

REIVINDICACIONES:

1. Un virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende una cápside de virus adenoasociado (AAV) y un genoma de vector, en donde el genoma de vector comprende una repetición terminal invertida (ITR) AAV 5', un casete de expresión y una AAV 3' ITR, 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 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.
2. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 1, en donde 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).
3. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia codificante de hSGSH madura es la SEQ ID NO: 16.
4. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia codificante de hSGSH madura tiene la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de la SEQ ID NO: 16 o una secuencia de ácido nucleico que es al menos 85 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 23.
5. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia peptídica señal es una secuencia señal nativa que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ

ID NO: 31 o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a esta que codifica la SEQ ID NO: 32.

6. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la secuencia codificante de hSGSH comprende además una secuencia señal exógena fusionada a la secuencia codificante para el extremo amino de la hSGSH.
7. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la secuencia señal exógena es una secuencia peptídica 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.
8. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde la secuencia codificante de hSGSH que comprende el péptido señal BiP 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.
9. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde la hSGSH que comprende el péptido señal BiP 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.
10. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la secuencia codificante de hSGSH comprende además una secuencia de péptido vIGF2 fusionada a la secuencia codificante para el extremo carboxi de la hSGSH.
11. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la secuencia codificante de hSGSH que comprende la secuencia señal exógena en el extremo 5' y el vIGF2 en el extremo 3'.
12. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la secuencia codificante de hSGSH que comprende la secuencia señal BiP y el péptido vIGF2 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.

13. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la secuencia codificante de hSGSH que comprende la secuencia señal BiP y el péptido vIGF2 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.
14. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde las secuencias de control reguladoras comprenden un promotor CB7 que comprende un potenciador IE de CMV y un promotor de beta actina de pollo (CB).
15. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde las secuencias de control reguladoras comprenden además una o más de una secuencia Kozak, un intrón, un potenciador, una señal TATA y una secuencia poliA.
16. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 15, en donde las secuencias de control reguladoras comprenden uno o más de un intrón de beta actina de pollo, una secuencia de poliadenilación de globina de conejo.
17. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde las secuencias de control reguladoras comprenden además un elemento WPRE mutante.
18. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el genoma de vector rAAV comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7 (CB7.CI.BiP.hSGSHcov1-A482Y_E488V.vIGF2.WPRE.rBG).
19. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el genoma de vector comprende además al menos una, dos, tres, cuatro o más repeticiones en tándem de secuencias diana de miARN específicas del ganglio de la raíz dorsal (drg), en donde la al menos una, dos, tres, cuatro o más

repeticiones en tándem comprenden al menos una primera secuencia diana de miARN, al menos una segunda, al menos una tercera, y/o al menos una cuarta secuencia diana de miARN.

20. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la secuencia diana de miARN comprende al menos una primera secuencia diana de miARN, al menos una segunda, al menos una tercera, y/o al menos una cuarta secuencia diana de miARN cuya diana es miR182.
21. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la secuencia diana de miARN comprende al menos una primera secuencia diana de miARN, al menos una segunda, al menos una tercera, y/o al menos una cuarta secuencia diana de miARN cuya diana es miR183.
22. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 19 o 20, en donde la secuencia diana de miARN para la al menos primera, al menos segunda, al menos tercera, y/o al menos cuarta secuencia diana de miARN para la cadena positiva de ARNm o ADN del casete de expresión es AGTGTGAGTTCTACCAT TGCCAAA (miR182, SEQ ID NO: 47).
23. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 19 o 21, en donde la secuencia diana de miARN para la al menos primera, al menos segunda, al menos tercera, y/o al menos cuarta secuencia diana de miARN para la cadena positiva de ARNm o ADN del casete de expresión es AGTGAATTCTACCAGTGCCATA (miR183, SEQ ID NO: 28).
24. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o 19 a 22, en donde el genoma de vector comprende además al menos ocho repeticiones en tándem que comprenden al menos una primera, al menos una segunda, al menos una tercera, al menos una cuarta, al menos una quinta, al menos una sexta, al menos una séptima y al menos una octava secuencia diana de miARN, que pueden ser iguales o diferentes, y se dirigen a miR183 o miR182.

25. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 24, en donde las al menos ocho repeticiones en tándem comprenden al menos cuatro repeticiones en tándem de secuencias diana de miARN182 específicas del ganglio de la raíz dorsal (drg) y al menos cuatro repeticiones en tándem de secuencias diana de miARN183 específicas del drg.
26. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, en donde la secuencia diana de miARN específica del drg para la al menos primera, al menos segunda, al menos tercera, al menos cuarta, al menos quinta, al menos sexta, al menos séptima y/o al menos octava secuencia diana de miARN para la cadena positiva de ARNm o ADN del casete de expresión es (i) AGTGAATTCTACCAGTGCCATA (miR183, SEQ ID NO: 28); y (ii) AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA (miR182, SEQ ID NO: 47).
27. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en donde la secuencia diana de miARN específica del drg para la al menos primera, al menos segunda, al menos tercera, y/o al menos cuarta secuencia diana de miARN para la cadena positiva de ARNm o ADN del casete de expresión es AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA (miR182, SEQ ID NO: 47) y la al menos quinta, al menos sexta, al menos séptima y/o al menos octava secuencia diana de miARN para la cadena positiva de ARNm o ADN del casete de expresión es AGTGAATTCTACCAGTGCCATA (miR183, SEQ ID NO: 28).
28. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, en donde dos, tres, cuatro o más o las al menos ocho de las secuencias diana de miARN están separadas por un espaciador.
29. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 28, en donde 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.

30. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el espaciador ubicado entre las secuencias diana de miARN puede ubicarse 3' con respecto a la primera secuencia diana de miARN y/o 5' con respecto a la última secuencia diana de miARN.
31. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 30, en donde la al menos una, dos, tres, cuatro o más o las al menos ocho repeticiones en tándem de secuencias diana de miARN específicas del ganglio de la raíz dorsal (drg) están enlazadas operativamente a una región 3' no traducida (UTR) de la hSGSH.
32. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 30, en donde la al menos una, dos, tres, cuatro o más o las al menos ocho repeticiones en tándem de secuencias diana de miARN específicas del ganglio de la raíz dorsal (drg) están enlazadas operativamente a una región 5' no traducida (UTR) de la hSGSH.
33. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, 19 a 22, en donde el genoma de vector rAAV comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 (CB7.CI.BiP.hSGSHcov1(A482Y-E488V).vIGF2.WPRE.4xmiR183.rBG).
34. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el genoma de vector rAAV comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4 (CB7.CI.BiP.hSGSHcov1-A482Y_E488V.vIGF2.rBG).
35. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el genoma de vector rAAV comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10 (AAV.CB7.CI.hSGSHcoV1.rBG).
36. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o 19 a 22, en donde el genoma de vector rAAV comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 13 (CB7.CI.hSGSHcoV1-4xmiR183.rBG).

37. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o 19 a 22, en donde el genoma de vector rAAV comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 40 (CB7.Cl.BiP.hSGSHcov1-A482Y_E488V.vIGF2.WPRE.4xmiR182.rBG).
38. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o 19 a 30, en donde el genoma de vector rAAV comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 37 (CB7.Cl.Bip.hSGSHcov1-A482Y_E488V.vIGF2.WPRE.4xmiR182.4xmiR183.rBG).
39. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, en donde la cápside de AAV es un AAV de subtipo F.
40. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, en donde la cápside de AAV es AAVhu68.
41. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, en donde la cápside de AAV es AAVrh91.
42. El rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, que es para usar en el tratamiento de 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.
43. Una composición que comprende una reserva de rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42 y un medio de suspensión acuoso.
44. La composición de acuerdo con la reivindicación 43, en donde la suspensión está formulada para inyección intracerebroventricular (ICV), intratecal (IT), intracisternal o intravenosa (IV).

45. Una composición farmacéutica que comprende un rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42 en un amortiguador de formulación.
46. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 45, que se formula para administración mediante inyección intracerebroventricular (ICV), intratecal (IT), intracisternal o intravenosa (IV).
47. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 45 a 46, que puede administrarse a una dosis de 1×10^9 GC por gramo de masa cerebral a aproximadamente 1×10^{13} GC por gramo de masa cerebral.
48. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 45 a 47, que se formula para tener un pH de aproximadamente 7,28 a aproximadamente 7,32.
49. Un vector que comprende un casete de expresión, en donde el casete de expresión comprende una secuencia codificante de hSGSH, que es una secuencia de ácido nucleico que codifica una N-sulfoglicosamina sulfhidrolasa humana (hSGSH) funcional, bajo control de secuencias de control reguladoras que dirigen la expresión de hSGSH, en donde la secuencia codificante de hSGSH comprende una secuencia peptídica señal y una hSGSH madura, y en donde la secuencia codificante de hSGSH madura se selecciona de la SEQ ID NO: 16 o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 22, o una secuencia al menos aproximadamente 95 % idéntica a esta.
50. El vector de acuerdo con la reivindicación 49, en donde el vector es un vector viral seleccionado de un parvovirus recombinante, un lentivirus recombinante, un retrovirus recombinante, o un adenovirus recombinante; o un vector no viral seleccionado de ADN desnudo, ARN desnudo.

51. Una molécula de ácido nucleico que comprende un casete de expresión que comprende un gen de N-sulfoglicosamina sulfohidrolasa humana (hSGSH) funcional modificado genéticamente y secuencias de control reguladoras, donde dicho casete de expresión está flanqueado por una repetición terminal invertida (ITR) 5' y una 3' ITR, en donde el gen de hSGSH modificado genéticamente codifica una hSGSH funcional, en donde la secuencia codificante de hSGSH comprende una secuencia peptídica señal y una hSGSH madura, y en donde la secuencia codificante de hSGSH madura se selecciona de SEQ ID NO: 16 y 22.
52. La secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 51, en donde la secuencia señal se selecciona de SEQ ID NO: 29 y 31.
53. La secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 51, en donde el casete de expresión se selecciona de SEQ ID NO: 8, 2, 5, 11 y 14.
54. Una célula hospedadora de empaquetamiento que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 51 a 53.
55. La célula hospedadora de empaquetamiento de acuerdo con la reivindicación 54, que comprende además secuencias codificantes de AAV rep enlazadas operativamente a secuencias que expresan proteína rep en la célula hospedadora de empaquetamiento, secuencias codificantes de cápside de AAV enlazadas operativamente a secuencias que expresan proteínas de cápside de AAV en la célula hospedadora de empaquetamiento, y funciones de virus auxiliar necesarias para permitir el empaquetamiento del casete de expresión y las ITR en la cápside de AAV.
56. La célula hospedadora de empaquetamiento de acuerdo con la reivindicación 54 o la reivindicación 55, en donde la cápside de AAV se selecciona de AAVhu68 y AAVrh91.

57. Un sistema de producción de rAAV útil para producir el rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en donde 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) un genoma de vector; y
 - (c) suficientes funciones de AAV rep y funciones auxiliares para permitir el empaquetamiento del genoma de vector en la cápside de AAV.
58. El sistema de producción de rAAV de acuerdo con la reivindicación 57, en donde la cápside de AAV se selecciona de AAVhu68 y AAVrh91.
59. El sistema de producción de rAAV de acuerdo con la reivindicación 57, en donde el genoma de vector se selecciona de SEQ ID NO: 7, 1, 4, 10 y 13.
60. Un método para tratar a un sujeto humano diagnosticado con MPS IIIA 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 necesita, que comprende administrarle al sujeto una suspensión de un rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42 en un amortiguador de formulación a una dosis de 1×10^9 GC por gramo de masa cerebral a aproximadamente 1×10^{13} GC por gramo de masa cerebral.