias heterólogas que pueden obtenerse de un AAV seleccionado diferente, de porciones no contiguas del mismo AAV, de una fuente viral que no sea un AAV, o de una fuente no viral. Un AAV artificial puede ser, entre otros, un AAV pseudotipado, una cápside de AAV quimérico, una cápside de AAV recombinante o una cápside de AAV “humanizado”. Los vectores pseudotipados, en donde la cápside un AAV se sustituye por una proteína de cápside heteróloga, son útiles en la invención. En una modalidad, AAV2/5 y AAV2/8 son vectores pseudotipados ilustrativos. El elemento genético seleccionado puede administrarse mediante cualquier método adecuado, que incluye transfección, electroporación, administración de liposomas, técnicas de fusión de membrana, pélets

recubiertos con ADN de alta velocidad, infección viral y fusión de protoplastos. Los métodos usados para fabricar tales construcciones son conocidos por los expertos en las técnicas de manipulación de ácidos nucleicos e incluyen ingeniería genética, ingeniería genética recombinante y técnicas de síntesis. Véase, por ejemplo, Green y Sambrook, 5 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

**[00164]** En muchos casos, las partículas de rAAV se denominan resistentes a DNasa. Sin embargo, además de esta endonucleasa (DNasa), también se pueden usar otras endonucleasas y exonucleasas en las etapas de purificación descritas en este 10 documento, para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes. Se pueden seleccionar tales nucleasas para degradar el ADN monocatenario y/o el ADN bicatenario, así como el ARN. Tales etapas pueden contener una sola nucleasa, o mezclas de nucleasas dirigidas a diferentes dianas, y pueden ser endonucleasas o exonucleasas.

**[00165]** La expresión "resistente a nucleasa" indica que la cápside de AAV se 15 ensambló por completo alrededor del casete de expresión que está diseñado para administrar un gen a una célula hospedadora y protege estas secuencias genómicas empaquetadas de la degradación (digestión) durante las etapas de incubación de nucleasa diseñadas para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes que pueden estar presentes a partir del proceso de producción.

20 **[00166]** Como se usa en este documento cuando se usa para referirse a proteínas de la cápside de vp, el término "heterogéneo" o cualquier variación gramatical de este, se refiere a una población que consiste en elementos que no son iguales, por ejemplo, que tienen monómeros (proteínas) vp1, vp2 o vp3 con diferentes secuencias de aminoácidos modificadas.

25 **[00167]** El término "heterogéneo", como se usa en relación con las proteínas vp1, vp2 y vp3 (alternativamente denominadas "isoformas"), se refiere a las diferencias en la secuencia de aminoácidos de las proteínas vp1, vp2 y vp3 dentro de una cápside. La cápside de AAV contiene subpoblaciones dentro de las proteínas vp1, dentro de las proteínas vp2 y dentro de las proteínas vp3 que tienen modificaciones de los residuos de 30 aminoácidos previstos. Como mínimo, estas subpoblaciones incluyen ciertos residuos de

asparagina (N o Asn) desamidados. Por ejemplo, ciertas subpoblaciones comprenden al menos una, dos, tres o cuatro posiciones de asparaginas (N) altamente desamidadas en pares de asparagina-glicina y, opcionalmente, comprenden además otros aminoácidos desamidados, en donde la desamidación da como resultado un cambio de aminoácido y otras modificaciones opcionales.

**[00168]** Como se usa en este documento, una "subpoblación" de proteínas vp se refiere a un grupo de proteínas vp que tiene al menos una característica definida en común y que consiste en desde al menos un miembro del grupo hasta menos que todos los miembros del grupo de referencia, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, una "subpoblación" de proteínas vp1 es al menos una (1) proteína vp1 y menos que todas las proteínas vp1 en una cápside de AAV ensamblada, a menos que se especifique lo contrario. Una "subpoblación" de proteínas vp3 puede ser de una (1) proteína vp3 a menos que todas las proteínas vp3 en una cápside de AAV ensamblada, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, las proteínas vp1 pueden ser una subpoblación de proteínas vp; las proteínas vp2 pueden ser una subpoblación separada de proteínas vp, y vp3 es aún otra subpoblación de proteínas vp en una cápside de AAV ensamblada. En otro ejemplo, las proteínas vp1, vp2 y vp3 pueden contener subpoblaciones que tienen modificaciones diferentes, por ejemplo, al menos una, dos, tres o cuatro asparaginas altamente desamidadas, por ejemplo, en pares asparagina-glicina.

### Composición farmacéutica

**[00169]** En un aspecto, en la presente se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector como se describe en este documento en un amortiguador de formulación. En una modalidad, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un rAAV como se describe en este documento en un amortiguador de formulación. En una modalidad, el rAAV se formula de aproximadamente  $1 \times 10^9$  copias de genoma (GC)/ml a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  GC/ml. En una modalidad

adicional, el rAAV se formula de aproximadamente  $3 \times 10^9$  GC/ml a aproximadamente  $3 \times 10^{13}$  GC/ml. En aun una modalidad adicional, el rAAV se formula de aproximadamente  $1 \times 10^9$  GC/ml a aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  GC/ml. En una modalidad, el rAAV se formula a al menos aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  GC/ml.

5 **[00170]** En este documento se proporciona una composición que comprende un rAAV o un vector como se describe en este documento y un medio de suspensión acuoso. En determinadas modalidades, la suspensión se formula para administración intravenosa, administración intratecal o administración intracerebroventricular. En un aspecto, las composiciones contienen al menos una reserva de rAAV y un portador, excipiente y/o  
10 conservante opcional. Como se usa en este documento, una "reserva" de rAAV se refiere a una población de rAAV. A pesar de la heterogeneidad en sus proteínas de la cápside debido a la desamidación, se espera que los rAAV en una reserva compartan un genoma de vector idéntico. Una reserva puede incluir rAAV que tengan cápsides con, por ejemplo, patrones de desamidación heterogéneos característicos de las proteínas de la cápside  
15 de AAV seleccionadas y un sistema de producción seleccionado. Las reservas se pueden producir a partir de un único sistema de producción o agruparse a partir de múltiples ejecuciones del sistema de producción. Se pueden seleccionar diversos sistemas de producción, incluidos, entre otros, los descritos en este documento.

**[00171]** Como se usa en este documento, "portador" incluye todos los solventes,  
20 medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardadores de la absorción, amortiguadores, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. En la técnica se conoce el uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas. También se pueden incorporar ingredientes activos complementarios en las composiciones. La frase  
25 "aceptable desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción alérgica u otra reacción inadecuada similar cuando se administran a un huésped. Se pueden usar vehículos de administración, tales como liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, para la introducción de las composiciones de la presente invención  
30 en células huésped adecuadas. En particular, los genomas del vector administrados por

vector de rAAV se pueden formular para su administración encapsulados en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera o una nanopartícula o similares.

**[00172]** En una modalidad, una composición incluye una formulación final adecuada para administrar a un sujeto, por ejemplo, es una suspensión líquida acuosa amortiguada a un pH y una concentración de sal fisiológicamente compatibles. Opcionalmente, están presentes uno o más tensioactivos en la formulación. En otra modalidad, la composición se puede transportar como un concentrado que se diluye para la administración a un sujeto. En otras modalidades, la composición se puede liofilizar y reconstituir al momento de la administración.

**[00173]** Un tensioactivo adecuado, o una combinación de tensioactivos, se puede seleccionar de los tensioactivos no iónicos que no son tóxicos. En una modalidad, se selecciona un tensioactivo de copolímero en bloque disfuncional que termina en grupos hidroxilo primarios, por ejemplo, tal como Pluronic® F68 [BASF], también denominado Poloxámero 188, que tiene un pH neutro y un peso molecular promedio de 8400. Se pueden seleccionar otros tensioactivos y otros poloxámeros, es decir, copolímeros tribloque no iónicos compuestos por una cadena hidrófoba central de polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)), Solutol HS 15 (macrogol-15 hidroxistearato), Labrasol (glicérido polioxi caprílico), oleil éter de polioxi 10, Tween (ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán), etanol y polietilenglicol. En una modalidad, la formulación contiene un poloxámero. Estos copolímeros se denominan normalmente con la letra "P" (de poloxámero), seguida de tres dígitos: los dos primeros dígitos x 100 proporcionan la masa molecular aproximada del núcleo de polioxipropileno, y el último dígito x 10 proporciona el porcentaje de contenido de polioxietileno. En una modalidad, se selecciona Poloxámero 188. En una modalidad, el tensioactivo puede estar presente en una cantidad de hasta aproximadamente 0,0005 % a aproximadamente 0,001 % (en función de la relación de peso, % en p/p) de la suspensión. En aun otra modalidad, el tensioactivo puede estar presente en una cantidad de hasta aproximadamente 0,0005 % a aproximadamente 0,001 % (en función de la relación de volumen, % en v/v) de la suspensión. En aun otra modalidad, el tensioactivo puede estar presente en una cantidad

de hasta aproximadamente 0,0005 % a aproximadamente 0,001 % de la suspensión, en donde n % indica n gramo por 100 ml de suspensión.

**[00174]** En otra modalidad, la composición incluye un portador, diluyente, excipiente y/o adyuvante. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente portadores  
5 adecuados en función de la indicación para la que se dirige el virus de transferencia. Por ejemplo, un portador adecuado incluye solución salina, que se puede formular con una variedad de soluciones amortiguadoras (por ejemplo, solución salina amortiguada con fosfato). Otros portadores ilustrativos incluyen solución salina estéril, lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, gelatina, dextrano, agar, pectina, aceite de maní, aceite de sésamo y  
10 agua. El amortiguador/portador debería incluir un componente que evite que el rAAV se adhiera al tubo de infusión, pero que no interfiera con la actividad de fijación de rAAV in vivo. Un tensioactivo adecuado, o una combinación de tensioactivos, se puede seleccionar de los tensioactivos no iónicos que no son tóxicos. En una modalidad, se selecciona un copolímero en bloque difuncional que termina en grupos hidroxilo primario,  
15 por ejemplo, tal como Poloxámero 188 (también conocido con los nombres comerciales Pluronic® F68 [BASF], Lutrol® F68, Synperonic® F68, Kolliphor® P188) que tiene un pH neutro, y tiene un peso molecular promedio de 8400. Se pueden seleccionar otros tensioactivos y otros poloxámeros, es decir, copolímeros en tribloque no iónicos compuestos por una cadena hidrófoba central de polioxipropileno (poli(óxido de  
20 propileno)) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)), SOLUTOL HS 15 (Macrogol-15 hidroxiestearato), LABRASOL (polioxi glicérido caprílico), polioxi-oleíl éter, TWEEN (ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán), etanol y polietilenglicol. En una modalidad, la formulación contiene un poloxámero. Estos copolímeros se denominan normalmente con la letra "P" (de poloxámero), seguida de  
25 tres dígitos: los dos primeros dígitos x 100 proporcionan la masa molecular aproximada del núcleo de polioxipropileno, y el último dígito x 10 proporciona el porcentaje de contenido de polioxietileno. En una modalidad, se selecciona Poloxámero 188. El tensioactivo puede estar presente en una cantidad de hasta aproximadamente 0,0005 % a aproximadamente 0,001 % de la suspensión.

**[00175]** En determinadas modalidades, la composición que contiene el rAAV.hSGSH se administra a un pH en el intervalo de 6,8 a 8, o 7,2 a 7,8, o 7,5 a 8. Para la administración intratecal, puede ser conveniente un pH mayor a 7,5, por ejemplo, 7,5 a 8, o 7,8.

5 **[00176]** En determinadas modalidades, la formulación puede contener una solución salina amortiguada acuosa que no comprende bicarbonato de sodio. Dicha formulación puede contener una solución acuosa salina amortiguada que comprende uno o más de fosfato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio y mezclas de estos, en agua, tales como un amortiguador de Harvard. En una  
10 modalidad, el amortiguador es PBS. En otra modalidad, el amortiguador es un líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF), por ejemplo, el amortiguador de formulación de Elliott; o el líquido de perfusión del aparato de Harvard (un CSF artificial con concentraciones iónicas finales (en mM): Na 150; K 3,0; Ca 1,4; Mg 0,8; P 1,0; Cl 155). La solución acuosa, además, puede contener Kolliphor® P188, un poloxámero que está disponible en el  
15 comercio a través de BASF y que se vendía anteriormente bajo el nombre comercial Lutrol® F68. La solución acuosa puede tener un pH de 7,2.

**[00177]** En otra modalidad, la formulación puede contener una solución salina amortiguada acuosa que comprende fosfato de sodio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) 1 mM, cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) 150 mM, cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ) 3mM, cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 1,4 mM, cloruro  
20 de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) 0,8 mM y 0,001 % de poloxámero (por ejemplo, Kolliphor®) 188, pH 7,2. Véase, por ejemplo, [harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html](http://harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html). En determinadas modalidades, se prefiere el amortiguador de Harvard debido a una mejor estabilidad del pH observada con este.

**[00178]** En determinadas modalidades, el amortiguador de formulación es CSF  
25 artificial con Pluronic F68. En otras modalidades, la formulación puede contener uno o más mejoradores de la permeación. Los ejemplos de potenciadores de penetración adecuados pueden incluir, por ejemplo, manitol, glicolato de sodio, taurocolato de sodio, deoxicolato de sodio, salicilato de sodio, caprilato de sodio, caprato de sodio, lauril sulfato de sodio, polioxietilen-9-laurel éter o EDTA.

**[00179]** Opcionalmente, las composiciones de la invención pueden contener, además del rAAV y portadores, otros ingredientes farmacéuticos convencionales, tales como conservantes o estabilizantes químicos. Los conservantes de ejemplo adecuados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, parabenos, etilvanilina, glicerina, fenol y paraclorofenol. Los estabilizantes químicos adecuados incluyen gelatina y albúmina.

**[00180]** Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden comprender un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, tal como se definió anteriormente. De manera adecuada, las composiciones descritas en este documento comprenden una cantidad eficaz de uno o más AAV suspendidos en un portador adecuado desde el punto de vista farmacéutico y/o mezclados con excipientes adecuados diseñados para la administración al sujeto mediante inyección, bomba osmótica o catéter intratecal, o para la administración mediante otro dispositivo o vía. En determinadas modalidades, se utiliza el depósito de ommaya para la administración. En un ejemplo, la composición se formula para administración intratecal. En un ejemplo, la composición se formula para administración intravenosa (iv).

**[00181]** En una modalidad, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho vector se incluye en la composición farmacéutica. La selección del portador no se considera una limitación de la presente invención. Otros portadores convencionales aceptables desde el punto de vista farmacéutico tales como conservante o estabilizantes químicos. Los conservantes de ejemplo adecuados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, parabenos, etilvanilina, glicerina, fenol y paraclorofenol. Los estabilizantes químicos adecuados incluyen gelatina y albúmina.

**[00182]** La frase "aceptable desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción alérgica u otra reacción inadecuada similar cuando se administran a un huésped.

**[00183]** Como se usan en este documento, los términos "dosis" o "cantidad" pueden referirse a la dosis o cantidad total administrada al sujeto durante el tratamiento, o la dosis o cantidad administrada en una única administración de unidad (o múltiples unidades o dosis divididas).

**[00184]** Además, las composiciones de virus incapaz de replicarse se pueden formular en unidades de dosis que contengan una cantidad de virus incapaz de replicarse en el rango de aproximadamente  $1,0 \times 10^9$  GC a aproximadamente  $1,0 \times 10^{16}$  GC (para tratar un sujeto promedio de 70 kg de peso corporal) que incluye todos los números enteros o fracciones dentro del rango y, preferentemente, de  $1,0 \times 10^{12}$  GC a  $1,0 \times 10^{14}$  GC para un paciente humano. En una modalidad, las composiciones se formulan para contener al menos  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$  o  $9 \times 10^9$  GC por dosis, que incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del rango. En otra modalidad, las composiciones se formulan para contener al menos  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$  o  $9 \times 10^{10}$  GC por dosis, que incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del rango. En otra modalidad, las composiciones se formulan para contener al menos  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$  o  $9 \times 10^{11}$  GC por dosis, que incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del rango. En otra modalidad, las composiciones se formulan para contener al menos  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$  o  $9 \times 10^{12}$  GC por dosis, que incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del rango. En otra modalidad, las composiciones se formulan para contener al menos  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$  o  $9 \times 10^{13}$  GC por dosis, que incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del rango. En otra modalidad, las composiciones se formulan para contener al menos  $1 \times 10^{14}$ ,  $2 \times 10^{14}$ ,  $3 \times 10^{14}$ ,  $4 \times 10^{14}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $6 \times 10^{14}$ ,  $7 \times 10^{14}$ ,  $8 \times 10^{14}$  o  $9 \times 10^{14}$  GC por dosis, que incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del rango. En otra modalidad, las composiciones se formulan para contener al menos  $1 \times 10^{15}$ ,  $2 \times 10^{15}$ ,  $3 \times 10^{15}$ ,  $4 \times 10^{15}$ ,  $5 \times 10^{15}$ ,  $6 \times 10^{15}$ ,  $7 \times 10^{15}$ ,  $8 \times 10^{15}$  o  $9 \times 10^{15}$  GC por dosis, que incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del rango. En una modalidad, para la aplicación a seres humanos, la dosis puede variar de  $1 \times 10^{10}$  a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  GC por dosis, que incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del rango.

**[00185]** En una modalidad, la composición farmacéutica que comprende un rAAV como se describe en este documento se puede administrar a una dosis de

aproximadamente  $1 \times 10^9$  GC por gramo de masa cerebral a aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  GC por gramo de masa cerebral.

**[00186]** Debe entenderse que las composiciones en la composición farmacéutica descrita en este documento pretenden aplicarse a otras composiciones, regímenes, aspectos, modalidades y métodos descritos en la memoria descriptiva..

## Usos

**[00187]** En un aspecto, se proporciona en este documento un método para tratar a un sujeto humano diagnosticado con MPS IIIA. Actualmente, cuando existe una sospecha clínica de MPS III, el primer paso es la solicitud de una prueba cuantitativa para detectar la presencia de GAG en orina mediante métodos espectrofotométricos utilizando azul de dimetilmetileno (DMB). La prueba DMB se basa en la unión de los GAG al azul de dimetilmetileno y la cuantificación del complejo GAG-DMB con un espectrofotómetro. La sensibilidad de esta prueba es del 100 %, con una especificidad del 75-100 %. Un resultado negativo en la detección de GAG en orina no descarta la existencia de MPS III debido a que en algunos pacientes con formas atenuadas de la enfermedad, los niveles de excreción de GAG con controles sanos pueden solaparse y la mayor excreción de heparán sulfato en la MPS III puede ignorarse. La técnica de referencia actual para el diagnóstico es la determinación de la actividad enzimática en fibroblastos de piel cultivados, leucocitos, plasma o suero. El diagnóstico específico de MPS IIIA se confirma mostrando una disminución o ausencia de una de las actividades enzimáticas de SGSH implicadas en la degradación del heparán sulfato en los leucocitos o fibroblastos del paciente; la reducción debe ser inferior al 10 % en comparación con la actividad en individuos sanos, con normalidad en otras sulfatasas. Dado que la enfermedad por deficiencia de sulfatasas múltiples también muestra una reducción de la actividad de la heparán N-sulfatasa, la N-acetilglucosamina 6-sulfatasa y otras sulfatasas, se requiere el análisis bioquímico de al menos otra sulfatasa para confirmar el diagnóstico de MPS III y descartar así la deficiencia de sulfatasas múltiples. Sin embargo, el método de diagnóstico no es una limitación de la presente invención y pueden seleccionarse otros métodos adecuados.

**[00188]** El método comprende administrar a un sujeto una suspensión de un vector como se describe en este documento. En una modalidad, el método comprende administrarle a un sujeto una suspensión de un rAAV como se describe en este documento en un amortiguador de formulación a una dosis de aproximadamente  $1 \times 10^9$  GC por gramo de masa cerebral a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  GC por gramo de masa cerebral.

**[00189]** La(s) composición(es) y el(los) método(s) proporcionados en este documento logran eficacia en el tratamiento de un sujeto con MPS IIIA que lo necesita. La eficacia del método en un sujeto puede demostrarse evaluando (a) un aumento de la actividad enzimática de SGSH; (b) la mejora de un síntoma de MPS IIIA; (c) la mejora de los biomarcadores relacionados con MPS IIIA, por ejemplo, los niveles de GAG, los niveles de poliaminas (por ejemplo, espermina) en el líquido cefalorraquídeo (CSF), suero, orina y/u otras muestras biológicas; o (e) la facilitación de cualquier tratamiento(s) de MPS IIIA. En determinadas modalidades, la eficacia puede determinarse mediante la observación de la mejora cognitiva y/o la corrección de la ansiedad, la mejora de la marcha y/o la movilidad, la reducción de la frecuencia y/o gravedad de los temblores, la reducción de la distonía/espasmos, las mejoras en la postura, las mejoras en la opacidad corneal. De manera adicional o alternativa, la eficacia del método puede predecirse basándose en un modelo animal. En otra modalidad, se desarrolló una escala de clasificación multiparamétrica para evaluar la corrección de la enfermedad y la respuesta a la terapia de vectores de MPSIIIA descrita en este documento en un modelo animal. A los animales se les asigna una puntuación basada en una evaluación de una combinación de temblor, postura, calidad del pelaje, distonía, opacidad corneal y marcha/movilidad. En determinadas modalidades, puede usarse cualquier combinación de uno o más de estos factores para demostrar la eficacia, solos o en combinación con otros factores. Véase, por ejemplo, Burkholder et al. Curr Protoc Mouse Biol. Jun 2012, 2:145-65; Tumpey et al. J Virol. May 1998, 3705-10; y Guyenet et al. J Vis Exp, May 2010, 39; 1787). La mejora cognitiva y la corrección de la ansiedad de los animales tratados se evalúa mediante la valoración del movimiento en campo abierto (es decir, medición de la interrupción del haz como se describe, por ejemplo, en Tatem et al. J Vis Exp, 2014,

(91):51785) y el ensayo de laberinto elevado (como se describe, por ejemplo, en Walf y Frye, Nat Protoc, 2007, 2(2): 322-328.

**[00190]** Tal como se usa en este documento, “facilitación de cualquier tratamiento para la MPS IIIA” o cualquier variante gramatical de este, se refiere a una disminución de la dosis o una menor frecuencia de un tratamiento de MPS IIIA en un sujeto distinto de la o las composiciones o métodos que se divulgan en primer lugar en la invención, en comparación con la de un tratamiento estándar sin la administración de la o las composiciones descritas y el uso del o de los métodos descritos. Los ejemplos de tratamiento adecuado facilitado por la o las composiciones o métodos descritos en este documento pueden incluir, entre otros, medicamentos utilizados para aliviar los síntomas (como convulsiones y trastornos del sueño) y mejorar la calidad de vida; trasplante de células madre hematopoyéticas, como trasplante de médula ósea o trasplante de sangre de cordón umbilical; terapias de sustitución enzimática (ERT) mediante administración intravenosa o infusión intracerebroventricular; y cualquier combinación de estos. En una modalidad, el método descrito tiene como resultado que el sujeto demuestra una mejora de los biomarcadores relacionados con MPS IIIA.

**[00191]** Un “aumento en la actividad enzimática de SGSH” se usa de forma intercambiable con el término “aumento en una función deseada de SGSH”, y se refiere a una actividad de SGSH de al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 100 % del rango de la enzima SGSH para un paciente sano. La actividad enzimática de SGSH puede medirse mediante un ensayo como el descrito en este documento. En una modalidad, la actividad enzimática de SGSH puede medirse en suero, plasma, sangre, orina, CSF u otra muestra biológica. En una modalidad, la administración de la composición como se describe en este documento, o el uso del método como se describe en este documento, resultan en un aumento de la actividad

enzimática SGSH en suero, plasma, saliva, orina u otras muestras biológicas. De manera alternativa, pueden medirse los niveles de GAG en CSF y otros biomarcadores de CSF, como los niveles de espermina, para determinar el efecto terapéutico. Véase, por ejemplo, WO 2017/136533.

5 **[00192]** La neurocognición puede determinarse mediante métodos convencionales, véase, por ejemplo, WO 2017/136500 A1. La prevención del deterioro neurocognitivo se refiere a la ralentización de un deterioro neurocognitivo del sujeto administrado con la composición descrita en este documento o que ha recibido el método descrito en este documento en al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 20 %, al  
10 menos aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 100 % en comparación con la de un  
15 paciente con MPS IIIA.

**[00193]** Tal como se usan en este documento, los términos “biomarcador” o “biomarcador relacionado con MPS IIIA” se refieren a la presencia, concentración, nivel de expresión o actividad de una molécula biológica o química en una muestra biológica  
20 de un sujeto que se correlaciona con la evolución o el desarrollo de MPS IIIA en forma positiva o negativa. En una modalidad, el biomarcador son los niveles de GAG en el líquido cefalorraquídeo (CSF), suero, orina, fibroblastos de piel, leucocitos, plasma o cualquier otra muestra biológica. En otra modalidad, el biomarcador se evalúa mediante química clínica. En incluso otra modalidad, el biomarcador es el volumen del hígado o del  
25 bazo. En una modalidad, el biomarcador es la actividad de la heparán N-sulfatasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa y otras sulfatasas. En otra modalidad, el biomarcador es el nivel de espermina en CSF, suero u otra muestra biológica. En incluso otra modalidad, el biomarcador es la actividad enzimática lisosomal en suero, CSF u otra muestra biológica. En una modalidad, el biomarcador se evalúa mediante imágenes de resonancia  
30 magnética (MRI) del cerebro. En otra modalidad, el biomarcador es una puntuación

neurocognitiva medida mediante una prueba de desarrollo neurocognitivo. La frase “mejora del biomarcador”, tal como se usa en este documento, significa una reducción de un biomarcador que se correlaciona positivamente con la evolución de la enfermedad, o un aumento de un biomarcador que se correlaciona negativamente con la evolución de la enfermedad, en donde la reducción o el aumento es de al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 100 % en comparación con la situación anterior a la administración de la composición descrita en este documento o al uso del método descrito en este documento.

**[00194]** En una modalidad, el método comprende además la detección o monitorización de biomarcadores relacionados con MPS IIIA en el sujeto antes del inicio del tratamiento con la terapia proporcionada en este documento. En determinadas modalidades, el método comprende la detección del biomarcador que es una poliamina (tal como espermina) en una muestra de un sujeto (véase WO/2017/136533, que se incorpora a este documento por referencia). En determinadas modalidades, los niveles de concentración de espermina en una muestra de un paciente se detectan para monitorizar la eficacia de un tratamiento para MPSIII usando el vector como se describe en este documento.

**[00195]** Actualmente, los pacientes con MPSIIIA no se consideran candidatos para trasplante de médula ósea (BMT), terapia de reducción de sustrato (SRT) o terapia de reemplazo enzimático (ERT). Sin embargo, en determinadas modalidades, un paciente de genoterapia tratado con un vector que expresa la SGSH descrito en este documento tiene, como mínimo, niveles de expresión enzimática suficientes para que cualquier nivel enzimático por debajo del rango normal pueda tratarse con ERT o SRT. Dicha ERT puede ser una coterapia en la que la dosis de la ERT se controla y modula durante meses o

años tras la dosificación del vector. De manera adicional o alternativa, una SRT puede ser una coterapia en la que la dosis de la SRT se controla y modula durante meses o años tras la dosificación del vector.

**[00196]** Tal como se usa en este documento, una terapia de sustitución enzimática

5 (ERT) es un tratamiento médico que consiste en sustituir una enzima en pacientes donde una enzima concreta es deficiente o está ausente. La enzima se produce normalmente como una proteína recombinante y se administra al paciente. En una modalidad, la enzima es una SGSH funcional. En otra modalidad, la enzima es una proteína recombinante que comprende una SGSH funcional. La administración sistémica, intratecal, intracerebroventricular o intracisternal puede realizarse mediante ERT. Como  
10 se usa en este documento, una terapia de reducción de sustrato (SRT) se refiere a una terapia que usa un fármaco de molécula pequeña para inhibir parcialmente la biosíntesis de los compuestos, que se acumulan en ausencia de SGSH. En una modalidad, la SRT es una terapia mediante genisteína. Véase, por ejemplo, Ritva Tikkanen et al, Less Is  
15 More: Substrate Reduction Therapy for Lysosomal Storage Disorders. Int J Mol Sci. Jul 2016; 17(7): 1065. Publicado en línea el 4 Jul 2016. doi: 10.3390/ijms17071065; Delgadillo V et al, Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. J Inherit Metab Dis. Oct 2011;34(5):1039-44. doi: 10.1007/s10545-011-9342-4. Epub  
20 May 2011; y de Ruijter J et al, Genistein in Sanfilippo disease: a randomized controlled crossover trial. Ann Neurol. Ene 2012;71(1):110-20. doi: 10.1002/ana.22643.

**[00197]** Una experto en la técnica puede determinar volúmenes adecuados para la

administración de estas dosis y concentraciones. Por ejemplo, se pueden seleccionar volúmenes de aproximadamente 1 µL a 150 ml, en donde los volúmenes más altos se seleccionan para adultos. Por lo general, para bebés recién nacidos, un volumen  
25 adecuado es de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 10 ml, y, para bebés mayores, se pueden seleccionar de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 15 ml. Para niños pequeños, se puede seleccionar un volumen de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 20 ml. Para niños, se pueden seleccionar volúmenes de hasta aproximadamente 30 ml. Para preadolescentes y adolescentes, se pueden seleccionar  
30 volúmenes de hasta aproximadamente 50 ml. En aun otras modalidades, un paciente

puede recibir una administración intratecal en un volumen de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 15 ml, o de aproximadamente 7,5 ml a aproximadamente 10 ml. Se pueden determinar otros volúmenes y dosis adecuados. La dosis se ajustará para equilibrar el beneficio terapéutico con cualquier efecto secundario, y dichas dosis pueden

5 variar en función de la aplicación terapéutica para la cual se emplea el vector recombinante.

**[00198]** En una modalidad, el rAAV como se describe en este documento se puede administrar a una dosis de aproximadamente  $1 \times 10^9$  GC por gramo de masa cerebral a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  GC por gramo de masa cerebral. En determinadas

10 modalidades, el rAAV se coadministra sistémicamente a una dosis de aproximadamente  $1 \times 10^9$  GC por kg de peso corporal a aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  GC por kg de peso corporal.

**[00199]** En una modalidad, se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los vectores descritos en este documento. Como se usa en este documento,

15 una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de la composición que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la hSGSH que administra y expresa en las células diana una cantidad de enzima suficiente para lograr la eficacia. En una modalidad, la dosis del vector es de aproximadamente  $1 \times 10^9$  GC por gramo de masa cerebral a aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  copias del genoma (GC) por gramo (g) de

20 masa cerebral, incluso todas cantidades en números enteros o fracciones dentro del rango y los límites definidos. En otra modalidad, la dosis es de  $1 \times 10^{10}$  GC por gramo de masa cerebral a aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  GC por gramo de masa cerebral. En modalidades específicas, la dosis del vector administrada a un paciente es al menos

25 aproximadamente  $1,0 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $1,5 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $2,0 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $2,5 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $3,0 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $3,5 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $4,0 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $4,5 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $5,0 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $5,5 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $6,0 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $6,5 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $7,0 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $7,5 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $8,0 \times 10^9$  GC/g,

30 aproximadamente  $8,5 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente  $9,0 \times 10^9$  GC/g, aproximadamente

9,5 x 10<sup>9</sup> GC/g, aproximadamente 1,0 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente 1,5 x 10<sup>10</sup> GC/g,  
 aproximadamente 2,0 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente 2,5 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente  
 3,0 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente 3,5 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente 4,0 x 10<sup>10</sup> GC/g,  
 aproximadamente 4,5 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente 5,0 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente  
 5 5,5 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente 6,0 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente 6,5 x 10<sup>10</sup> GC/g,  
 aproximadamente 7,0 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente 7,5 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente  
 8,0 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente 8,5 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente 9,0 x 10<sup>10</sup> GC/g,  
 aproximadamente 9,5 x 10<sup>10</sup> GC/g, aproximadamente 1,0 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente  
 1,5 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente 2,0 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente 2,5 x 10<sup>11</sup> GC/g,  
 10 aproximadamente 3,0 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente 3,5 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente  
 4,0 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente 4,5 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente 5,0 x 10<sup>11</sup> GC/g,  
 aproximadamente 5,5 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente 6,0 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente  
 6,5 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente 7,0 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente 7,5 x 10<sup>11</sup> GC/g,  
 aproximadamente 8,0 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente 8,5 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente  
 15 9,0 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente 9,5 x 10<sup>11</sup> GC/g, aproximadamente 1,0 x 10<sup>12</sup> GC/g,  
 aproximadamente 1,5 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente 2,0 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente  
 2,5 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente 3,0 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente 3,5 x 10<sup>12</sup> GC/g,  
 aproximadamente 4,0 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente 4,5 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente  
 5,0 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente 5,5 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente 6,0 x 10<sup>12</sup> GC/g,  
 20 aproximadamente 6,5 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente 7,0 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente  
 7,5 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente 8,0 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente 8,5 x 10<sup>12</sup> GC/g,  
 aproximadamente 9,0 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente 9,5 x 10<sup>12</sup> GC/g, aproximadamente  
 1,0 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente 1,5 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente 2,0 x 10<sup>13</sup> GC/g,  
 aproximadamente 2,5 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente 3,0 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente  
 25 3,5 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente 4,0 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente 4,5 x 10<sup>13</sup> GC/g,  
 aproximadamente 5,0 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente 5,5 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente  
 6,0 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente 6,5 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente 7,0 x 10<sup>13</sup> GC/g,  
 aproximadamente 7,5 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente 8,0 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente  
 8,5 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente 9,0 x 10<sup>13</sup> GC/g, aproximadamente 9,5 x 10<sup>13</sup> GC/g,  
 30 o aproximadamente 1,0 x 10<sup>14</sup> GC/g de masa cerebral.

**[00200]** La dosis se ajusta para equilibrar el beneficio terapéutico con cualquier efecto secundario y tales dosis pueden variar en función de la aplicación terapéutica para la cual se emplea el vector recombinante. Los niveles de expresión para el producto de transgén pueden monitorearse para determinar la frecuencia de dosis que da como resultado vectores virales, preferentemente, vectores de AAV que contienen el minigén. Opcionalmente, se pueden utilizar regímenes de dosis similares a los descritos con fines terapéuticos para una inmunización con las composiciones de la invención.

**[00201]** En una modalidad, el método comprende además que el sujeto reciba una coterapia inmunosupresora. Los inmunosupresores para tal cotratamiento incluyen, entre otros, un glucocorticoide, esteroides, antimetabolitos, inhibidores de linfocitos T, un macrólido (por ejemplo, rapamicina o rapalog) y agentes citostáticos que incluyen un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico citotóxico, un anticuerpo o un agente activo sobre la inmunofilina. El inmunosupresor puede incluir mostaza nitrogenada, nitrosourea, compuesto de platino, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, fluorouracilo, dactinomicina, una antraciclina, mitomicina C, bleomicina, mitramicina, receptor de IL-2 (CD25) o anticuerpos dirigidos a CD3, anticuerpos anti-IL-2, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , un opioide, o agente de fijación a TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral-alfa).

**[00202]** En determinadas modalidades, la terapia inmunosupresora puede iniciarse 0, 1, 2, 7 o más días antes de la administración de la genoterapia. Dicho tratamiento puede implicar la coadministración de dos o más fármacos, el (por ejemplo, prednelisona, micofenolato de mofetilo (MMF) y/o sirolimus (es decir, rapamicina)) el mismo día. Uno o más de estos fármacos puede continuarse después de la administración de la genoterapia, con la misma dosis o una dosis ajustada. Tal tratamiento puede durar aproximadamente 1 semana (7 días), aproximadamente 60 días o más, de ser necesario. En determinadas modalidades, se selecciona un régimen libre de tacrolimus.

**[00203]** En determinadas modalidades, el método comprende la medición de anticuerpos séricos anti-hSGSH. Se dispone de ensayos adecuados para medir anticuerpos anti-hSGSH como se describe en este documento.

**[00204]** En una modalidad, el rAAV descrito en este documento se administra una vez al sujeto que lo necesita. En otra modalidad, el rAAV se administra más de una vez al sujeto que lo necesita.

**[00205]** Los vectores recombinantes descritos anteriormente pueden administrarse a células huésped de acuerdo con métodos publicados. El rAAV, preferentemente suspendido en un portador compatible desde el punto de vista fisiológico, puede administrarse a un paciente humano o mamífero no humano. En determinadas modalidades, para la administración a un paciente humano, el rAAV se suspende de manera adecuada en solución acuosa que contiene solución salina, un tensioactivo y una sal o mezcla de sales compatible desde el punto de vista fisiológico. De manera adecuada, la formulación se ajusta a un pH adecuado desde el punto de vista fisiológico, por ejemplo, en el rango de pH 6 a 9, de pH 6,5 a 7,5, de pH 7,0 a 7,7 o de pH 7,2 a 7,8. Como el pH del líquido cefalorraquídeo es de aproximadamente 7,28 a aproximadamente 7,32, puede ser deseable un pH dentro de este rango para la administración intratecal; mientras que, para la administración intravenosa, puede ser deseable un pH de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2. Sin embargo, otros pH dentro de los rangos más amplios y estos subrangos se pueden seleccionar para otra vía de administración.

**[00206]** Como se usa en este documento, la expresión "administración intratecal" se refiere a una vía de administración para fármacos mediante una inyección en el canal vertebral, más específicamente en el espacio subaracnoideo, de modo que alcance el líquido cefalorraquídeo (CSF). La administración intratecal puede incluir punción lumbar, intraventricular (que incluye intracerebroventricular (ICV)), suboccipital/intracisternal y/o punción C1-2. Por ejemplo, se puede introducir material para su difusión por todo el espacio subaracnoideo mediante punción lumbar. En otro ejemplo, la inyección puede realizarse en la cisterna magna. En determinada modalidad, un rAAV, vector o composición según se describe en este documento se administra a un sujeto que lo necesita mediante la administración intratecal. En determinadas modalidades, la administración intratecal se lleva a cabo como se describe en la publicación de patente estadounidense núm. 2018-0339065 A1, presentada el 29 de noviembre de 2019, que se incorpora en este documento mediante referencia en su totalidad.

**[00207]** Como se usa en este documento, la expresión "administración intracisternal" se refiere a una vía de administración para fármacos directamente en el líquido cefalorraquídeo de la cisterna magna cerebelomedular, más específicamente mediante una punción suboccipital o mediante inyección directa en la cisterna magna o mediante un tubo posicionado de manera permanente.

**[00208]** En determinadas modalidades, el tratamiento de la composición descrita en este documento tiene una degeneración asintomática mínima a leve de las neuronas sensoriales DRG en animales y/o en pacientes humanos, bien tolerada con respecto a la toxicidad del nervio sensorial y las lesiones subclínicas de las neuronas sensoriales.

**[00209]** Debe entenderse que las composiciones en el método descritas en este documento pretenden aplicarse a otras composiciones, regímenes, aspectos, modalidades y métodos descritos en la memoria descriptiva.

#### Kit

**[00210]** En determinadas modalidades, se proporciona un kit que incluye un vector concentrado suspendido en una formulación (opcionalmente congelada), amortiguador de dilución opcional, y dispositivos y componentes necesarios para la administración intratecal, intracerebroventricular o intracisternal. En otra modalidad, el kit puede incluir adicional o alternativamente componentes para la administración intravenosa. En una modalidad, el kit proporciona suficiente amortiguador para permitir la inyección. Dicho amortiguador puede permitir una dilución de aproximadamente 1:1 a 1:5 del vector concentrado, o más. En otras modalidades, se incluyen cantidades mayores o menores de amortiguador o agua estéril para permitir la titulación de la dosis y otros ajustes por parte del clínico tratante. En incluso otras modalidades, se incluyen en el kit uno o más componentes del dispositivo. Hay amortiguadores de dilución adecuados disponibles, como una solución salina, una solución salina amortiguada con fosfato (PBS) o una solución de glicerol/PBS.

**[00211]** Debe entenderse que las composiciones en el kit descritas en este documento pretenden aplicarse a otras composiciones, regímenes, aspectos, modalidades y métodos descritos en la memoria descriptiva.

Aparato y método para la administración de una composición farmacéutica en el líquido cefalorraquídeo

**[00212]** En un aspecto, los vectores, rAAV o composiciones de estos proporcionados en este documento pueden administrarse por vía intratecal mediante el método y/o el dispositivo proporcionado en esta sección y descrito en WO 2017/136500 y WO 2018/160582, que se incorpora en este documento por referencia. Alternativamente, se pueden seleccionar otros dispositivos y métodos. En determinadas modalidades, el método comprende los pasos de inyección suboccipital guiada por CT mediante aguja espinal en la cisterna magna de un paciente. Como se usa en este documento, el término tomografía computarizada (CT) se refiere a una radiografía en la que una imagen tridimensional de una estructura corporal se construye por computadora a partir de una serie de imágenes planas en sección transversal hechas a lo largo de un eje. En determinadas modalidades, los vectores y/o composiciones de estos descritos en este documento se administran mediante inyección suboccipital guiada por tomografía computarizada (CT) en la cisterna magna (intracisterna magna [ICM]). En determinadas modalidades, el aparato se describe en la publicación de patente estadounidense núm. 2018-0339065 A1, publicada el 29 de noviembre de 2019, que se incorpora en este documento mediante referencia en su totalidad. En determinadas modalidades, los vectores, rAAV o composiciones de estos proporcionados en este documento pueden administrarse usando el depósito ommaya.

**[00213]** Debe entenderse que las composiciones en el dispositivo descritas en este documento pretenden aplicarse a otras composiciones, regímenes, aspectos, modalidades y métodos descritos en la memoria descriptiva.

**[00214]** Tal como se usa en este documento, el término “administración” o cualquier variación gramatical de este se refiere a la administración de la composición descrita en este documento a un sujeto.

**[00215]** Las palabras "comprende", "comprenden" y "que comprende" deben interpretarse de manera inclusiva y no exclusiva. Las palabras "consiste", "que consiste" y sus variantes deben interpretarse de manera exclusiva y no inclusiva. Si bien se

presentan diversas modalidades en la memoria descriptiva que usan la expresión "que comprende", en otras circunstancias, también se pretende que una modalidad relacionada se incluya y describa mediante el uso de las expresiones "que consiste" o "que consiste esencialmente en". Como se utilizan en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las expresiones "que comprende", "que contiene", "que incluye" y sus variantes incluyen otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares. Por el contrario, la expresión "que consiste" y sus variantes excluyen otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares.

**[00216]** Cabe señalar que el término "uno" o "una" se refiere a uno o más. De este modo, los términos "uno" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" se usan indistintamente en este documento.

**[00217]** Tal como se usa en este documento, el término "aproximadamente" o "≈" se refiere a una variante de  $\pm 10\%$  del número entero de referencia y los valores intermedios, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, "aproximadamente" 500  $\mu\text{M}$  incluye  $\pm 50$  (es decir, 450 - 550, que incluye los enteros intermedios). Para otros valores, en particular cuando se hace referencia a un porcentaje (por ejemplo, 90 % del sabor), el término "aproximadamente" incluye todos los valores dentro del intervalo, tanto los enteros como las fracciones.

**[00218]** Como se describió anteriormente, el término "aproximadamente" cuando se usa para modificar un valor numérico significa una variabilidad de  $\pm 10\%$ , ( $\pm 10\%$ , por ejemplo,  $\pm 1$ ,  $\pm 2$ ,  $\pm 3$ ,  $\pm 4$ ,  $\pm 5$ ,  $\pm 6$ ,  $\pm 7$ ,  $\pm 8$ ,  $\pm 9$ ,  $\pm 10$ , o los valores intermedios) desde la referencia otorgada, a menos que se especifique lo contrario.

**[00219]** En ciertas instancias, se usa el término "E+#" o el término "e+#" para hacer referencia a un exponente. Por ejemplo, "5E10" o "5e10" es  $5 \times 10^{10}$ . Estas expresiones se pueden usar indistintamente.

**[00220]** Con respecto a la descripción de varias modalidades de este documento, en otra modalidad se pretende que cada una de las composiciones descritas en este documento sea útil en los métodos de la invención. Además, también se pretende que cada una de las composiciones descritas en este documento como útiles en los métodos sea, en otra modalidad, en sí misma una modalidad de la invención.

**[00221]** A menos que se defina lo contrario en la presente memoria descriptiva, los términos técnicos y científicos que se usan en este documento tienen el mismo significado que entienden normalmente los expertos en la técnica relacionadas con la presente invención y por referencia a textos publicados, que proporcionan a un experto en la técnica una guía general de muchos de los términos utilizados en esta solicitud.

## EJEMPLOS

**[00222]** Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertos aspectos de la invención reivindicada. La invención no se limita a estos ejemplos.

**[00223]** Se trata de un método para tratar la mucopolisacaridosis tipo IIIA (MPSIIIA, o síndrome de Sanfilippo A) utilizando un virus adenoasociado recombinante serotipo hu68 (u otro serotipo pantrópico/neurotrópico) con un promotor ubicuo que expresa una versión modificada genéticamente de la N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa humana (hSGSHco) con una secuencia poliA. Se abarcan varias secuencias modificadas genéticamente que codifican versiones de la hSGSH: secuencia de aminoácidos referencia (precursor de la isoforma 1 de N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa [Homo sapiens], secuencia de referencia NCBI: NP\_000190.1); otro poliformismo rs7503034 frecuente de nucleótido único de sentido alterado que codifica para NP\_000190.1:p.Arg456Pro; proteína de fusión vIGF2-hSGSHco; proteína de fusión vIGF2-hSGSHco(R456P). En este documento se incluyen más detalles sobre las secuencias a lo largo de la solicitud.

**[00224]** El vector se administra por vía intracerebroventricular (ICV) o intratecal (IT). La administración IT cubre tanto la vía lumbar como la cisterna magna suboccipital. El objetivo es conseguir una alta expresión de hSGSH en el CNS para corregir las manifestaciones neurológicas de la enfermedad MPSIIIA.

**[00225]** Además, la optimización completa de la modificación genética de la secuencia de codificación y la optimización de la proteína (probando SNP alternativos, modificación genéticamente del péptido diana, etc.) proporciona una estrategia de

genoterapia eficiente que permite reducir la dosis mínima de eficacia en comparación con los enfoques tradicionales que utilizan la proteína WT o enfoques de primera generación que utilizan diferentes procesos de modificación genética de la secuencia de codificación.

EJEMPLO 1. Comparación de SGSH modificada genéticamente en ratones WT y construcciones de SGSH modificadas genéticamente in vitro.

**[00226]** En este estudio se comparó la secuencia codificante de hSGSH modificada genéticamente para su expresión (es decir, cuantificación) y actividad. La actividad de hSGSH se ensayó en muestras de suero obtenidas el día 7 y el día 28.

**[00227]** Existen varios ensayos de SGSH que examinan la actividad y la cuantificación de la SGSH. Un ensayo de SGSH es un ensayo de actividad de SGSH basado en la fluorescencia, en el que se utiliza una SGSH pura de calidad comercial, medios acondicionados y un homogeneizado de tejido de ratón. Otro ensayo de SGSH es el ensayo de actividad de SGSH basado en HPLC, que requiere una mayor optimización. Incluso otro ensayo de SGSH es un ensayo de actividad de SGSH basado en espectrometría de masa, que requiere una mayor optimización. Además, se puede utilizar un ensayo de cuantificación de la proteína SGSH del péptido señal basado en espectrometría de masas.

**[00228]** En primer lugar, examinamos la construcción in vitro. Para este estudio, probamos varias construcciones de hSGSH para su expresión en células HEK293 (FIG. 1A). La FIG. 1A muestra varias construcciones de hSGSH diseñadas, que comprenden la secuencia codificante de SGSH madura natural (WT), y además comprenden la secuencia señal endógena o la secuencia señal de proteína inmunoglobulina de unión (BIP), enlazador, péptido vIGF2 (es decir, péptido que se une a CI-MPR), y/o secuencia de escisión lisosomal. Se transfectaron células HEK293 con plásmidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican las construcciones descritas en la FIG. 1A. A continuación, se analizaron los medios recolectados de las células HEK293 para determinar la expresión y secreción de las construcciones de SGSH a los 3 y 4 días después de la transfección. La FIG. 1B muestra los niveles de expresión de SGSH secretada en el medio de células HEK293 a los 3 días después de la transfección,

analizados mediante inmunoelectrotransferencia. La FIG. 1C muestra los niveles de expresión de SGSH cuantificados (del análisis de inmunoelectrotransferencia; FIG. 1B), representados como niveles de secreción de SGSH normalizados. La FIG. 2A muestra los niveles de expresión de SGSH secretada en el medio de células HEK293 a los 4 días después de la transfección, analizados mediante inmunoelectrotransferencia. La FIG. 2B muestra los niveles de expresión de SGSH cuantificados (del análisis de inmunoelectrotransferencia; FIG. 2A), representados como niveles de secreción de SGSH normalizados. Además, se modificó genéticamente la secuencia de codificación de SGSH madura (FIG. 2C) para usar en la secuencia señal BiP- y péptido vIGF2-que comprende construcciones.

**[00229]** Además se examinó la expresión in vitro de plásmidos AAV que comprenden el transgén WT y el transgén SGSH modificado genéticamente en células HEK293F. La FIG. 16A muestra los niveles de expresión de SGSH secretada en medios celulares de HEK293 tras la transfección con plásmidos AAV que comprenden la construcción de SGSH modificada genéticamente, la construcción de SGSH modificada genéticamente con elemento WPRE y la construcción de SGSH WT, analizados mediante inmunoelectrotransferencia. La FIG. 16B muestra la expresión de SGSH cuantificada por AAV (normalizada a SGSH WT) tras la transfección de células HEK293F con plásmidos AAV. Estos resultados muestran que la inclusión del elemento WPRE aumentó la expresión de SGSH modificada genéticamente en aproximadamente 40 % (n=1). Como referencia, las FIGS. 16C y 16D muestran la expresión típica observada con el vector de expresión de mamíferos. La FIG. 16C muestra los niveles de expresión de SGSH después de la transfección con el plásmido que comprende la construcción de SGSH con y sin el péptido vIGF2, como se examinó con el análisis de inmunoelectrotransferencia. La FIG. 16D muestra los niveles de expresión de SGSH cuantificados a partir del análisis de inmunoelectrotransferencia, y representados como normalizados a niveles de expresión de WT SGSH. Estos resultados muestran un aumento de los niveles de expresión de SGSH en las construcciones de SGSH que comprenden vIGF2.

**[00230]** A continuación, se examinaron las construcciones modificadas genéticamente in vivo en ratones WT. Para este estudio, se administró a ratones (de 1 a

2 meses de edad) un rAAV con una cápside AAVhu68 y que comprende un genoma de vector que comprende varias secuencias codificantes de hSGSH (es decir, WT y modificadas genéticamente; también denominado AAVhu68.hSGSH), cuya expresión estaba dirigida por el promotor CB7.

- 5 **[00231]** La inyección se realizó el día 0 del estudio. Se recolectaron muestras de suero los días 7 y 28 del estudio. El día 28 se realizó la necropsia, durante la cual se recolectaron tejidos cerebrales y hepáticos. Las muestras de suero del día 7 tras la inyección se recolectaron y almacenaron a -80 °C. En el día 28 se realizó la necropsia, durante la cual se recolectaron muestras que se almacenaron a -80 °C. Más
- 10 concretamente, el día 28 tras la inyección se recolectaron muestras de suero en lugar de muestras de plasma. Las muestras almacenadas incluían tejido cerebral (mitad derecha) y tejidos hepáticos, que se analizaron para determinar la actividad enzimática y expresión de hSGSH (es decir, inmunoelectrotransferencia). La otra mitad de los tejidos hepáticos y cerebrales (izquierda) se fijaron en formol y se transfirieron al núcleo de patología para
- 15 hSGSH IHC. En la tabla siguiente se resume el esquema del estudio.

| Grupo | Tratamiento               | Dosis<br>(GC/ratón)   | Cantidad<br>de<br>animales |
|-------|---------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1     | CO Versión 1              | $1 \times 10^{10}$ GC | 4                          |
|       |                           | $1 \times 10^{11}$ GC | 4                          |
| 2     | CO Versión 2 con<br>R456P | $1 \times 10^{10}$ GC | 4                          |
|       |                           | $1 \times 10^{11}$ GC | 4                          |
| 3     | CO Versión 2              | $1 \times 10^{10}$ GC | 4                          |
|       |                           | $1 \times 10^{11}$ GC | 4                          |
| 4     | CO Versión 3              | $1 \times 10^{10}$ GC | 4                          |
|       |                           | $1 \times 10^{11}$ GC | 4                          |
| 5     | PBS                       | $1 \times 10^{10}$ GC | 4                          |
|       |                           | $1 \times 10^{11}$ GC | 4                          |

[00232] La actividad de la enzima SGSH se analizó en suero el día 7 y el día 28 del estudio mediante un ensayo de actividad fluorescente. Las muestras de suero recolectadas se diluyeron 1:50. La FIG. 3A muestra la actividad enzimática de SGSH a partir de muestras de suero recolectadas de ratones administrados con AAVhu68.hSGSH (1 x 10<sup>10</sup> GC o 1 x 10<sup>11</sup> GC) el día 7 del estudio. La FIG. 3B muestra la actividad enzimática de SGSH a partir de muestras de suero recolectadas de ratones administrados con AAVhu68.hSGSH (1 x 10<sup>11</sup> GC o 1 x 10<sup>11</sup> GC) el día 28 del estudio. Estos resultados muestran que se observó un aumento de aproximadamente el doble entre las concentraciones de SGSH en el suero de los tratados frente a los tratados con PBS (grupos de control). Además, se examinó la actividad enzimática de SGSH a partir de tejido cerebral y hepático recolectado de ratones en la necropsia. La FIG. 4A muestra la actividad enzimática de SGSH a partir de muestras de tejido hepático homogeneizado recolectadas de ratones administrados con 1 x 10<sup>10</sup> GC o 1 x 10<sup>11</sup> GC. La FIG. 4B muestra la actividad enzimática de SGSH a partir de muestras de tejido cerebral homogeneizado recolectadas de ratones administrados con 1 x 10<sup>10</sup> GC o 1 x 10<sup>11</sup> GC. Estos resultados confirman la transducción hepática, ya que se observó una actividad significativa de SGSH en las muestras de homogeneizado de tejido hepático. La actividad de SGSH en el homogeneizado de tejido cerebral no fue estadísticamente superior a WT. Además, se examinaron los niveles de expresión de SGSH en muestras de homogeneizado de tejido hepático mediante inmunoelectrotransferencia. La FIG. 5A muestra niveles de expresión de SGSH según se analizaron a partir de muestras de tejido hepático homogeneizado de ratones administrados con AAVhu68.hSGSH a dosis de 1 x 10<sup>10</sup> GC y 1 x 10<sup>11</sup> GC. La FIG. 5B muestra los niveles de expresión cuantificados de SGSH según se analizaron mediante inmunoelectrotransferencia (mostrados en la FIG. 5A). El análisis de inmunoelectrotransferencia de homogeneizados cerebrales no mostró bandas visibles a la misma intensidad que el hígado. Las bandas se revelaron en alto contraste sin características distintivas entre los grupos (blots no mostrados). Se realizó un análisis de microscopía inmunohistoquímica del tejido hepático recolectado de ratones administrados con AAVhu68.hSGSH que comprende varias construcciones (CoV1, CoV1-R456P, CoV2, CoV3) a una dosis de 1 x 10<sup>11</sup> GC, a una dosis de 1 x 10<sup>10</sup> GC o

tratados con PBS (datos no mostrados). Estos resultados confirman la expresión de hSGSH en el tejido hepático analizado mediante inmunoelectrotransferencia.

**[00233]** Además, se realizó el ensayo del péptido señal de SGSH en muestras de tejido hepático. La FIG. 7A muestra resultados de la concentración de proteínas de SGSH, representados como ng/g según se analizaron a partir de muestras de tejido hepático recolectadas de ratones a los que se les administró con AAVhu68.hSGSH a dosis de  $1 \times 10^{10}$  GC a  $1 \times 10^{11}$  GC. La FIG. 7B muestra la correlación entre la actividad enzimática de SGSH (según se midió usando el ensayo de fluorescencia) y el ensayo de péptido señal realizado en muestras de hígado recolectadas de ratones administrados con dosis altas de AAVhu68.hSGSH (FIG. 7A;  $1 \times 10^{11}$  GC).

**[00234]** Además, se examinó el efecto del elemento WPRE en el genoma de vector. La FIG. 6A muestra la expresión y cuantificación de SGSH en la corteza tras la administración de AAVhu68.hSGSH con WPRE. La FIG. 6B muestra la expresión y cuantificación de SGSH en el cerebelo tras la administración de AAVhu68.hSGSH con WPRE. La FIG. 6C muestra la expresión y cuantificación de SGSH en el hipocampo tras la administración de AAVhu68.hSGSH con WPRE. La FIG. 6D muestra la expresión y cuantificación de SGSH en el tronco encefálico tras la administración de AAVhu68.hSGSH con WPRE. Estos resultados muestran que la adición de WPRE al candidato modificado genéticamente rescata la expresión a niveles similares a los de la construcción WT.

**[00235]** En resumen, cuando las construcciones rAAVhu68.hSGSH se administraron a dosis altas (HD;  $1 \times 10^{11}$  GC) o dosis bajas (LD;  $1 \times 10^{10}$  GC), ninguno de los grupos mostró una transducción significativa del cerebro. El análisis de las muestras de homogeneizado de tejido hepático muestra una transducción significativa en todos los grupos de tratamiento.

**[00236]** La construcción "SGSH-CoV1" (o CoV1) mostró una actividad ligeramente superior en hígado que otras construcciones CohSGSH (por ejemplo, CoV1-R456P, CoV2, CoV3), y mostró niveles de actividad estadísticamente diferentes entre las dosis altas y bajas tanto en el día 7 como en el día 28 en suero. Además, se confirmó que

Arg456Pro no es una variante benigna. El análisis de inmunoelectrotransferencia corrobora los datos del ensayo de actividad.

#### Producción de rAAV que comprende hSGSH

**[00237]** En los estudios en este documento se generó una proteína de fusión que comprende un líder BIP exógeno y/o un péptido vIGF fusionado con secuencias modificadas genéticamente que codificaban la SGSH humana, y se realizaron estudios comparativos con la construcción correspondiente sin las secuencias exógenas del péptido BIP y del péptido vIGF2. Los rAAV se generan usando técnicas de transfección triple, utilizando (1) un plásmido cis que codifica proteínas AAV2 rep y el gen cap AAVhu68 VP1, (2) un plásmido cis que comprende genes auxiliares de adenovirus no proporcionados por la línea celular de empaquetamiento que expresa adenovirus E1a, y (3) un plásmido trans que contiene el genoma de vector para empaquetamiento en la cápside de AAV. Véase, por ejemplo, US 2020/0056159. El plásmido trans está diseñado para contener el genoma de vector que comprende hSGSH con péptido líder exógeno (BIP) y hSGSH con el péptido líder nativo de hSGSH con y sin péptido vIGF2. Los genomas de vector incluyen:

(i) CB7.CI.BIP.hSGSHcov1(A482Y-E488V).vIGF2.WPRE.4xmiR183.rBG (SEQ ID NO: 1);

(ii) CB7.CI.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.rBG (SEQ ID NO: 3);

(iii) CB7.CI.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.WPRE.rBG (SEQ ID NO: 7);

(iv) CB7.CI.hSGSHcoV1.rBG (SEQ ID NO: 10);

(v) CB7.CI.hSGSHcoV1-4xmiR183.rBG (SEQ ID NO: 13);

(vi)CB7.CI.BIP.hSGSHcov1

A482Y\_E488V.vIGF2.WPRE.4xmiR182.4xmiR183.rBG (SEQ ID NO: 37); o

(vii) CB7.CI.BIP.hSGSHcov1-A482Y\_E488V.vIGF2.WPRE.4xmiR182.rBG (SEQ ID NO: 40).

**[00238]** El genoma de vector contiene una repetición terminal invertida (ITR) AAV 5' y una AAV 3' ITR en los extremos 5' y 3', respectivamente. Las ITR flanquean las 5 secuencias del casete de expresión empaquetado en la cápside de AAV que tienen secuencias que codifican una hSGSH, hSGSH.A482Y.E488V, BIP-hSGSH, o BIP-hSGSH.A482Y.E488V, en la que BIP se refiere a un péptido señal exógeno. El casete de expresión comprende además secuencias reguladoras enlazadas operativamente a las 10 secuencias codificantes de la proteína de fusión, incluidos un promotor CB7, intrón de beta actina de pollo, poliA de beta-globina de conejo, y opcionalmente un elemento WPRE, que es un elemento WPRE mutado. Véase también Kingsman et al., 2005 y Zanta-Boussif et al., 2009.

#### EJEMPLO 2. Estudio de cribado del vector de MPS IIIA en ratones con MPS IIIA

**[00239]** A continuación, se examinó la eficacia de las construcciones de SGSH en 15 ratones MPSIIIA KO. En este estudio, se usó la construcción hSGSH coV1 modificado genéticamente basado en los resultados observados en el EJEMPLO 1 (estudio de expresión en ratones WT). Se utilizó la cápside AAVhu68 para la administración de la construcción hSGSHcoV1 en ratones MPSIIA y WT (control) (ratones N-110 KO y N=10 ratones WT). El AAVhu68.hSGSH se administró mediante inyección ICV (intraventricular 20 directa) unilateral a dosis de  $1 \times 10^{10}$  (dosis baja) y  $5 \times 10^{10}$  (dosis alta). Los ratones tenían 2-3 meses de edad en el momento de la inyección ICV. La duración del estudio fue de 1 mes. Además, se examinaron múltiples variaciones de la construcción hSGSHcoV1 modificada genéticamente, incluidas las que comprendían el péptido señal BiP, cambios estabilizadores en los aminoácidos (AA) y/o el péptido vIGF2. Los límites definidos del 25 estudio utilizados fueron la reducción del tamaño del compartimento lisosomal (examinada mediante el análisis de inmunofluorescencia (IF) de LAMP1), la reducción del almacenamiento (examinada mediante HS y MS de almacenamiento de GAG) y los

niveles de expresión de SGSH (examinados mediante ensayos de actividad enzimática y análisis inmunohistoquímicos).

| Cohorte | Núm. de grupo | N   | Sexo | Genotipo | Tratamiento                                      | Dosis (GC)                  |
|---------|---------------|-----|------|----------|--------------------------------------------------|-----------------------------|
| 1       | 1             | 5/5 | M/F  | KO       | AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1                            | 1 x 10 <sup>10</sup> (1e10) |
|         | 2             | 5/5 | M/F  | KO       | AAVhu68.CB7.BIP-hSGSHcoV1                        | (1e10)                      |
|         | 3             | 5/5 | M/F  | KO       | AAVhu68.CB7.BIP-hSGSHcoV1-vIGF2                  | (1e10)                      |
|         | 4             | 5/5 | M/F  | KO       | AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1         | (1e10)                      |
|         | 5             | 5/5 | M/F  | KO       | AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 – vIGF2 | (1e10)                      |
|         | 6             | 5/5 | M/F  | KO       | PBS                                              | n/a                         |
|         | 7             | 5/5 | M/F  | WT       | PBS                                              | n/a                         |
| 2       | 8             | 5/5 | M/F  | KO       | AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1                            | (5e10)                      |
|         | 9             | 5/5 | M/F  | KO       | AAVhu68.CB7.BIP-hSGSHcoV1                        | (5e10)                      |
|         | 10            | 5/5 | M/F  | KO       | AAVhu68.CB7.BIP-hSGSHcoV1-vIGF2                  | (5e10)                      |
|         | 11            | 5/5 | M/F  | KO       | AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1         | (5e10)                      |

| Cohorte | Núm. de grupo | N   | Sexo | Genotipo | Tratamiento                                      | Dosis (GC) |
|---------|---------------|-----|------|----------|--------------------------------------------------|------------|
|         | 12            | 5/5 | M/F  | KO       | AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 – vIGF2 | (5e10)     |

**[00240]** En la cohorte 1, las muestras de tejido recolectadas incluyen cerebro, médula espinal e hígado. En la cohorte 2, las muestras de tejido recolectadas incluyen corazón y bazo.

5 **[00241]** Las FIGS. 8A a 8F muestran el análisis de límites definidos de la reducción del compartimento lisosomal como se examinó mediante la cuantificación de LAMP1 utilizando inmunofluorescencia y análisis histoquímico en ratones MPS IIIA SGSH KO administrados a una dosis baja ( $1 \times 10^{10}$ ) de AAVhu68.hSGSH. Grupo 1 (G1) = AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1; G2 = AAVhu68.CB7.BIP-hSGSHcoV1; G3 =  
10 AAVhu68.CB7.BIP-hSGSHcoV1-vIGF2; G4 = AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1; G5 = AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 – vIGF2; G6 = controles PBS ratones KO; G7 = controles PBS ratones WT. La FIG. 8A muestra el tamaño promedio de las células LAMP1-positivas ( $\mu\text{m}^2$ ) en el cerebelo. La FIG. 8B muestra el porcentaje de área LAMP1 en el cerebelo. La FIG. 8C muestra el tamaño promedio de  
15 las células LAMP1-positivas ( $\mu\text{m}^2$ ) en el tronco encefálico. La FIG. 8D muestra el porcentaje de área LAMP1 en el tronco encefálico. La FIG. 8E muestra el tamaño promedio de las células LAMP1-positivas ( $\mu\text{m}^2$ ) en la corteza. La FIG. 8F muestra el porcentaje de área LAMP1 en la corteza.

**[00242]** Las FIGS. 9A a 9J muestran el análisis de límites definidos de la reducción  
20 del compartimento lisosomal como se examinó mediante la cuantificación de LAMP1 utilizando inmunofluorescencia y análisis histoquímico en ratones MPS IIIA SGSH KO administrados a una dosis baja ( $1 \times 10^{11}$ ) de AAVhu68.hSGSH. G6 y G7 similares a la FIG. 8 (controles PBS KO y WT); G8 = AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1; G11 =

AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) ; G12 =AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 – vIGF2.

**[00243]** La FIG. 9A muestra el tamaño promedio de las células LAMP1-positivas ( $\mu\text{m}^2$ ) en el cerebelo. La FIG. 9B muestra el porcentaje de área LAMP1 en el cerebelo.

5 La FIG. 9C muestra el tamaño promedio de las células LAMP1-positivas ( $\mu\text{m}^2$ ) en el tronco encefálico. La FIG. 9D muestra el porcentaje de área LAMP1 en el tronco encefálico. La FIG. 9E muestra el tamaño promedio de las células LAMP1-positivas ( $\mu\text{m}^2$ ) en la corteza. La FIG. 9F muestra el porcentaje de área LAMP1 en la corteza. La FIG. 9H muestra el porcentaje de área LAMP1 en la corteza para G1, G2 y G3, como se define en las FIGS. 8A-8F, a una dosis de  $2 \times 10^{10}$  GC en ratones de 2-3 meses de edad, medido a 1 mes usando la prueba de Mann-Whitney. La FIG. 9I muestra el porcentaje de área LAMP-1 en el cerebelo para G1, G2 y G3, a una dosis de  $2 \times 10^{10}$  GC en ratones de 2-3 meses de edad, medido a 1 mes usando la prueba de Mann-Whitney. La FIG. 9J muestra el porcentaje de área LAMP-1 en el hipocampo para G1, G2 y G3 a una dosis de  $2 \times 10^{10}$  GC en ratones de 2-3 meses de edad, medido a 1 mes usando la prueba de Mann-Whitney. Estos resultados muestran que cerca del lugar de la inyección se observó un rendimiento similar de los candidatos WPRE WT (grupo 1) y modificado genéticamente (grupo 3), y en el cerebelo, donde no se detectó SGSH por IHC independientemente del grupo, solo el candidato WPRE modificado genéticamente demostró la depuración de material LAMP1 positivo.

**[00244]** A continuación, se realizaron además los siguientes ensayos: actividad enzimática de SGSH, acumulación/reducción de glicosaminoglicanos (GAG) (HS) y título de anticuerpos anti-SGSH. La actividad enzimática de SGSH se examinó mediante cromatografía líquida con cuantificación por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) de la formación de productos a partir de una reacción de un solo paso utilizando 2-naftaleno-GlcNS. La acumulación/reducción de GAG (HS) se examinó mediante cuantificación LC-MS/MS de productos de descomposición de disacáridos a partir de la butanolisis de HS en tejidos. El título de anticuerpos anti-SGSH se examinó mediante ELISA.

**[00245]** Las FIGS. 10A a 10C muestran la actividad de SGSH y la reducción de GAG en el cerebro de ratones machos y hembras. La FIG. 10A muestra la actividad de la SGSH en el cerebro, representada como actividad (nmol/ml/h). La FIG. 10B muestra la actividad de la SGSH en el cerebro, representada como logaritmo de la actividad. La FIG. 10C muestra los niveles de GAG en el cerebro representados como ng GAG(HS) por mg de proteína.

**[00246]** Además, se examinó la actividad de SGSH y la reducción del sustrato en el cerebro de ratones tratados después de 1 mes de la administración. Brevemente, se administró a los ratones una dosis de  $2 \times 10^{10}$  ( $1 \times 10^{12}$  vg/kg) de rAAV como se indica (hSGSHcoV1, coV1BIP-hSGSH(A482Y E488V)coV1-vIGF2, y coV1BIP-hSGSH(A482Y E488V)coV1-vIGF2 con WPRE). La FIG. 17A muestra la actividad de SGSH en el cerebro de ratón tratado. La FIG. 17B muestra los niveles de GAG (HS) en el cerebro. La FIG. 17C muestra GM3 total en cerebro de ratón. Estos resultados muestran que la adición de WPRE al candidato modificado genéticamente rescata la expresión a niveles similares a los de la construcción WT y permite una depuración de almacenamiento comparable o mejor.

**[00247]** Las FIGS. 11A a 11C muestran la actividad de SGSH en la reducción de GAG en la médula espinal de ratones machos y hembras. La FIG. 11A muestra la actividad de la SGSH en la médula espinal representada como actividad (nmol/ml/h). La FIG. 11B muestra la actividad de la SGSH en la médula espinal representada como logaritmo de la actividad. La FIG. 11C muestra los niveles de GAG en la médula espinal representada como ng GAG(HS) por mg de proteína.

**[00248]** Las FIGS. 12A a 12C muestran la actividad de SGSH en la reducción de GAG en el hígado de ratones machos y hembras. La FIG. 12A muestra la actividad de la SGSH en el hígado, representada como actividad (nmol/ml/h). La FIG. 12B muestra la actividad de la SGSH en el hígado representada como logaritmo de la actividad. La FIG. 12C muestra los niveles de GAG en el hígado representados como ng GAG(HS) por mg de proteína.

**[00249]** La FIG. 13A muestra la actividad de la SGSH en suero representada como actividad (nmol/ml/h) según se midió en el día 7 posterior a la inyección ICV. La FIG. 13B

muestra la actividad de la SGSH en suero representada como logaritmo de la actividad (nmol/ml/h) en el día 7 posterior a la inyección ICV. La FIG. 13C muestra los niveles de actividad de SGSH en plasma representados como actividad (nmol/ml/h) según se midió al mes posterior a la inyección ICV. La FIG. 13D muestra los niveles de actividad de SGSH en plasma representados como logaritmo de la actividad (nmol/ml/h) según se midió al mes posterior a la inyección ICV.

**[00250]** Además, se examinaron los niveles de GM3 en muestras de cerebro de ratón. La FIG. 14A muestra los niveles de GM3 total en cerebro de ratón representados como pmol GM3 por mg de proteína. La FIG. 14B muestra los niveles de GM3 total en cerebro de ratón representados como escala logarítmica de pmol GM3 por mg de proteína. Estos resultados muestran que, a dosis bajas, las construcciones modificadas genéticamente (BIP-AA SGSH-vIGF2 estabilizado) son superiores a las demás.

**[00251]** En resumen, se examinó y comparó la construcción hSGSH-coV1 modificada genéticamente con otros cuatro (4) candidatos de SGSH modificados genéticamente. La actividad de SGSH fue mayor con la construcción hSGSH-coV1. Además, se observó que la reducción de GAG era igualmente reducida con dos (2) versiones modificadas genéticamente: coV1BIP-hSGSH(A482Y E488V)coV1 y coV1BIP-hSGSH(A482Y E488V)coV1-vIGF2. Además, se observó que la reducción de GM3 era superior a dosis bajas con coV1BIP-hSGSH(A482Y E488V)coV1-vIGF2. Todos los candidatos redujeron la tinción LAMP1 en comparación con los ratones MPSIIIA KO a dosis altas. A dosis bajas, se observaron resultados variables debido a la expresión deficiente de las construcciones modificadas genéticamente. En vista de los resultados mencionados, los estudios posteriores se centran en BIP-hSGSH(A482Y\_E488Y)coV1-vIGF2 y hSGSHcoV1 (sin modificación genética), que se usa como control.

**EJEMPLO 3.** Estudio del vector de MPS IIIA en ratones y primates no humanos (NHP).

**[00252]** A continuación, se examinó la eficacia de AAV.hSGSH que comprende la secuencia codificante de SGSH modificada genéticamente (BIP-hSGSH(A482Y\_E488Y)coV1-vIGF).

**[00253]** En primer lugar, en este estudio se examinó la expresión y la actividad enzimática de SGSH en la construcción modificada genéticamente (BIP-hSGSH(A482Y\_E488Y)coV1-vIGF) que comprende el elemento WPRE en el genoma de vector de AAV (véase también el Ejemplo 1). Además, se examinó el efecto de la adición de sitios de anulación de diana de miR y se evaluó el impacto en la eficacia. La anulación de diana de miR se realiza con la adición de 4 o más secuencias de direccionamiento de miARN, es decir, miR182 y miR183.

**[00254]** A continuación, se examinó y comparó la biodistribución y los niveles de transducción de AAV.hSGSH cuando se administra utilizando cápsides AAVhu68 y AAVrh91 en primates no humanos (NHP). Además, se examinaron y compararon los niveles de transducción de AAV.hSGSH.WPRE cuando se utiliza la cápside AAVhu68. Además, se examinó la seguridad, la eficacia y se evaluó el impacto de AAV.hSGSH, que además comprende secuencias diana de miARN de anulación de diana de DRG. La tabla que figura a continuación muestra un resumen del estudio con NHP. Brevemente, a un total de 15 NHP (N-3/grupo) se les administró AAV vía ICM (intra-cisterna magna) a una dosis de  $3 \times 10^{13}$  GC (ajustado en función del peso del cerebro de macacos rhesus (por ejemplo, 90g)). Las principales lecturas del estudio son la farmacología (niveles de expresión de SGSH), la toxicología y la histopatología.

| Núm.<br>de<br>grupo | Tratamiento                                               |
|---------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1                   | AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1                                     |
| 2                   | AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1                                     |
| 3                   | AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1. miR                                |
| 4                   | AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 – vIGF2.WPRE     |
| 5                   | AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 – vIGF2.WPRE.miR |

**[00255]** Se realizaron estudios preliminares para examinar y medir la actividad de referencia de SGSH en macacos rhesus (NHP) no tratados antes de la administración del vector AAV.hSGSH. La FIG. 15A muestra los niveles de actividad de referencia de la SGSH en secciones cerebrales de NHP no tratadas, representados como nmol/mg/h, medidos en médula, cerebelo, tálamo y corteza frontal. La FIG. 15B muestra los niveles de actividad de referencia de la SGSH en secciones de médula espinal de NHP no tratadas, representados como nmol/mg/h, según se midió en secciones cervicales, torácicas, lumbares y de ganglios de la raíz dorsal (DRG) cervicales, lumbares y torácicos de la médula espinal. Estos datos muestran una actividad significativa de SGSH observada en secciones de DRG y plasma. La FIG. 15B muestra los niveles de actividad de referencia de la SGSH en secciones de médula espinal de NHP no tratadas, representados como nmol/mg/h, según se midió en secciones cervicales, torácicas, lumbares y de ganglios de la raíz dorsal (DRG) cervicales, lumbares y torácicos de la médula espinal. Véase, FIGS. 15C - 15E. La FIG. 23 muestra suero Nfl en NHP tratados, lo que demuestra que el Nfl suero se alinea con la gravedad de la axonopatía histopatológica.

**[00256]** La FIG. 18A muestra la actividad de SGSH en tejido cerebral de cerebelo de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2 (AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE). La FIG. 18B muestra la actividad de SGSH en tejido cerebral de médula de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2 (AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE). La FIG. 18C muestra la actividad de SGSH en tejido cerebral de corteza frontal de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2 (AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE). La FIG. 18D muestra la actividad de SGSH en tejido cerebral de tálamo de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2

(AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE).

**[00257]** La FIG. 19A muestra la actividad de SGSH en la sección de médula espinal (SC cervical) de cerebelo de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2 (AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE). La FIG. 19B muestra la actividad de SGSH en la sección de médula espinal (SC torácica) de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2 (AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE). La FIG. 19C muestra la actividad de SGSH en la sección de médula espinal (SC lumbar) de NHP tratado, comparada con la actividad de fondo para G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1), G2 (AAVrh91.CB7.hSGSHcoV1) y G4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE).

**[00258]** La FIG. 20A muestra la actividad de SGSH en plasma de NHP tratado. La FIG. 20B muestra la actividad de SGSH en CSF tratado.

**[00259]** La FIG. 21A muestra el título total de IgG anti-hSGSH en plasma de NHP. La FIG. 21B muestra el título total de anti-hSGSH en CSF. Estos resultados muestran que la construcción del grupo 2 (rAAVrh91.hGSH) es más inmunogénico en CSF y plasma que las construcciones del grupo 1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1) o 4 (AAVhu68.CB7.BIP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE).

**[00260]** Además, se realizó ELISPOT para muestras obtenidas de NHP tratadas con G1 (AAVhu68.CB7.hSGSHcoV1; Tabla A) y G4 (AAVhu68.CB7.BiP-hSGSH (A482Y E488V) coV1 - vIGF2.WPRE; Tabla B), cuyos resultados se describen en las tablas siguientes.

25 Tabla A.

|               |                                   |               | SFU millón de células |     |     |           |          |         | SFU<br>cada<br>2,0E+0<br>4<br>células | SFU<br>cada<br>2,0E+03<br>células |             |
|---------------|-----------------------------------|---------------|-----------------------|-----|-----|-----------|----------|---------|---------------------------------------|-----------------------------------|-------------|
| Muestra       | Linfocit<br>o                     | DMS<br>O      | AAVhu68               |     |     | hSGSHcoV1 |          |         | Controles positivos                   |                                   |             |
|               |                                   | Sin<br>estim. | A                     | B   | C   | A         | B        | C       | PHA                                   | CD3                               | PMA/IO<br>N |
| HS160605<br>6 | Valor<br>inicial                  | 15            | 8                     | 25  | 10  | 13        | 20       | 20      | TNT<br>C                              | 52                                | 134         |
| HS160605<br>6 | Día 34                            | 18            | 18                    | 43  | 55  | 143       | 95       | 10      | TNT<br>C                              | 10                                | 111         |
| HS160605<br>6 | Día 25<br>Bazo                    | 8             | 8                     | 13  | 5   | 70        | 50       | 10      | TNT<br>C                              | 8                                 | 123         |
| HS160605<br>6 | Día 35<br>Cuello<br>uterino<br>LN | 13            | 3                     | 13  | 18  | 45        | 28       | 5       | 820*                                  | 2                                 | 58          |
| HS160605<br>6 | Día 35<br>Hígado                  | 153           | 17<br>5               | 185 | 178 | 588       | 390      | 16<br>0 | TNT<br>C                              | 72                                | TNTC        |
| HS160311<br>2 | Valor<br>inicial                  | 28            | 18                    | 23  | 10  | 18        | 10       | 3       | TNT<br>C                              | 25                                | 34          |
| HS160311<br>2 | Día 34                            | 13            | 18                    | 13  | 20  | 200       | 303      | 23      | TNT<br>C                              | 7                                 | 97          |
| HS160311<br>2 | Día 25<br>Bazo                    | 28            | 20                    | 10  | 18  | 115       | 178      | 13      | TNT<br>C                              | 6                                 | 131         |
| HS160311<br>2 | Día 35<br>Cuello<br>uterino<br>LN | 0*            | X                     | X   | X   | X         | X        | X       | x                                     | 0                                 | 3           |
| HS160311<br>2 | Día 35<br>Hígado                  | 233           | 25<br>5               | 240 | 143 | 133<br>8  | 165<br>3 | 21<br>3 | TNT<br>C                              | 47                                | TNTC        |

|         |                                   |      | SFU millón de células |      |      |           |     |    | SFU<br>cada<br>2,0E+0<br>4<br>células | SFU<br>cada<br>2,0E+03<br>células |      |
|---------|-----------------------------------|------|-----------------------|------|------|-----------|-----|----|---------------------------------------|-----------------------------------|------|
| Muestra | Linfocito                         | DMSO | AAVhu68               |      |      | hSGSHcoV1 |     |    | Controles positivos                   |                                   |      |
| 181344  | Valor inicial                     | 5    | 8                     | 23   | 20   | 20        | 15  | 18 | TNT<br>C                              | 6                                 | 195  |
| 181344  | Día 34                            | 25   | 113                   | 170  | 163  | 203       | 200 | 20 | TNT<br>C                              | 2                                 | 240  |
| 181344  | Día 25<br>Bazo                    | 135  | 320                   | 293  | 283  | 313       | 248 | 85 | TNT<br>C                              | 3                                 | 202  |
| 181344  | Día 35<br>Cuello<br>uterino<br>LN | 0    | 5                     | 33   | 10   | 15        | 13  | 3  | 348                                   | 0                                 | 118  |
| 181344  | Día 35<br>Hígado                  | 23   | 228                   | 1145 | 1273 | 888       | 723 | 25 | TNT<br>C                              | 57                                | TNTC |

Tabla B.

| Muestra   | Linfocito                      | DMSO       | AAVhu68 |     |     | hSGSHcoV1 |      |    | Controles positivos |     |         |
|-----------|--------------------------------|------------|---------|-----|-----|-----------|------|----|---------------------|-----|---------|
|           |                                | Sin estim. | A       | B   | C   | A         | B    | C  | PHA                 | CD3 | PMA/ION |
| HS1603122 | Valor inicial                  | 13         | 18      | 13  | 8   | 13        | 8    | 5  | TNTC                | 9   | 87      |
| HS1603122 | Día 34                         | 5          | 53      | 25  | 43  | 243       | 805  | 48 | TNTC                | 7   | 129     |
| HS1603122 | Día 25<br>Bazo                 | 38         | 93      | 110 | 108 | 263       | 1190 | 90 | TNTC                | 16  | 122     |
| HS1603122 | Día 35<br>Cuello<br>uterino LN | 0          | 5*      | 5*  | 5*  | 10*       | 20*  | 0* | 385*                | 8   | 1       |

| Muestra   | Linfocito                      | DMSO       | AAVhu68 |     |     | hSGSHcoV1 |      |     | Controles positivos |     |         |
|-----------|--------------------------------|------------|---------|-----|-----|-----------|------|-----|---------------------|-----|---------|
|           |                                | Sin estim. | A       | B   | C   | A         | B    | C   | PHA                 | CD3 | PMA/ION |
| HS1603122 | Día 35<br>Hígado               | 258        | 425     | 263 | 248 | 1423      | 2093 | 328 | TNTC                | 80  | TNTC    |
| 192289    | Valor inicial                  | 3          | 0       | 0   | 0   | 3         | 0    | 3   | 1268                | 3   | 79      |
| 192289    | Día 34                         | 0          | 0       | 0   | 3   | 3         | 5    | 0   | 358                 | 2   | 37      |
| 192289    | Día 25<br>Bazo                 | 25         | 10      | 48  | 15  | 40        | 70   | 35  | 933                 | 7   | 92      |
| 192289    | Día 35<br>Cuello<br>uterino LN | 0*         | 0*      | 0*  | 0*  | X         | X    | X   | X                   | 0   | 2       |
| 192289    | Día 35<br>Hígado               | 215        | 185     | 298 | 203 | 295       | 560  | 365 | TNTC                | 20  | TNTC    |
| 191412    | Valor inicial                  | 45         | 35      | 25  | 15  | 30        | 33   | 25  | TNTC                | 38  | 55      |
| 191412    | Día 34                         | 23         | 103     | 70  | 48  | 108       | 258  | 98  | TNTC                | 55  | 79      |
| 191412    | Día 25<br>Bazo                 | 83         | 270     | 155 | 145 | 93        | 148  | 85  | TNTC                | 36  | 172     |
| 191412    | Día 35<br>Cuello<br>uterino LN | 23         | 48      | 120 | 13  | 35        | 88   | 43  | 825                 | 1   | 71      |
| 191412    | Día 35<br>Hígado               | 83         | 195     | 313 | 110 | 118       | 343  | 203 | TNTC                | 127 | TNTC    |

**[00261]** La FIG. 22A muestra resultados de la velocidad de conducción nerviosa (NCV), representada como NP (polarización nerviosa en Amp) en el nervio mediano izquierdo. La FIG. 22B muestra resultados de la velocidad de conducción nerviosa (NCV), representada como NP (polarización nerviosa en Amp) en el nervio mediano derecho. La FIG. 22C muestra resultados de la velocidad de conducción nerviosa (NCV), representada como velocidad en el nervio mediano izquierdo. La FIG. 22D muestra

resultados de la velocidad de conducción nerviosa (NCV), representada como velocidad en el nervio mediano derecho. Estos resultados muestran que el NP o la velocidad en los nervios medianos no mostraron una reducción significativa con el candidato WPRE modificado genéticamente.

- 5 **[00262]** En resumen, los estudios bioanalíticos en ratones mostraron que la actividad de SGSH de todos los candidatos era equivalente a la del WT no tratado en cerebro e hígado y, en general, indistinguibles entre sí; la reducción de sustrato fue más reducida en el candidato WPRE modificado genéticamente. La corrección de la patología lisosomal cerebral por LAMP-1 IF fue más reducida con el candidato WPRE modificado
- 10 genéticamente a distancia del lugar de inyección. Además, el estudio piloto de seguridad/farmacología en NHP demostró que la expresión parece estar a la par o mejor que la del candidato WPRE principal modificado genéticamente. El hSGSH-WPRE modificado genéticamente tuvo un perfil de inmunogenicidad similar al del candidato no modificado genéticamente según los datos ELISPOT. El hSGSH-WPRE modificado
- 15 genéticamente mostró el mejor perfil de seguridad basado en el biomarcador de toxicidad DRG (NfL) y la histopatología.

#### EJEMPLO 4. Eficacia de AAV.hSGSH en neuroesferas de ratón.

- [00263]** En este estudio se examinaron y compararon los niveles de expresión de SGSH y la eficacia de AAV.hSGSH que comprende la construcción de SGSH WT, la
- 20 construcción de SGSH modificada genéticamente y la construcción de SGSH modificada genéticamente que comprende además el elemento WPRE en el genoma de vector AAV. En este estudio, se usa una placa de 48 pocillos sembrada con neuroesferas WT (que se diferencian en un linaje astrocítico), que se incuban durante 10 días después del tratamiento con AAV para permitir la máxima expresión. Se utilizó el análisis de
- 25 inmunoelectrotransferencia en células (es decir, la imagen de la placa), en donde la fluorescencia del canal 800 (verde) indica la expresión transgénica a través del anticuerpo secundario (anti-SGSH), y la fluorescencia del canal 700 (rojo) indica la masa celular a través de la herramienta CellTag™. La tabla siguiente muestra una representación

esquemática de la disposición de las placas y las condiciones/tratamientos experimentales utilizados.

|                                   | Col.<br>1 | Col.<br>2 | Col. 3     | Col. 4 | Col. 5 | Col. 6 | Col. 7 | Col. 8 |
|-----------------------------------|-----------|-----------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Fila 1: WT SGSH                   |           |           |            |        |        |        |        |        |
| Fila 2: SGSH Modif.               |           |           |            |        |        |        |        |        |
| Fila 3: SGSH Modif.<br>c/WPRE     |           |           |            |        |        |        |        |        |
| Fila 4: Control (sin<br>virus)    | 1°+2°     | 1°+2°     | 2°<br>solo |        |        |        |        |        |
| Virus MOI: ½<br>dilución en serie | 100K      | 50K       | 25K        | 12,5K  | 6250   | 3125   | 1563   | 781    |

- 5 **[00264]** La FIG. 16 muestra los niveles de expresión del transgén SGSH, representados como AFU (800/700 nm), en neuroesferas tratadas con AAV.hSGSH que comprenden la construcción WT SGSH, la construcción SGSH modificada genéticamente o la construcción SGSH modificada genéticamente que comprende además el elemento WPRE en el genoma de vector AAV a varias MOI. Los datos se normalizaron para tener
- 10 en cuenta la variación de la masa celular. El virus de SGSH modificado genéticamente dio lugar a una expresión transgénica inferior al natural: lo que concuerda con los datos in vivo antes mencionados, mientras que la transfección transitoria de los plásmidos en células HEK muestra que la expresión modificada genéticamente es superior a la natural. Estos resultados son alentadores en el sentido de que la adición de WPRE puede
- 15 aumentar significativamente la expresión de la construcción modificada genéticamente in vivo.

**[00265]** Todos los documentos citados en esta memoria descriptiva se incorporan en este documento por referencia. El listado de secuencias electrónico presentado con este documento denominado “UPN-19-9075PCT\_20221111.xml” con un tamaño de 257.646 bytes, creado el 11 de noviembre de 2022, y el contenido del listado de

5 secuencias electrónico (por ejemplo, las secuencias y el texto en estas) se incorporan en este documento mediante referencia en su totalidad. La patente provisional estadounidense núm. 63/278.775, presentada el 12 de noviembre de 2021, la solicitud de patente provisional estadounidense núm. 63/288.293, presentada el 10 de diciembre de 2021, se incorporan mediante referencia. Si bien la invención se ha descrito con

10 referencia a modalidades particulares, se deberá tener en cuenta que se pueden realizar modificaciones sin que esto signifique apartarse del espíritu de la invención. Se pretende que tales modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.