

MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE LA LEUCODISTROFIA METACROMÁTICA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica los derechos de prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 63/342,590, presentada el 16 de mayo de 2022, y de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 63/459,564, presentada el 14 de abril de 2023, cuyos contenidos se incorporan por referencia en su totalidad.

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS ELECTRÓNICO

El contenido del listado de secuencias electrónico (159792018440seqlist.xml; tamaño: 36,314 bytes; y fecha de creación: 8 de mayo de 2023) se incorpora como referencia en el presente documento en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente divulgación se refiere a proporcionar métodos para tratar la leucodistrofia metacromática (MLD) en un paciente que lo necesita, que comprenden administrar en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de un paciente una partícula vírica del virus adenoasociado (rAAV) recombinante que comprende un vector que codifica la arilsulfatasa A (ARSA).

ANTECEDENTES

La leucodistrofia metacromática (MLD) es un trastorno neurodegenerativo autosómico recesivo provocado por mutaciones en la enzima arilsulfatasa A (ARSA). Unos niveles reducidos de actividad de la ARSA dan como resultado una acumulación tóxica de sulfátido caracterizada por la degeneración de las células formadoras de mielina (oligodendrocitos y células de Schwann) en el sistema nervioso central y periférico. Esto da como resultado desmielinización, disfunción, degeneración de las neuronas y neuroinflamación (astrocitosis, activación microglial). Las manifestaciones clínicas se encuentran principalmente en el sistema nervioso, lo que da como resultado discapacidad intelectual, problemas emocionales y de comportamiento, pérdida de habilidades motoras (movimiento, habla, deglución), mal funcionamiento muscular y parálisis, ceguera, pérdida de audición y convulsiones.

El tratamiento actual de la MLD implica un trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas (HSCT) que implica un trasplante alogénico de médula ósea.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

En algunos aspectos, la invención proporciona métodos para tratar la leucodistrofia metacromática (MLD) en un paciente que lo necesita, que comprenden administrar en el líquido cefalorraquídeo (LCR) del paciente una partícula vírica del virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica la enzima arilsulfatasa A (ARSA) (denominado también en el presente documento polipéptido ARSA). En algunas realizaciones, la partícula vírica se administra directamente en el LCR a través de una administración intracerebroventricular (ICV), una administración directa en la cisterna magna (dCM) o un microcatéter intratecal (IT-CM).

La presente invención se basa, al menos en parte, en el desarrollo de partículas víricas del rAAV que comprenden (a) un vector de rAAV que comprende un casete de expresión que codifica un polipéptido de arilsulfatasa A (ARSA) y (b) una cápside capaz de transducir las células del sistema nervioso central (SNC). La administración de las partículas víricas en el LCR proporciona altos niveles de expresión de la

proteína ARSA en el cerebro. En realizaciones particulares, el casete de expresión de la partícula vírica es capaz de dirigir la expresión del transgén en el sistema nervioso central y periférico para tratar la MLD. En algunas realizaciones, el casete de expresión comprende un gen ARSA de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el gen ARSA expresa un polipéptido ARSA que tiene una SEQ ID NO: 1.

5 En algunos aspectos, la invención proporciona una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector de rAAV, en donde el vector de rAAV comprende un casete de expresión para expresar un polipéptido ARSA en los sistemas nerviosos central y periférico, en donde el casete de expresión comprende un transgén unido operativamente a un promotor y opcionalmente un potenciador, en donde el transgén codifica un polipéptido ARSA, y en donde la partícula vírica del AAV comprende una
10 proteína de la cápside capaz de transducir las células del sistema nervioso central (SNC). En algunas realizaciones, la proteína de la cápside del AAV es una proteína de la cápside del AAV9 (SEQ ID NO: 9). En algunas realizaciones, la cápside del rAAV es una proteína de la cápside del AAV9 modificada. En algunas realizaciones, la cápside del rAAV es la proteína de la cápside AAV.rh10. En algunas realizaciones, el gen ARSA expresa un polipéptido ARSA que tiene una SEQ ID NO: 1.

15 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona partículas del rAAV para la administración intra-LCR de un polipéptido ARSA que comprende una proteína de la cápside del AAV9 modificada que comprende un péptido de direccionamiento que dirige las partículas del rAAV al cerebro. Dichas cápsides del AAV9 modificadas se describen en la publicación internacional n.º WO 2021/102234 A1, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En realizaciones particulares, el péptido
20 de direccionamiento de las cápsides del AAV9 modificadas se inserta después del resto 588 de la proteína estructural del AAV9. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento tiene la SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento está flanqueado por secuencias conectoras en el extremo aminoterminal y el extremo carboxiterminal del péptido de direccionamiento. En algunas realizaciones, la secuencia conectora en el lado aminoterminal tiene la secuencia AAA. En algunas
25 realizaciones, la secuencia conectora en el lado carboxiterminal es AS. En algunas realizaciones, la secuencia completa insertada después del resto 588 de la proteína estructural de la cápside del AAV9 tiene la SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, la proteína estructural de la cápside del AAV9 modificada completa (VP1) tiene la SEQ ID NO: 12. La proteína de la cápside que tiene la SEQ ID NO: 12 se denomina en el presente documento AAV1999. En algunas realizaciones, la proteína estructural de la cápside del
30 AAV9 modificada completa es al menos un 90 % (por ejemplo, al menos un 92 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 98.5 %, al menos un 99 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.5 %, o al menos un 99.8 %) idéntica a la SEQ ID NO: 12, en donde la cápside estructural del AAV9 modificada comprende el péptido de direccionamiento de la SEQ ID NO: 10.

35 Las partículas del rAAV que comprenden proteínas de la cápside del AAV9 modificadas, como se divulga en el presente documento, comprenden tres proteínas estructurales de la cápside, VP1, VP2 y VP3. Las tres proteínas de la cápside son variantes de corte y empalme alternativas. La proteína VP1 completa tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 9. La proteína VP2 incluye los aminoácidos 138 a 736 de la SEQ ID NO: 9. La proteína VP3 incluye los aminoácidos 203 a 736 de la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones,

el péptido de direccionamiento (SEQ ID NO: 10) se inserta en la proteína de la cápside VP3 del AAV9 en la partícula rAAV. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento (SEQ ID NO: 10) se inserta en la proteína de la cápside VP2 del AAV9 en la partícula rAAV. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento (SEQ ID NO: 10) se inserta en la proteína de la cápside VP1 del AAV9 en la partícula rAAV. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento (SEQ ID NO: 10) se inserta en las proteínas de la cápside de VP1, VP2 y VP3 dentro de la partícula del rAAV. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento en la proteína de la cápside del AAV9 modificada está flanqueado por secuencias conectoras en el extremo aminoterminal y el extremo carboxiterminal del péptido de direccionamiento. En algunas realizaciones, la secuencia conectora en el lado aminoterminal tiene la secuencia AAA. En algunas realizaciones, la secuencia conectora en el lado carboxiterminal es AS.

Se ha descubierto que las partículas del rAAV que comprenden proteínas de la cápside del AAV9 modificadas que comprenden un péptido de direccionamiento de la SEQ ID NO: 10 muestran unos niveles muy altos de expresión del transgén después de la administración en el cerebro (por ejemplo, administración intra-LCR) de un sujeto. Por ejemplo, las partículas del rAAV que comprenden una proteína de la cápside VP1 modificada que tiene una SEQ ID NO: 12 (y/o una proteína de la cápside VP2 modificada que tiene una SEQ ID NO: 13 y/o una proteína de la cápside VP2 modificada que tiene una SEQ ID NO: 14) muestran unos niveles más altos de expresión del transgén en el cerebro y la médula espinal que las partículas del rAAV que comprenden otras cápsides capaces de transducir las células del SNC, por ejemplo, AAV9 y AAV.rh10, después de la administración intra-LCR de las partículas del rAAV. Por el contrario, los niveles de transgén expresados en otros órganos, tales como el corazón y el hígado son sustancialmente inferiores después de la administración intra-LCR de partículas del rAAV que comprenden una cápside del AAV9 modificada que comprende un péptido de direccionamiento de la SEQ ID NO: 10. Además, pueden lograrse unos niveles de expresión altos con dosis menores de partículas del rAAV que comprenden una cápside del AAV9 modificada que comprende un péptido de direccionamiento de la SEQ ID NO: 10 en relación con partículas del rAAV que comprenden otras cápsides capaces de transducir las células del SNC, por ejemplo, AAV9 y AAV.rh10. Por consiguiente, las partículas del rAAV que comprenden proteínas de la cápside del AAV9 modificadas que comprenden un péptido de direccionamiento de la SEQ ID NO: 10 tienen un índice terapéutico mejorado en relación con partículas del rAAV que comprenden una cápside del AAV9 o una cápside del AAV.rh10.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar la MLD en un paciente que lo necesita, que comprenden administrar en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de un paciente una partícula vírica del virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende (1) un vector que codifica un polipéptido ARSA y (2) una proteína de la cápside del AAV9 modificada, en donde la proteína de la cápside del rAAV modificada comprende un péptido de direccionamiento de la SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, la proteína de la cápside del AAV9 modificada que comprende la SEQ ID NO: 10 es al menos un 90 % (por ejemplo, al menos un 92 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 98.5 %, al menos un 99 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.5 %, o al menos un 99.8 %) idéntica a una proteína

de la cápside que tiene una SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, la proteína de la cápside tiene la SEQ ID NO: 12.

En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la partícula del rAAV comprende un vector que comprende un casete de expresión flanqueado por una o más secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) del AAV. En algunas realizaciones, el casete de expresión está flanqueado por dos ITR del AAV. En algunas realizaciones, las ITR del AAV son AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAV.rh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino o ITR de serotipo del AAV de ratón. En algunas realizaciones, las ITR del AAV son ITR del AAV2. En algunas realizaciones, el vector es un vector autocomplementario. En algunas realizaciones, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido ARSA y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un complemento del polipéptido ARSA, en donde la primera secuencia de ácido nucleico puede formar pares de bases intracatenarias con la segunda secuencia de ácido nucleico a lo largo de la mayor parte o de la totalidad de su longitud. En algunas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico están unidas por una ITR del AAV mutada, en donde la ITR del AAV mutada comprende una delección de la región D y comprende una mutación de la secuencia de resolución terminal.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición que comprende cualquiera de las partículas de rAAV descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunos aspectos, la invención proporciona una célula que comprende cualquiera de las partículas de rAAV descritas en el presente documento. En algunos aspectos, la invención proporciona un método para producir un polipéptido ARSA, comprendiendo el método cultivar una célula como se describe en el presente documento en condiciones para producir el polipéptido ARSA. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la etapa de purificar el polipéptido ARSA.

En algunos aspectos, la invención proporciona métodos para tratar la MLD en un individuo que lo necesita, que comprenden administrar al individuo una partícula del rAAV como se describe en el presente documento. En algunos aspectos, la invención proporciona métodos para tratar la MLD en un individuo que lo necesita, que comprenden administrar al individuo una composición como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para tratar la MLD en un individuo que lo necesita, que comprenden administrar al individuo la célula como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el individuo carece de actividad de la ARSA.

En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para aumentar la actividad de la ARSA en al menos aproximadamente un 5 % en un individuo que lo necesita, que comprenden administrar al individuo una partícula del rAAV como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, la invención proporciona métodos para aumentar la actividad de la ARSA en al menos aproximadamente un 10 % en un individuo que lo necesita, que comprenden administrar al individuo una partícula del rAAV como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, la invención proporciona métodos para aumentar la actividad de la ARSA en al menos aproximadamente un 20 % en un individuo que lo necesita,

que comprenden administrar al individuo una partícula del rAAV como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, la invención proporciona métodos para aumentar la actividad de la ARSA en al menos aproximadamente un 30 % en un individuo que lo necesita, que comprenden administrar al individuo una partícula del rAAV como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, la invención proporciona métodos para aumentar la actividad de la ARSA en al menos aproximadamente un 50 % en un individuo que lo necesita, que comprenden administrar al individuo una partícula del rAAV como se describe en el presente documento.

La administración de las partículas del rAAV puede realizarse a través de diversas vías. En algunas realizaciones, la administración incluye una inyección directa en la médula espinal y/o una administración intracerebral. En algunas realizaciones, la administración está en un sitio seleccionado entre el cerebro, el bulbo raquídeo, la protuberancia, el cerebelo, la cavidad intracraneal, las meninges que rodean el cerebro, la duramadre, la aracnoides, la piamadre, el líquido cefalorraquídeo (LCR) del espacio subaracnoideo que rodea al cerebro, núcleos cerebelosos profundos del cerebelo, el sistema ventricular del cerebro, el espacio subaracnoideo, el cuerpo estriado, la corteza, el tabique, el tálamo, el hipotálamo y el parénquima cerebral. En algunas realizaciones, la administración comprende una inyección intracerebroventricular en al menos un ventrículo lateral cerebral. En algunas realizaciones, la administración comprende una inyección intratecal en la región cervical, torácica y/o lumbar. En algunas realizaciones, la administración comprende una inyección intraestriatal. En algunas realizaciones, la administración comprende una inyección intratálámica.

En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la partícula del rAAV se administra mediante una inyección directa en la médula espinal, mediante una inyección intratecal y/o mediante una inyección intracisternal. En algunas realizaciones, la partícula del rAAV se administra en más de una ubicación de la médula espinal o la cisterna magna. En algunas realizaciones, la partícula del rAAV se administra en más de una ubicación de la médula espinal. En algunas realizaciones, la partícula del rAAV se administra en uno o más de un espacio subaracnoideo lumbar, espacio subaracnoideo torácico y un espacio subaracnoideo cervical de la médula espinal. En algunas realizaciones, la partícula del rAAV se administra en la cisterna magna.

En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la partícula del rAAV se administra una única vez a un paciente que lo necesita. En algunas realizaciones, la partícula del rAAV se administra múltiples veces a un paciente que lo necesita (por ejemplo, a lo largo de uno o más meses o años). En otras realizaciones, la partícula del rAAV se administra una vez al año a un paciente que lo necesita. En otras realizaciones, la partícula del rAAV se administra dos veces al año a un paciente que lo necesita.

En algunas realizaciones, la invención proporciona kits que comprenden cualquiera de las partículas de rAAV, las composiciones o la célula como se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, el kit comprende además instrucciones para su uso; tampones y/o excipientes farmacéuticamente aceptables; y/o frascos, viales y/o jeringas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En las **FIGS. 1A-C** se muestra la expresión de la ARSA aumentada *in vivo* con partículas víricas que comprenden dos casetes de expresión diferentes, lo que conduce una mejor eliminación de los depósitos tóxicos de sulfátido (C24-ST) en un modelo de ratón de MLD (ARSA^{-/-}). En la **FIG. 1A** se muestran los casetes de expresión utilizados en las partículas víricas, uno con un elemento WPRE y otro sin un elemento WPRE. En la **FIG. 1B** se muestran los niveles de expresión de la ARSA después de una inyección retroorbital bilateral de las partículas víricas a ratones. En la **FIG. 1C** se muestran los niveles de C24-ST después de una inyección retroorbital bilateral de las partículas víricas a ratones.

En la **FIG. 2** se muestra que los ratones con MLD en fase tardía (ARSA^{-/-}) tratados con AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE muestran un aumento de la actividad de sulfatasa mediada por la ARSA en el cerebro, la médula espinal y el hígado.

En la **FIG. 3** se representa que los ratones con MLD en fase tardía (ARSA^{-/-}) tratados con AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE muestran unos niveles de sulfátido significativamente reducidos en el cerebro y la médula espinal 3 meses después de la administración.

En la **FIG. 4** se muestra la mielinización mejorada del cuerpo calloso medida en el cerebro de ratones con MLD en fase tardía tratados con AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE (ARSA^{-/-}).

En la **FIG. 5** se muestra un aumento en el número de células de oligodendrocitos maduras y formadoras de mielina observadas en el cerebro de ratones con MLD en fase tardía (ARSA^{-/-}) tratados con AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE.

En las **FIGS. 6A-B** se muestra la magnitud de la corrección cruzada de la proteína ARSA en el cerebro de ratones con MLD en fase tardía tratados con AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE (ARSA^{-/-}). En la **FIG. 6A** se muestra la superposición de señales de hemisecciones sagitales coincidentes del cerebro después de tres meses tras la administración del AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE. En la **FIG. 6B** se muestra un gráfico cromático del factor de corrección cruzada.

En las **FIGS. 7A-B** se muestra que los ratones con MLD en fase temprana (ARSA^{-/-}) tratados con AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE

muestran una amplia expresión de la ARSA humana (hARSA) en el SNC y una actividad de sulfatasa mediada por la ARSA aumentada en el cerebro, la médula espinal, los ganglios de la raíz dorsal (GRD) y el hígado. En la **FIG. 7A** se muestra que cuatro meses después de la administración, se observó una amplia expresión de la ARSA en secciones cerebrales sagitales mediante IHQ frente a la ARSA humana. En la **FIG. 7B** se muestra que el cerebro, la médula espinal, los GRD y el hígado manifiestan un aumento significativo en la actividad de la ARSA en los animales tratados con AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE.

En las **FIGS. 8A-D** se muestran los niveles de sulfátido en el cerebro (**FIG. 8A**), el hígado (**FIG. 8B**), el plasma (**FIG. 8C**) y el LCR (**FIG. 8D**) tras la administración del AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE a ratones ARSA^{-/-} en fase temprana (6 meses). Los niveles de sulfátido aumentaron significativamente en el cerebro, la médula espinal, el hígado, el plasma y el LCR después de la administración del AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE.

En las **FIGS. 9A-C** se muestra que el tratamiento con la administración del AAV.rh10-ARSA-FLAG-WPRE da como resultado una actividad de sulfatasa significativamente aumentada en el cerebro y la médula espinal de primates no humanos (PNH) a dosis bajas y altas de las partículas víricas. En la **FIG. 9A** se muestra la actividad de sulfatasa en el cerebro. En la **FIG. 9B** se muestra la actividad de sulfatasa en la médula espinal. En la **FIG. 9C** se muestran secciones cerebrales representativas tras la administración de las partículas víricas.

En las **FIGS. 10A y 10B** se muestra que la cápside del AAV1999 muestra una mayor expresión del transgén en el cerebro y la médula espinal de PNH, en comparación con el AAVrh.10. En la **FIG. 10A** se muestran los niveles de expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) después de la administración de las partículas del rAAV. En la **FIG 10B** se muestra que, en todas las muestras, la expresión de la GFP en el cerebro de PNH tratados con AAV1999 era un 93-123 % mayor, en comparación con PNH tratados con el AAVrh.10.

En la **FIG. 11** se muestra un mapa cromático de la expresión de la GFP en el cerebro después de la administración del AAV1999 o del AAVrh.10 a PNH.

En la **FIG. 12** se muestra que secciones cerebrales coincidentes representativas teñidas con anticuerpos contra la eGFP muestran una expresión robusta en los PNH tratados con el AAV1999, lo que demuestra una biodistribución superior en comparación con el AAVrh10 (**FIG. 12**).

En la **FIG. 13** se muestra la expresión de la GFP en la médula espinal y los GRD de los PNH después de la administración de partículas que comprenden AAV1999-GFP.

En la **FIG. 14** se muestra que la expresión de AAV1999-GFP en el corazón y el hígado fueron menores en comparación con AAVrh10-GFP en los PNH tratados.

En las **FIGS. 15A-B** se muestra la carga genómica del vector AAVrh10 y AAV1999 en diferentes tejidos después de la administración de partículas AAVrh10-GFP o de partículas AAV1999-GFP. En la **FIG. 15A** se muestran las cargas genómicas del vector en el cerebro, la médula espinal y los GRD. La carga genómica del vector en el cerebro, la médula espinal y los GRD son menores para AAV1999 que para AAVrh10. En la **FIG. 15B** se muestran las cargas genómicas del vector en hígado, corazón, pulmón, riñón y bazo después de la administración de AAVrh10-GFP o de AAV1999-GFP.

En la **FIG. 16** se muestra un desplazamiento a la izquierda en la correlación entre la expresión de la GFP (eje y) y los genomas de vectores tisulares (eje x), donde la correlación para AAV1999 (rojo) está desplazada a la izquierda, lo que indica una mayor expresión de proteína y una dosis tisular menor (~10 veces) del vector en comparación con AAVrh.10.

En la **FIG. 17** se muestra un mapa del vector de un plásmido particular para la producción de partículas del rAAV.

En la **FIG. 18** se muestra que los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA muestran una expresión persistente del ARNm de la hARSA. Trece meses después de la dosis, se sacrificaron los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) y se recogieron muestras de cerebro y de médula espinal. Se llevó a cabo una RT-PCRd para cuantificar la expresión del ARNm del hARSA, normalizada respecto al gen *Hprt* de ratón. Cada punto de datos representa un único animal. TF = tampón de

formulación. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. $* < 0.05$; $** < 0.01$; $*** < 0.001$; $**** < 0.0001$. natural+TF: ratones naturales a los que se les administró tampón de formulación; KO+TF: ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) a los que se les administró tampón de formulación; KO+AAV: ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) a los que se les administró AAV1999-ARSA.

En la **FIG. 19** se muestra que los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA muestran una actividad de sulfatasa mediada por la ARSA persistente a lo largo del tiempo. Trece meses después de la dosis, se sacrificaron los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) y se obtuvieron muestras de cerebro, médula espinal, GRD, nervio ciático, hígado y plasma. Se midió la actividad de sulfatasa mediada por la ARSA usando el ensayo de actividad de sulfatasa; datos normalizados respecto a la proteína total medida mediante un ensayo con BCA. Cada punto de datos representa un único animal. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. $* < 0.05$; $** < 0.01$; $*** < 0.001$; $**** < 0.0001$.

En la **FIG. 20** se muestra que los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA muestran una mejora significativa en los niveles de lisosulfátido en el cerebro y la médula espinal. Trece meses después de la dosis, se sacrificaron los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) y se recogieron muestras de cerebro, médula espinal, GRD, nervio ciático, hígado, plasma y LCR. Los niveles de sulfátido se midieron mediante una CL-EM. Datos normalizados respecto al peso de tejido: se convirtieron de ng/ml (50 μ l) a μ g/g. Los datos se convirtieron de (30 μ l) ng/ml a ng/ml (plasma), y de ng/ml (5 μ l) a ng/ μ l (LCR). Cada punto de datos representa un único animal. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. $* < 0.05$; $** < 0.01$; $*** < 0.001$; $**** < 0.0001$.

En la **FIG. 21** se muestra que los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA muestran mejoras significativas en la expresión de marcadores inflamatorios clave. Trece meses después de la dosis, se sacrificaron los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) y se recogieron muestras de cerebro y de médula espinal. Se realizó una RT-PCRd para cuantificar los niveles de *Gfap*, *Aif1* (gen para *Iba1*) y *Lamp1*, normalizados respecto al gen *Hprt* de ratón. Cada punto de datos representa un único animal. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. $* < 0.05$; $** < 0.01$; $*** < 0.001$; $**** < 0.0001$.

En la **FIG. 22** se muestra que el tratamiento de ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) con AAV1999-hARSA redujo significativamente los niveles de Nf-L en plasma a largo plazo (13 meses después de la dosis). Trece meses después de la dosis, se sacrificaron los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) y se recogieron muestras de plasma. Los niveles de Nf-L se midieron mediante la plataforma Quanterix. Cada punto de datos representa un único animal. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. $* < 0.05$; $** < 0.01$; $*** < 0.001$; $**** < 0.0001$.

En la **FIG. 23** se muestra que los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) muestran un deterioro progresivo de la audición con el tiempo; el tratamiento con AAV1999-ARSA impide la progresión del

fenotipo auditivo: A los 4, 7, 10 y 13 meses después de la dosis, se registraron las mediciones de la ABR mediante electrodos colocados en el cuero cabelludo de un animal anestesiado. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA bidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Los asteriscos indican el grupo KO+TF frente a KO+AAV. *= KO+TF frente a KO+AAV; * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 ; **** <0.0001 .

En las **FIGS. 24A-C** se muestra que los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA muestran una reversión significativa de la patología asociada con la MLD en el cerebro y la médula espinal: trece meses después de la dosis, se sacrificaron los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) y se recogieron muestras de cerebro (**FIG. 24A**), médula espinal (**FIG. 24B**) y GRD (**FIG. 24C**) para su evaluación histopatológica. Cada punto de datos representa un único animal. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 ; **** <0.0001

En las **FIGS. 25A-C** se muestra que los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA muestran una actividad de sulfatasa mediada por la ARSA persistente a lo largo del tiempo. Uno, dos, tres y seis meses después de la administración, se sacrificaron los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) y se recogieron muestras de cerebro (**FIG. 25A**). Se realizó una PCR digital (PCRd) para cuantificar los niveles del vector AAV1999-ARSA en cada tejido y se normalizaron respecto al gen *Rab1a*. (**FIGURA 25B** y **FIG 25C**) Se midió la actividad de sulfatasa mediada por la ARSA utilizando el kit de ensayo de actividad de sulfatasa (ab204731); datos normalizados respecto a la proteína total medida mediante un ensayo con BCA. Cada punto de datos representa un único animal. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA bidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

En las **FIGS. 26A-F** se muestra que los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA muestran una eliminación progresiva de las isoformas de sulfátido a lo largo del tiempo. Uno, dos, tres y seis meses después de la administración, se sacrificaron los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) y se recogieron muestras de cerebro. (**FIG. 26A**) El lisosulfátido, (**FIG. 26B**) la isoforma de C16-sulfátido y (**FIG. 26C**) la isoforma de C18-sulfátido se midieron mediante CL-EM. Datos normalizados respecto al peso de tejido: se convirtieron de ng/ml (50 μ l) a μ g/g. (**FIGS 26D-F**) para elucidar la naturaleza progresiva de la eliminación de sulfátido, los datos se presentan como un porcentaje del ST restante en animales KO+AAV, en relación con el ST promedio restante en animales KO+TF para (**FIG. 26D**) lisosulfátido, (**FIG. 26E**) la isoforma de C16-sulfátido y la (**FIG. 26F**) isoforma de C18-sulfátido. Cada punto de datos representa un único animal. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA bidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 ; **** <0.0001 .

En la **FIG. 27** se muestra que los niveles totales de sulfátido en el LCR y el plasma de los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) muestran una reducción significativa tras el tratamiento con AAV1999-ARSA. Uno, dos, tres y seis meses después de la administración, se sacrificaron los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) y se recogieron muestras de LCR y de plasma. Los niveles de sulfátido se midieron

mediante una CL-EM. Los datos se convirtieron de (30 μ l) ng/ml a ng/ml (plasma), y de ng/ml (5 μ l) a ng/ μ l (LCR). Cada punto de datos representa un único animal. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadística: ANOVA de dos vías con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

En la **FIG. 28** se muestra que el aumento inicial en los niveles de Nf-L en plasma disminuyó 6 meses después de la administración de AAV1999-ARSA en comparación con el grupo KO+TF. Se sacrificaron los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) uno, dos, tres y seis meses después de la administración, y se recogieron muestras de plasma. Los niveles de Nf-L se midieron mediante la plataforma Quanterix. Cada punto de datos representa un único animal. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 ; **** <0.0001 .

En las **FIGS. 29A-D** se muestran los hallazgos microscópicos de gravedad mínima observados en los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA cerebral. Se sacrificaron los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) uno, dos, tres y seis meses después de la administración y se recogieron muestras de cerebro para un análisis histopatológico. Cada punto de datos representa a un único animal; los hallazgos se clasifican según la incidencia y la gravedad de (**FIG. 29A**) la degeneración del tronco encefálico y el cerebelo, la (**FIG. 29B**) vacuolización, la (**FIG. 29C**) infiltración y la (**FIG. 29D**) degeneración del hipocampo. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadística: ANOVA de dos vías con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

En las **FIGS. 30A-E** se muestra que los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA muestran hallazgos de mínimos a leves en los GRD y los nervios periféricos. Uno, dos, tres y seis meses después de la administración, se sacrificaron los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) y se recogieron los GRD (**FIGS. 30A-C**), la médula espinal (**FIGS. 30D**) y el nervio ciático (**FIG. 30E**) para un análisis histopatológico. Cada punto de datos representa un único animal. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadística: ANOVA de dos vías con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

En la **FIG. 31** se muestra una biodistribución generalizada del vector AAV1999-ARSA dependiente de la dosis en cerebro de PNH. Cinco semanas después de la dosis del AAV1999-ARSA, se sacrificaron los PNH y se recogieron muestras. Se hemiseccionó el cerebro y se ultracongeló uno de los hemisferios; se recogieron 64 punciones de tejido de cada hemisferio que representaban la sustancia gris (47 punciones) y la blanca (17 punciones). Se realizó una PCR digital (PCRd) para cuantificar la concentración del vector AAV1999 en cada punción de tejido y se normalizó respecto al intrón génico TUBB1. Cada punto de datos representa la exposición VG/célula para esa punción de tejido, ya sea (**izquierda**) promediada para todos los PNH de ese grupo o (**derecha**) presentada por regiones cerebrales individuales. Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Dosis por PNH.

En la **FIG. 32** se muestra una expresión generalizada dependiente de la dosis del ARNm de la hARSA en 19 regiones cerebrales de sustancia gris en PNH. Cinco semanas después de la dosis, se sacrificaron los PNH y se recogieron muestras. Se hemiseccionó el cerebro y se ultracongeló uno de los

hemisferios; se recogieron 47 punciones de tejido de cada hemisferio que representaban 19 regiones de sustancia gris. Se realizó una PCR digital con transcripción inversa (RT-PCRd) para cuantificar la expresión del ARNm de hARSA, normalizada respecto al gen de la hipoxantina-fosforribosiltransferasa 1 (HPRT) de *Macaca fascicularis*. Cada punto de datos representa la expresión de hARSA normalizada en esa punción de tejido, ya sea (izquierda) promediada para todos los PNH de ese grupo o (derecha) presentada por regiones cerebrales individuales. Izquierda: diagrama de dispersión que representa la mediana; Derecha: las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

En las **FIGS. 33A-C** se muestra una expresión generalizada dependiente de la dosis de la proteína hARSA en 19 regiones cerebrales de sustancia gris en PNH. Cinco semanas después de la dosis del AAV1999-ARSA, se sacrificaron los PNH y se recogieron muestras. Se hemiseccionó el cerebro y se ultracongeló uno de los hemisferios; se recogieron 30 punciones de tejido de cada hemisferio que representaban la sustancia gris. Se realizó una CL-EM para cuantificar los niveles de la proteína ARSA humana. Cada punto de datos representa la cantidad de ARSA humana en esa punción de tejido, promedio de tres animales de ese grupo, ya sea presentado como (**FIG. 33A**) un promedio de todos los PNH de ese grupo, (**FIG. 33B**) presentado por regiones cerebrales individuales o (**FIG. 33C**) como una correlación con el genoma vectorial en esas punciones. Las barras de error representan la media con el error estándar. Los datos de $1e10$ VG/g ($7.5e11$ VG) y $3.3e10$ VG/g ($2.5e12$ VG) estaban por debajo de los límites de detección, y se han excluido. Izquierda: diagrama de dispersión que representa la mediana; Derecha: las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

En las **FIGS. 34A-B** se muestra cuán uniforme es la biodistribución dependiente de la dosis del vector AAV1999 y la expresión del ARNm de hARSA a lo largo del eje medular anterior-posterior. Cinco semanas después de la dosis del AAV1999-ARSA, se sacrificaron los PNH y se recogieron muestras. Se ultracongelaron ocho segmentos de la médula espinal con los GRD adyacentes, dos de cada uno de cervical, torácico superior, torácico inferior y lumbar, y se aisló el ADN/ARN. (**FIG. 34A**) Se realizó una PCR digital (PCRd) para cuantificar la concentración del vector AAV1999 y se normalizó respecto al intrón del gen TUBB1. (**FIG. 34B**) Se realizó una RT-PCRd para cuantificar la expresión del ARNm de hARSA, normalizada respecto al gen HPRT endógeno. Cada punto de datos representa la exposición VG/célula sin el fondo o la expresión de hARSA normalizada para esa muestra, promediada para todos los PNH de ese grupo. Las barras de error representan la media con el error estándar.

En la **FIG. 35** se muestra la biodistribución del vector AAV1999-ARSA hacia órganos viscerales y nervios periféricos. Cinco semanas después de la dosis, se sacrificaron los PNH y se recogieron muestras de órganos viscerales. Se realizó una PCR digital (PCRd) para cuantificar la concentración del vector AAV1999 en cada punción de tejido y se normalizó respecto al intrón génico TUBB1. Cada punto de datos representa la exposición VG/célula para esa punción de tejido, promediada para todos los PNH de ese grupo. Las barras de error representan la media con el error estándar.

En la **FIG. 36** se muestra la expresión de la proteína ARSA humana en cerebro de PNH que es probable que cumpla el umbral terapéutico a una dosis de $1e11$ y $3.3e11$ VG/g de peso de cerebro. Cinco semanas después de la dosis del AAV1999-ARSA, se sacrificaron los PNH y se recogieron muestras. Se hemiseccionó el cerebro y se ultracongeló uno de los hemisferios; se recogieron 30 punciones de tejido de cada hemisferio que representaban la sustancia gris. Se realizó una CL-EM para cuantificar los niveles de proteína humana y endógena cyARSA en *Macaca fascicularis*, y se presentó como porcentaje (huARSA/cyARSA). Cada punto de datos se representa como una relación de la proteína hARSA con respecto a la cyARSA de macaco cangrejero en esa punción de tejido, promedio de tres animales de ese grupo, ya sea presentado como un (**izquierda**) promedio de todos los PNH de ese grupo o (**derecha**) presentado por regiones individuales del cerebro. Las barras de error representan la media con el error estándar.

En las **FIGS. 37A-B** se muestra que las dosis eficaces de AAV1999-ARSA son terapéuticamente significativas. En la **FIG. 37A** se muestra que se realizó una CL-EM para cuantificar los niveles de proteína ARSA humana en 12 regiones cerebrales de 7 donantes de órganos sanos de 3-8 años de edad. Los tejidos se obtuvieron del banco de cerebros de los NIH. En la **FIG. 37B** se muestra que cinco semanas después de la dosis, se sacrificaron los PNH y se recogieron muestras. Se hemiseccionó el cerebro y se ultracongeló uno de los hemisferios; se recogieron 30 punciones de tejido de cada hemisferio que representaban la sustancia gris. Se realizó una CL-EM para cuantificar los niveles de la proteína ARSA humana. Se presenta la proteína ARSA media de cada grupo. El patrocinador presenta el porcentaje de ARSA humana en los PNH, en relación con la ARSA humana en el cerebro de donantes sanos de órganos. Las barras de error representan la media con el error estándar.

En la **FIG. 38** se muestra que no se observaron signos clínicos (deficiencias funcionales o conductuales) en los PNH en la semana 1 o la semana 5 (necropsia) después de la administración del AAV1999-ARSA en ninguno de los grupos de administración. Se analizaron 35 parámetros funcionales y conductuales de los PNH antes de la dosis, el día 7 después de la dosis y antes de la necropsia (semana 5 después de la dosis). Los hallazgos se clasificaron como "dentro del intervalo normal" o "hallazgos clínicos anormales". A continuación se representan gráficamente los hallazgos de la necropsia. Evaluación funcional y conductual realizada por CRL veterinario.

En las **FIGS. 39A-C** se muestra que la inyección intra-CM del AAV1999-ARSA se toleró bien, dio como resultado la elevación esperada de Nf-L; el AAV1999-ARSA no desencadenó respuestas inmunitarias innatas ni mediadas por células. Como se muestra en la **FIG. 39A**, antes de la dosis y en la necropsia, se recogió LCR y se analizaron los niveles de Nf-L mediante la plataforma Quanterix. Cada punto de datos representaba los niveles de Nf-L en esa muestra, promediados para todos los PNH de ese grupo. Como se muestra en la **FIG. 39B**, el plasma se aisló antes de la dosis y los días 2, -4, 7, 14 después de la dosis y en la necropsia. Se usó el ensayo Luminex para determinar la concentración de IL-1b, IL-1RA, IL-6, IL-10, IL-12/23 (p40), IL-15, IL-18, IFN-g, TNF-a, G-CSF, MCP-1, MIP-1b, GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13 e IL-17A. Cada punto de datos representaba la concentración de citocinas en esa muestra, promediada para todos los PNH de ese grupo. Como se muestra en la **FIG. 39C**, se sometieron PBMC aislados de

animales de los grupos con la administración de $1e11$ y $3.3e11$ VG/g de peso de cerebro a un ELISPOT con IFN- γ . Las barras de error representan la media con el error estándar; Estadísticas: ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de *Tukey y de #Dunnett.

En la **FIG. 40** se muestra que los PNH tratados con AAV1999-ARSA muestran hallazgos microscópicos leves en el cerebro a lo largo de cuatro dosis. Cinco semanas después de la dosis, se sacrificaron los PNH y se recogieron muestras. Se hemiseccionó el cerebro y se fijó un hemisferio para su evaluación histopatológica. Cada punto de datos representa la incidencia y la gravedad de los hallazgos microscópicos, promediadas para todos los animales de ese grupo de administración, medidas en las categorías de infiltración de monomorfonucleares, degeneración de las fibras neuronales o nerviosas, y gliosis. Las barras de error representan la media con el error estándar.

En las **FIGS. 41A-41B** se muestra que los PNH tratados con AAV1999-ARSA muestran hallazgos microscópicos moderados en nervios de médula espinal, radiales y femorales de los PNH; hallazgos notables en el nervio ciático. Cinco semanas después de la dosis, se sacrificaron los PNH y se recogieron muestras para una evaluación histopatológica. Cada punto de datos representa la incidencia y la gravedad de los hallazgos microscópicos, promediadas para todos los animales de ese grupo de administración, medidas en las categorías de infiltración de monomorfonucleares, degeneración de las fibras neuronales o nerviosas, y gliosis. Las barras de error representan la media con el error estándar.

En las **FIGS. 42A-42B** se muestra que los PNH tratados con AAV1999-ARSA muestran hallazgos leves en los GRD, cuando se promedian para 8 segmentos a lo largo del eje medular anterior-posterior. Cinco semanas después de la dosis, se sacrificaron los PNH y se recogieron muestras para una evaluación histopatológica. En los paneles de la izquierda, cada punto de datos representa la incidencia promedio y la gravedad de los hallazgos microscópicos promediados para los GRD de 8 segmentos medulares, en todos los animales de ese grupo de administración. En los paneles de la derecha, cada punto de datos representa la incidencia y la gravedad de los hallazgos microscópicos por GRD, promediados para todos los animales de ese grupo de administración. Las categorías medidas son (**FIG. 42A**) degeneración y necrosis y (**FIG. 42B**) infiltración de monomorfonucleares. Las barras de error representan la media con el error estándar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En algunos aspectos, la invención proporciona casetes de expresión, vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) y partículas víricas y composiciones farmacéuticas que comprenden el transgén que codifica un polipéptido ARSA. En aspectos adicionales, la invención proporciona métodos para tratar la leucodistrofia metacromática (MLD), por ejemplo, aumentando la actividad de la ARSA, reduciendo la acumulación de sulfátido en el cerebro, la médula espinal, el hígado, el plasma y el LCR, aumentando y normalizando la mielinización en el cuerpo calloso, aumentando las poblaciones de oligodendrocitos en el cerebro y mejorando la patología del SNC, lo que da lugar a la eliminación del sulfátido en las regiones cerebrales. En otros aspectos adicionales más, la invención proporciona kits para tratar la MLD en un individuo con un casete de expresión de la presente divulgación.

Definiciones

Un "vector", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un virus o un plásmido recombinante que comprende un ácido nucleico que se va a suministrar a una célula hospedadora, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente para referirse a un polímero de residuos aminoacídicos y no se limitan a una longitud mínima. Tales polímeros de residuos aminoacídicos pueden contener residuos aminoacídicos naturales o no naturales e incluyen, pero no se limitan a, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros y multímeros de residuos aminoacídicos. La definición abarca tanto las proteínas completas como los fragmentos de las mismas. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación y similares. Adicionalmente, para los fines de la presente divulgación, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), en la secuencia natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación mediante PCR.

Un "vector vírico recombinante" se refiere a un vector polinucleotídico recombinante que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, una secuencia de un ácido nucleico que no es de origen vírico). En el caso de vectores de AAV recombinantes, el ácido nucleico recombinante está flanqueado por al menos una, y en las realizaciones dos, secuencias de repetición terminal invertida (ITR).

Un "vector de AAV recombinante (vector de rAAV)" se refiere a un vector polinucleotídico que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, una secuencia de un ácido nucleico no procedente del AAV) que están flanqueadas por al menos una, y en las realizaciones dos, secuencias de repetición terminal invertidas (ITR) del AAV. Dichos vectores de rAAV pueden replicarse y empaquetarse en partículas víricas infecciosas cuando están presentes en una célula hospedadora que se ha infectado con un virus auxiliar adecuado (o que está expresando funciones auxiliares adecuadas) y que está expresando productos de los genes rep y cap del AAV (es decir, las proteínas Rep y Cap del AAV). Cuando se incorpora un vector de rAAV en un polinucleótido más grande (por ejemplo, en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido utilizado para clonación o transfección), entonces el vector de rAAV puede denominarse "provector", el cual puede "rescatarse" mediante replicación y encapsidación en presencia de funciones de empaquetamiento del AAV y funciones auxiliares adecuadas. Un vector de rAAV puede estar en cualquiera de varias formas, que incluyen, pero sin limitación, plásmidos, cromosomas artificiales lineales, complejo con lípidos, encapsulado dentro de liposomas, y encapsidado en una partícula vírica, particularmente una partícula de AAV. Un vector de rAAV puede empaquetarse en la cápside de un virus AAV para generar una "partícula de virus adenoasociado recombinante (partícula de rAAV)".

"Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se compara o en la que se introduce o incorpora. Por ejemplo, un polinucleótido introducido mediante técnicas de ingeniería genética en un tipo celular diferente es un polinucleótido heterólogo (y, cuando se expresa, puede codificar un polipéptido heterólogo). De manera similar, una secuencia celular

(por ejemplo, un gen o una porción del mismo) que se incorpora en un vector vírico es una secuencia de nucleótidos heteróloga con respecto al vector.

El término "transgén" se refiere a un polinucleótido que se introduce en una célula y es capaz de transcribirse en ARN y, opcionalmente, traducirse y/o expresarse en las condiciones apropiadas. En algunos aspectos, confiere una propiedad deseada a la célula en la que se introdujo, o conduce de otro modo a un resultado terapéutico o de diagnóstico deseado.

"Promotor de la actina β de pollo (CBA)" se refiere a una secuencia de polinucleótidos derivada de un gen de la actina β de pollo (por ejemplo, actina β de *Gallus*, representada por el GenBank Entrez Gene ID 396526). Como se utiliza en el presente documento, "promotor de la actina β de pollo" puede referirse a un promotor que contiene un elemento potenciador temprano de citomegalovirus (CMV), el promotor y el primer exón e intrón del gen de la actina β de pollo, y el aceptor de corte y empalme del gen de la globina beta de conejo, tal como las secuencias descritas en Miyazaki, J. *et al*(1989) *Gene* 79 (2): 269-77. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "promotor CAG" puede usarse indistintamente. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "potenciador temprano del CMV/promotor de la actina β de pollo (CAG)" puede usarse indistintamente.

Las expresiones "partículas de genoma (pg)", "equivalentes de genoma" o "copias de genoma", como se utilizan haciendo referencia a un título vírico, se refieren al número de viriones que contienen el genoma de ADN del AAV recombinante, independientemente de la infectividad o la funcionalidad. El número de partículas genómicas en una preparación de un vector particular puede medirse mediante procedimientos tales como los que se describen en los Ejemplos del presente documento o, por ejemplo, en Clark *et al.* (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk *et al.* (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278.

La expresión "genoma de vector (vg)", como se utiliza en el presente documento, puede referirse a uno o más polinucleótidos que comprenden un conjunto de secuencias polinucleotídicas de un vector, por ejemplo, un vector vírico. Un genoma de un vector puede encapsidarse en una partícula vírica. Dependiendo del vector vírico particular, el genoma de un vector puede comprender ADN monocatenario, ADN bicatenario o ARN monocatenario o ARN bicatenario. Un genoma de un vector puede incluir secuencias endógenas asociadas con un vector vírico particular y/o cualesquiera secuencias heterólogas insertadas en un vector vírico particular mediante técnicas recombinantes. Por ejemplo, un genoma de un vector de AAV recombinante puede incluir al menos una secuencia de ITR que flanquea un promotor, un relleno, una secuencia de interés (por ejemplo, un ARNi) y una secuencia de poliadenilación. Un genoma de un vector completo puede incluir un conjunto completo de las secuencias polinucleotídicas de un vector. En algunas realizaciones, el título de ácido nucleico de un vector vírico puede medirse en términos de vg/ml. Los métodos adecuados para medir este título se conocen en la técnica (por ejemplo, una PCR cuantitativa).

Las expresiones "unidad de infección (iu)", "partícula infecciosa" o "unidad de replicación", como se utilizan haciendo referencia a un título vírico, se refieren al número de partículas de vectores de AAV recombinantes infecciosos y competentes para la replicación como se mide mediante el ensayo del centro

infeccioso, también conocido como ensayo del centro de replicación, como se describe, por ejemplo, en McLaughlin *et al.* (1988) *J. Virol.*, 62: 1963-1973.

La expresión "unidad de transducción (tu)", como se utiliza en referencia a un título vírico, se refiere al número de partículas de vectores de AAV recombinantes infecciosos que dan como resultado la producción de un producto transgénico funcional como se mide en ensayos funcionales tales como los que se describen en los Ejemplos del presente documento o, por ejemplo, en Xiao *et al.* (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144: 113-124; o en Fisher *et al.* (1996) *J. Virol.*, 70: 520-532 (ensayo de LFU).

Una secuencia de "repetición terminal invertida" o "ITR" es una expresión bien comprendida en la técnica y se refiere a secuencias relativamente cortas que se encuentran en los extremos de los genomas víricos que están en orientación opuesta.

Una secuencia de "repetición terminal invertida (ITR) del AAV", una expresión bien comprendida en la técnica, es una secuencia de aproximadamente 145 nucleótidos que está presente en ambos extremos del genoma del AAV monocatenario natural. Los 125 nucleótidos más externos de la ITR pueden estar presentes en cualquiera de dos orientaciones alternativas, lo que conduce a una heterogeneidad entre los diferentes genomas del AAV y entre los dos extremos de un único genoma del AAV. Los 125 nucleótidos más externos también contienen varias regiones más cortas de autocomplementariedad (designadas regiones A, A', B, B', C, C' y D), lo que permite que se produzca un emparejamiento de bases intracatenario dentro de esta porción de la ITR.

Una "secuencia de resolución terminal" o "trs" es una secuencia en la región D de la ITR del AAV que es escindida por las proteínas rep del AAV durante la replicación del ADN vírico. Una secuencia de resolución terminal mutada es resistente a la escisión por parte de las proteínas rep del AAV.

Las "funciones auxiliares del AAV" se refieren a funciones que permiten que una célula hospedadora replique y empaquete el AAV. Las funciones auxiliares del AAV pueden proporcionarse en cualquier número de formas, que incluyen, pero sin limitación, virus auxiliares o genes de virus auxiliares que ayudan en la replicación y el empaquetamiento del AAV. En la técnica se conocen otras funciones auxiliares del AAV, tales como agentes genotóxicos.

Un "virus auxiliar" para un AAV se refiere a un virus que permite que el AAV (que es un parvovirus defectuoso) sea replicado y empaquetado por una célula hospedadora. Un virus auxiliar proporciona "funciones auxiliares" que permiten la replicación del AAV. Se han identificado varios de dichos virus auxiliares, incluidos adenovirus, herpesvirus y poxvirus, tales como virus de la variolovacuna y baculovirus. Los adenovirus abarcan una serie de subgrupos diferentes, aunque el que se utiliza más habitualmente es el Adenovirus de tipo 5 del subgrupo C (Ad5). Se conocen numerosos adenovirus de origen humano, mamífero no humano y aviar y están disponibles en depósitos tales como la ATCC. Los virus de la familia del herpes, que también están disponibles en depósitos tales como ATCC, incluyen, por ejemplo, los virus del herpes simple (VHS), los virus de Epstein-Barr (VEB), los citomegalovirus (CMV) y los virus de la pseudorrabia (VPR). Algunos ejemplos de funciones auxiliares de adenovirus para la replicación del AAV incluyen funciones de E1A, funciones de E1B, funciones de E2A, funciones de VA y funciones de E4orf6.

Los baculovirus disponibles de los depósitos incluyen el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica*.

Se dice que una preparación del rAAV está "sustancialmente exenta" de virus auxiliares si el cociente de partículas del AAV infecciosas con respecto a partículas de virus auxiliares infecciosas es de al menos aproximadamente 10^2 :1; al menos aproximadamente 10^4 :1; al menos aproximadamente 10^6 :1; o al menos aproximadamente 10^8 :1 o más. En algunas realizaciones, las preparaciones también están exentas de cantidades equivalentes de proteínas de virus auxiliares (es decir, proteínas que estarían presentes como resultado de dicho nivel de virus auxiliar si las impurezas de partículas de virus auxiliares indicadas anteriormente estuvieran presentes en forma alterada). La contaminación por proteínas víricas y/o celulares generalmente puede observarse como la presencia de bandas de tinción de Coomassie en geles de SDS (por ejemplo, la aparición de bandas distintas de las correspondientes a las proteínas de la cápside VPL, VP2 y VP3 del AAV).

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para conseguir unos resultados beneficiosos o deseados, incluidos los resultados clínicos (por ejemplo, la mejora de los síntomas, la consecución de criterios de valoración clínicos y similares). Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. En términos de una patología, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para mejorar, estabilizar o retrasar el desarrollo de una enfermedad.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Algunos mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros, y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

Como se utiliza en el presente documento, el "tratamiento" es un enfoque para obtener unos resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de la presente divulgación, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, el alivio de síntomas, la disminución del grado de la enfermedad, el estado estabilizado (por ejemplo, sin empeoramiento) de la enfermedad, la prevención de la propagación (por ejemplo, metástasis) de la enfermedad, el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado patológico y la remisión (ya sea parcial o total), tanto detectable como indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

La expresión "tratamiento profiláctico", como se utiliza en el presente documento, se refiere al tratamiento en donde se sabe o se sospecha que un individuo padece o corre el riesgo de padecer un trastorno pero no presenta síntomas ni síntomas mínimos del trastorno. Un individuo que se somete a tratamiento profiláctico puede ser tratado antes de la aparición de los síntomas.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí. Por ejemplo, la descripción que se refiere a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Como se utiliza en el presente documento, la forma singular de los artículos "un/o", "una" y "el/la" incluye referencias en plural a menos que se indique otra cosa.

Se entiende que los aspectos y realizaciones de la divulgación descritos en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste" y/o "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.

Casetes de expresión

En algunas realizaciones, el transgén que codifica un polipéptido ARSA tiene codones optimizados.

- 5 En algunas realizaciones, el transgén que codifica un polipéptido ARSA tiene codones optimizados para su expresión en una célula particular, tal como una célula eucariota. Las células eucariotas pueden ser las de o derivadas de un organismo particular, tal como un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, un ser humano, un ratón, una rata, un conejo, un perro o un primate no humano. En general, la optimización de codones se refiere a un proceso de modificación de una secuencia de ácido nucleico para una expresión
- 10 mejorada en las células hospedadoras de interés reemplazando al menos un codón de la secuencia natural por codones que se usan con mayor frecuencia o con la mayor frecuencia en los genes de esa célula hospedadora manteniendo al mismo tiempo la secuencia de aminoácidos natural. Diferentes especies muestran un sesgo particular para ciertos codones de un aminoácido particular. Se puede disponer fácilmente de tablas de uso de codones, por ejemplo, en la "Codon Usage Database", y estas tablas se
- 15 pueden adaptar de varias maneras (véase, por ejemplo, Nakamura, Y. *et al* (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: 292). También hay disponibles algoritmos informáticos para optimizar los codones de una secuencia particular para su expresión en una célula hospedadora particular, tales como Gene Forge (Aptagen; Jacobus, Pa.), DNA2.0, GeneArt (GA) o GenScript (GS) y un algoritmo GS combinado con reducción en el contenido de CpG. En algunas realizaciones, un transgén que codifica el polipéptido ARSA tiene los
- 20 codones optimizados utilizando el algoritmo GA. En algunas realizaciones, el transgén que codifica el polipéptido ARSA tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 1.

- En algunas realizaciones, el casete de expresión comprende además un intrón. Los expertos en la materia conocen una diversidad de intrones para su uso en la invención, e incluyen el intrón MVM, el intrón 1 truncado del F IX, la globina β SD/cadena pesada de inmunoglobina SA, el adenovirus SD/inmunoglobina
- 25 SA, el SV40 tardío SD/SA (19S/16S) y el adenovirus híbrido SD/IgG SA. (Wu *et al.* 2008, Kurachi *et al.*, 1995, Choi *et al.* 2014, Wong *et al.*, 1985, Yew *et al.* 1997, Huang y Gorman (1990). En algunas realizaciones, el intrón es un intrón híbrido de la actina β de pollo (CBA)/globina β de conejo. En algunas realizaciones, el intrón es un promotor e intrón híbrido de la actina β de pollo (CBA)/globina β de conejo donde se eliminan todos los sitios ATG para minimizar los falsos sitios de inicio de la traducción. En algunas
- 30 realizaciones, el intrón es un intrón MVM, un intrón 1 truncado del F IX, una globina β SD/cadena pesada de inmunoglobina SA, un adenovirus SD/inmunoglobina SA, un SD tardío/SA del SV40 (19S/16S) o un híbrido de adenovirus SD/IgG SA. En algunas realizaciones, el intrón es un intrón híbrido de la actina β de pollo (CBA)/globina β de conejo.

En algunas realizaciones, el casete de expresión comprende además una señal de poliadenilación.

- 35 En algunas realizaciones, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina, una señal de poliadenilación del SV40 o una TK pA del VHS. En algunas realizaciones, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación sintética como se describe en Levitt, N *et al.* (1989), *Genes Develop.* 3: 1019-1025.

En algunas realizaciones, el casete de expresión comprende un ácido nucleico de relleno. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno puede comprender una secuencia que codifica un polipéptido indicador. Como apreciarán los expertos en la materia, el ácido nucleico de relleno puede estar ubicado en una diversidad de regiones dentro del ácido nucleico, y puede comprender una secuencia continua (por ejemplo, un único ácido nucleico de relleno en una única ubicación) o múltiples secuencias (por ejemplo, más de un ácido nucleico de relleno en más de una ubicación (por ejemplo, 2 ubicaciones, 3 ubicaciones, etc.) dentro del ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno puede estar ubicado secuencia abajo del transgén que codifica el polipéptido ARSA. En realizaciones, el ácido nucleico de relleno puede estar ubicado secuencia arriba del transgén que codifica el polipéptido ARSA (por ejemplo, entre el promotor y el transgén). Como también apreciarán los expertos en la técnica, se pueden utilizar diversos ácidos nucleicos como ácido nucleico de relleno. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno comprende la totalidad o una parte de una secuencia de relleno de la alfa-1-antitripsina (AAT) humana o una secuencia de relleno (C16 humana) del clon 16 P1 del cromosoma C16 P1. En algunas realizaciones, la secuencia de relleno comprende todo o una parte de un gen. Por ejemplo, la secuencia de relleno comprende una parte de la secuencia de la AAT humana. Un experto en la técnica reconocería que se pueden utilizar diferentes partes de un gen (por ejemplo, la secuencia de la AAT humana) como fragmento de relleno. Por ejemplo, el fragmento de relleno puede ser del extremo 5' del gen, el extremo 3' del gen, el centro de un gen, una porción no codificante del gen (por ejemplo, un intrón), una región codificante del gen (por ejemplo, un exón) o una mezcla de partes no codificantes y codificantes de un gen. Un experto en la materia también reconocerá que toda o parte de la secuencia de relleno se puede utilizar como una secuencia de relleno. En algunas realizaciones, la secuencia de relleno se modifica para eliminar los codones ATG internos.

En algunas realizaciones, el casete de expresión se incorpora en un vector. En algunas realizaciones, el casete de expresión se incorpora en un vector vírico. En algunas realizaciones, el vector vírico es un vector del rAAV como se describe en el presente documento.

Vectores y partículas víricas

En ciertos aspectos, el casete de expresión para expresar un polipéptido ARSA (por ejemplo, un polipéptido ARSA humano natural) está contenido en un vector. En algunas realizaciones, la presente invención contempla el uso de un genoma vírico recombinante para la introducción de secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido ARSA para su empaquetamiento en una partícula vírica, por ejemplo, una partícula vírica descrita a continuación. El genoma vírico recombinante puede incluir cualquier elemento para establecer la expresión del polipéptido ARSA, por ejemplo, un promotor, una ITR, un elemento de unión al ribosoma, un terminador, un potenciador, un marcador de selección, un intrón, una señal de PoliA y/o un origen de replicación. A continuación se describen con mayor detalle elementos genómicos víricos y métodos de administración para partículas víricas ilustrativos.

Sistemas de administración no víricos

También pueden usarse métodos de transferencia génica no víricos convencionales para introducir ácidos nucleicos en células o tejidos objetivo. Los sistemas de suministro de vectores no víricos incluyen

plásmidos de ADN, ácido nucleico desnudo y ácido nucleico complejo con un sistema de suministro. Por ejemplo, el vector puede estar complejo con un lípido (por ejemplo, un lípido catiónico o neutro), un liposoma, un polication, una nanopartícula o un agente que aumenta la captación celular de ácido nucleico. El vector puede complejarse con un agente adecuado para cualquiera de los métodos de administración descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende una o más ITR víricas (por ejemplo, ITR del AAV).

Partículas víricas

En algunas realizaciones, el vector que comprende el casete de expresión para expresar un polipéptido ARSA (por ejemplo, un polipéptido ARSA humano natural) es un vector vírico recombinante. Algunos ejemplos de vectores víricos recombinantes incluyen AAV, lentivirus y adenovirus. En un aspecto, el vector vírico es un vector de un virus adenoasociado recombinante (rAAV). En algunas realizaciones, el casete de expresión para expresar un polipéptido ARSA (por ejemplo, un polipéptido ARSA humano natural) está flanqueado por una o más secuencias de repetición terminal invertida (ITR) del AAV. En algunas realizaciones, la partícula vírica es una partícula del AAV recombinante que comprende un casete de expresión para expresar un polipéptido ARSA flanqueado por una o dos ITR. En algunas realizaciones, el casete de expresión para expresar un polipéptido ARSA está flanqueado por dos ITR del AAV.

En algunas realizaciones, el casete de expresión para expresar un polipéptido ARSA de la presente divulgación unido operativamente componentes en la dirección de la transcripción, secuencias de control que incluyen secuencias de inicio y de terminación de la transcripción, formando así un casete de expresión. El casete de expresión está flanqueado en el extremo 5' y 3' por al menos una secuencia ITR del AAV funcional. Por "secuencias ITR del AAV funcionales" se entiende que las secuencias ITR actúan como se pretende para el rescate, la replicación y el empaquetamiento del virión del AAV. Véase Davidson *et al.*, *PNAS*, 2000, 97 (7) 3428-32; Passini *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77 (12): 7034-40; y Pechan *et al.*, *Gene Ther.*, 2009, 16: 10-16, todos los cuales se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad. Para poner en práctica algunos aspectos de la invención, los vectores recombinantes comprenden al menos todas las secuencias del AAV esenciales para la encapsidación y las estructuras físicas para la infección por parte del rAAV. Las ITR del AAV para su uso en los vectores de la invención no necesitan tener una secuencia de nucleótidos natural (por ejemplo, como se describe en Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5: 793-801) y pueden alterarse mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos o las ITR de AAV pueden derivar de cualquiera de los diferentes serotipos de AAV. Actualmente se conocen más de 40 serotipos de AAV y se siguen identificando nuevos serotipos y variantes de los serotipos existentes. Véase Gao *et al.*, *PNAS*, 2002, 99 (18): 11854-6; Gao *et al.*, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6; y Bossis *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810.

El uso de cualquier serotipo del AAV se considera dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, un vector de rAAV es un vector derivado de un serotipo de AAV, incluyendo sin limitación, ITR del AAV son AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAV.rh10, AAV11, AAV12, ITR de un AAV de cabra, un AAV bovino o un AAV de ratón, o similares. En algunas realizaciones, el ácido nucleico del AAV comprende una ITR de las ITR de AAV que

son AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, un AAV de cabra, un AAV bovino o un AAV de ratón, o similares. En ciertas realizaciones, las ITR del AAV son ITR del AAV2.

En algunas realizaciones, un vector puede incluir un ácido nucleico de relleno. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno puede codificar una proteína fluorescente verde (GFP). En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno puede estar ubicado en 3' respecto al casete de expresión para expresar un polipéptido ARSA de la presente divulgación.

En algunos aspectos, la invención proporciona partículas víricas que comprenden un genoma autocomplementario recombinante. En algunas realizaciones, el vector es un vector autocomplementario.

Se describen partículas víricas del AAV con genomas autocomplementarios y métodos de uso de genomas del AAV autocomplementarios en las Patentes de los Estados Unidos n.º 6,596,535; 7,125,717; 7,765,583; 7,785,888; 7,790,154; 7,846,729; 8,093,054; y 8,361,457; y en Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10: 2105-2111, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Un rAAV que comprende un genoma autocomplementario formará rápidamente una molécula de ADN bicatenaria en virtud de sus secuencias parcialmente complementarias (por ejemplo, complementando hebras codificantes y no codificantes de un transgén). En algunas realizaciones, la invención proporciona una partícula vírica de un AAV que comprende un genoma del AAV, en donde el genoma del rAAV comprende una primera secuencia polinucleotídica heteróloga (por ejemplo, la hebra codificante del polipéptido ARSA de la invención) y una segunda secuencia polinucleotídica heteróloga (por ejemplo, la hebra no codificante o antisentido del polipéptido ARSA de la presente divulgación), en donde la primera secuencia polinucleotídica heteróloga puede formar pares de bases intracatenarios con la segunda secuencia polinucleotídica a lo largo de la mayor parte o de la totalidad de su longitud.

En algunas realizaciones, la primera secuencia polinucleotídica heteróloga y una segunda secuencia polinucleotídica heteróloga se unen mediante una secuencia que facilita el emparejamiento de bases intracatenario; por ejemplo, una estructura de ADN en horquilla. En la técnica se conocen estructuras en horquilla, por ejemplo, en moléculas de ARNip. En algunas realizaciones, la primera secuencia polinucleotídica heteróloga y una segunda secuencia polinucleotídica heteróloga están unidas mediante una ITR mutada (por ejemplo, la ITR derecha). La ITR mutada comprende una delección de la región D que comprende la secuencia de resolución terminal. Como resultado, al replicar un genoma vírico del AAV, las proteínas rep no escindirán el genoma vírico en la ITR mutada y, como tal, un genoma vírico recombinante que comprende lo siguiente en orden de 5' a 3' se empaquetará en una cápside vírica: una ITR del AAV, incluyendo la primera secuencia polinucleotídica heteróloga secuencias reguladoras, la ITR del AAV mutada, el segundo polinucleótido heterólogo en orientación inversa con respecto al primer polinucleótido heterólogo, y una tercera ITR del AAV.

En algunas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico heterólogo y una segunda secuencia de ácido nucleico heterólogo están unidas mediante una ITR mutada (por ejemplo, la ITR derecha). En algunas realizaciones, la ITR comprende la secuencia polinucleotídica 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCT

CGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG -
 3' (SEQ ID NO: 15). La ITR mutada comprende una delección de la región D que comprende la secuencia
 de resolución terminal. Como resultado, al replicar un genoma vírico del AAV, las proteínas rep no
 escindirán el genoma vírico en la ITR mutada y, como tal, un genoma vírico recombinante que comprende
 lo siguiente en orden de 5' a 3' se empaquetará en una cápside vírica: una ITR del AAV, incluyendo la
 primera secuencia polinucleotídica heteróloga secuencias reguladoras, la ITR del AAV mutada, el segundo
 polinucleótido heterólogo en orientación inversa con respecto al primer polinucleótido heterólogo, y una
 tercera ITR del AAV.

En algunas realizaciones, el vector está encapsidado en una partícula vírica. En algunas
 realizaciones, la partícula vírica es una partícula vírica del AAV recombinante que comprende un vector del
 AAV recombinante. Se usan diferentes serotipos de AAV para optimizar la transducción de células objetivo
 particulares o para dirigirse a tipos de células específicos dentro de un tejido objetivo particular (por
 ejemplo, el cerebro o la médula espinal). Una partícula de rAAV puede comprender proteínas víricas y
 ácidos nucleicos víricos del mismo serotipo o de un serotipo mixto. Por ejemplo, en algunas realizaciones,
 una partícula de rAAV puede comprender proteínas de la cápside del AAV1999 modificadas y al menos
 una ITR del AAV2, o puede comprender proteínas de la cápside del AAV1999 modificadas y al menos una
 ITR del AAV1. En el presente documento se proporciona cualquier combinación de serotipos del AAV para
 la producción de una partícula del rAAV como si cada combinación se hubiera establecido expresamente
 en el presente documento.

Se sabe que la cápside del AAV (por ejemplo, AAV9, AAV1999, etc.) incluye tres proteínas de la
 cápside: VP1, VP2 y VP3. Estas proteínas contienen cantidades significativas de secuencias de
 aminoácidos superpuestas y secuencias aminoterminales únicas. Una cápside del AAV9 incluye 60
 subunidades dispuestas en una simetría icosaédrica. El AAV9 incluye las proteínas de la cápside de VP1,
 VP2 y VP3 en una relación de aproximadamente 5:5:50. Las proteínas VP del AAV9 son productos del
 marco abierto de lectura que codifica la proteína estructural del genoma, denominadas *cap*, VP1 (~82 kDa)
 y VP2 (~73 kDa), que son las proteínas minoritarias de la cápside, y VP3 (~61 kDa), la proteína principal
 de la cápside. Debido a la utilización tanto del corte y empalme alternativo como del barrido con pérdidas,
 cuando se expresan, las VP individuales comparten un extremo carboxílico que abarca toda la VP3,
 mientras que las VP1 y VP2 son extensiones de la VP3 aminoterminales. La VP1 y la VP2 comparten una
 región de ~73 aminoácidos que está extendida por ~137 aminoácidos adicionales en la VP1, denominada
 región única de la VP1 (VP1u). Véase Penzes et al., (2021), Journal of Virology 95 (19) e0084321. En
 algunas realizaciones de las proteínas de la cápside del AAV9 modificadas divulgadas en el presente
 documento, el péptido de direccionamiento (por ejemplo, la SEQ ID NO: 10) está incorporado en la VP1.
 En algunas realizaciones de las proteínas de la cápside del AAV9 modificadas divulgadas en el presente
 documento, el péptido de direccionamiento (por ejemplo, la SEQ ID NO: 10) está incorporado en la VP2.
 En algunas realizaciones de las proteínas de la cápside del AAV9 modificadas divulgadas en el presente
 documento, el péptido de direccionamiento (por ejemplo, la SEQ ID NO: 10) está incorporado en la VP3.
 En algunas realizaciones de las proteínas de la cápside del AAV9 modificadas divulgadas en el presente

documento, el péptido de direccionamiento (por ejemplo, la SEQ ID NO: 10) está incorporado en las VP1, VP2 y VP3.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona partículas del rAAV para la administración intra-LCR de un polipéptido ARSA que comprende una proteína de la cápside del AAV9 modificada que comprende un péptido de direccionamiento que dirige las partículas del rAAV al cerebro. En realizaciones particulares, el péptido de direccionamiento de las cápsides del AAV9 modificadas se inserta después del resto 588 de la proteína estructural del AAV9. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento tiene la SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento está flanqueado por secuencias conectoras en el extremo aminoterminal y el extremo carboxiterminal del péptido de direccionamiento. En algunas realizaciones, la secuencia conectora en el lado aminoterminal tiene la secuencia AAA. En algunas realizaciones, la secuencia conectora en el lado carboxiterminal es AS. En algunas realizaciones, la secuencia completa insertada después del resto 588 de la proteína estructural de la cápside del AAV9 tiene la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, la proteína estructural de la cápside del AAV9 modificada completa (VP1) tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, la proteína estructural de la cápside del AAV9 modificada completa (VP1) es al menos un 90 % (por ejemplo, al menos un 92 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 98.5 %, al menos un 99 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.5 % o al menos un 99.8 %) idéntica a la SEQ ID NO: 12, en donde la cápside estructural del AAV9 modificada comprende el péptido de direccionamiento de la SEQ ID NO: 10.

En algunas realizaciones, la cápside de la VP2 modificada de la cápside del AAV9 tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la cápside de la VP2 modificada del AAV9 tiene una secuencia que es al menos un 90 % (por ejemplo, al menos un 92 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 98.5 %, al menos un 99 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.5 % o al menos un 99.8 %) idéntica a la SEQ ID NO: 13, en donde la cápside estructural del AAV9 modificada comprende el péptido de direccionamiento de la SEQ ID NO: 10.

En algunas realizaciones, la cápside de la VP3 modificada de la cápside del AAV9 tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, la cápside de la VP3 modificada del AAV9 tiene una secuencia que es al menos un 90 % (por ejemplo, al menos un 92 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 98.5 %, al menos un 99 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.5 % o al menos un 99.8 %) idéntica a la SEQ ID NO: 14, en donde la cápside estructural del AAV9 modificada comprende el péptido de direccionamiento de la SEQ ID NO: 10.

Producción de partículas del AAV

Se conocen numerosos métodos en la técnica para la producción de vectores de rAAV, que incluyen transfección, producción de estirpes celulares estables y sistemas de producción de virus híbridos infecciosos que incluyen híbridos de adenovirus-AAV, híbridos de virus del herpes-AAV (Conway, JE *et al.*, (1997) *J. Virology* 71 (11): 8780-8789) e híbridos de baculovirus-AAV (Urabe, M. *et al.* (1935-1943) *Human Gene Therapy* 2011 (16): 2002; Kotin, R. (13) *Hum Mol Genet.* 20 (R1): R2-R6). Todos los cultivos de producción de rAAV para la producción de partículas de virus de rAAV requieren; 1) células hospedadoras

adecuadas, 2) función de virus auxiliar adecuada, 3) genes rep y cap del AAV y productos génicos; 4) un ácido nucleico (tal como un ácido nucleico terapéutico) flanqueado por al menos una secuencia ITR del AAV (por ejemplo, un genoma del AAV que codifica un polipéptido ARSA); y 5) medios y componentes de medios adecuados para sustentar la producción del rAAV. En algunas realizaciones, la célula hospedadora adecuada es una célula hospedadora de primate. En algunas realizaciones, la célula hospedadora adecuada es una estirpe celular derivada de un ser humano tal como células HeLa, A549, 293 o Perc.6. En algunas realizaciones, la función de virus auxiliar adecuada es proporcionada por un adenovirus natural o mutado (tal como un adenovirus sensible a la temperatura), un herpesvirus (VHS), un baculovirus o una construcción de plásmido que proporciona funciones auxiliares. En algunas realizaciones, los productos génicos de rep y cap del AAV pueden ser de cualquier serotipo de AAV. En general, aunque no es obligatorio, el producto génico rep del AAV es del mismo serotipo que las ITR del genoma del vector del rAAV siempre que los productos génicos rep puedan funcionar para replicarse y empaquetar el genoma del rAAV. Se pueden utilizar medios adecuados conocidos en la técnica para la producción de vectores de rAAV. Estos medios incluyen, sin limitación, los medios producidos por Hyclone Laboratories y JRH, que incluyen medio de Eagle modificado (MEM), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), formulaciones personalizadas tales como las descritas en la Patente de EE. UU. n.º 6,566,118 y los medios SF-900 II SFM tal como se describen en la Patente de EE. UU. n.º 6,723,551, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, particularmente con respecto a las formulaciones de medios personalizados para su uso en la producción de vectores de AAV recombinantes. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares del AAV son proporcionadas por adenovirus o el VHS. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares del AAV son proporcionadas por un baculovirus, y la célula hospedadora es una célula de insecto (por ejemplo, células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9)).

Un método para producir partículas de rAAV es el método de transfección triple. Brevemente, un plásmido que contiene un gen rep y un gen de la cápside, junto con un plásmido adenovírico auxiliar, puede transfectarse (por ejemplo, utilizando el método de fosfato de calcio) en una estirpe celular (por ejemplo, células HEK-293), y el virus puede recogerse y opcionalmente purificarse. Como tal, en algunas realizaciones, la partícula del rAAV se produjo mediante transfección triple de un ácido nucleico que codifica el vector de rAAV, un ácido nucleico que codifica los rep y cap del AAV y un ácido nucleico que codifica funciones de virus auxiliares del AAV en una célula hospedadora, en donde la transfección de los ácidos nucleicos a las células hospedadoras genera una célula hospedadora capaz de producir partículas del rAAV.

En algunas realizaciones, las partículas del rAAV pueden producirse mediante un método de estirpe celular productora (véase Martin *et al.*, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24: 253-269; Pub. PG de EE. UU. n.º US2004/0224411; y Liu, X.L. *et al.* (1999) *Gene Ther.* 6: 293-299). Brevemente, una estirpe celular (por ejemplo, una estirpe de células HeLa, 293, A549 o PERC.6) puede transfectarse de manera estable con un plásmido que contiene un gen rep, un gen de la cápside y un genoma del vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de un promotor heterólogo (por ejemplo, un polipéptido ARSA). Las estirpes celulares pueden analizarse para seleccionar un clon principal para la producción del

rAAV, que a continuación puede expandirse a un biorreactor de producción e infectarse con un virus auxiliar (por ejemplo, un adenovirus o un VHS) para iniciar la producción del rAAV. Posteriormente, se podrán recoger los virus, se podrán inactivar (por ejemplo, por calor) y/o eliminar los adenovirus y/o se podrán purificar las partículas del rAAV. Como tal, en algunas realizaciones, la partícula del rAAV fue producida por una estirpe celular productora que comprende uno o más de un ácido nucleico que codifica el vector de rAAV, un ácido nucleico que codifica los rep y cap del AAV, y un ácido nucleico que codifica las funciones de virus auxiliares del AAV. Como se describe en el presente documento, el método de la estirpe celular productora puede ser ventajoso para la producción de partículas de rAAV con un genoma sobredimensionado, en comparación con el método de transfección triple.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap del AAV y/o el genoma del rAAV se mantiene de manera estable en la estirpe celular productora. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap del AAV y/o el genoma del rAAV se introduce en uno o más plásmidos en una estirpe celular para generar una estirpe celular productora. En algunas realizaciones, el rep del AAV, el cap del AAV y el genoma del rAAV se introducen en una célula en el mismo plásmido. En otras realizaciones, el rep del AAV, el cap del AAV y el genoma del rAAV se introducen en una célula en diferentes plásmidos. En algunas realizaciones, una estirpe celular transfectada de forma estable con un plásmido mantiene el plásmido durante múltiples pases de la estirpe celular (por ejemplo, 5, 10, 20, 30, 40, 50 o más de 50 pases de la célula). Por ejemplo, el plásmido o los plásmidos pueden replicarse cuando se replica la célula, o el plásmido o los plásmidos pueden integrarse en el genoma celular. Se ha identificado una diversidad de secuencias que permiten que un plásmido se replique de forma autónoma en una célula (por ejemplo, una célula humana) (véase, por ejemplo, Krysan, P.J. *et al.* (1989) *Mol. Cell Biol.* 9: 1026-1033). En algunas realizaciones, el plásmido o plásmidos pueden contener un marcador de selección (por ejemplo, un marcador de resistencia a antibióticos) que permite la selección de células que mantienen el plásmido. Los marcadores de selección habitualmente utilizados en células de mamífero incluyen, sin limitación, blastomicina, G418, higromicina B, zeocina, puromicina y derivados de estas. Los métodos para introducir ácidos nucleicos en una célula son conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, transducción vírica, transfección catiónica (por ejemplo, utilizando un polímero catiónico tal como DEAE-dextrano o un lípido catiónico tal como lipofectamina), transfección con fosfato de calcio, microinyección, bombardeo con partículas, electroporación y transfección con nanopartículas (para más detalles, véase, por ejemplo, Kim, T.K. y Eberwine, J.H. (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 397: 3173-3178).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap del AAV y/o el genoma del rAAV está integrado de forma estable en el genoma de la estirpe celular productora. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap del AAV y/o el genoma del rAAV se introduce en uno o más plásmidos en una estirpe celular para generar una estirpe celular productora. En algunas realizaciones, el rep del AAV, el cap del AAV y el genoma del rAAV se introducen en una célula en el mismo plásmido. En otras realizaciones, el rep del AAV, el cap del AAV y el genoma del rAAV se introducen en una célula en diferentes plásmidos. En algunas realizaciones, el plásmido o plásmidos pueden contener un marcador de selección (por ejemplo, un marcador de resistencia a antibióticos) que

permite la selección de células que mantienen el plásmido. Los métodos para la integración estable de ácidos nucleicos en una diversidad de estirpes de células hospedadoras son conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse una selección repetida (por ejemplo, mediante el uso de un marcador de selección) para seleccionar las células que han integrado un ácido nucleico que contiene un marcador de selección (y los genes cap y rep del AAV y/o un genoma del rAAV). En otras realizaciones, los ácidos nucleicos pueden integrarse de una manera específica del sitio en una estirpe celular para generar una estirpe celular productora. En la técnica se conocen varios sistemas de recombinación específicos del sitio, tales como FLP/FRT (véase, por ejemplo, O'Gorman, S. *et al.* (1991) *Science* 251: 1351-1355), CRE/loxP (véase, por ejemplo, Sauer, B. y Henderson, N. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 5166-5170) y phi C31-att (véase, por ejemplo, Groth, A.C. *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 5995-6000).

En algunas realizaciones, la estirpe celular productora deriva de una estirpe celular de primate (por ejemplo, una estirpe celular de primate no humano, tal como una estirpe de células Vero o FRhL-2). En algunas realizaciones, la estirpe celular deriva de una estirpe celular humana. En algunas realizaciones, la estirpe celular productora deriva de células HeLa, 293, A549 o PERC.6® (Crucell). Por ejemplo, antes de la introducción y/o el mantenimiento/integración estable del ácido nucleico que codifica los genes rep y cap del AAV y/o el genoma del rAAV sobredimensionado en una estirpe celular para generar una estirpe celular productora, la estirpe celular es una estirpe de células HeLa, 293, A549 o PERC.6® (Crucell), o un derivado de la misma.

En algunas realizaciones, la estirpe celular productora está adaptada para un crecimiento en suspensión. Como se sabe en la técnica, normalmente las células dependientes del anclaje no son capaces de crecer en suspensión sin un sustrato, tal como perlas microportadoras. La adaptación de una estirpe celular para crecer en suspensión puede incluir, por ejemplo, cultivar la estirpe celular en un cultivo giratorio con una paleta de agitación, utilizando un medio de cultivo que carezca de iones de calcio y magnesio para evitar la aglutinación (y opcionalmente un agente antiespumante), utilizando un recipiente de cultivo revestido con un compuesto siliconizante, y seleccionar células del cultivo (en lugar de grandes grumos o en los lados del recipiente) en cada pase. Para una descripción adicional, véase, por ejemplo, el documento de preguntas frecuentes del ATCC (disponible en www.atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20suspension-40.aspx) y las referencias citadas en el mismo.

En algunos aspectos, se proporciona un método para producir cualquier partícula de rAAV como se divulga en el presente documento que comprende (a) cultivar una célula hospedadora en una condición en la que se produzcan partículas de rAAV, en donde la célula hospedadora comprende (i) uno o más genes de empaquetamiento del AAV, en donde cada uno de dichos genes de empaquetamiento del AAV codifica una proteína de replicación y/o de encapsidación del AAV; (ii) un pro-vector de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un ácido nucleico heterólogo, como se describe en el presente documento, flanqueado por al menos una ITR del AAV, y (iii) una función auxiliar del AAV; y (b) recuperar las partículas del rAAV producidas por la célula hospedadora. En algunas realizaciones, dicha al menos una ITR del AAV se selecciona del grupo que consiste en una ITR de los serotipos AAV1, AAV2, AAV3,

AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, un AAV de cabra, un AAV bovino o un AAV de ratón o similares. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el serotipo del AAV es AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10 o AAVrh10. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico del AAV comprende una ITR del AAV2. En algunas realizaciones, dicha proteína encapsidación se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV1999, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV de cabra, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino, cápside del AAV de ratón, serotipo rAAV2/HBoV1, proteínas de la cápside de AAV-XL32 o de AAV-XL32.1 o mutantes de las mismas. En algunas realizaciones, la proteína encapsidación es una proteína de la cápside del AAV8. En algunas realizaciones, las partículas del rAAV comprenden una cápside del AAV9 y un genoma recombinante que comprende ITR del AAV2 y un ácido nucleico que codifica un transgén/ácido nucleico terapéutico (por ejemplo, un casete de expresión para expresar un polipéptido ARSA). En algunas realizaciones, las partículas del rAAV comprenden una cápside del AAV1999 y un genoma recombinante que comprende ITR del AAV2 y un ácido nucleico que codifica un transgén/ácido nucleico terapéutico (por ejemplo, un casete de expresión para expresar un polipéptido ARSA).

Los medios de cultivo de producción del rAAV adecuados de la presente invención pueden complementarse con suero o proteínas recombinantes derivadas de suero a un nivel del 0.5 %-20 % (v/v o p/v). Alternativamente, como es conocido en la técnica, pueden producirse vectores del rAAV en unas condiciones sin suero que también pueden denominarse medios sin productos derivados de animales. Un experto habitual en la materia puede apreciar que los medios comerciales o personalizados diseñados para sustentar la producción de vectores del rAAV también pueden complementarse con uno o más componentes de cultivo celular conocidos en la técnica que incluyen, sin limitación, glucosa, vitaminas, aminoácidos y/o factores de crecimiento, con el fin de aumentar el título del rAAV en los cultivos de producción.

Los cultivos de producción de rAAV pueden cultivarse en una variedad de condiciones (en un amplio intervalo de temperatura, durante diversos períodos, y similares) adecuadas para la célula hospedadora particular que se está utilizando. Como es conocido en la técnica, los cultivos de producción de rAAV incluyen cultivos dependientes de la unión que pueden cultivarse en recipientes adecuados dependientes de la unión tales como, por ejemplo, botellas rotatorias, filtros de fibra hueca, microportadores, y biorreactores de lecho empaquetado o de lecho fluido. Los cultivos de producción de vectores del rAAV también pueden incluir células hospedadoras adaptadas para crecer en suspensión, tales como células HeLa, 293 y SF-9, que pueden cultivarse de una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, frascos de agitación, biorreactores de tanque agitado y sistemas desechables, tales como el sistema de bolsa Wave.

Las partículas de vectores de rAAV de la invención pueden recogerse a partir de cultivos de producción del rAAV mediante la lisis de las células hospedadoras del cultivo de producción o mediante recogida del medio gastado del cultivo de producción, siempre que las células se cultiven en unas

condiciones conocidas en la técnica para provocar la liberación de partículas del rAAV en el medio desde las células intactas, como se describe más completamente en la Patente de EE. UU. n.º 6,566,118). También se conocen en la técnica métodos adecuados de lisis de células e incluyen, por ejemplo, múltiples ciclos de congelación/descongelación, ultrasonidos, microfluidización y tratamiento con productos químicos, tales como detergentes y/o proteasas.

En una realización adicional, las partículas del rAAV se purifican. El término "purificado", como se utiliza en el presente documento, incluye una preparación de partículas del rAAV desprovistas de al menos algunos de los otros componentes que también pueden estar presentes cuando las partículas del rAAV se producen de manera natural o se preparan inicialmente a partir de las mismas. Por tanto, por ejemplo, pueden prepararse partículas del rAAV aisladas usando una técnica de purificación para enriquecerlas a partir de una fuente mixta, tal como un lisado de cultivo o un sobrenadante de cultivo de producción. El enriquecimiento puede medirse de una diversidad de formas, tales como, por ejemplo, mediante la proporción de partículas resistentes a DNasa (DRP) o copias de genoma (cg) presentes en una solución, o mediante infectividad, o puede medirse con respecto a una segunda sustancia potencialmente interferente presente en la mezcla fuente, tal como contaminantes, que incluyen contaminantes del cultivo de producción o contaminantes del proceso, que incluyen virus auxiliares, componentes del medio y similares.

En algunas realizaciones, la cosecha del cultivo de producción del rAAV se clarifica para eliminar los residuos de las células hospedadoras. En algunas realizaciones, la recolección del cultivo de producción se clarifica mediante filtración a través de una serie de filtros de profundidad que incluyen, por ejemplo, un filtro Millistak+ HC Pod de grado DOHC, un filtro Millistak+ HC Pod de grado A1HC y un filtro de membrana hidrófila de 0.2 µm Opticap XL10 Millipore Express SHC. La clarificación también se puede conseguir mediante diversas técnicas convencionales diferentes conocidas en la técnica, tales como centrifugación o filtración a través de cualquier filtro de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0.2 µm o superior conocido en la técnica.

En algunas realizaciones, la cosecha del cultivo de producción del rAAV se trata además con Benzonase® para digerir cualquier ADN de alto peso molecular presente en el cultivo de producción. En algunas realizaciones, la digestión con Benzonase® se realiza en unas condiciones convencionales conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, una concentración final de 1-2.5 unidades/ml de Benzonase® a una temperatura que varía desde la ambiente hasta 37 °C durante un periodo de 30 minutos a varias horas.

Las partículas del rAAV pueden aislarse o purificarse usando una o más de las siguientes etapas de purificación: centrifugación en equilibrio; filtración de intercambio aniónico en flujo continuo; filtración en flujo tangencial (TFF) para concentrar las partículas del rAAV; captura del rAAV por cromatografía con apatita; inactivación por calor del virus auxiliar; captura del rAAV por cromatografía de interacción hidrófoba; intercambio de tampón por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC); nanofiltración; y captura del rAAV por cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de afinidad. Estas etapas pueden utilizarse solas, en diversas combinaciones o en diferentes órdenes. En

algunas realizaciones, el método comprende todas las etapas en el orden que se describe más adelante. Algunos métodos para purificar partículas del rAAV se encuentran, por ejemplo, en Xiao *et al.*, (1998) Journal of Virology 72: 2224-2232; en las Patentes de EE. UU. n.º 6,989,264 y 8,137,948; y en el documento WO 2010/148143.

5 **Métodos de tratamiento**

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos para tratar la MLD y/o aumentar los niveles de un polipéptido ARSA en un individuo que lo necesita. En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para tratar la MLD administrando una cantidad eficaz de un casete de expresión (por ejemplo, un casete de expresión suministrado en una partícula de rAAV) para expresar un polipéptido ARSA de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el polipéptido ARSA es un polipéptido ARSA natural. El casete de expresión (por ejemplo, casete de expresión suministrado en una partícula de rAAV) para expresar un polipéptido ARSA puede administrarse a través de diversas vías. En algunas realizaciones, la administración incluye una inyección directa en la médula espinal y/o una administración intracerebral. En algunas realizaciones, la administración está en un sitio seleccionado entre el cerebro, el bulbo raquídeo, la protuberancia, el cerebelo, la cavidad intracraneal, las meninges que rodean el cerebro, la duramadre, la aracnoides, la piamadre, el líquido cefalorraquídeo (LCR) del espacio subaracnoideo que rodea al cerebro, núcleos cerebelosos profundos del cerebelo, el sistema ventricular del cerebro, el espacio subaracnoideo, el cuerpo estriado, la corteza, el tabique, el tálamo, el hipotálamo y el parénquima cerebral. En algunas realizaciones, la administración comprende una inyección intracerebroventricular en al menos un ventrículo lateral cerebral. En algunas realizaciones, la administración comprende una inyección intratecal en la región cervical, torácica y/o lumbar. En algunas realizaciones, la administración comprende una inyección intraestriatal. En algunas realizaciones, la administración comprende una inyección intratálámica.

Se administra una cantidad eficaz del rAAV (en algunas realizaciones en forma de partículas), dependiendo de los objetivos del tratamiento. Por ejemplo, cuando un porcentaje bajo de transducción puede conseguir el efecto terapéutico deseado, entonces el objetivo del tratamiento es generalmente llegar o superar este nivel de transducción. En algunos casos, este nivel de transducción se puede conseguir mediante la transducción de tan solo aproximadamente el 1 al 5 % de las células objetivo del tipo de tejido deseado, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 20 % de las células del tipo de tejido deseado, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 50 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 80 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 95 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 99 % de las células del tipo de tejido deseado. La composición del rAAV puede administrarse mediante una o más administraciones, ya sea durante el mismo procedimiento o separadas por días, semanas, meses o años. Se pueden utilizar una o más de cualquiera de las vías de administración descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, se pueden utilizar múltiples vectores para tratar al ser humano.

En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, el rAAV se administra mediante una inyección directa en la médula espinal, mediante una inyección intratecal o mediante una inyección intracisternal. En

algunas realizaciones, el rAAV se administra en más de una ubicación de la médula espinal o la cisterna magna. En algunas realizaciones, el rAAV se administra en más de una ubicación de la médula espinal. En algunas realizaciones, el rAAV se administra a uno o más de un espacio subaracnoideo lumbar, espacio subaracnoideo torácico y un espacio subaracnoideo cervical de la médula espinal. En algunas realizaciones, el rAAV se administra en la cisterna magna.

Los métodos para identificar las células transducidas por partículas víricas de AAV son conocidos en la técnica; por ejemplo, pueden utilizarse la inmunohistoquímica o el uso de un marcador, tal como la proteína fluorescente verde mejorada, para detectar la transducción de partículas víricas; por ejemplo, partículas víricas que comprenden una cápside de rAAV con una o más sustituciones de aminoácidos.

En algunas realizaciones, se administra una cantidad eficaz de partículas del rAAV en más de una ubicación simultánea o secuencialmente. En otras realizaciones, se administra una cantidad eficaz de partículas del rAAV en una única ubicación más de una vez (por ejemplo, repetidas). En algunas realizaciones, múltiples inyecciones de partículas víricas del rAAV no se separan más de una hora, dos horas, tres horas, cuatro horas, cinco horas, seis horas, nueve horas, doce horas o 24 horas.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para tratar a un ser humano con MLD mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un vector vírico recombinante que codifica un polipéptido ARSA de la presente divulgación. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un vector vírico recombinante que codifica un polipéptido ARSA de la presente divulgación para tratar la MLD en un individuo que lo necesita. En algunas realizaciones, el título vírico de las partículas víricas (por ejemplo, partículas del rAAV) es de al menos aproximadamente cualquiera de 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 10×10^{12} , 11×10^{12} , 15×10^{12} , 20×10^{12} , 25×10^{12} , 30×10^{12} o 50×10^{12} copias de genoma/ml. En algunas realizaciones, el título vírico de las partículas víricas (por ejemplo, partículas del rAAV) es de aproximadamente cualquiera de 5×10^{12} a 6×10^{12} , de 6×10^{12} a 7×10^{12} , de 7×10^{12} a 8×10^{12} , de 8×10^{12} a 9×10^{12} , de 9×10^{12} a 10×10^{12} , de 10×10^{12} a 11×10^{12} , de 11×10^{12} a 15×10^{12} , de 15×10^{12} a 20×10^{12} , de 20×10^{12} a 25×10^{12} , de 25×10^{12} a 30×10^{12} , de 30×10^{12} a 50×10^{12} o de 50×10^{12} a 100×10^{12} copias de genoma/ml. En algunas realizaciones, el título vírico de las partículas víricas (por ejemplo, partículas del rAAV) es de aproximadamente cualquiera de 5×10^{12} a 10×10^{12} , de 10×10^{12} a 25×10^{12} o de 25×10^{12} a 50×10^{12} copias de genoma/ml. En algunas realizaciones, el título vírico de las partículas víricas (por ejemplo, partículas del rAAV) es de al menos aproximadamente cualquiera de 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 10×10^9 , 11×10^9 , 15×10^9 , 20×10^9 , 25×10^9 , 30×10^9 o 50×10^9 unidades de transducción/ml. En algunas realizaciones, el título vírico de las partículas víricas (por ejemplo, partículas del rAAV) es de aproximadamente cualquiera de 5×10^9 a 6×10^9 , de 6×10^9 a 7×10^9 , de 7×10^9 a 8×10^9 , de 8×10^9 a 9×10^9 , de 9×10^9 a 10×10^9 , de 10×10^9 a 11×10^9 , de 11×10^9 a 15×10^9 , de 15×10^9 a 20×10^9 , de 20×10^9 a 25×10^9 , de 25×10^9 a 30×10^9 , de 30×10^9 a 50×10^9 o de 50×10^9 a 100×10^9 unidades de

transducción/ml. En algunas realizaciones, el título vírico de las partículas víricas (por ejemplo, partículas del rAAV) es de aproximadamente cualquiera de 5×10^9 a 10×10^9 , de 10×10^9 a 15×10^9 , de 15×10^9 a 25×10^9 o de 25×10^9 a 50×10^9 unidades de transducción/ml. En algunas realizaciones, el título vírico de las partículas víricas (por ejemplo, partículas del rAAV) es de al menos cualquiera de aproximadamente 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 10×10^{10} , 11×10^{10} , 15×10^{10} , 20×10^{10} , 25×10^{10} , 30×10^{10} , 40×10^{10} o 50×10^{10} unidades infecciosas/ml. En algunas realizaciones, el título vírico de las partículas víricas (por ejemplo, partículas del rAAV) es de al menos cualquiera de aproximadamente 5×10^{10} a 6×10^{10} , de 6×10^{10} a 7×10^{10} , de 7×10^{10} a 8×10^{10} , de 8×10^{10} a 9×10^{10} , de 9×10^{10} a 10×10^{10} , de 10×10^{10} a 11×10^{10} , de 11×10^{10} a 15×10^{10} , de 15×10^{10} a 20×10^{10} , de 20×10^{10} a 25×10^{10} , de 25×10^{10} a 30×10^{10} , de 30×10^{10} a 40×10^{10} , de 40×10^{10} a 50×10^{10} o de 50×10^{10} a 100×10^{10} unidades infecciosas/ml. En algunas realizaciones, el título vírico de las partículas víricas (por ejemplo, partículas del rAAV) es de al menos cualquiera de aproximadamente 5×10^{10} a 10×10^{10} , de 10×10^{10} a 15×10^{10} , de 15×10^{10} a 25×10^{10} o de 25×10^{10} a 50×10^{10} unidades infecciosas/ml. En algunas realizaciones, las partículas víricas son partículas del rAAV. En algunas realizaciones, las partículas del rAAV comprenden una proteína de la cápside del AAV1999.

En algunas realizaciones, la dosis de partículas víricas administrada al individuo es de al menos aproximadamente cualquiera de 1×10^8 a aproximadamente 6×10^{13} copias de genoma/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis de partículas víricas administrada al individuo es de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 6×10^{13} copias de genoma/kg de peso corporal. . En algunas realizaciones, la dosis de partículas víricas administrada al individuo es aproximadamente cualquiera de 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 13×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} o 1×10^{13} copias de genoma/kg de peso corporal.

En algunas realizaciones, la cantidad total de partículas víricas administrada al individuo es de al menos aproximadamente cualquiera de 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{14} copias genómicas. En algunas realizaciones, la cantidad total de partículas víricas administrada al individuo es de aproximadamente cualquiera de 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{14} copias genómicas. En algunas realizaciones, la cantidad total de partículas víricas administrada al individuo es de aproximadamente cualquiera de 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 13×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , 9×10^{13} o 1×10^{14} copias genómicas.

Las composiciones de la invención (por ejemplo, partículas víricas recombinantes que comprenden un vector que codifica un polipéptido ARSA de la presente divulgación) pueden usarse solas o junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar la MLD. El intervalo entre la administración secuencial puede ser en términos de al menos (o, como alternativa, menos de) minutos, horas o días.

Se administra una cantidad eficaz del rAAV (en algunas realizaciones en forma de partículas), dependiendo de los objetivos del tratamiento. Por ejemplo, cuando un porcentaje bajo de transducción puede conseguir el efecto terapéutico deseado, entonces el objetivo del tratamiento es generalmente llegar

o superar este nivel de transducción. En algunos casos, este nivel de transducción puede lograrse mediante la transducción de solo aproximadamente el 1 al 5 % de las células objetivo, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 20 % de las células del tipo de tejido deseado, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 50 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 80 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 95 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 99 % de las células del tipo de tejido deseado. La composición del rAAV puede administrarse mediante una o más administraciones, ya sea durante el mismo procedimiento o separadas por días, semanas, meses o años. En algunas realizaciones, se pueden utilizar múltiples vectores para tratar al mamífero (por ejemplo, un ser humano).

En algunas realizaciones, una composición del rAAV de la presente divulgación puede utilizarse para la administración a un ser humano. En algunas realizaciones, una composición del rAAV de la presente divulgación puede utilizarse para la administración pediátrica. En algunas realizaciones, se administra una cantidad eficaz del rAAV (en algunas realizaciones en forma de partículas) a un paciente que tiene menos de un mes, menos de dos meses, menos de tres meses, menos de cuatro meses, menos de cinco meses, menos de seis meses, menos de siete meses, menos de ocho meses, menos de nueve meses, menos de diez meses, menos de once meses, menos de un año, menos de 13 meses, menos de 14 meses, menos de 15 meses, menos de 16 meses, menos de 17 meses, menos de 18 meses, menos de 19 meses, menos de 20 meses, menos de 21 meses, menos de 22 meses, menos de dos años, menos de tres años, menos de cinco años o menos de siete años de edad.

En algunas realizaciones, una composición del rAAV de la presente divulgación puede utilizarse para la administración a un adulto joven. En algunas realizaciones, se administra una cantidad eficaz del rAAV (en algunas realizaciones en forma de partículas) a un paciente que tiene menos de 12 años, menos de 13 años, menos de 14 años, menos de 15 años, menos de 16 años, menos de 17 años, menos de 18 años, menos de 19 años, menos de 20 años, menos de 21 años, menos de 22, menos de 23 años, menos de 24 años o menos de 25 años de edad.

Kits o artículos de fabricación

Los casetes de expresión (por ejemplo, un casete de expresión para expresar un polipéptido ARSA, tal como un polipéptido ARSA humano natural), vectores de rAAV, partículas y/o composiciones farmacéuticas como se describen en el presente documento pueden estar contenidos dentro de un kit o un artículo de fabricación, por ejemplo, diseñado para usar en uno de los métodos de la invención como se describe en el presente documento.

Generalmente, el sistema comprende una cánula, una o más jeringas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más), y uno o más líquidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más) adecuados para su uso en los métodos de la invención.

La jeringa puede ser cualquier jeringa adecuada, siempre que pueda conectarse a la cánula para la administración de un líquido. En algunas realizaciones, el sistema tiene una jeringa. En algunas realizaciones, el sistema tiene dos jeringas. En algunas realizaciones, el sistema tiene tres jeringas. En algunas realizaciones, el sistema tiene cuatro o más jeringas. Los líquidos adecuados para usar en los

métodos de la invención incluyen los descritos en el presente documento, por ejemplo, uno o más líquidos, comprendiendo cada uno una cantidad eficaz de uno o más vectores como se describe en el presente documento, y uno o más líquidos que comprenden uno o más agentes terapéuticos.

En algunas realizaciones, el kit comprende un único líquido (por ejemplo, un líquido farmacéuticamente aceptable que comprende una cantidad eficaz del vector). En algunas realizaciones, el kit comprende 2 líquidos. En algunas realizaciones, el kit comprende 3 líquidos. En algunas realizaciones, el kit comprende 4 o más líquidos. Un líquido puede incluir un diluyente, un tampón, un excipiente o cualquier otro líquido descrito en el presente documento o conocido en la técnica adecuado para administrar, diluir, estabilizar, tamponar o transportar de otro modo un casete de expresión para expresar un polipéptido ARSA o una composición de vector del rAAV de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el kit comprende uno o más tampones, por ejemplo, una solución acuosa de pH tamponado. Algunos ejemplos de tampones pueden incluir, sin limitación, tampones de fosfato, citrato, Tris, HEPES y otros tampones de ácidos orgánicos.

En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente. Algunos recipientes adecuados pueden incluir, por ejemplo, viales, bolsas, jeringas y frascos. El recipiente puede estar hecho de uno o más de un material tal como vidrio, metal o plástico. En algunas realizaciones, el recipiente se usa para contener una composición del rAAV de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el recipiente también puede contener un líquido y/u otro agente terapéutico.

En algunas realizaciones, el kit comprende un agente terapéutico adicional con una composición del rAAV de la presente divulgación. En algunas realizaciones, se pueden mezclar la composición del rAAV y el agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, la composición del rAAV y el agente terapéutico adicional pueden mantenerse separados. En algunas realizaciones, la composición del rAAV y el agente terapéutico adicional pueden estar en el mismo recipiente. En algunas realizaciones, la composición del rAAV y el agente terapéutico adicional pueden estar en diferentes recipientes. En algunas realizaciones, la composición del rAAV y el agente terapéutico adicional pueden administrarse simultáneamente. En algunas realizaciones, la composición del rAAV y el agente terapéutico adicional pueden administrarse el mismo día. En algunas realizaciones, la composición del rAAV puede administrarse en el plazo de un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses o seis meses de la administración del agente terapéutico adicional.

En algunas realizaciones, el kit comprende un agente terapéutico para suprimir temporalmente el sistema inmunitario antes de la administración del AAV. En algunas realizaciones, los pacientes se inmunosuprimen temporalmente poco antes y después de la inyección del virus para inhibir la respuesta de los linfocitos T a las partículas del AAV (por ejemplo, véase Ferreira *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 25: 180-188, 2014). En algunas realizaciones, el kit proporciona además ciclosporina, micofenolato de mofetilo y/o metilprednisolona.

Las partículas y/o las composiciones del rAAV de la invención pueden envasarse además en kits que incluyen instrucciones de uso. En algunas realizaciones, los kits comprenden además un dispositivo

para la administración (por ejemplo, cualquier tipo de administración parenteral descrito en el presente documento) de las composiciones de partículas del rAAV. En algunas realizaciones, las instrucciones de uso incluyen instrucciones de acuerdo con uno de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, las instrucciones están impresas en una etiqueta proporcionada con (por ejemplo, fijada a) un recipiente. En algunas realizaciones, las instrucciones de uso incluyen instrucciones para administrar a un individuo (por ejemplo, un ser humano) una cantidad eficaz de partículas del rAAV, por ejemplo, para tratar la MLD en un individuo.

EJEMPLOS

La invención se comprenderá mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Se entiende que los ejemplos y las realizaciones que se describen en el presente documento tienen únicamente fines ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos a los expertos en la materia, que se incluirán dentro del espíritu y el ámbito de esta solicitud y del alcance de las realizaciones adjuntas.

Métodos generales

Homogeneización del tejido

Los tejidos se homogeneizaron con tampón Tris 10 mM EDTA 1 mM frío añadido en tubos de homogeneización con perlas cerámicas de 1.4 mm en perlas Omni ruptor refrigeradas: ciclo de 20 segundos a 4.7 oscilaciones/s. Después de la homogeneización, se toman alícuotas para el ensayo posterior.

Solubilización del tejido para analizar la actividad de sulfatasa

A los tejidos homogeneizados se añadió Nonidet P-40 hasta una concentración final del 0.1 %, se permitió que se solubilizara a 4 °C durante 1.5 horas en un agitador orbital y a continuación se centrifugó a 18 000 x g durante 20 minutos. Se retiró el sobrenadante y se transfirió a un tubo Eppendorf en hielo.

Ensayo del BCA

La concentración de proteína total se determinó mediante el ensayo con BCA (ácido bicinconínico) (Thermo Scientific 23227) utilizando 10 µl de sobrenadante diluido en agua. Detección colorimétrica del catión cuproso (Cu^{1+}) con ácido bicinconínico (BCA) mediante absorbancia a 562 nm. Molecular Devices SpectraMax 340PC-384 con el programa informático SoftMax Pro versión 5.4.4 utilizado para leer la placa de microtitulación de 96 pocillos.

Actividad de sulfatasa

Se sometieron a ensayo diez microlitros de sobrenadante clarificado para determinar la actividad de sulfatasa total usando el ensayo de actividad de sulfatasa para 4-nitrocatecol (PNC) hidrolizado a partir de sustrato de sulfato de 4-nitrocatecol (PNCS). (Abcam Ab204731). Actividad determinada con 4-nitrocatecol hidrolizado (PNC) de la muestra con respecto a la curva patrón de PNC y lectura de la absorbancia a 515 nm. Actividad de sulfatasa notificada como mU/mg (nmol/min/mg). Molecular Devices SpectraMax 340PC-384 con el programa informático SoftMax Pro versión 5.4.4 utilizado para leer la placa de microtitulación de 96 pocillos.

Extracción de lípidos

Se extrajo una alícuota de homogeneizado (o líquido) de tejido con solución de extracción 20-100X (formiato de amonio 5 mM, ácido fórmico al 0.2 % en acetonitrilo:metanol (70:30), complementado con 10 ng/ml de C17-sulfátido). Después de mezclar vigorosamente durante 10 min, las muestras se dejaron reposar durante 5 min y se agitaron vorticialmente de nuevo rápidamente (30 s). Todas las muestras se centrifugaron a 8400 rpm durante 10 min a 4 °C. Se transfirió una alícuota del sobrenadante (200 µl) a un vial Q-sert desactivado para el análisis mediante CL-EM.

Se preparó la curva patrón (intervalo de linealidad de 0.03-1000 ng/ml, diluciones dobles en serie) en la misma solución de extracción utilizando sulfátidos con una longitud de cadena C16, C18, C24 y C24:l (Matreya) y de sulfátido de 2R-OH C18 y lisosulfátido (Avanti).

10 **Análisis mediante CL-EM de los sulfátidos**

Se acopló un sistema Acquity UPLC de Waters (Milford, MA) a un sistema de espectrómetro de masas Qtrap 6500 (Framingham, MA) equipado con una fuente de ESI operada en modo de ion negativo con los siguientes parámetros: cortina de gas 25.0; voltaje de electroionización -4.5 kV; temperatura 500 °C; gas fuente de los iones: 50 y 70; potencial de desagrupamiento -80 V; potencial de entrada -10 V; energía de colisión -155 V; y potencial de salida de la celda de colisión -15 V.

Las especies de sulfátido se separaron con una Acquity UPLC BEH Amide de Waters (1.7 µ, 2.1 × 100 mm, P/N: 186004801). El tomamuestras automático y el horno de columna se mantuvieron a 10 °C y 20 °C, respectivamente. La fase móvil consistió en disolvente A:formiato de amonio 5 mM en 95:5 de acetonitrilo:agua, y disolvente B:formiato de amonio 5 mM en 90:10 de metanol:agua.

El programa de gradiente comenzó con un 0 % de B y se mantuvo durante 2 min, seguido de una curva lineal del 0 % de B al 100 % de B. Después de 1 min más al 100 % de B, se volvió a equilibrar a un 0 % de B. Todas las especies de sulfátido se normalizaron con respecto al patrón interno de C17-sulfátido y se calcularon mediante la curva patrón de los sulfátidos patrón correspondientes.

Tinción de la mielina con Nitroblue

Transferir las secciones a una placa de 12 pocillos y realizar todas las etapas en secciones de flotación libre. Lavar la sección 2 × 1 min con TBA en el agitador. Incubar en solución de Nitroblue (n.º de cat. de Sigma N5374) durante 1 hora y aclarar 2 × 5 min con TBA en un agitador. Incubar las secciones en tinción DAB (n.º de cat. de Sigma D4293) durante 1 hora y enjuagar 2 × 1 en agua RO. Enjuagar las secciones con PBS durante 1 min, montar en PBS y secar al aire los portaobjetos. Contrateñir con solución Roja Neutra durante 2 min, lavar 2 × 2 en agua RO. Enjuagar los portaobjetos durante 1 min con alcohol reactivo al 95 %, 2 × 2 min con alcohol reactivo 100 %, 2 × 2 min con xileno, cubrir con medio de montaje Acrytol.

ELISA DE LA GFP

La medición de la proteína GFP se completó usando el kit GFP SimpleStep ELISA® de Abcam (ab171581). Es imprescindible leer el prospecto del protocolo proporcionado con cada lote del kit ya que algunas concentraciones de reactivos cambian según los diferentes lotes, en particular el patrón.

Antes de comenzar, se equilibraron todos los componentes del kit a la temperatura ambiente (18-25 °C), al menos 30 minutos. Una alícuota de homogeneizado tisular procesado con proteína se

descongeló en hielo. Se prepararon reactivos y patrones de trabajo nuevos, según las instrucciones del kit. Las muestras se diluyeron en tampón de extracción celular completo de la siguiente manera: Sustancia gris 1:5, Médula espinal 1:5, Corazón: 1:5, hígado 1:20. Se añadieron la muestra diluida y el patrón a los pocillos apropiados, seguido de cóctel de anticuerpos a cada pocillo. La placa se selló, se incubó a la temperatura ambiente durante 1 hora, agitando a 400 RPM. Los pocillos se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se garantizó la completa eliminación del líquido. Se añadió solución de TMB a cada pocillo y se incubó en la oscuridad durante 10 minutos a la temperatura ambiente, agitando a 400 RPM. Rápidamente después de la incubación con TMB, se añadió solución de detención a cada pocillo y se mezcló en un agitador de placas durante 1 minuto. La placa se leyó a 450 nm con un lector de placas SpectraMax (Molecular Devices) utilizando el programa informático Softmax.

IHQ DEL FLAG

Los portaobjetos de FFPE con cerebro de PNH se trataron en solución de EDTA (pH 9.0) durante 20 minutos a 90 °C para recuperar el antígeno, seguido de un bloqueo con peróxido de hidrógeno al 3 % durante 5 minutos. A continuación, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo Flag DDK (Abcam ab205606) a una dilución de 1:200 en diluyente de anticuerpo (Cell Signaling, n.º 8112) durante una hora a la temperatura ambiente, seguido de la incubación del anticuerpo secundario anti-HRP de conejo (Abcam ab6721). El desarrollo de color para la señal **Flag DDK** se consiguió incubando los portaobjetos en solución de DAB durante 3 minutos a la temperatura ambiente, y posteriormente los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina para la tinción de núcleos.

IHQ DE LA GFP

Los portaobjetos de FFPE con cerebro de PNH se trataron en solución de EDTA (pH 9.0) durante 20 minutos a 90 °C para recuperar el antígeno, y posteriormente se bloquearon con peróxido de hidrógeno al 3 % durante 10 minutos, seguido de suero de caballo al 5 % durante 45 minutos a la temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo contra la GFP (ThermoFisher A-11122) a una dilución de 1:500 en diluyente de anticuerpo (Cell Signaling n.º 8112) durante una hora a la temperatura ambiente, seguido de incubación del anticuerpo secundario anti-HRP de conejo (Abcam ab6721). El desarrollo de color para la señal de la **GFP** se logró incubando los portaobjetos en solución de DAB durante 3 minutos a la temperatura ambiente, y los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina para la tinción de núcleos.

Análisis de corrección cruzada

Se procesaron secciones en FFPE de 5 µm adyacentes para la IHQ y DAPI de ARSA o la HIS y DAPI de WPRE. A continuación, las placas individuales se solaparon para obtener secciones sagitales para las imágenes tanto de IHQ como de HIS. A continuación, estas imágenes se registraron globalmente con una matriz de transformación (parámetros rotacional y traduccional) para alinear las imágenes de IHQ y de HIS. Las placas individuales dentro de las secciones sagitales se registraron a continuación localmente usando DAPI para asegurar una buena alineación entre las placas individuales de IHQ y de HIS. En cada placa se estimaron las células positivas en la IHQ y las células positivas en la HIS mediante parámetros de umbral determinados empíricamente en todas las secciones sagitales. En el caso de la HIS, las células

positivas en la IHQ tenían que tener al menos un 20 % de solapamiento con un núcleo para contarse como una señal de HIS auténtica. En las imágenes de la IHQ se utilizaron controles negativos sin tinción de ARSA para determinar los parámetros de umbral. Se estimó para cada placa el factor de corrección cruzada, que es la relación de células positivas en la IHQ y de células positivas en la HIS, y se representó como un gráfico cromático.

Secuenciación de un único núcleo

Aislamiento de los núcleos: Para el aislamiento de los núcleos, los cerebros disecados se transfirieron a tubos de microcentrífuga, se ultracongelaron en una suspensión de hielo seco y etanol, y se almacenaron a -800 °C hasta el momento de su uso. Para aislar los núcleos, los cerebros de ratón congelados se pusieron en tampón de lisis de núcleos que contenía Triton-100 al 0.1 % (Sigma-Aldrich), DTT 1 mM (Sigma-Aldrich) y 0.2 U/μl de inhibidor de RNasa (Sigma-Aldrich) en 1 ml de homogeneizador de Dounce (Wheaton). El tejido se homogeneizó utilizando 10 golpes del mazo de mortero Dounce suelto seguidos de 10 golpes del mazo de mortero apretado, y se incubó en hielo durante 15 min. El homogeneizado resultante se hizo pasar a través de un filtro de células de 30 μm (Miltenyi Biotec) y se centrifugó a 500 × g durante 5 min para sedimentar los núcleos. Los núcleos se resuspendieron en tampón que contenía 1x de PBS (Thermo Fisher), BSA sin nucleasa 1 % (Sigma-Aldrich), DTT 1 mM (Sigma-Aldrich) y 0.2 U/μl de inhibidor de RNasa (Sigma-Aldrich). Se añadió anti-NeuN de ratón conjugado con PE (EMD Millipore) a las preparaciones a una dilución de 1:500, y las muestras se incubaron durante 30 min a 40 °C. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 5 min a 500 × g para sedimentar los núcleos, y los núcleos se resuspendieron en 1x de PBS, 1 % de BSA, DTT 1 mM y 0.2 U/μl de inhibidor de RNasa. Se añadió DAPI a una concentración de 0.1 μg/ml. Se llevó a cabo una clasificación de núcleos individuales en INFLUX-83 (BD Biosciences) usando una boquilla de 100 μm. Los núcleos se seleccionaron con DAPI y la señal NeuN (PE).

Preparación de la biblioteca y secuenciación NovaSeq

Las bibliotecas se prepararon de acuerdo con el protocolo de 10xGenomics para el kit Chromium Single Cell 3' Gene Expression V3.1. Brevemente, inmediatamente después de la clasificación, los núcleos se mezclaron con núcleos con un 90 % de NeuN- y un 10 % de NeuN+. Se llevó a cabo la etapa de generación de GEM en el kit de expresión génica 10X Genomics (10xGenomics). Después de la generación de GEM, las muestras se mantuvieron a -20 °C para una etapa adicional. Todas las muestras se procesaron juntas, desde la amplificación del ADNc, la construcción de la biblioteca hasta la secuenciación de las bibliotecas. La cuantificación del ADNc y las bibliotecas fueron sólidas para todas las muestras. Las bibliotecas se secuenciaron en Illumine Novaseq 6000. Las bibliotecas se secuenciaron a una profundidad media de aproximadamente 50 K de lecturas/núcleos. Matrices de recuento UMI generadas mediante Cell Ranger V5.

Preprocesamiento de datos: las matrices de recuento generadas junto con los códigos de barras del núcleo y las etiquetas génicas se cargaron en Partek Flow. Para el control de calidad (QC), los núcleos se filtraron siguiendo los protocolos convencionales basados en el análisis de gráficos de violín. Los puntos de corte detallados fueron $250 < nFeature_RNA < 6000$ y $nCount_RNA < 30000$. Los genes que codifican

la proteína mitocondria eran <2 %. Después del filtrado de calidad, permanecieron 147313 núcleos totales para el análisis posterior.

Evaluación del genoma del vector

Aislamiento de ADNg de HT: El ADNg se aisló a partir de 50 µl de homogeneizado tisular de PNH utilizando el kit QIAmp 96 DNA QIAcube HT (n.º de cat. 51331) de acuerdo con el protocolo del fabricante "QIAamp® 96 DNA QIAcube® HT Handbook". El homogeneizado tisular se trató en primer lugar con proteinasa K a 56 °C durante la noche, a continuación se transfirió a un bloque S y se colocaron las muestras en el instrumento QIAcube HT que realiza el aislamiento de ADNg con el instrumental programa informático QIAcube HT Prep Manager. A continuación, se midió la concentración de ADNg con NANODROP 8000 (Thermo Fisher Scientific).

PCRd a través de QIAcuity: el genoma del vector se determinó mediante una PCRd a través de QIAcuity fabricado por QIAGEN. Se mezclaron 7 µg de ADNg aislado a partir de tejido de PNH y 5 µl de mezcla maestra de reacción que contenía 1x de mezcla maestra de sonda de PCR (n.º de cat. 250103); 1x de mezcla 1 (BGH) y mezcla 2 de cebador-sonda (gen constitutivo); 0.25 U de enzima de restricción HindIII en placa de PCR convencional, y a continuación se transfirieron a nanoplaca. El volumen de reacción total es de 12 µl por pocillo. A continuación, se coloca la nanoplaca en el instrumento QIAcuity y se realiza la PCRd utilizando los ciclos sugeridos por el fabricante. La copia de ADN de cada muestra y de cada gen fue analizada automáticamente por el programa informático. A continuación, se calculó el genoma del vector por célula como: las copias 2XBGH dividen las copias del gen constitutivo.

Ejemplo 1. Expresión de ARSA *in vivo* con dos casetes de expresión diferentes

Se diseñó la carga activa de vector para expresar el gen de la arilsulfatasa A (ARSA) con codones humanos optimizados (SEQ ID NO: 2) dirigido por el promotor constitutivo quimérico de la actina β de pollo (CBA) CMV. La expresión del transgén se potencia adicionalmente con la adición del elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). La SEQ ID NO: 3 muestra una secuencia de ADN completa representativa del plásmido para el empaquetamiento del rAAV, incluyendo la ITR en 5' del AAV2 (SEQ ID NO: 4) y la ITR en 3' del AAV2 (SEQ ID NO: 5), el elemento potenciador de CMV (SEQ ID NO: 6), el promotor de la actina β de pollo (SEQ ID NO: 7) y el elemento WPRE (SEQ ID NO: 8). Un esquema de un mapa de un plásmido particular para la producción de partículas del rAAV se muestra en la **FIG. 17**. Los elementos particulares del plásmido se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Anotación de la secuencia desde la ITR en 5' hasta la ITR en 3'

Secuencia Numeración	Anotación
1 - 145	ITR en 5' del AAV2
173-553	Elemento potenciador del CMV
554-873	Promotor de la actina β de pollo
874-924	Exón 1 de la actina β de pollo
925-1799	Intrón 1 de la actina β de pollo

Secuencia Numeración	Anotación
1808-1848	Intrón 2 de la globina β de conejo
1849-1902	Exón 3 de la globina β de conejo
1914-3443	ARSA humana con codones optimizados
3446-4030	Elemento WPRE
4043-4245	Secuencia de la señal de poliA; secuencia de poliadenilación del gen de la hormona del crecimiento bovina
4253-4397	Elemento de la ITR en 3' del AAV2 en orientación invertida

El día después del nacimiento, se administró a dos ratones ARSA^{-/-} por vía IV (inyección retroorbital bilateral) PBS o AAV9 (2e11 VG; 2e14 VG/kg) partículas víricas del rAAV que expresaban la ARSA humana con o sin el elemento WPRE. Los dos casetes de expresión se esquematizan en la **FIG. 1A**. En la **FIG. 1B** se muestra un análisis de inmunoelectrotransferencia de la expresión de la hARSA en el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo después de la administración de las partículas víricas. Los niveles de expresión se comparan con los niveles de expresión en ratones ARSA^{-/-} y en ratones que expresan niveles normales de la ARSA (es decir, ratones naturales).

Como se muestra en la **FIG. 1B**, los niveles de expresión aumentan después de la administración de las partículas víricas que comprenden los dos casetes de expresión. La inclusión del elemento WPRE en el casete de expresión proporciona unos niveles de expresión aumentados de la ARSA con respecto al casete de expresión sin el elemento WPRE.

A continuación, se utilizó una CL-EM para medir los niveles de C24-ST. Los niveles de ST se normalizaron respecto al peso del tejido. En la **FIG. 1C** se muestran los niveles de CST en el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo después de la administración de las partículas víricas que comprenden los dos casetes de expresión. Las barras de error representan la media con la desviación estándar. ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. ELN: 20200205-188, 20200305-152, 20200205-006. Los niveles de C24-ST después de la administración de partículas del AAV9 a ratones ARSA^{-/-} que comprendían casetes de expresión sin el elemento WPRE disminuyeron significativamente en relación con los niveles de C24-ST en ratones ARSA^{-/-}. Se observaron incluso reducciones adicionales en los niveles de C24-ST tras la administración de partículas del AAV9 a ratones ARSA^{-/-} que comprendían casetes de expresión con el elemento WPRE.

Ejemplo 2. Evaluación de la actividad de sulfatasa en ratones ARSA^{-/-} a los que se les administró AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE

A ratones ARSA^{-/-} en fase tardía (13 meses) se les administró AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE (1.97e11 VG por animal). Como controles, se inyectó tampón de formulación a ratones naturales y ARSA^{-/-} de la misma edad. Tres meses después de la administración, los ratones se sacrificaron y se recogieron el cerebro, la médula espinal y el hígado. Se midió la actividad de sulfatasa mediada por la ARSA con el kit de ensayo de actividad de sulfatasa (ab204731); datos normalizados con respecto a la proteína total

medida mediante un ensayo con BCA. Las barras de error representan la media con la desviación estándar. ANOVA bidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$; $****p<0.0001$. ELN: 20201205-001, 20210225-107, 20210211-117. Como se muestra en la **FIG. 2**, los ratones tratados con AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE con MLD en fase tardía (ARSA^{-/-}) muestran un aumento de la actividad de sulfatasa mediada por la ARSA en el cerebro, la médula espinal y el hígado.

Ejemplo 3. Evaluación del sulfátido en ratones ARSA^{-/-} a los que se les administró AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE

La deposición de sulfátido en pacientes con MLD es el principal impulsor de la toxicidad y la muerte neuronal. Los ácidos grasos de cadena corta (C16, C18) se acumulan predominantemente en neuronas y astrocitos, mientras que los sulfátidos de ácidos grasos de cadena larga (C24:1, C24) se acumulan en las células formadoras de mielina. El lisosulfátido, la forma desacilada de los sulfátidos, se acumula en todos los tejidos de los pacientes con MLD.

A ratones ARSA^{-/-} (ARSA con el gen inactivado (KO)) en fase tardía (13 meses) se les administró AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE. Como controles, se inyectó tampón de formulación a naturales y ARSA^{-/-} de la misma edad. Tres meses después de la administración, los ratones se sacrificaron y se recogieron el cerebro y la médula espinal. Los niveles de sulfátido se midieron mediante una CL-EM. Datos normalizados respecto al peso de tejido: se convirtieron de ng/ml (50 µl) a µg/g. Las barras de error representan la media con la desviación estándar. ANOVA bidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Los niveles de sulfátido medidos mediante CL-EM y muestras tanto de cerebro como de médula espinal en ratones ARSA^{-/-} a los que se les administró AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE mostraron una disminución significativa en todos los niveles de isoformas de sulfátido (**FIG. 3**).

Ejemplo 4. Evaluación de la mielinización en ratones ARSA^{-/-} a los que se les administró AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE

Los pacientes con MLD presentan una pérdida significativa de mielinización en las regiones de sustancia blanca. Para abordar el impacto de la terapia génica en ratones ARSA^{-/-} en fase tardía (13 meses), a los ratones se les administró AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE. Como controles, se inyectó tampón de formulación a naturales y ARSA^{-/-} de la misma edad. Tres meses después de la administración, los semicortes cerebrales sagitales coincidentes se tiñeron con Nitroblue y la cuantificación de la intensidad de la señal se realizó especialmente en el cuerpo caloso. Las barras de error representan la media con la desviación estándar. ANOVA unidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Los ratones (ARSA^{-/-}) con MLD en fase tardía tratados con AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE muestran una mielinización mejorada del cuerpo caloso en relación con el control (**FIG. 4**).

Ejemplo 5. Evaluación de la cantidad de células de oligodendrocitos maduras y formadoras de mielina en ratones ARSA^{-/-} a los que se les administró AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE

A ratones ARSA^{-/-} con MLD en fase tardía (13 meses) se les administró AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE. Como controles, se inyectó tampón de formulación a ratones naturales y ARSA^{-/-} de la misma edad. Los hemisferios cerebrales recogidos se ultracongelaron; se diseccionaron el cerebelo, el tronco encefálico y el bulto olfativo. El resto del cerebro se procesó para secuenciación del ARN de un solo núcleo para medir

la abundancia relativa de diferentes tipos de células. Las barras de error representan la media con la desviación estándar. ANOVA bidireccional con comparación múltiple de Tukey. En la **FIG. 5** se muestra que ratones ARSA^{-/-} tratados con AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE mostraron una normalización en los recuentos de células de oligodendrocitos, en comparación con ratones ARSA^{-/-} no tratados.

5 **Ejemplo 6. Estudios de corrección cruzada de la proteína ARSA**

A ARSA^{-/-} en fase tardía (13 meses) se les administró AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE. Tres meses después de la administración, se realizó la hibridación *in situ* del ARNm de ARSA (HIS) y la inmunohistoquímica de la proteína ARSA (IHQ) en semicortes cerebrales sagitales coincidentes. Se obtuvieron imágenes de las secciones y se analizaron para determinar la superposición de señales. (**FIG. 6A**) Se trataron secciones sagitales adyacentes del cerebro de ratón para la HIS de WPRE o la IHQ de ARSA con tinción DAPI para los núcleos. A continuación, las secciones sagitales se analizaron como placas individuales de 1024 × 1024 píxeles. En cada placa, se determinaron las células positivas en la HIS y las células positivas en la IHQ mediante parámetros de umbral determinados empíricamente en todas las imágenes sagitales. El factor de corrección cruzada, que es la relación de células IHQ+ con respecto a las células HIS+, se representa como un gráfico cromático con placas con mucha corrección cruzada mostrado en tonos de rojo (**FIG. 6B**). El recuento de células HIS+ frente al recuento de células IHQ+ de cada placa se representa gráficamente como un diagrama de dispersión con la línea y=x mostrada en rojo. Las placas por encima de la línea y=x indican células con corrección cruzada. En ratones neuropáticos tardíos, las células 10 veces más altas se corrigieron de forma cruzada, en comparación con las células infectadas, destacando la amplia corrección cruzada lograda con esta estrategia.

10 **Ejemplo 7. La evaluación del reemplazo génico mediado por AAV.rh10-h ARSA-WPRE en ratones con MLD (Arsa^{-/-}) en las fases neuropatológicas tempranas (6 meses) dio como resultado la inversión de la patología asociada con la MLD**

A ratones ARSA^{-/-} en fase temprana (6 meses) se les administró AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE. Como controles, se inyectó tampón de formulación a ratones naturales y ARSA^{-/-} de la misma edad. Cuatro meses después de la administración, se observó una amplia expresión de la ARSA en secciones cerebrales sagitales mediante una IHQ contra la ARSA humana (**FIG. 7A**). En los mismos animales, el cerebro, la médula espinal, los GRD y el hígado mostraron un aumento significativo en la actividad de la ARSA (**FIG. 7B**). Por tanto, los ratones con MLD en fase temprana tratados con AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE (ARSA^{-/-}) muestran una amplia expresión de la ARSA humana en el SNC y un aumento de la actividad de sulfatasa mediada por la ARSA en el cerebro, la médula espinal, los GRD y el hígado.

30 **Ejemplo 8. Evaluación de los niveles de sulfátido en el reemplazo génico mediado por AAV.rh10-hARSA-WPRE en ratones con MLD (Arsa^{-/-}) en fases neuropatológicas tempranas (6 meses)**

A ratones ARSA^{-/-} en fase temprana (6 meses) se les administró AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE. Como controles, se inyectó tampón de formulación a ratones naturales y ARSA^{-/-} de la misma edad. Cuatro meses después de la administración, los animales se sacrificaron y se recogieron (**A**) cerebro y médula espinal, (**B**) hígado, (**C**) plasma y (**D**) LCR. Los niveles de sulfátido se midieron mediante una CL-EM. Los datos se normalizaron respecto al peso del tejido: se convirtieron de ng/ml (50 µl) a µg/g. Líquidos: datos

convertidos de (30 μ l) ng/ml a ng/ml, y de ng/ml (5 μ l) a ng/ μ l. Las **FIGS. 8A-D** muestran los niveles de sulfátido en cerebro (**FIG. 8A**), hígado (**FIG. 8B**), plasma (**FIG. 8C**) y LCR (**FIG. 8D**). Los niveles de sulfátido aumentaron significativamente en el cerebro, la médula espinal, el hígado, el plasma y el LCR después de la administración del AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE.

5 **Ejemplo 9: estudios con primates no humanos (PNH): actividad de sulfatasa**

A macacos cangrejeros (macho, mauritano de 2 años de edad, de 2 a 3 kg) seronegativos para AAVrh.10 se les administró AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE por vía intratecal en la unión cervical de nivel 1-2 usando un catéter intratecal portado insertado en la región lumbar. A los animales en la posición de Trendelenburg se les administraron dos infusiones de 2.5 ml a 0.125 ml/min, con aproximadamente seis
10 horas de diferencia. Se administraron dos dosis: 7.5e12 VG/PNH (a 1e11 VG/gramo de cerebro) y 2.75e13 VG/PNH (a 3.3e11 VG/gramo de cerebro). 29 días después de la administración, los animales se sacrificaron y se evaluaron las muestras para determinar la actividad de la ARSA: 59 punciones de tejido cerebral y 7 punciones de tejido de la médula espinal. Se observó una actividad de sulfatasa significativamente aumentada en el cerebro y la médula espinal, mostrando un 59 % y un 86 % de las
15 punciones cerebrales al menos un 10 % aumento de actividad con respecto al fondo a dosis bajas y altas, respectivamente (**FIG. 9A**). Esto superó nuestros criterios objetivo del 50 % punciones con >10 % de aumento de la actividad. De manera similar, se observó un aumento del 25 % y el 32 % en la actividad de sulfatasa en la médula espinal de PNH tratados a dosis bajas y altas, respectivamente (**FIG. 9B**). Se observó una amplia biodistribución de la ARSA en el cerebro de PNH tratados mediante una IHQ contra el anticuerpo FLAG (**FIG 9C**). Nuestros resultados indican que el reemplazo génico mediado por AAV.rh10-
20 CBA-ARSA-WPRE es un enfoque viable para lograr unos niveles amplios y terapéuticos de ARSA en el sistema nervioso central (SNC) y en el sistema nervioso periférico (SNP).

Ejemplo 10: estudios con primates no humanos (PNH): niveles de expresión de transgenes comparativos después de la administración de partículas que comprenden AAV1999 o AAV.rh10

A macacos cangrejeros (macho, mauritano de 2 años de edad, de 2-3 kg) seronegativos para AAVrh10 y AAV1999 (VP1 que tiene la SEQ ID NO 12; VP2 que tiene la SEQ ID NO 13; y VP3 que tiene la SEQ ID NO: 14) se les administró por vía intratecal en la unión cervical de nivel 1-2 usando un catéter intratecal portado insertado en la región lumbar. A los animales en la posición de Trendelenburg se les administraron dos infusiones de 2.5 ml a 0.125 ml/min, con aproximadamente 6 horas de diferencia. Se
30 administró una dosis de AAV1999/rh10/Myo-CBA-eGFP a 2.75e13 VG/PNH (a 3.3e11 VG/gramo de cerebro). Dos semanas después de la administración, los animales se sacrificaron y se evaluaron las muestras para determinar la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) mediante un ELISA.

Un total de 41 punciones cerebrales (sustancia gris) que representan 16 regiones del cerebro diferentes mostraron una expresión de la GFP significativamente mayor a partir del AAV1999 en
35 comparación con el AAVrh.10 (**FIG. 10A**). En todas las muestras, la expresión de la GFP en el cerebro de los PNH tratados con AAV1999 fue un 93 %-123 % más alta en comparación con los PNH tratados con AAVrh.10 (**FIG. 10B**). Esto se demuestra por el gráfico cromático, donde en 38 de las 41 punciones (promediadas para los tres PNH) en los PNH tratados con AAV1999 muestran un aumento mínimo del

10 % en la expresión de la GFP, en comparación con los PNH tratados con AAVrh10 (**FIG. 11**). Las secciones de cerebro coincidentes representativas teñidas con anticuerpos contra la eGFP muestran una expresión robusta en los PNH tratados con el AAV1999, lo que demuestra una biodistribución superior en comparación con el AAVrh10 (**FIG. 12**). Adicionalmente, en la médula espinal y los GRD, la expresión de la GFP en los PNH tratados con AAV1999 fue un 79 % y un 22 % más alta en comparación con los PNH tratados con AAVrh.10, respectivamente. En la **FIG. 13** se muestra la expresión de la GFP en la médula espinal y los GRD de los PNH. La expresión del AAV1999-GFP en el corazón y el hígado fueron menores, en comparación con los PNH tratados con AAVrh10-GFP (**FIG. 14**).

La carga del genoma del vector AAV1999 fue diez veces menor en el cerebro y tres veces menor en la médula espinal, en comparación con el AAVrh.10 (**FIG. 15A**). Esto es apreciable en el "desplazamiento a la izquierda" en la correlación entre la expresión de la GFP (eje y) y los genomas del vector tisular (eje x), donde la correlación para AAV1999 (rojo) está desplazada a la izquierda, lo que indica una mayor expresión de proteína y una dosis tisular menor (~10 veces) del vector (**FIG. 16**). Adicionalmente, los GRD, el hígado, el corazón, el pulmón, y el riñón también muestran menos genomas de vector AAV1999 en comparación con el AAVrh.10 (**FIG. 15B**). El bazo es el único tejido analizado que muestra genomas de vector AAV1999 más altos en comparación con AAVrh.10 (**FIG. 15B**). Estos resultados indican que AAV1999 es superior a AAVrh.10 y proporciona una biodistribución más amplia y una mayor expresión del transgén a una dosis más baja.

Ejemplo 11: estudio de farmacología, eficacia y durabilidad a largo plazo en un modelo de ratón con el gen Arsa inactivado (KO) preneuropático utilizando AAV1999-ARSA

Este estudio se diseñó para evaluar la farmacología y la eficacia a largo plazo del AAV1999-ARSA en un modelo de ratón con el gen Arsa inactivado (KO). El diseño del estudio se resume en la Tabla 2. A ratones con el gen Arsa inactivado (KO) de dos meses de edad se les administró (inyección ICV bilateral; 4 µl por hemisferio) AAV1999-ARSA (n.º de lote VP091321) a 1.6e11 VG por ratón (3.3e11 VG/g de peso de cerebro). Como controles, se administró tampón de formulación a ratones naturales y con el gen Arsa inactivado (KO) de la misma edad. Los ratones se sacrificaron 13 meses después de la dosis y se recogieron las muestras.

Tabla 2 - Estudio a largo plazo de farmacología, eficacia y durabilidad en ratones con el gen Arsa inactivado (KO) (2 meses-15 meses)

Grupo	Número/s exo	Genotipo	Producto investigado	Dosis	Pauta posológica	Puntos temporales, recogida de muestras, análisis
1	12 (6M, 6H)	Natural	Tampón de formulación	N/D	ICV bilateral, 4 µl por lado	Edad en la administración: 2 meses
2	12 (6M, 6H)	ARSA ^{-/-}	Tampón de formulación	N/D		

5	3	12 (6M, 6H)	ARSA ^{-/-}	AAV1999-ARSA (N.º DE LOTE VP091321)	1.6e11 VG (3.3e11 VG/gramo de peso del cerebro)	• Edad en la necropsia: 15 meses (13 meses en vida) • Cerebro, médula espinal, GRD, nervio ciático, hígado, LCR y plasma
---	---	-------------	---------------------	---	---	---

Se observó una expresión robusta del ARNm de la *hARSA* en el cerebro y la médula espinal de ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA (**FIG. 18**). La actividad de sulfatasa se midió usando el kit de ensayo de actividad de sulfatasa (Abcam, ab204731). Los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) a los que se les administró el AAV1999-ARSA mostraron unos niveles normales (equivalentes a los de los naturales) de actividad de sulfatasa en cerebro, médula espinal, GRD y nervio ciático (**FIG. 19**). Se observó un aumento medible con respecto a los niveles de actividad de sulfatasa natural en el hígado de los ratones tratados (**FIG. 19**). La deposición de sulfátido en pacientes con MLD es el principal impulsor de la toxicidad y la muerte neuronal. El lisosulfátido (liso-ST), la forma desacilada del sulfátido, se acumula en todos los tejidos y es un rasgo característico de la patología asociada con la MLD en los pacientes. En los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con el AAV1999-ARSA, los niveles de liso-ST volvieron a la normalidad (similar a los de los naturales) en el cerebro y la médula espinal (**FIG. 20**). También se observó una reducción significativa en los niveles de liso-ST en los GRD, el nervio ciático y el hígado, mientras que los niveles totales de sulfátido se redujeron significativamente en el plasma y el LCR de los animales tratados (**FIG. 20**). Como consecuencia de la eliminación del sulfátido en el cerebro y la médula espinal, los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) con el AAV1999-ARSA mostraron una mejora significativa en los marcadores neuroinflamatorios (*GFAP* y *Aif1*) y la expresión de *Lamp1* (marcador de la salud lisosómica) en el cerebro y la médula espinal (**FIG. 21**). Adicionalmente, se observó una reducción significativa en los niveles de Nf-L en plasma en ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con el AAV1999-ARSA, en comparación con ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con tampón (**FIG. 22**).

Los pacientes con MLD a menudo presentan discapacidad auditiva. La prueba auditiva de respuesta del tronco encefálico (ABR) proporciona información funcional sobre el oído interno (cóclea) y las vías centrales de audición. La ABR refleja las respuestas eléctricas de las neuronas del ganglio coclear y los núcleos de la vía auditiva central a la estimulación del sonido (Zhou et al., 2006; Burkard et al., 2007). La ABR se registra mediante electrodos colocados en el cuero cabelludo de un animal anestesiado. Los umbrales de la ABR hacen referencia al nivel de presión acústica más bajo (SPL) que puede generar unas ondas de respuesta eléctrica identificables. Los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) muestran un deterioro progresivo de la audición con el tiempo, que se revierte tras el tratamiento con AAV1999-ARSA (**FIG. 23**). Se observa una reversión parcial del fenotipo tan pronto como 4 meses después de la administración (el momento más temprano analizado después de la dosis) (**FIG. 23**).

Se observó vacuolación y neurodegeneración en los cerebros de todos los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO), normalmente en el tronco encefálico y/o el cerebelo. En los ratones tratados, se detectaron cambios histológicos únicamente en 4 de 10 ratones, y la gravedad fue inferior a la de los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) (**FIG. 24A**). Todos los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) mostraron una vacuolación de gravedad mínima en la médula espinal, mientras que no se detectaron cambios en los ratones naturales ni los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA (**FIG. 24B**). Finalmente, no se detectaron cambios patológicos en los GRD en ningún grupo (excepto 1 de 10 animales en el grupo KO+AAV) (**FIG. 24C**). Por lo tanto, el tratamiento de los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) con AAV1999-ARSA minimizó y/o impidió significativamente la patología asociada a la MLD en el cerebro e impidió la patología asociada a la MLD en la médula espinal.

Ejemplo 12: estudio longitudinal de farmacología, eficacia y durabilidad en un modelo de ratón con el gen *Arsa* inactivado (KO) neuropático temprano utilizando AAV1999

Este estudio se diseñó para evaluar el direccionamiento al objetivo y la reversión de los fenotipos patológicos y bioquímicos asociados con la MLD en el modelo de ratón con el gen *Arsa* inactivado (KO) a lo largo de un periodo de 6 meses. Se seleccionó la fase neuropática temprana (6 meses en el momento de la dosis) como la más relevante para la población de pacientes objetivo. El diseño del estudio se resume en la Tabla 3. A ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) de seis meses de edad (inyección ICV bilateral; 4 µl por hemisferio) se administró AAV1999-ARSA (n.º de lote VP091321) a una dosis de 5e10 VG por ratón (1e11VG/g de peso de cerebro). Se dosificó tampón de formulación a ratones naturales y a ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) de la misma edad de control. Los ratones se sacrificaron a los 1, 2, 3 y 6 meses después de la dosis y se recogieron las muestras.

Tabla 3- Estudio longitudinal de farmacología, eficacia y durabilidad en ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO)

Grupo	Número y sexo	Genotipo	Producto investigado	Dosis	Pauta posológica	Puntos temporales, recogida de muestras, análisis
1	32 (16M, 16H)	Natural	Tampón de formulación	N/D	ICV bilateral, 4 µl por lado	- Edad en la administración: 6 meses - Edad en la necropsia: 7 meses (1 mes en vida), 8 meses (2 meses en vida), 9 meses (3 meses en vida), 12 meses (6 meses en vida) - Cerebro, médula espinal, GRD, nervio ciático, hígado, LCR y plasma
2	32 (16M, 16H)	<i>Arsa</i> ^{-/-}	Tampón de formulación	N/D		
3	32 (16M, 16H)	<i>Arsa</i> ^{-/-}	AAV1999-ARSA (N.º DE LOTE VP091321)	5e10 VG (1e11 VG/gramo de peso del cerebro)		

La exposición al genoma del vector AAV1999-ARSA en el cerebro permaneció constante durante el periodo de 6 meses después de la dosis (**FIG. 25A**). Esto se tradujo en una actividad de sulfatasa mediada por la ARSA persistente a lo largo del tiempo (**FIG. 25B**), alcanzándose la actividad de sulfatasa máxima 1 mes después de la administración (**FIG. 25C**). En cada punto temporal, los ratones tratados mostraron una disminución significativa de liso-, C16- y C18-sulfátidos(**FIGS. 26A-C**). Es importante destacar que la eliminación fue progresiva, volviendo los niveles de sulfátido (especialmente Liso-ST) a la normalidad 6 meses después de la dosis (**FIGS. 26 D-F**). Adicionalmente, los niveles de sulfátido total en LCR y plasma se redujeron significativamente en los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA (**FIG. 27**). Finalmente, el aumento inicial en los niveles plasmáticos de Nf-L disminuyó 6 meses después de la administración del AAV1999-ARSA, en comparación con el grupo KO+TF (**FIG. 28**).

Se observaron cambios neuronales y de neutrófilos en el cerebro de los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) en los núcleos del tronco cerebral y/o cerebelosos. Notablemente, se observó una disminución en la incidencia y la gravedad de estos cambios en los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA, tan pronto como 2 meses después de la dosis (**FIGS. 29A-B**). El cerebro (normalmente cerca del hipocampo) de algunos ratones tratados con AAV1999-ARSA tuvo infiltrados de células monomorfonucleares focales o multifocales, perivasculares de gravedad mínima (**FIG. 29C**). También hubo una degeneración/necrosis mínima de neuronas, principalmente de la región CA3 del hipocampo, en 1-2 animales por grupo (**FIG. 29D**).

Los ganglios de la raíz dorsal de algunos ratones tratados con AAV1999-ARSA tuvieron un aumento focal o multifocal en la celularidad de las células gliales y/o células monomorfonucleares con una gravedad habitualmente mínima (**FIG. 30A**), mostrando algunos ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados una degeneración mínima de los axones nerviosos (**FIGS. 30B-C**). Se observaron hallazgos microscópicos en la médula espinal de animales de todos los grupos, y se consideraron aleatorios o sin importancia (**FIG. 30D**). La mayoría de los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) mostraron cambios histológicos (degeneración del axón muy mínima o mínima) en el nervio ciático, con una incidencia y gravedad ocasionalmente aumentada a mínimo/leve o leve en los ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) tratados con AAV1999-ARSA (**FIG. 30E**). El nervio ciático de los ratones naturales también tenía un fondo raro, muy mínimo, de degeneración axonal sin importancia (**FIG. 30E**). No se observaron hallazgos específicos del producto investigado en el hígado.

En conjunto, estos datos demuestran que el reemplazo génico mediado por AAV1999-ARSA en ratones con el gen *Arsa* inactivado (KO) es bien tolerado e invierte el fenotipo asociado con la MLD en la misma medida en ratones tanto macho como hembra.

Ejemplo 13: estudio de búsqueda del intervalo de dosis y farmacología de PNH que evalúa el AAV1999-ARSA

En resumen, a PNH de macaco cangrejero macho/hembra criados a propósito sin tratamiento previo (camboyanos de 2-3 años de edad, de 2.6 a 3.1 kg) seronegativos para anticuerpos neutralizantes del AAV1999, se les administró una única infusión directa en la cisterna magna (ICM). Los animales se colocaron en la posición de Trendelenburg durante la administración. El paradigma de administración

implicó una única infusión de 2.5 ml del AAV1999-ARSA (n.º de lote VP050322) a 0.125 ml/min, seguido de un lavado con 250 µl de tampón de formulación. Cinco semanas después de la administración, los animales se sacrificaron y se evaluó la biodistribución del vector en las muestras para (PCRd) y el ARNm de *hARSA* (RT-PCRd), acompañado de una evaluación de la seguridad. Las muestras representan 64 punciones del cerebro que representan 19 regiones de sustancia gris distintas y 7 regiones de sustancia blanca distintas, 8 segmentos de la médula espinal con los GRD, los nervios periféricos y los órganos viscerales adyacentes. El diseño del estudio se describe en la Tabla 4.

Tabla 4 - Estudio CRL.2021-5613: estudio de búsqueda del intervalo de dosis en PNH

Grupo	Producto investigado	Dosis/g peso del cerebro	Dosis/animal	Pauta posológica	N.º de animales	Puntos temporales, recogida de muestras, análisis
1	AAV1999-ARSA	1e10 VG	7.5e11 VG	RoA: ICM con el animal colocado en la posición de Trendelenburg	5 (M/H)	En vida: 35 días Cerebro, médula espinal, GRD, nervios periféricos, órganos viscerales en la necropsia LCR (antes del estudio y en la necropsia) Plasma: antes del estudio, días después de la dosis: 2, 4, 7, 14 y en la necropsia Evaluación neurológica/conductual (antes de la dosis, 7 días y 5 semanas después de la dosis)
2		3.3e10 VG	2.5e12 VG		5 (M/H)	
3		1e11 VG	7.5e12 VG		5 (M/H)	
4		3.3e11 VG	2.5e13 VG		5 (M/H)	
5	Tampón de formulación	n/d	n/d	Parámetros de realización: 2.5 ml a 0.125 ml/min con un enjuague de 250 µl	3 (M/H)	

Se observó un aumento dependiente de la dosis de la biodistribución del vector AAV1999-ARSA en el cerebro de los PNH con administración ICM, tanto en regiones de sustancia gris (19 regiones cerebrales únicas) como de sustancia blanca (7 regiones cerebrales únicas) (**FIG. 31**). El tratamiento con AAV1999-ARSA también dio como resultado un aumento dependiente de la dosis de amplia extensión en los niveles del ARNm (**FIG. 32**) y la proteína (**FIG. 33**) de la *hARSA* a las dos dosis superiores: 7.5e12 VG (1e11 VG/g de peso del cerebro) y 2.5e13 VG (3.3e11 VG/g de peso del cerebro). Se observó una biodistribución uniforme del vector dependiente de la dosis y expresión de la *hARSA* en los GRD y la médula espinal, a lo largo del eje medular anterior-posterior (**FIG. 34**). Entre los órganos viscerales, el hígado, el

bazo y los ganglios linfáticos cervicales muestran una biodistribución del vector de aumento dependiente de la dosis (**FIG. 35**).

Para explorar si la administración del AAV1999-ARSA condujo a una expresión de la ARSA humana significativa en los cerebros de los PNH, se evaluó el nivel de proteína ARSA humana derivada del AAV y se comparó con 1) proteína cyARSA de macaco endógena (hARSA/cyARSA en 19 regiones cerebrales medidas dentro de las mismas muestras) y con 2) la proteína ARSA humana medida en los cerebros (en 12 regiones cerebrales) de 7 donantes de órganos humanos sanos con unas edades de entre 3 y 8 años. Para unas dosis de $1e11$ VG/g y $3.3e11$ VG/g en peso de cerebro, los niveles de proteína ARSA humana medios en todo el cerebro fueron un ~ 63 % y ~ 546 % de la cyARSA natural (**FIG. 36**). Además, a unas dosis de $1e11$ VG/g y $3.3e11$ VG/g de peso de cerebro, los niveles de proteína ARSA humana medios para todo el cerebro fueron un ~ 51 % y ~ 416 % de los niveles de proteína ARSA humana de los donantes de órganos sanos de control (**FIG. 37**). Por lo tanto, el tratamiento con AAV1999-ARSA en PNH da como resultado una expresión de la proteína ARSA terapéuticamente significativa en el SNC a $1e11$ y $3.3e11$ VG/g de peso del cerebro.

No se observaron signos clínicos (deficiencias funcionales o conductuales) en los PNH en la semana 1 o la semana 5 (necropsia) después de la administración en ninguno de los grupos de administración, en comparación con las pruebas previas a la dosis (**FIG. 38**). La infusión intra-CM fue bien tolerada; como se esperaba, el procedimiento de ICM representó un aumento significativo en los niveles de Nf-L en el LCR, con un aumento adicional observado en los PNH tratados con AAV1999-ARSA en comparación con los PNH tratados con tampón de formulación (**FIG. 39A**). Sin embargo, no se observó un aumento dependiente de la dosis (**FIG. 39A**). No se observaron cambios significativos en la concentración de citocinas en plasma en los PNH tratados con AAV1999-ARSA con ninguna dosis (**FIG. 39B**), y no se observó ninguna respuesta inmunitaria mediada por células contra la cápside del AAV1999 o la proteína hARSA en los PNH tratados con AAV1999-ARSA a las dos dosis altas mediante un ELISPOT con IFN- γ (**FIG. 39C**). Adicionalmente, no se observó ningún hallazgo macroscópico relacionado con el producto investigado en ningún animal en la necropsia.

Los cambios en el líquido cefalorraquídeo consistieron en aumentos mínimos, no relacionados con la dosis, en los recuentos de células nucleadas (principalmente de células monomorfonucleares) en la mayoría de los animales desde $1e10$ VG/g de peso de cerebro. Además, la albúmina y/o las proteínas totales aumentaron en la mayoría de los animales a $\geq 3.3e10$ VG/g de peso de cerebro 5 semanas después de la administración del vector. Unos pocos animales individuales con $3.3e10$ o $3.3e11$ VG/g de peso de cerebro tuvieron una cantidad variable de material granular de basófilo a eosinófilo morfológicamente compatible con el material neural. Estos cambios se correlacionaron con la degeneración neuronal y la infiltración de monomorfonucleares observadas en diferentes secciones del sistema nervioso central.

Los cambios en la hematología consistieron en leves aumentos temporales en el recuento de reticulocitos en la mayoría de los machos $\geq 1e10$ VG/g de peso de cerebro y en algunas hembras esporádicas con $1e11$ VG/g de peso de cerebro el día 7, con disminuciones mínimas simultáneas de los parámetros de masa de los glóbulos rojos en unos pocos individuos. Hubo aumentos en los recuentos de

glóbulos blancos secundarios a aumentos en los recuentos de neutrófilos, linfocitos y/o monocitos en algunos machos y hembras con 3.3×10^{10} VG/g de peso de cerebro, aún se observa en algunos animales, principalmente en machos a los que se les administraron 3.3×10^{11} VG/g de peso de cerebro. No se observaron efectos relacionados con el producto investigado sobre la coagulación o la química clínica.

Los principales efectos del producto investigado comprendían degeneración neuronal (que afecta al cerebro, la médula espinal lumbar y los GRD), aumento de la respuesta de las células gliales (cerebelo y médula espinal), degeneración de las fibras nerviosas (que afecta a la sustancia blanca de la médula espinal y las fibras nerviosas de los nervios periféricos) e infiltrado de células monomorfonucleares (incluyendo una distribución perivascular) que afectó al cerebro (cerebelo), los GRD y la médula espinal (**FIGS. 40-42**). No se observaron hallazgos relacionados con el producto investigado en los órganos viscerales (corazón, hígado, vesícula biliar, bazo, páncreas, glándula suprarrenal, pulmón, hueso, esternón/médula ósea, ovario, duodeno, testículos, epidídimo, timo, ojo, útero con cuello uterino, riñón) a cualquier dosis. Se observó una respuesta a la dosis entre la dosis más baja (1×10^{10} VG/g de peso de cerebro) y la dosis más alta (3.3×10^{11} VG/g de peso de cerebro) para algunos cambios en algunas ubicaciones, tales como degeneración neuronal (cerebelo, GRD lumbares a la dosis más alta), gliosis (corteza cerebral, cerebelo, pero no en la médula espinal), y para infiltrados de células monomorfonucleares (en la corteza cerebral y en los GRD lumbares a la dosis más alta) (**FIGS. 40-42**).

En conclusión, la administración única del AAV1999-ARSA directamente en la cisterna magna (ICM) se toleró bien en macacos cangrejeros (tanto macho como hembra) a unos niveles de administración de 1×10^{10} , 3.3×10^{10} , 1×10^{11} y 3.3×10^{11} VG/g de peso de cerebro, y 1×10^{11} y 3.3×10^{11} VG/g de peso de cerebro se consideraron dosis eficaces.

SECUENCIAS**Secuencia del polipéptido ARSA**

5	10	20	30	40	50
	MGAPRLLLLA	LAAGLAVARP	PNIVLIFADD	LGYGDLGCGY	HPSSTTPNLD
	60	70	80	90	100
	QLAAGGLRFT	DFYVPVSLCT	PSRAALLTGR	LPVRMGMYPG	VLVPSSRGGL
	110	120	130	140	150
	PLEEVTVAEV	LAARGYLTGM	AGKWHLGVP	EGAFLPPHQG	FHRFLGIPYS
10	160	170	180	190	200
	HDQGPCQNLT	CFPPATPCDG	GCDQGLVIP	LLANLSVEAQ	PPWLPGLEAR
	210	220	230	240	250
	YMAFAHDLMA	DAQRQDRPFF	LYYASHHthy	PQFSGQSFAE	RSGRGPFGDS
	260	270	280	290	300
15	LMELDAAVGT	LMTAIGDLGL	LEETLVIFTA	DNGPETMRMS	RGGCSGLLRC
	310	320	330	340	350
	GKGTTYEGGV	REPALAFWPG	HIAPGVTHEL	ASSLDLLPTL	AALAGAPLPN
	360	370	380	390	400
	VTLDGFDLSP	LLLGTGKSPR	QSLFFYPSYP	DEVRGVFAVR	TGKYKAHFFT
20	410	420	430	440	450
	QGSAHSDTTA	DPACHASSSL	TAHEPPLLYD	LSKDPGENYN	LLGGVAGATP
	460	470	480	490	500
	EVLQALKQLQ	LLKAQLDAAV	TFGPSQVARG	EDPALQICCH	PGCTPRPACC
25	HCPDPHA (SEQ ID NO: 1)				

Secuencia de ADN de la ARSA con codones optimizados (humana)

	ATGAGCATGGGAGCCCCTAGATCTCTGCTGCTGGCTCTTGCTGCTGGACTGGCTGTGGCCAGACCT
	CCTAACATCGTGCTGATCTTCGCCGACGATCTCGGCTATGGCGATCTGGGCTGTTACGGACACCCTA
30	GCAGCACACACCTAACCTGGATCAACTGGCTGCCGGCGGACTGAGATTCACCGATTCTACGTGCC
	CGTGTCTCTGTGCACACCTAGTAGAGCTGCTCTGCTGACAGGCAGACTGCCAGTGCGGATGGGAAT
	GTATCCTGGCGTGCTGGTTCCTAGCAGTAGAGGCGGACTGCCTCTGGAAGAAGTGACAGTTGCTGA
	AGTGCTGGCCGCCAGAGGCTATCTGACTGGAATGGCCGGAAAATGGCACCTCGGAGTTGGACCTGA
	AGGCGCTTTTCTGCCTCCTCACCAGGGCTTCCACAGATTTCTGGGCATCCCTTACAGCCACGATCAG
35	GGCCCTTGCCAGAACCTGACCTGCTTTCTCCTGCCACACCTTGTGATGGCGGCTGTGATCAGGGA
	CTCGTGCCTATTCCTCTGCTGGCCAATCTGAGCGTGGAAGCTCAACCTCCTTGGCTGCCTGGCCTGG
	AAGCCAGATATATGGCCTTCGCTCACGACCTGATGGCCGACGCTCAGAGACAGGACAGACATTCTT
	CCTGTACTACGCCAGCCACCACACACACTACCCTCAGTTCTCTGGCCAGTCCTTCGCCGAGAGATCT
	GGCAGAGGCCCTTTTGGCGATAGCCTGATGGAAGTGGATGCCGCCGTGGGAACACTGATGACAGCC

ATTGGAGATCTGGGCCTGCTGGAAGAGACACTGGTCATCTTCACCGCCGACAACGGCCCCGAGACA
 ATGAGAATGAGCAGAGGGCGGCTGTAGCGGCCTGCTGAGATGTGGCAAGGGAACAACATACGAAGGC
 GCGCTCAGAGAGCCTGCTCTGGCTTTTTGGCCTGGACATATTGCCCTGGCGTGACACACGAACTG
 GCCTCTTCTCTGGATCTGCTGCCTACACTGGCTGCTTTGGCTGGCGCTCCTCTGCCTAATGTGACCC
 5 TGGATGGCTTCGATCTGTCTCCACTGCTGCTCGGAACAGGCAAGAGCCCTAGACAGAGCCTGTTCTT
 CTACCCTAGCTACCCCGATGAAGTGCGGGGAGTGTGTTGCCGTGCGGACAGGCAAGTACAAGGCCCA
 CTTTTTTACCCAAGGCAGCGCCACAGCGATACCACAGCTGATCCTGCTTGTACGCCTCTAGCAGC
 CTGACAGCTCATGAACCACCTCTGCTGTACGACCTGTCTAAGGACCCCGGCGAGAACTATAATCTGC
 TTGGCGGAGTTGCCGGCGCTACACCTGAAGTTCTGCAGGCTCTGAAACAGCTCCAGCTGCTGAAAG
 10 CCCAGCTGGACGCTGCTGTGACATTTGGACCTTCTCAGGTGGCAAGAGGCGAGGACCCTGCTCTGC
 AGATTTGTTGTACCCCTGGCTGTACCCCTAGACCTGCCTGCTGTCACTGTCCTGATCCTCACGCTTGA
 (SEQ ID NO: 2)

**Secuencia de ADN completa del plásmido para el empaquetamiento del rAAV; la secuencia
 codificante de la ARSA está subrayada**

15 TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCC
 GGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCA
 TCACTAGGGGTTCTTACGTACAATTGGGATCCCGGACCGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTA
 TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGT
 AAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC
 20 ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTT
 GGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
 GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT
 CATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCC
 CCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGG
 25 GGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTG
 CGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGG
 CGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCC
 CCGCTCCGCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGA
 GCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTCCTT
 30 TCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGG
 GGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTG
 TGAGCGCTGCGGGCGCGGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCC
 GGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTG
 TCGTGGGGGGGGTGAGCAGGGGGGTGTTGGGCGCGTCGGTCTGGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCC
 35 CTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGG
 GCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCG
 GGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGC
 GGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCA

AATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGC
 GGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCC
 CTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCA
 GGGCGGGGTTCTGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCT
 5 TCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAAT
 TCTACGTACCACCATGAGCATGGGAGCCCCTAGATCTCTGCTGCTGGCTCTTGCTGCTGGACTGGCT
GTGGCCAGACCTCCTAACATCGTGCTGATCTTCGCCGACGATCTCGGCTATGGCGATCTGGGCTGTT
ACGGACACCCTAGCAGCACCACACCTAACCTGGATCAACTGGCTGCCGGCGGACTGAGATTACCG
ATTTCTACGTGCCCGTGTCTCTGTGCACACCTAGTAGAGCTGCTCTGCTGACAGGCAGACTGCCAGT
 10 GCGGATGGGAATGTATCCTGGCGTGCTGGTTCCTAGCAGTAGAGGCGGACTGCCTCTGGAAGAAGT
GACAGTTGCTGAAGTGCTGGCCGCCAGAGGCTATCTGACTGGAATGGCCGGAATAATGGCACCTCGG
AGTTGGACCTGAAGGCGCTTTTCTGCCTCCTCACCAGGGCTTCCACAGATTTCTGGGCATCCCTTAC
AGCCACGATCAGGGCCCTTGCCAGAACCTGACCTGCTTTCCTCCTGCCACACCTTGTGATGGCGGCT
GTGATCAGGGACTCGTGCTATTCTCTGCTGGCCAATCTGAGCGTGGAAGCTCAACCTCCTTGGCT
 15 GCCTGGCCTGGAAGCCAGATATATGGCCTTCGCTCACGACCTGATGGCCGACGCTCAGAGACAGGA
CAGACATTCTTCCTGTACTACGCCAGCCACCACACACACTACCCTCAGTTCTCTGGCCAGTCCTTC
GCCGAGAGATCTGGCAGAGGCCCTTTTGGCGATAGCCTGATGGAAGTGGATGCCGCCGTGGGAACA
CTGATGACAGCCATTGGAGATCTGGGCCTGCTGGAAGAGACACTGGTCATCTTCACCGCCGACAAC
GGCCCCGAGACAATGAGAATGAGCAGAGGCGGCTGTAGCGGCCTGCTGAGATGTGGCAAGGGAAC
 20 AACATACGAAGGCGGCGTCAGAGAGCCTGCTCTGGCTTTTGGCCTGGACATATTGCCCTGGCGT
GACACACGAAGTGGCCTCTTCTCTGGATCTGCTGCCTACACTGGCTGCTTTGGCTGGCGCTCCTCTG
CCTAATGTGACCCTGGATGGCTTCGATCTGTCTCCACTGCTGCTCGGAACAGGCAAGAGCCCTAGAC
AGAGCCTGTTCTTCTACCCTAGCTACCCCGATGAAGTGCGGGGAGTGTTCGCGTGCGGACAGGCA
AGTACAAGGCCCACTTTTTTACCCAAGGCAGCGCCACAGCGATACCACAGCTGATCCTGCTTGTC
 25 CGCCTCTAGCAGCCTGACAGCTCATGAACCACCTCTGCTGTACGACCTGTCTAAGGACCCCGGCGA
GAACTATAATCTGCTTGGCGGAGTTGCCGGCGCTACACCTGAAGTTCTGCAGGCTCTGAAACAGCTC
CAGCTGCTGAAAGCCCAGCTGGACGCTGCTGTGACATTTGGACCTTCTCAGGTGGCAAGAGGCGAG
GACCCTGCTCTGCAGATTTGTTGTCACCCTGGCTGTACCCCTAGACCTGCCTGCTGTCACTGTCCTG
ATCCTCACGCTTGAGATTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAAC
 30 TATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGT
 ATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTT
 GTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCC
 ACCACCTGTCAGCTCCTTTCGGGACTTTCGCTTTCCTTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCATCG
 CCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGTGTGTG
 35 CGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTC
 CTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCT
 GCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCC
 GCCTGATCCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACC

CTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG
 GTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATA
 GCAGGCATGCTCGAAATTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT
 CGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTG
 5 AGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAATCGCGACGGCCGACGTCTTTGTTACAACCTTACTA
 TATATATGCACACATATATATATATTTGGGTATATTGGGGGGGTCTAATTTAAGAAATGCATAATTGG
 CTATAGACAGACAGTTGTCAGAACTTGGCAATGGGTACGTGCAGGTTTATTATACCAAGTCTACTTGT
 AGTTGTTCAAAATGTATCATAATAACAAGGCCGGGCGAGGTCGTACGCCTGTAATCCCAGCATTTTG
 GGAGGCTAAGGCAGGAGGATTGCTTGAGGTCAGGAGTTTGTGACCAGCCTGGGCAACAGAGCAAGA
 10 CCCTGTCTCCAAAAAGAAAAAAATAATTTTTTACAAAATAAAAACAAAATGTATCATCAGACGAAATTA
 AATAAGAGGCAATTCATTGTAATGACAACTTTTCCCAGCTTGACATTTAACAAAAAGTCTAAGTCCTCT
 TAATTCATATTTAATGATCAAATATCAAATACTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTCTCG
 CTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCCTGGCTCACTGCAAGCTCCGCCTCCCGGGTT
 CACGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGACATGCGCCACCACGCCCCGGC
 15 TAATTTTGTATTTTAGTAGAGATGGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGGCTGGTCTTGAATTTCCCACCTC
 AGGTGATCTGCCTGCCTCAGCCTCACAAAGCAGTAGCTGGGACTACAGGCACCCACCACCACACTT
 GGTTAATCTTTTGTATTTTTTTGTAAAGACGGGATTTACCATGTAGCCAGGATGGTCTCGATCTC
 CTGATCTCATGATCCGCCCGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCCCGC
 CCGGCCATCAAATACTAATTCTTAAATGGTAAGGACCCACTATTCAGAACCTGTATCCTTATCACTAAT
 20 ATGCAAATATTTATTGAATACTTACTATGTCATGCATACTAGAGAGAGTTAGATAAATTTGATACAGCTA
 CCCTCACAGAACTTACAGTGTAAATAGATGGCATGACATGTACATGAGTAACTGTGAACAGTGTTAAAT
 TGCTATTTAAAAAAAAGACGGCTGGGCGCTGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGC
 CAAGGCAAGTTGATCGCTCGAGGTCAAGAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAACGTGGTAAACCCCGT
 CTCTACTAAAAATACAAAAAAAATTAGCCAGGCATGGTGGCACAGGCCTGTAATCCCAGCTACTAG
 25 GGAGGCTGAGACATGGAGAAGTCTTGAATCCAGGAGGCAGAGGTTACAGTGAGCCGAGATCATA
 CACTACACTCCAGCCTGAGTGACAGAGCGAGACTCCTGTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATACA
 GGTTAAGTGTTATGGTAGTTGAAGAGAGAACTCAAACCTGTCTCAGAAGCCTCACTTGATGTGGAC
 CACTGATATGAAATAATATAAATAGGTATAATTCAATAAATAGGAACTTCAGTTTTAATCATCCCAAACA
 CCAAACCTTCCTATCAAACAGGTCCAATAAACTCAATCTCTATAAGAGCTAGACAGAAATCTACTTGGT
 30 GGCCTATAATCTTATTAGCCCTTACTTGTCCCATCTGATATTAATTAACCCCATCTAATATGGATTAGTT
 AACAAATCCAGTGGCTGCTTTGACAGGAACAGTTGGAGAGAGTTGGGGATTGCAACATATTCAATTATA
 CAAAAATGCATTACAGCATCTACCTTGATTAAGGCAGTGTGCAACAGAATTTGCAGGAGAGTAAAGAA
 TGATTATAAATTTACAACCCTTAAGAGCTATAGCTGGGCGTGGTGGCTCATGCCTGTAAATCCCAGC
 ACTTTGGGAGGCTGAGGCGGGTGGATCACCTGAGGCCAGAAGTTCAAGACCAGCCTAGCCAACATG
 35 GCGAAACCCTGTCTCTACAAAAAATACAAAAATTAGCCGGGTGTGGTGGCACGTGCCTGTAGTCCCA
 GTTACTTGGGAGGCCGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCTAGGAGGTGGAGGCTGCAGTGAGCCGA
 GATTGTGCCACTGCACTCCACTTCAGCCTGGGCGACAAGAGCAAGACTCCGTCACAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAGGCTAAAATCTAGTGGGAAAGGCATATATACATACTAACTGTATAGCATAATAAAGC

TCATAATCTGTAACAAAATCTAATTCGACAAGCCCAGAACTTGTGATTTACCAAAAACAGTTATATAT
 ACACAAAAAGTAAACCTAGAACCCCAAAGTTACCCAGCACCAATGATTCTCTCCCTAAGCAGTATCAAG
 TTAAAGCAGTGATTACATTCTACTGCCTAGATTGTAACTGAGTAAAGGAGACCAGCACCTTTCTGC
 TACTGAACTAGCACAGCCGTGTAAACCAACAAGGCAATGGCAGTGCCCAACTTTCTGTATGAATATAA
 5 GTTACATCTGTTTTATTATTTGTGACTTGGTGTTCATGTGGTTATTATCAACACCTTCTGAAAGAACA
 ACTACCTGCTCAGGCTGCCATAACAAAATACCACAGACTGAGTGACTTAACAGAACTTATTTCTCAC
 AGTTTTTGAGGCTGGGAAGTCCAAAATTAAGCTAACTGCAAGGTAGGTTTCAATCTCAGGCCTCTTCT
 TTGGCTTGAAGGTCTTCTAACTGTGTGCTCACATGACCTCTTCTAACAAGCTCTCTGGTGTCTCTTTTT
 TTTTTTTTTCTTTTTTGAGACAGAGTCTCACTCTGTCACCCAGGCTGGAGTACAGTGGCACAATCTG
 10 GGCTCACTGCAACCTCCAACTCCCGGGTTCAAGTGATTCTCATGCCTCACCTCCCGAGTAGCTTGG
 ATGACAGGAGCCCGCTACCACACCCAGCTAATTTTTGTATTTTAGTAGAGATGGTGTTCCTACATT
 GGCCAGGCTGGTCTCAAACCTCCTGACCTCGTGATCCACCCACCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATT
 ACAGGTGTGAGCCACTGCGCCCGTCTGGTGTCTTTTCATATAAGGGCACTAATCCAATCAGACCTG
 GGCCCAACCCTCCCGACTTCTTCTAACTGTAATTACCTTCCAAAGGCCCTGTCTCCAAATACCATCAC
 15 ACTGGGGGTTAGGACTTCAAAAAAGGTATGGGGGGGGTGTGGGAGGACATAAATGCTCAGTCCATA
 ACAAGCACCCAACATAAAAAATGGCTAGAACAGATCACAAAAAAGGTCTGTATGGCTTTGGGGAA
 GGGCTCAACCCCAAAATATCTGAAAGCTCTGGAGGGGCCTAGAAGTGGTAAATGAATGAAAACGTGG
 TTAATCTCCCGATCTGCCTTTCCCAAATATGGCCATTCTTGGCTGAATCAGAAATCAAAGGACAGGTT
 ATTAATTACTAGCTCTAAGTTACTTACCATTTGCTGAGACAGTTCAGAAATCTGACTGCATCTCCTCAG
 20 GGATCTAGAACACAGTTCTCAAATTCTAACTTACTTGTGATATACTTGTGAATGATAAAATCGCTACA
 GGTACTTTTATTAATCTGAAAGAGTATTGAGAAATTACCTTTCATTCTGACTTTTGTCTGGAATGAAAAT
 CAATACTTTTGTCTATATTCCATTACTGAAATAATTTTACTTTCCAGTAAACTGGCATTATAATTTTTTT
 AATTTTTTAAACTTCATAATTTTTTGCCAGACTGACCCATGTAAACATACAAATTACTAATAATTATGCA
 CGTCACATCTGTAATAATGGCCTTCATGTAAACATTTTTGTGGTTTACACATAAAATCTCTAATTACAA
 25 GCTATATTATCTAAAATTACAGTAAGCAAGAAAATTAATCCAAGCTAAGACAATACTTGCAACATCAAT
 TCATCATCTGTGACAAGGACTGCTTAAGTCTCTTTGTGGTTGACGTCATTAATTAAGTGGCCTCATGG
 GCCTTCCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAACATGGTCATA
 GCTGTTTCCTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCG
 GGTAAGCCTGGGGTGCTAATGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
 30 TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
 GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCT
 CTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCT
 TTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG
 CACGAACCCCCCGTTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG
 35 GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA
 GGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTA
 TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAAC
 CACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAA

GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTT
GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATC
TAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGC
GATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGG
5 GCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATC
AGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT
CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTG
TTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACAGCTCCGGTTC
CCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCT
10 CCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTC
TCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAG
AATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAG
CAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGC
TGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACC
15 AGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGGCGACACGG
AAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGA
GCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAA
GTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCATT
TTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGA
20 GTGGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGGT
GCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGT
AACGCCAGGGTTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACGACT
CACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCTAGGCGCGCCAACGCGT (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de ADN de la ARSA subrayada con codones optimizados (humana)

25 **Secuencia de ADN de la ITR en 5' del AAV2**

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCG
GGCGACCTTTGGTGCCTCGCCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCA
TCACTAGGGGTTCT (SEQ ID NO: 4)

Secuencia de ADN de la ITR en 3' del AAV2 en orientación invertida

30 AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCC
GGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTGCCTCGCCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
AGAGGGAGTGGCCAA (SEQ ID NO: 5)

Secuencia de ADN del elemento potenciador de CMV (GenBank: K03104.1)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGG
35 AGTTCCGCGTTACATACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCAT
GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG
AGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATT

GACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTA
CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de ADN del promotor de la actina de pollo

TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTA
5 TTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGG
CGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCA
GAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGC
GAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCC
(SEQ ID NO: 7)

Secuencia de ADN del elemento WPRE

TTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTAC
GCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCAATTTCTC
CTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGC
GTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTC
15 CTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCTTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCCTTGCCC
GCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGT
CCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCC
TTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCG
TCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTG (SEQ ID NO: 8)

Secuencia de aminoácidos de la cápside del AAV9 (VP1)

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Ser
1				5					10					15	
Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Gln	Pro
			20					25					30		
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	His	Gln	Asp	Asn	Ala	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro
		35				40				45					
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro
	50				55				60						
Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp
65				70				75						80	
Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala
			85					90					95		
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly
		100				105						110			
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Leu	Glu	Pro
		115				120					125				
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg
	130					135					140				
Pro	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ala	Gly	Ile	Gly

	145		150		155		160									
	Lys	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr
			165				170				175					
	Gly	Asp	Thr	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Ile	Gly	Glu	Pro	Pro
5			180				185				190					
	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Ser	Leu	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly
			195				200				205					
	Ala	Pro	Val	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Ser
			210				215				220					
10	Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Gln	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile
	225					230					235				240	
	Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu
			245				250				255					
	Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Asn	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Asn	Asp	Asn
15			260				265				270					
	Ala	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg
			275				280				285					
	Phe	His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn
			290				295				300					
20	Asn	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile
	305					310					315				320	
	Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly	Val	Lys	Thr	Ile	Ala	Asn
			325				330				335					
	Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Asp	Tyr	Gln	Leu
25			340				345				350					
	Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Glu	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro
			355				360				365					
	Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp
			370				375				380					
30	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe
	385					390					395				400	
	Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Phe	Ser	Tyr	Glu
			405				410				415					
	Phe	Glu	Asn	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu
35			420				425				430					
	Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser
			435				440				445					
	Lys	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Gln	Asn	Gln	Gln	Thr	Leu	Lys	Phe	Ser
			450				455				460					

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
 485 490 495
 5 Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
 500 505 510
 Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
 10 530 535 540
 Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
 545 550 555 560
 Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
 565 570 575
 15 Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
 580 585 590
 Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 20 610 615 620
 Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
 625 630 635 640
 Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655
 25 Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
 660 665 670
 Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
 675 680 685
 Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
 30 690 695 700
 Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
 705 710 715 720
 Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 725 730 735

(SEQ ID NO: 9)

35

Secuencia de aminoácidos del péptido de direccionamiento

KGGGFHG (SEQ ID NO: 10)

Péptido de direccionamiento flanqueado por conectores - Secuencia de aminoácidos

AAAKGGGFHGAS (SEQ ID NO: 11)

Secuencia de aminoácidos de la cápside del AAV1999 (VP1)

	Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Ser
	1				5					10					15	
	Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Gln	Pro
5				20				25					30			
	Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	His	Gln	Asp	Asn	Ala	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro
			35					40					45			
	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro
		50					55					60				
10	Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp
	65				70						75				80	
	Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala
				85					90					95		
	Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly
15			100					105					110			
	Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Leu	Glu	Pro
			115					120					125			
	Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg
		130					135					140				
20	Pro	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ala	Gly	Ile	Gly
	145				150					155				160		
	Lys	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr
				165						170				175		
	Gly	Asp	Thr	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Ile	Gly	Glu	Pro	Pro
25			180					185					190			
	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Ser	Leu	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly
			195					200					205			
	Ala	Pro	Val	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Ser
		210					215					220				
30	Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Gln	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile
	225			230						235				240		
	Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu
				245						250				255		
	Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Asn	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Asn	Asp	Asn
			260					265					270			
35	Ala	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg
			275					280					285			
	Phe	His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn
		290					295					300				

	Asn	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile
	305					310				315						320
	Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly	Val	Lys	Thr	Ile	Ala	Asn
					325					330						335
5	Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Asp	Tyr	Gln	Leu
					340					345						350
	Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Glu	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro
					355					360						365
	Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp
10		370						375						380		
	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe
	385						390					395				400
	Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Phe	Ser	Tyr	Glu
					405					410						415
15	Phe	Glu	Asn	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu
					420					425						430
	Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser
					435					440						445
	Lys	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Gln	Asn	Gln	Gln	Thr	Leu	Lys	Phe	Ser
20		450						455						460		
	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Asn	Met	Ala	Val	Gln	Gly	Arg	Asn	Tyr	Ile	Pro
	465						470					475				480
	Gly	Pro	Ser	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Asn
					485					490						495
25	Asn	Asn	Ser	Glu	Phe	Ala	Trp	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Ala	Leu	Asn
					500					505						510
	Gly	Arg	Asn	Ser	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys
					515					520						525
	Glu	Gly	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Phe	Gly
30		530						535					540			
	Lys	Gln	Gly	Thr	Gly	Arg	Asp	Asn	Val	Asp	Ala	Asp	Lys	Val	Met	Ile
	545						550					555				560
	Thr	Asn	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Ser
					565					570						575
35	Tyr	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Asn	His	Gln	Ser	Ala	Gln	Ala	Ala	Ala	<u>Lys</u>
					580					585						590
	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	<u>Phe</u>	<u>His</u>	<u>Gly</u>	Ala	Ser	Ala	Gln	Ala	Gln	Thr	Gly	Trp	Val
					595					600						605
	Gln	Asn	Gln	Gly	Ile	Leu	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln	Asp	Arg	Asp	Val

	610	615	620	
	Tyr	Leu	Gln	Gly
	Pro	Ile	Trp	Ala
	Lys	Ile	Pro	His
	Thr	Asp	Gly	Asn
	625	630	635	640
	Phe	His	Pro	Ser
	Pro	Leu	Met	Gly
	Gly	Gly	Phe	Gly
	Met	Lys	His	Pro
	Pro	645	650	655
5	Pro	Gln	Ile	Leu
	Ile	Lys	Asn	Thr
	Pro	Val	Pro	Ala
	Asp	Pro	Pro	Thr
	660	665	670	
	Ala	Phe	Asn	Lys
	Asp	Lys	Leu	Asn
	Ser	Phe	Ile	Thr
	Gln	Tyr	Ser	Thr
	675	680	685	
10	Gly	Gln	Val	Ser
	Val	Glu	Ile	Glu
	Trp	Glu	Leu	Gln
	Lys	Glu	Asn	Ser
	690	695	700	
	Lys	Arg	Trp	Asn
	Pro	Glu	Ile	Gln
	Tyr	Thr	Ser	Asn
	Tyr	Tyr	Lys	Ser
	705	710	715	720
	Asn	Asn	Val	Glu
	Phe	Ala	Val	Asn
	Thr	Glu	Gly	Val
	Tyr	Ser	Glu	Pro
	725	730	735	
15	Arg	Pro	Ile	Gly
	Thr	Arg	Tyr	Leu
	Thr	Arg	Asn	Leu
	(SEQ ID NO: 12)			
	740	745		

Secuencia de aminoácidos de la cápside del AAV1999 (VP2)

Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

20 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser

25 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg

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

30 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp

35 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
 Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
 Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 5 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
 Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
 Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
 Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Ala Ala **Lys**
Gly Gly Gly Phe His Gly Ala Ser Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val
 10 Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
 Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn
 Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro
 Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr
 Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
 15 Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser
 Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser
 Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro
 Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu (SEQ ID NO: 13)
Secuencia de aminoácidos de la cápside del AAV1999 (VP3)
 20 Met Ala Ser Gly Gly Gly
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 25 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
 30 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
 Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 35 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
 Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
 Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
 Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
 Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
 5 Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
 Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Ala Ala Lys
Gly Gly Gly Phe His Gly Ala Ser Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val
 Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
 Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn
 10 Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro
 Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr
 Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
 Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser
 Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser
 15 Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro
 Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu (SEQ ID NO: 14)

Secuencia de ADN completa del vector; la secuencia codificante de la ARSA está subrayada

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCTG
 GGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCA
 20 TCACTAGGGGTTCCCTTACGTACAATTGGGATCCCGGACCGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAA
 TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGT
 AAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC
 ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCACTT
 GGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
 25 GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT
 CATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCC
 CCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGG
 GGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTG
 CGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGG
 30 CGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCC
 CCGCTCCGCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGA
 GCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTT
 TCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGG
 GGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCGGCGGCTG
 35 TGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCC
 GGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTG
 TCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCC
 CTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGCGCGGGG

GCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCG
 GGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGC
 GGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCA
 AATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGC
 5 GGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCC
 CCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCA
 GGGCGGGGTTCTGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCT
 TCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAAT
 TCTACGTACCACCATGAGCATGGGAGCCCCTAGATCTCTGCTGCTGGCTCTTGCTGCTGGACTGGCT
 10 GTGGCCAGACCTCCTAACATCGTGCTGATCTTCGCCGACGATCTCGGCTATGGCGATCTGGGCTGTT
 ACGGACACCCTAGCAGCACCAACCTAACCTGGATCAACTGGCTGCCGGCGGACTGAGATTCACCG
 ATTTCTACGTGCCCGTGTCTCTGTGCACACCTAGTAGAGCTGCTCTGCTGACAGGCAGACTGCCAGT
 GCGGATGGGAATGTATCCTGGCGTGTGTTTCTAGCAGTAGAGGCGGACTGCCTCTGGAAGAAGT
 GACAGTTGCTGAAGTGCTGGCCGCCAGAGGCTATCTGACTGGAATGGCCGGAAAATGGCACCTCGG
 15 AGTTGGACCTGAAGGCGCTTTTCTGCCTCCTCACCAGGGCTTCCACAGATTTCTGGGCATCCCTTAC
 AGCCACGATCAGGGCCCTTGCCAGAACCTGACCTGCTTTCCTCCTGCCACACCTTGTGATGGCGGCT
 GTGATCAGGGACTCGTGCTATTCTCTGCTGGCCAATCTGAGCGTGGAAGCTCAACCTCCTTGGCT
 GCCTGGCCTGGAAGCCAGATATATGGCCTTCGCTCACGACCTGATGGCCGACGCTCAGAGACAGGA
 CAGACCATTCTTCCTGTACTACGCCAGCCACCACACACTACCCTCAGTTCTCTGGCCAGTCCTTC
 20 GCCGAGAGATCTGGCAGAGGCCCTTTTGGCGATAGCCTGATGGAAGTGGATGCCGCCGTGGGAACA
 CTGATGACAGCCATTGGAGATCTGGGCCTGCTGGAAGAGACACTGGTCATCTTCACCGCCGACAAC
 GGCCCCGAGACAATGAGAATGAGCAGAGGCGGCTGTAGCGGCCTGCTGAGATGTGGCAAGGGAAC
 AACATACGAAGGCGGCGTCAGAGAGCCTGCTCTGGCTTTTTGGCCTGGACATATTGCCCTGGCGT
 GACACACGAAGTGGCCTCTTCTCTGGATCTGCTGCCTACACTGGCTGCTTTGGCTGGCGCTCCTCTG
 25 CCTAATGTGACCCTGGATGGCTTCGATCTGTCTCCACTGCTGCTCGGAACAGGCAAGAGCCCTAGAC
 AGAGCCTGTTCTTCTACCCTAGCTACCCCGATGAAGTGCGGGGAGTGTTTGCCGTGCGGACAGGCA
 AGTACAAGGCCCACTTTTTTACCCAAGGCAGCGCCACAGCGATACCACAGCTGATCCTGCTTGCA
 CGCCTCTAGCAGCCTGACAGCTCATGAACCACCTCTGCTGTACGACCTGTCTAAGGACCCCGGCGA
 GAACTATAATCTGCTTGGCGGAGTTGCCGGCGCTACACCTGAAGTTCTGCAGGCTCTGAAACAGCTC
 30 CAGCTGCTGAAAGCCCAGCTGGACGCTGCTGTGACATTTGGACCTTCTCAGGTGGCAAGAGGCGAG
 GACCCTGCTCTGCAGATTTGTTGTCACCCTGGCTGTACCCCTAGACCTGCCTGCTGTCACTGTCTG
 ATCCTCACGCTTGAGATTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAAC
 TATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGT
 ATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTT
 35 GTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCC
 ACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCG
 CCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTTGT
 CGGGGAAATCATCGTCCTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTC

CTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCT
GCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCC
GCCTGATCCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACC
CTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG
5 GTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATA
GCAGGCATGCTCGAAATTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT
CGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTG
AGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA (SEQ ID NO: 16)

Secuencia de ADN de la ARSA subrayada con codones optimizados (humana)

10

15

20

25

30

35