

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 991 277**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/86	(2006.01)	A61P 19/00	(2006.01)
A01K 67/0276	(2014.01)	A61P 1/10	(2006.01)
C12N 9/12	(2006.01)	A61P 1/12	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)	A61P 9/00	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)		
A61P 31/00	(2006.01)		
A61P 25/28	(2006.01)		
A61P 21/00	(2006.01)		
A61P 11/16	(2006.01)		
A61P 11/00	(2006.01)		

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2016 PCT/US2016/066611**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17106313**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2016 E 16822578 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024 EP 3390644**

(54) Título: **Vectores víricos adenoasociados para tratar la mucolipidosis de tipo II**

(30) Prioridad:

15.12.2015 US 201562267502 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2024

(73) Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (50.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US y
SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE
FOUNDATION (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**YEW, NELSON y
JIN, DONG-KYU**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 991 277 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vectores víricos adenoasociados para tratar la mucolipidosis de tipo II

5 Remisión a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º de serie 62/267 502, presentada el 15 de diciembre de 2015.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a vectores rAAV, partículas, composiciones, para su uso para tratar la mucolipidosis de tipo II y/o de tipo III.

15 Breve sumario de la invención

La mucolipidosis de tipo II y III (ML II; ML III) son enfermedades recesivas autosómicas del almacenamiento lisosómico caracterizadas por una deficiencia de UDP-GlcNAc; enzima lisosómica N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (abreviada GlcNAc-1-fosfotransferasa). La GlcNAc-1-fosfotransferasa es un complejo enzimático hexamérico que consiste en tres subunidades diferentes: α_2 , β_2 y γ_2 . Las subunidades α_2 y β_2 contienen la actividad catalítica y están codificadas por un solo gen, GNPTAB. Mutaciones en GNPTAB que provocan una pérdida completa de actividad enzimática se encuentran en pacientes con MLII. La mucolipidosis II es muy progresiva y los pacientes rara vez sobreviven más allá de la primera década de vida. Además, las opciones de tratamiento disponibles para ML II siguen siendo limitadas. Solo se ha intentado el trasplante de médula ósea en un pequeño número de pacientes. Por el contrario, mutaciones en GNPTAB que provocan una reducción parcial de la actividad de GlcNAc-1-fosfotransferasa se encuentran en pacientes con MLIII. Estos pacientes en general muestran síntomas menos graves y progresión más lenta de la enfermedad, pero siguen presentando problemas graves de salud tales como anomalías esqueléticas, retraso del desarrollo y cardiomegalia.

30 La disponibilidad de serotipos de AAV que presentan tropismo específico de tejido y promueven la expresión mantenida de transgenes ofrece la posibilidad de genoterapia mediada por AAV para el tratamiento sistémico de enfermedades lisosómicas, incluyendo ML II y ML III. Por consiguiente, la investigación del tratamiento mediado por AAV de ML II/III es importante para establecer si esta estrategia representa una posible estrategia terapéutica para esta enfermedad devastadora. Sin embargo, antes de que pueda examinarse el tratamiento mediado por AAV de MLII/III, deben superarse las limitaciones técnicas. La secuencia codificante de GNPTAB (más de 5,6 kb en seres humanos) es más larga que el genoma de AAV endógeno (aproximadamente 4,7 kb). Por lo tanto, los vectores AAV que pueden alojar GNPTAB junto con secuencias promotoras/potenciadoras funcionales y los otros componentes del genoma de AAV, mientras se sigue facilitando un empaquetamiento eficaz en partículas víricas son muy ventajosos.

40 La invención es como se define por las reivindicaciones. La invención se refiere a una partícula vírica adenoasociada recombinante (rAAV) para su uso en un método para tratar la mucolipidosis de tipo II (ML II) o la mucolipidosis de tipo III (ML III) en un mamífero, en donde la partícula de rAAV comprende un vector rAAV, en donde el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (GNPTAB), al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV y un intrón de virus diminuto de ratones (MVM), en donde la GNPTAB está unida de forma funcional a un promotor, en donde el promotor es un potenciador de citomegalovirus (CMV)/promotor de beta-actina de pollo (CBA), en donde el potenciador de CMV es un potenciador acortado y el promotor de CBA es un promotor de CBA truncado.

50 La solicitud divulga un vector vírico adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende ácido nucleico que codifica N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (GNPTAB) y al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV. En algunas realizaciones, la GNPTAB comprende las subunidades alfa y beta. De acuerdo con la invención, la GNPTAB está unido de forma funcional a un promotor. En algunas realizaciones, la GNPTAB es una GNPTAB humana. En algunas realizaciones, la GNPTAB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, la GNPTAB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. De acuerdo con la invención, el promotor es un promotor de CBA modificado que es un promotor de CBA truncado. De acuerdo con la invención, el potenciador de CMV es un potenciador de CMV acortado. De acuerdo con la invención, el vector comprende un intrón de MVM. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de poliadenilación. En algunas realizaciones, la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina. En algunas realizaciones, la repetición terminal de AAV es una ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón. En algunas realizaciones, el vector rAAV comprende dos ITR.

En algunos aspectos, la solicitud divulga una partícula de rAAV que comprende el vector rAAV de una cualquiera de las realizaciones anteriores. En algunas realizaciones, la partícula de AAV comprende una cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AA VRh8, AA VRh8R, AAV9, AAV10, AA VRh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV de cabra, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino, AAV de ratón o rAAV2/HBoV1. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende una o más ITR y la cápside derivada del mismo serotipo de AAV. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende una o más ITR derivadas de un serotipo de AAV diferente a la cápside de las partículas víricas de rAAV. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV8, y en donde el vector comprende ITR de AAV2. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV se produce transfectando una célula hospedadora con ácido nucleico que codifica el vector rAAV y ácido nucleico que codifica las funciones rep y cap de AAV, y proporcionando ácido nucleico que codifica funciones auxiliares de AAV. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV se proporcionan transfectando la célula hospedadora con ácido nucleico que codifica las funciones auxiliares de AAV. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV se proporcionan infectando la célula hospedadora con un virus auxiliar AAV que proporciona las funciones auxiliares de AAV. En algunas realizaciones, el virus auxiliar AAV es un adenovirus, un virus del herpes simple o un baculovirus. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV se produce por una célula productora de AAV que comprende ácido nucleico que codifica el vector rAAV y ácido nucleico que codifica las funciones rep y cap de AAV, y proporcionando ácido nucleico que codifica funciones auxiliares de AAV. En algunas realizaciones, la célula productora de AAV comprende ácido nucleico que codifica funciones auxiliares de AAV. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV se proporcionan infectando las células productoras de AAV con un virus auxiliar AAV que proporciona las funciones auxiliares de AAV. En algunas realizaciones, el virus auxiliar AAV es un adenovirus, un virus del herpes simple o un baculovirus. En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las partículas de rAAV descritas en este documento.

La invención proporciona la partícula de rAAV para su uso en un método para tratar la mucolipidosis de tipo II (ML II) o la mucolipidosis de tipo III (ML III) en un mamífero como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el método es para mantener o aumentar el tamaño corporal en un mamífero con mucolipidosis de tipo II (ML II) o mucolipidosis de tipo III (ML III), en donde las partículas de rAAV comprenden un vector rAAV, en donde el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (GNPTAB) y al menos una ITR de AAV, en donde la expresión de GNPTAB provoca el mantenimiento o un incremento en el aumento de peso corporal y/o el mantenimiento o un incremento en el aumento de la altura corporal. En algunas realizaciones, el método es para prevenir la reducción del tamaño corporal en un mamífero con mucolipidosis de tipo II (ML II) o mucolipidosis de tipo III (ML III), en donde las partículas de rAAV comprenden un vector rAAV, en donde el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (GNPTAB) y al menos una ITR de AAV, en donde la expresión de GNPTAB evita la reducción del peso corporal. En algunas realizaciones, el método es para mantener o aumentar el contenido mineral óseo en un mamífero con mucolipidosis de tipo II (ML II) o mucolipidosis de tipo III (ML III), en donde las partículas de rAAV comprenden un vector rAAV, en donde el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica GNPTAB y al menos una ITR de AAV, en donde la expresión de GNPTAB provoca el mantenimiento o un aumento en el contenido mineral óseo. En algunas realizaciones, el método es para prevenir la reducción del contenido mineral óseo en un mamífero con mucolipidosis de tipo II (ML II) o mucolipidosis de tipo III (ML III), en donde las partículas de rAAV comprenden un vector rAAV, en donde el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica GNPTAB y al menos una ITR de AAV, en donde la expresión de GNPTAB evita la reducción del contenido mineral óseo. En algunas realizaciones, el método es para mantener o aumentar la densidad mineral ósea en un mamífero con mucolipidosis de tipo II (ML II) o mucolipidosis de tipo III (ML III), en donde las partículas de rAAV comprenden un vector rAAV, en donde el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica GNPTAB y al menos una ITR de AAV, en donde la expresión de GNPTAB provoca el mantenimiento o un aumento en la densidad mineral ósea. En algunas realizaciones, el método es para prevenir la reducción de la densidad mineral ósea en un mamífero con mucolipidosis de tipo II (ML II) o mucolipidosis de tipo III (ML III), en donde las partículas de rAAV comprenden un vector rAAV, en donde el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica GNPTAB y al menos una ITR de AAV, en donde la expresión de GNPTAB evita la reducción de la densidad mineral ósea.

En algunas realizaciones de los usos anteriores, el tratamiento mejora uno o más síntomas de ML II o ML III, en donde el uno o más síntomas de ML II o ML III son defectos esqueléticos, deficiencias cognitivas, retrasos en el desarrollo de habilidades motoras gruesas y finas, pérdida de audición, falta de tono muscular, abdomen sobresaliente, hernias umbilicales, engrosamiento mucoso progresivo de las vías respiratorias, infecciones respiratorias frecuentes, engrosamiento e insuficiencia de la válvula mitral, estreñimiento o diarrea. En algunas realizaciones, el tratamiento retarda la progresión de uno o más síntomas de ML II o ML III, en donde el uno o más síntomas de ML II o ML III son defectos esqueléticos, deficiencias cognitivas, retrasos en el desarrollo de habilidades motoras gruesas y finas, pérdida de audición, falta de tono muscular, abdomen sobresaliente, hernias umbilicales, engrosamiento mucoso progresivo de las vías respiratorias, infecciones respiratorias frecuentes, engrosamiento e insuficiencia de la válvula mitral, estreñimiento o diarrea. En algunas realizaciones, el método es para mejorar uno o más síntomas de ML II o ML III en un mamífero, en donde las partículas de rAAV comprenden un vector rAAV, en donde el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica GNPTAB y al menos una ITR de AAV; en donde el uno o más síntomas de ML II o ML III son defectos esqueléticos, deficiencias cognitivas, retrasos en el desarrollo de habilidades motoras gruesas y finas, pérdida de audición, falta de tono muscular, abdomen sobresaliente, hernias umbilicales, engrosamiento mucoso progresivo de las vías respiratorias, infecciones respiratorias frecuentes, engrosamiento e insuficiencia de la válvula mitral, estreñimiento o diarrea. En algunas realizaciones, el método es para retardar la progresión de uno o más síntomas de

ML II o ML III en un mamífero, en donde las partículas de rAAV comprenden un vector rAAV, en donde el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica GNPTAB y al menos una ITR de AAV; en donde el uno o más síntomas de ML II o ML III son defectos esqueléticos, deficiencias cognitivas, retrasos en el desarrollo de habilidades motoras gruesas y finas, pérdida de audición, falta de tono muscular, abdomen sobresaliente, hernias umbilicales, engrosamiento mucoso progresivo de las vías respiratorias, infecciones respiratorias frecuentes, engrosamiento e insuficiencia de la válvula mitral, estreñimiento o diarrea.

De acuerdo con la invención, la GNPTAB está unido de forma funcional a un promotor. En algunas realizaciones, la GNPTAB es una GNPTAB humana. En algunas realizaciones, la GNPTAB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, la GNPTAB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. De acuerdo con la invención, el promotor es un potenciador de CMV/promotor de beta-actina de pollo (CBA). De acuerdo con la invención, el promotor de CBA es un promotor de CBA modificado. De acuerdo con la invención, el promotor de CBA modificado es un promotor de CBA truncado. De acuerdo con la invención, el potenciador de CMV es un potenciador de CMV acortado. De acuerdo con la invención, el vector comprende un intrón de MVM. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de poliadenilación. En algunas realizaciones, la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina. En algunas realizaciones, la repetición terminal de AAV es una ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón. En algunas realizaciones, el vector rAAV comprende dos ITR. En algunas realizaciones, la partícula de AAV comprende una cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV de cabra, AAV1/AAV2 químérico, AAV bovino, AAV de ratón o rAAV2/HBoV1. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende una o más ITR y la cápside derivada del mismo serotipo de AAV. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende una o más ITR derivadas de un serotipo de AAV diferente a la cápside de las partículas víricas de rAAV. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV8, y en donde el vector comprende ITR de AAV2.

En algunas realizaciones de las realizaciones anteriores, la partícula de rAAV se produce transfectando una célula hospedadora con ácido nucleico que codifica el vector rAAV y ácido nucleico que codifica las funciones rep y cap de AAV, y proporcionando ácido nucleico que codifica funciones auxiliares de AAV. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV se proporcionan transfectando la célula hospedadora con ácido nucleico que codifica las funciones auxiliares de AAV. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV se proporcionan infectando la célula hospedadora con un virus auxiliar AAV que proporciona las funciones auxiliares de AAV. En algunas realizaciones, el virus auxiliar AAV es un adenovirus, un virus del herpes simple o un baculovirus. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV se produce por una célula productora de AAV que comprende ácido nucleico que codifica el vector rAAV y ácido nucleico que codifica las funciones rep y cap de AAV, y proporcionando ácido nucleico que codifica funciones auxiliares de AAV. En algunas realizaciones, la célula productora de AAV comprende ácido nucleico que codifica funciones auxiliares de AAV. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV se proporcionan infectando las células productoras de AAV con un virus auxiliar AAV que proporciona las funciones auxiliares de AAV. En algunas realizaciones, el virus auxiliar AAV es un adenovirus, un virus del herpes simple o un baculovirus.

En algunas realizaciones de los usos anteriores, el mamífero es un ser humano. En algunas realizaciones, el ser humano es un sujeto pediátrico. En algunas realizaciones, el ser humano es un adulto joven.

En algunas realizaciones de los usos anteriores, el rAAV se administra por vía intravenosa, intraperitoneal, intraarterial, intramuscular, subcutánea o intrahepática. En algunas realizaciones, el rAAV se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, el rAAV se administra en más de una ubicación. En algunas realizaciones, se repite la administración. En algunas realizaciones, las partículas víricas de rAAV están en una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunos aspectos, la solicitud divulga el uso de cualquier composición farmacéutica como se describe en este documento en la fabricación de un medicamento para tratar ML II o ML III en un mamífero. En algunos aspectos, la solicitud divulga el uso de cualquier composición farmacéutica como se describe en este documento en la fabricación de un medicamento para su uso en cualquiera de los métodos descritos en este documento. En algunos aspectos, la solicitud divulga el uso de cualquiera de las partículas de rAAV como se describe en este documento en la fabricación de un medicamento para tratar ML II o ML III en un mamífero. En algunos aspectos, la solicitud divulga el uso de cualquiera de las partículas de rAAV descritas en este documento en la fabricación de un medicamento para su uso en cualquiera de los métodos como se describe en este documento. La invención proporciona cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en este documento para su uso para tratar ML II o ML III en un mamífero. En algunos aspectos, la solicitud divulga el uso de cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en este documento para su uso en cualquiera de los métodos descritos en este documento. La solicitud divulga el uso de cualquiera de los AAV recombinantes descritos en este documento para tratar ML II o ML III en un mamífero. En algunos aspectos, la solicitud divulga el uso de cualquiera de los AAV recombinantes descritos en este documento para su uso en cualquiera de los métodos descritos en este documento. En algunos aspectos, la solicitud divulga el uso de cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en este documento en la fabricación de un medicamento para mejorar uno o más síntomas de ML II o ML III en un mamífero o retardar la progresión de uno o

más síntomas de ML II o ML III en un mamífero. En algunas realizaciones, la invención proporciona cualquier partícula de rAAV descrita en este documento para su uso para mejorar uno o más síntomas de ML II o ML III en un mamífero o retardar la progresión de uno o más síntomas de ML II o ML III en un mamífero. En algunas realizaciones, la invención proporciona cualquier composición farmacéutica descrita en este documento para su uso para mejorar uno o más síntomas de ML II o ML III en un mamífero o retardar la progresión de uno o más síntomas de ML II o ML III en un mamífero. En algunos aspectos, la solicitud divulga el uso de cualquier AAV recombinante descrito en este documento para mejorar uno o más síntomas de ML II o ML III en un mamífero o retardar la progresión de uno o más síntomas de ML II o ML III en un mamífero. En algunas realizaciones, el uno o más síntomas de ML II o ML III son defectos esqueléticos, deficiencias cognitivas, retrasos en el desarrollo de habilidades motoras gruesas y finas, pérdida de audición, falta de tono muscular, abdomen sobresaliente, hernias umbilicales, engrosamiento mucoso progresivo de las vías respiratorias, infecciones respiratorias frecuentes, engrosamiento e insuficiencia de la válvula mitral, estreñimiento o diarrea. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano.

En algunos aspectos, la solicitud divulga un kit que comprende cualquiera de los vectores rAAV descritos en este documento, cualquiera de las partículas de rAAV descritas en este documento o cualquier composición farmacéutica como se describe en este documento. En algunos aspectos, el kit es para tratar ML II o ML III de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en este documento. En algunos aspectos, el kit comprende cualquiera de los vectores rAAV descritos en este documento, cualquiera de las partículas de rAAV descritas en este documento o cualquier composición farmacéutica descrita en este documento. En algunos aspectos, el kit comprende además uno o más tampones o excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunos aspectos, el kit comprende además instrucciones para su uso en el tratamiento de ML II y/o ML III.

Sin formar parte de la invención, la solicitud divulga un modelo animal no humano de mucolipidosis II (ML II), en donde al menos un alelo de un gen de N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (GNPTAB) comprende una eliminación localizada entre los exones 12 y 20. En algunos aspectos, al menos un alelo del gen GNPTAB comprende una eliminación que abarca los exones 12 y 20. En algunos aspectos, el animal es homocigótico para la eliminación en el gen GNPTAB. En algunos aspectos, el animal es heterocigótico para la eliminación en el gen GNPTAB. En algunos aspectos, una parte del gen GNPTAB se remplaza por un gen que codifica un indicador y/o marcador de selección. En algunos aspectos, el marcador de selección confiere resistencia a neomicina. En algunos aspectos, el animal es un mamífero. En algunos aspectos, el mamífero es un roedor. En algunos aspectos, el roedor es un ratón. En algunos aspectos, el ratón tiene un fondo genético derivado de 129/Sv y/o C57Bl/6. En algunos aspectos, el animal es inmunocompetente o inmunodeficiente.

Sin formar parte de la invención, la solicitud divulga un método de generación de un modelo animal no humano de mucolipidosis II (ML II), que comprende introducir una eliminación entre los exones 12 y 20 en al menos un alelo del gen GNPTAB en el animal. En algunos aspectos, al menos un alelo del gen GNPTAB comprende una eliminación que abarca los exones 12 y 20. En algunos aspectos, el animal se cruza para que sea homocigótico para la eliminación en el gen GNPTAB. En algunos aspectos, el animal se cruza para que sea heterocigótico para la eliminación en el gen GNPTAB. En algunos aspectos, una parte del gen GNPTAB se remplaza por un gen que codifica un indicador y/o marcador de selección. En algunos aspectos, el marcador de selección confiere resistencia a neomicina. En algunas realizaciones, el animal es un mamífero. En algunos aspectos, el mamífero es un roedor. En algunos aspectos, el roedor es un ratón. En algunos aspectos, el ratón tiene un fondo genético derivado de 129/Sv y/o C57Bl/6. En algunos aspectos, el animal es inmunocompetente o inmunodeficiente.

Sin formar parte de la invención, la solicitud divulga un método para evaluar un agente para el tratamiento de la mucolipidosis II (ML II), que comprende administrar el agente al modelo animal no humano como se describe en este documento, en donde la mejora de uno o más síntomas de ML II indica que el agente puede proporcionar tratamiento beneficioso de ML II. En algunos aspectos, el síntoma de ML II es peso corporal disminuido, densidad ósea disminuida, contenido mineral óseo disminuido, defectos esqueléticos, deficiencias cognitivas, retrasos en el desarrollo de habilidades motoras gruesas y finas, pérdida de audición, falta de tono muscular, abdomen sobresaliente, hernias umbilicales, engrosamiento mucoso progresivo de las vías respiratorias, infecciones respiratorias frecuentes, engrosamiento e insuficiencia de la válvula mitral, estreñimiento y/o diarrea. En algunos aspectos, el agente es una molécula pequeña, un polipéptido, un anticuerpo, un ácido nucleico o una partícula vírica recombinante.

55 Breve descripción de los dibujos

La figura 1A proporciona un diagrama de la estructura del gen GNPTAB de ratón y el sitio de inserción genómico del vector de captura génica usado para generar ratones con inactivación de GNPTAB.

La figura 1B es una transferencia de Southern que muestra clones ES de ratón usados para generar ratones con inactivación de GNPTAB.

Las figuras 2A-2C muestran el retraso del crecimiento presente en ratones con inactivación de GNPTAB. (Figura 2A) Peso corporal (g) de ratones naturales (+/+) y heterocigóticos (+/-) y homocigóticos (-/-) a las 6 semanas de edad (***, p <0,0001; prueba de comparación múltiple de Bonferroni). (Figura 2B) Longitud nasoanal (mm) de ratones naturales,

heterocigóticos y homocigóticos a las 6 semanas de edad (*; $p < 0,02$; prueba de comparación múltiple de Bonferroni). (Figura 2C) Morfología macroscópica de ratones naturales y homocigóticos.

- 5 Las figuras 3A y 3B muestran imágenes de microscopía óptica de secciones representativas de cartílago femoral teñido con hematoxilina y eosina procedentes de ratones naturales (figura 3A) y con inactivación homocigótica (figura 3B).
- 10 Las figuras 4A-4F demuestran la acumulación de autolisosomas en las glándulas salivales de ratones con inactivación (KO). (Figuras 4A-C) EM que muestra una visión general del ácido de la glándula salival de ratón natural, compuesto de células mucosas y serosas. (Figura 4D) Visión general de un ácido de glándula salival KO. La arquitectura global se ve alterada por la acumulación masiva de vacuolas grandes en KO. (Figuras 4E-F) Aumento mayor de una vacuola (figura 4D), que está rodeada por una sola membrana y contiene material no degradado. El área de aumento se indica mediante el recuadro en (figura 4D). AL, autolisosoma; Mu, célula mucosa; N, núcleo; SG, gránulo secretor.
- 15 Las figuras 5A-5D muestran actividades enzimáticas lisosómicas en sueros de ratones naturales (círculos vacíos) y KO (círculos llenos), como se indica. Se muestra la actividad de N-acetilglucosaminidasa (figura 5A), β -hexosaminidasa A (figura 5B), β -galactosidasa (figura 5C) y β -glucuronidasa (figura 5D).
- 20 Las figuras 6A y 6B proporcionan una visión general del cronograma experimental para inyecciones. (Figura 6A) Cronogramas para tratamiento a largo plazo del estudio para ratones a los que se inyectó el vector vírico con una edad de 6 semanas. (Figura 6B) Se indica el número total de ratones (n) inyectados para cada grupo de tratamiento.
- 25 La figura 7A representa un esquema del vector pAAV2/8-GNPTAB que contiene ADNc de GNPTAB de ratón. La secuencia de ADNc de GNPTAB de ratón se basa en el número de acceso a GenBank NM_001004164.2. Se optimizaron los codones de la secuencia de nucleótidos para la expresión en ratón. La secuencia de aminoácidos está inalterada.
- 30 La figura 7B muestra el análisis cuantitativo de hígados de ratones KO a los que se ha inyectado AAV-GNPTAB en comparación con crías de su misma camada de control.
- 35 Las figuras 8A y 8B muestran el cambio del peso corporal desde el peso inicial a lo largo del tiempo para ratones KO tratados con AAV-GNPTAB y de control. (Figura 8A) Peso corporal total de ratones de control y ratones KO tratados con AAV-GNPTAB (* $p < 0,05$ prueba de comparación múltiple de Dunnett). (Figura 8B) Datos expresados como la cantidad de cambio de peso desde el peso inicial a lo largo del tiempo.
- 40 Las figuras 9A y 9B muestran el cambio de la altura desde la altura inicial a lo largo del tiempo para ratones KO tratados con AAV-GNPTAB y de control. (Figura 9A) Datos expresados como la relación de la longitud corporal comparada antes y 6 semanas después de la inyección (figura 9B). Datos expresados como la relación de la longitud corporal comparada antes y 32 semanas después de la inyección.
- 45 Las figuras 10A-10C proporcionan histogramas que muestran los niveles de densidad mineral ósea antes de la inyección (figura 10A), a las 16 semanas después de la inyección (figura 10B) y a las 32 semanas después de la inyección (figura 10C). (Figura 10A) Se compararon los homocigóticos y homocigóticos tratados con AAV-GNPTAB con los naturales y heterocigóticos. (\dagger ; $p < 0,05$, \ddagger ; $p < 0,02$ en comparación con natural, *; $p < 0,02$, **; $p < 0,002$ en comparación con heterocigótico). El tratamiento con AAV-GNPTAB provocó un aumento estadísticamente significativo en la relación de BMD (después/antes de Tx) en ratones homocigóticos después de 16 semanas de tratamiento (figura 10B) y 32 semanas de tratamiento (figura 10C). (Figura 10B) 16 semanas después del tratamiento, los ratones con GNPTAB nula tratados con AAV-GNPTAB mostraron un aumento significativo en la relación de BMD que otros ratones (**; $P < 0,02$). (Figura 10C) 32 semanas después del tratamiento, se observaron diferencias significativas en la relación de BMD en los ratones tratados con GNPTAB. (#; $p < 0,05$, **; $p < 0,02$). Los valores de P se determinaron mediante análisis de prueba de la t bilateral para datos independientes. Los datos se presentan como la media \pm ETM.
- 55 Las figuras 11A-11C proporcionan histogramas que muestran los niveles de contenido mineral ósea antes de la inyección (figura 11A), a las 16 semanas después de la inyección (figura 11B) y a las 32 semanas después de la inyección (figura 11C). (Figura 11A) Se compararon los homocigóticos y homocigóticos tratados con AAV-GNPTAB con los naturales y heterocigóticos. (\dagger ; $p < 0,05$, \ddagger ; $p < 0,02$ en comparación con natural, *; $p < 0,02$, **; $p < 0,002$ en comparación con heterocigótico). El tratamiento con AAV-GNPTAB provocó un aumento estadísticamente significativo en la relación de BMD (después/antes de Tx) en ratones homocigóticos después de 16 semanas de tratamiento (figura 11B) y 32 semanas de tratamiento (figura 11C). (Figura 11B) 16 semanas después del tratamiento, los ratones con GNPTAB nula tratados con AAV-GNPTAB mostraron un aumento significativo en la relación de BMD que otros ratones (**; $P < 0,02$). (Figura 11C) 32 semanas después del tratamiento, se observaron diferencias significativas en la relación de BMD en los ratones tratados con GNPTAB. (#; $p < 0,05$, **; $p < 0,02$). Los valores de P se determinaron mediante análisis de prueba de la t bilateral para datos independientes. Los datos se presentan como la media \pm ETM.
- 60 Las figuras 12A y 12B proporcionan histogramas que muestran los niveles del porcentaje de masa magra antes de la inyección (figura 12A) y el cambio del porcentaje de masa magra 32 semanas después de la inyección (figura 12B). (Figura 12A) Se compararon los homocigóticos y homocigóticos tratados con AAV-GNPTAB con los naturales y

heterocigóticos. (†; $p < 0,02$ en comparación con natural, *; $p < 0,05$, **; $p < 0,001$ en comparación con heterocigótico). (Figura 12B) 32 semanas después del tratamiento, no se observó cambio en el % de masa magra en los ratones tratados con AAV-GNPTAB. Los valores de P se determinaron mediante análisis de prueba de la t bilateral para datos independientes. Los datos se presentan como la media ± ETM.

5 **Descripción detallada**

En algunos aspectos, la solicitud divulga un vector vírico adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende ácido nucleico que codifica las subunidades alfa y beta de N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (GNPTAB) y al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV. Se divultan además en este documento partículas de rAAV que comprenden un vector rAAV de la presente divulgación, así como composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula de rAAV de la presente divulgación.

10 En algunos aspectos, la solicitud divulga además métodos para tratar la mucolipidosis de tipo II (ML II) o mucolipidosis de tipo III (ML III) en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de partículas de rAAV, donde las partículas de rAAV comprenden un vector rAAV, y el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica GNPTAB y al menos una ITR de AAV. En este documento se proporcionan además métodos para aumentar el tamaño corporal, el contenido mineral óseo y/o la densidad mineral ósea en un mamífero con mucolipidosis de tipo II (ML II) o mucolipidosis de tipo III (ML III), que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de partículas de rAAV, donde las partículas de rAAV comprenden un vector rAAV, y el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica GNPTAB y al menos una ITR de AAV. En algunas realizaciones, la expresión de GNPTAB provoca un aumento del tamaño corporal, el contenido mineral óseo y/o la densidad mineral ósea.

15 En algunos aspectos, la solicitud divulga además usos y/o kits para tratar ML II o ML III, por ejemplo, usando un vector rAAV, partícula de rAAV o composición farmacéutica de la presente divulgación.

1. Técnicas generales

20 Las técnicas y procedimientos descritos o mencionados en este documento en general están bien comprendidos y se emplean normalmente usando metodología convencional por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, las metodologías utilizadas ampliamente descritas en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook *et al.*, 4.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, *et al.* eds., 2003); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds., 1995); Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow y Lane, eds., 1988); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney, 6.^a ed., J. Wiley and Sons, 2010); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1996); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds., J. Wiley and Sons, 2002); Immunobiology (C.A. Janeway *et al.*, 2004); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

II. Definiciones

50 Un "vector", como se usa en este documento, se refiere a un plásmido o virus recombinante que comprende un ácido nucleico a suministrar a una célula hospedadora, *in vitro* o *in vivo*.

55 El término "polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa en este documento, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por tanto, este término incluye, aunque sin limitación, ADN o ARN mono-, bi- o multicatenario, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales o derivatizadas. La cadena principal del ácido nucleico puede comprender glucidos y grupos fosfato (como se puede encontrar típicamente en ARN o ADN), o grupos glucídicos o fosfato modificados o sustituidos. Como alternativa, la cadena principal del ácido nucleico puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamidatos y, por tanto, puede ser un fosforamidato de oligodesoxinucleósido (P-NH₂) o un oligómero fosforamidato-fosfodiéster mixto. Además, puede obtenerse un ácido nucleico bicatenario a partir del producto polinucleotídico monocatenario de síntesis química, sintetizando la hebra complementaria e hibridando las hebras en condiciones apropiadas o sintetizando la hebra complementaria *de novo* usando una ADN polimerasa con un cebador apropiado.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos aminoacídicos, y no están limitados a una longitud mínima. Dichos polímeros de residuos aminoacídicos pueden contener residuos aminoacídicos naturales o no naturales, e incluyen, aunque sin limitación, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros y multímeros de residuos aminoacídicos. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas están englobados por la definición. Las expresiones también incluyen modificaciones tras la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, sialilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los propósitos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como eliminaciones, adicionales y sustituciones (en general 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 al sitio, o pueden ser accidentales, tales como través de mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a amplificación por PCR.

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

Un "vector AAV recombinante (vector rAAV)" se refiere a un vector polinucleotídico que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencia de ácido nucleico que no es de origen de AAV) que están flanqueadas por al menos una, por ejemplo, dos, secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV. Dichos vectores 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 los productos génicos rep y cap de AAV (es decir, las proteínas Rep y Cap de AAV). Cuando se incorpora un vector rAAV en un polinucleótido más grande (por ejemplo, en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido usado para clonación o transfección), entonces el vector rAAV puede denominarse "provector" que puede "rescatarse" mediante replicación y encapsidación en presencia de funciones de empaquetamiento de AAV y funciones auxiliares adecuadas. Un vector rAAV puede estar en cualquiera de varias formas, incluyendo, aunque sin limitación, plásmidos, cromosomas artificiales lineales, en complejo con lípidos, encapsulados dentro de liposomas y, en realizaciones, encapsidados en una partícula vírica, particularmente una partícula de AAV. Un vector rAAV puede empaquetarse en una cápside de virus AAV para generar una "partícula vírica adenoasociada recombinante (partícula de rAAV)".

Un "virus rAAV" o "partícula vírica rAAV" se refiere a una partícula vírica compuesta por al menos una proteína de la cápside de AAV y un genoma de vector rAAV encapsulado.

"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 ácido nucleico introducido por técnicas de genomanipulación en un tipo de célula diferente es un ácido nucleico heterólogo (y, cuando se expresa, puede codificar un polipéptido heterólogo). Asimismo, una secuencia celular (por ejemplo, un gen o parte 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 ácido nucleico que se introduce en una célula y puede transcribirse en ARN y, opcionalmente, traducirse y/o expresarse en condiciones apropiadas. En aspectos, confiere una propiedad deseada a una célula en la que se introdujo, o da lugar de otro modo a un resultado terapéutico o de diagnóstico deseado. En otro aspecto, puede transcribirse en una molécula que media la interferencia de ARN, tal como ARNip.

Las expresiones "partículas genómicas (gp)", "equivalentes genómicos" o "copias de genoma", como se usan en referencia a una concentración vírica, se refieren al número de viriones que contiene el genoma de ADN de AAV recombinante, independientemente de la infectividad o funcionalidad. El número de partículas genómicas en una preparación de vector particular puede medirse por procedimientos tales como los descritos en los ejemplos de este documento o, por ejemplo, en Clark *et al.* (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk *et al.* (2002) Mol. Ther., 6:272-278.

Las expresiones "unidad de infección (ui)", "partícula infecciosa" o "unidad de replicación", como se usan en referencia a una concentración vírica, se refieren al número de partículas de vector AAV recombinante infecciosas y competentes en la replicación, medido por el ensayo del centro infeccioso, también conocido como ensayo de centro de replicación, como se describe, por ejemplo, en McLaughlin *et al.* (1988) J. Virol., 62:1963-1973.

La expresión "unidad de transducción (ut)", como se usa en referencia a una concentración vírica, se refiere al número de partículas de vector AAV recombinante infecciosas que provocan la producción de un producto transgénico funcional, medido en ensayos funcionales tales como los descritos en los ejemplos de este 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 LFU).

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

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

- 5 Una "secuencia de resolución terminal" o "trs" es una secuencia en la región D de la ITR de AAV que se escinde por proteínas rep de AAV durante la replicación del ADN vírico. Una secuencia de resolución terminal mutante es resistente a la escisión por proteínas rep de AAV. Las "funciones auxiliares de AAV" se refieren a funciones que permiten replicar y empaquetar el AAV por una célula hospedadora. Pueden proporcionarse funciones auxiliares de AAV en cualquiera de varias formas incluyendo, aunque sin limitación, un virus auxiliar o genes de virus auxiliar que ayudan en la replicación y empaquetamiento de AAV. Otras funciones auxiliares de AAV son conocidas en la técnica, tales como agentes genotóxicos.
- 10

15 Las "funciones auxiliares de AAV" se refieren a funciones que permiten replicar y empaquetar el AAV por una célula hospedadora. Pueden proporcionarse funciones auxiliares de AAV en cualquiera de varias formas incluyendo, aunque sin limitación, un virus auxiliar o genes de virus auxiliar que ayudan en la replicación y empaquetamiento de AAV. Otras funciones auxiliares de AAV son conocidas en la técnica, tales como agentes genotóxicos.

20

25 Un "virus auxiliar" para AAV se refiere a un virus que permite que AAV (que es un parvovirus defectuoso) se replique y empaquete por una célula hospedadora. Se han identificado varios de dichos virus auxiliares, incluyendo adenovirus, herpesvirus, poxvirus tales como virus de la variolovacuna y baculovirus. Los adenovirus abarcan varios subgrupos diferentes, aunque el adenovirus de tipo 5 del subgrupo C (Ad5) es el usado más habitualmente. Se conocen numerosos adenovirus de origen humano, mamífero no humano y aviar y están disponibles de depósitos tales como la ATCC. Los virus de la familia del herpes, que también están disponibles de 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 seudorrabia (VPR). Los baculovirus disponibles de depósitos incluyen el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*.

30

35 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a un polipéptido o secuencia de ácido nucleico de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoácidos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos o nucleótidos en el polipéptido o secuencia de ácido nucleico de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos o ácido nucleico puede conseguirse de diversas maneras que pertenezcan a las habilidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles al público, por ejemplo, los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds., 1987), Sup. 30, sección 7.7.18, tabla 7.7.1, y que incluye BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Un posible programa de alineación es ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pensilvania). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. Para los propósitos de este documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que puede expresarse alternativamente como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue: 100 por la fracción X/Y, donde X es el número de residuos aminoácidos valorados como coincidencias idénticas mediante el programa de alineación de secuencias en la alineación de A y B de ese programa, y donde Y es el número total de residuos aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. Para los propósitos de este documento, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico dada C con respecto a, con o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada (que puede expresarse alternativamente como una secuencia de ácido nucleico C dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de ácido nucleico con respecto a, con o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada) se calcula como sigue: 100 por la fracción W/Z, donde W es el número de nucleótidos valorados como coincidencias idénticas mediante el programa de alineamiento de secuencias en el alineamiento de C y D de ese programa, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C con respecto a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D con respecto a C.

40

45

50

55

60

65 Una molécula (por ejemplo, ácido nucleico o proteína) o célula "aislada" significa que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos (por ejemplo, mejora de los síntomas, consecución de criterios de valoración clínica 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 retardar el desarrollo de una enfermedad. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una partícula de rAAV expresa una cantidad deseada de ácido nucleico heterólogo, tal como un polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, aunque 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 determinadas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

Como se usa en este documento, "tratamiento" es una estrategia para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, aunque sin limitación, el alivio de síntomas, la disminución del alcance de la enfermedad, estado estabilizado (por ejemplo, sin empeoramiento) de la enfermedad, prevención de la propagación (por ejemplo, metástasis) de la enfermedad, retardo o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación de la patología y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

Cuando se usa en referencia a un gen o secuencia codificante, "N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (también conocida como GlcNAc-1-fosfotransferasa o GNPTAB)" se refiere a una secuencia polinucleotídica que codifica las subunidades alfa y beta de la enzima que cataliza una reacción química que implica la formación por la enzima lisosómica de N-acetyl-glucosaminil-fosfo-D-manosa y UMP a partir de UDP-N-acetyl-D-glucosamina y por la enzima lisosómica de D-manosa (código EC 2.7.8.17). Cuando se usa en referencia a un polipéptido, "N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (también conocida como GlcNAc-1-fosfotransferasa o GNPTAB)" se refiere a las subunidades alfa y beta de la enzima mencionada anteriormente (Kudo, M. et al., J Biol Chem. 2005, 280(43):36141-9; Gelfman, CM et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2007, 48(11):5221-5228). Se sabe que el complejo completo enzimático GlcNAc-1-fosfotransferasa incluye las subunidades α_2 , β_2 y γ_2 , de las que se requieren las subunidades alfa y beta para la actividad catalítica. Cualquier enzima que se sepa o se prevea que cataliza la reacción descrita por el código EC 2.7.8.17 y/o realice la función molecular descrita por el término GO: 0003976 puede ser una GNPTAB de la presente divulgación. En algunas realizaciones, la GNPTAB es una GNPTAB variante. En algunas realizaciones, la GNPTAB es una GNPTAB truncada. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la GNPTAB es de aproximadamente 4,7 kb. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la GNPTAB es de menos de aproximadamente 4,7 kb. En algunas realizaciones, la GNPTAB variante (por ejemplo, truncada) comprende las subunidades alfa y beta. En algunas realizaciones, la GNPTAB variante (por ejemplo, una GNPTAB truncada) es al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a GNPTAB natural. En algunas realizaciones, la GNPTAB variante (por ejemplo, una GNPTAB truncada) mantiene al menos aproximadamente un 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o 10 % de la actividad de GNPTAB natural.

Se proporcionan ejemplos de GNPTAB humana por los números de acceso a GenBank NP_077288.2 y NM_024312.4. Se proporciona un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de GNPTAB humana por SEQ ID NO:1. Se proporcionan ejemplos de GNPTAB de ratón por el n.º de acceso a GenBank NP_001004164. Se proporciona un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de GNPTAB de ratón por SEQ ID NO:2. Se proporcionan ejemplos adicionales de GNPTAB por los números de acceso a GenBank XP_001155334 y XP_509312 (*Pan troglodytes*), XP_002687680 y NP_001179157 (*Bos taurus*), XP_416329 (*Gallus gallus*), XP_532667 (*Canis familiaris*), XP_001497199 (*Equus caballus*), XP_001079967 y XP_343195 (*Rattus norvegicus*) y NP_001038233 (*Danio rerio*).

"Mucolipidosis de tipo II" (los términos MLII, ML-II y ML de tipo II pueden usarse indistintamente en este documento) y "mucolipidosis de tipo III" (los términos MLIII, ML-III y ML de tipo III pueden usarse indistintamente en este documento) se refieren a una clase de enfermedades provocadas por mutaciones en el gen GNPTAB. Ambas enfermedades son trastornos autosómicos recesivos. Sin embargo, MLIII se asocia típicamente con mutaciones que provocan una pérdida más leve de la función de GNPTAB en comparación con MLII. Por tanto, MLII típicamente provoca fenotipos de enfermedad más graves que MLIII. MLII también se conoce como enfermedad de células I. Puede encontrarse una descripción adicional de MLII en la entrada de OMIM n.º 252500. MLIII también se conoce como seudopolidistrofia de Hurler. Puede encontrarse una descripción adicional de MLIII en la entrada de OMIM n.º 252600.

"Promotor de β -actina de pollo (CBA)" se refiere a una secuencia polinucleotídica derivada de un gen de β -actina de pollo (por ejemplo, beta actina de *Gallus gallus*, representada por la ID génica 396526 de GenBank Entrez). Como se usa en este documento, "promotor de β -actina 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 β -actina de pollo, y el aceptador de empalme del gen de beta-globina de conejo, tal como las secuencias descritas en Miyazaki, J., et al. (1989) Gene 79(2):269-77. Como se usa en este documento, la expresión "promotor de CAG" puede usarse indistintamente. Como se usa en este documento, la expresión "potenciador temprano de CMV/promotor de beta actina de pollo (CAG)" puede usarse indistintamente.

Se eligió un promotor de beta actina de pollo acortado en función de estudios de eliminación que mostraron que las secuencias anteriores de -106 podrían eliminarse sin influir significativamente en la actividad promotora (Quitschke *et al.*, J. Biol. Chem. 264:9539-9546, 1989).

5 Una referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en este documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, una descripción que se refiera a "aproximadamente X" incluye una descripción de "X".

10 Como se usa en este documento, la forma singular de los artículos "un/o", "una" y "el/la" incluye referencias en plural salvo que se indique de otro modo.

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

15 **III. Vectores**

En determinados aspectos, la divulgación proporciona vectores rAAV, por ejemplo, adecuados para su uso en cualquiera de los métodos, partículas de rAAV y/o composiciones farmacéuticas descritas en este documento. Por ejemplo, en algunos aspectos, un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, una secuencia polinucleotídica que codifica 20 un polipéptido GNPTAB funcional) se suministra a un sujeto a través de un vector rAAV de la presente divulgación.

Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren a N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, subunidades alfa y beta (GNPTAB), por ejemplo, polipéptidos GNPTAB o ácidos nucleicos que codifican un polipéptido GNPTAB. Como se conoce en la técnica, la enzima N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (también conocida como 25 N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa) incluye dos subunidades alfa, dos beta y dos gamma. Las subunidades alfa y beta están codificadas por un gen GNPTAB (también conocido como *GNPTA*, enfermedad de células I o *ICD* o *EG432486* o *mKIAA1208* en ratón). Los ejemplos de genes GNPTAB incluyen, por ejemplo, GNPTAB humana (por ejemplo, como se describe en el n.º de ID génica 79158 del NCBI) y GNPTAB de ratón (por ejemplo, como se describe en el n.º de ID génica 432486 del NCBI).

30 En algunas realizaciones, el polipéptido GNPTAB puede ser un polipéptido GNPTAB humano. Una secuencia polipeptídica de GNPTAB humana puede incluir, sin limitación, la secuencia de referencia del NCBI n.º NP_077288. En algunas realizaciones, el polipéptido GNPTAB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el polipéptido GNPTAB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 35 aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 81 %, al menos aproximadamente un 82 %, al menos aproximadamente un 83 %, al menos aproximadamente un 84 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos 40 aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la GNPTAB es una GNPTAB truncada. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la GNPTAB es de aproximadamente 4,7 kb. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la GNPTAB es de menos de aproximadamente 4,7 kb. En algunas realizaciones, la GNPTAB variante (por ejemplo, 45 truncada) comprende las subunidades alfa y beta. En algunas realizaciones, el polipéptido GNPTAB es un polipéptido GNPTAB variante (por ejemplo, GNPTAB truncada) que mantiene al menos una parte de la actividad de un polipéptido GNPTAB natural (por ejemplo, al menos aproximadamente cualquiera de un 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 100 % de la actividad GNPTAB natural). En algunas realizaciones, el polipéptido GNPTAB variante (por ejemplo, GNPTAB truncada) tiene mayor actividad en comparación con un polipéptido GNPTAB natural (por ejemplo, al menos 50 aproximadamente cualquiera de un 125 %, 150 %, 200 %, 300 % o 500 % mayor actividad en comparación con GNPTAB natural).

De acuerdo con la invención, el ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, ácido nucleico que codifica GNPTAB) está 55 unido de forma funcional a un promotor. De acuerdo con la invención, el promotor comprende un promotor de CBA truncado. De acuerdo con la invención, el promotor comprende un potenciador de CMV acortado.

De acuerdo con la invención, el vector comprende un intrón. El intrón es un intrón de virus diminuto de ratones (MVM).

60 En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de poliadenilación (poliA). Numerosos ejemplos de secuencias de poliadenilación son conocidos en la técnica, tal como la secuencia poli(A) de la hormona de crecimiento bovina (BGH) (véase, por ejemplo, el número de acceso EF592533), una secuencia de poliadenilación de SV40 y una secuencia de poliadenilación pA de TK de VHS.

65 Sin el deseo de quedar ligados a teoría alguna, debido al gran tamaño de la secuencia codificante de GNPTAB, puede ser ventajoso minimizar el tamaño de otros elementos del vector rAAV (por ejemplo, un promotor, potenciador, intrón, secuencia de poliA, etc.). En algunas realizaciones, una variante acortada del promotor de CBA descrito en este

documento puede usarse en un vector rAAV. Los métodos para generar una variante acortada de un promotor son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el promotor de interés podría mutarse introduciendo eliminaciones de uno o más nucleótidos en la secuencia promotora, y dichas secuencias promotoras variantes podrían clonarse individualmente en vectores que incluyen una construcción indicadora bajo la regulación de cada secuencia promotora. Este sistema 5 podría usarse para identificar variantes acortadas de un promotor que retengan una fuerza indicada (por ejemplo, cantidad de transcripto producido). Un vector rAAV de acuerdo con la presente invención incluye potenciador de CMV/promotor de CBA truncado y/o acortado, por ejemplo, como se describe en este documento. Se podrían usar métodos similares para identificar variantes acortadas de un intrón que retengan niveles apropiados de transcripción, 10 estabilidad del ARNm y/o empalme. En algunas realizaciones, un vector rAAV de la presente divulgación puede incluir un intrón acortado como se describe en este documento. Se podrían usar métodos similares para identificar variantes acortadas de una secuencia de poliA que retengan niveles apropiados de transcripción, estabilidad del ARNm y/o 15 poliadenilación. En algunas realizaciones, un vector rAAV de la presente divulgación puede incluir una secuencia de poliA acortada como se describe en este documento. En algunas realizaciones, el gen GTNAP comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2.

15 La presente solicitud divulga el uso de un genoma vírico recombinante para la introducción de una o más secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido y/o ácido nucleico terapéutico para empaquetarse en una partícula vírica de rAAV. El genoma vírico recombinante puede incluir cualquier elemento para establecer la expresión del polipéptido y/o ácido nucleico terapéutico, por ejemplo, un promotor, una ITR de la presente divulgación, un elemento 20 de unión al ribosoma, terminador, potenciador, marcador de selección, intrón, señal de poliA y/u origen de replicación.

IV. Partículas víricas y métodos de producción de partículas víricas

25 Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren a partículas de rAAV, por ejemplo, que contienen un vector rAAV de la presente divulgación. En una partícula de AAV, se encapsida un ácido nucleico en la partícula de AAV. La partícula de AAV también comprende proteínas de la cápside. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende la o las secuencias codificantes de interés (por ejemplo, una secuencia codificante de GNPTAB), componentes unidos de forma funcional en la dirección de transcripción, secuencias de control que incluyen secuencias de inicio y terminación de la transcripción, formando de ese modo un casete de expresión. El casete de expresión está flanqueado en el extremo 5' y 3' por al menos una secuencia ITR de AAV funcional. Por "secuencias ITR de AAV funcionales" se entiende que las secuencias ITR funcionan como se pretende para el rescate, replicación y empaquetamiento del virión 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. Para poner en práctica algunos aspectos de la invención, 30 los vectores recombinantes comprenden al menos todas las secuencias de AAV esenciales para la encapsidación y las estructuras físicas para la infección por el rAAV. Las ITR de 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, eliminación o sustitución de nucleótidos o las ITR de AAV 35 pueden derivar de cualquiera de varios serotipos de AAV. Actualmente se conocen más de 40 serotipos de AAV, y se siguen identificando nuevos serotipos y variantes de 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 40 serotipo de AAV se considera dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, un vector rAAV es un vector derivado de un serotipo de AAV incluyendo, sin limitación, ITR de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón o similares. En algunas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende una ITR de AAV1, 45 AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, una ITR de AAV de cabra, AAV bovino o de AAV de ratón o similares.

50 En algunas realizaciones, una partícula de rAAV comprende una proteína de encapsidación seleccionada de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 (por ejemplo, una cápside de AAV6 natural, o una cápside de AAV6 variante tal como ShH10, como se describe en la publicación PG de Estados Unidos 2012/0164106), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9 (por ejemplo, una cápside de AAV9 natural, o una cápside de AAV9 modificada como se describe en la publicación PG de Estados Unidos 2013/0323226), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, un mutante de tirosina de la cápside, un mutante de unión a heparina de la cápside, una cápside de AAV2R471A, una cápside de AAVAAV2/2-7m8, una cápside de AAV DJ (por ejemplo, una cápside de AAV-DJ/8, una cápside de AAV-DJ/9 o cualquier otra de las 55 cápsides descritas en la publicación PG de Estados Unidos 2012/0066783), cápside de AAV2 N587A, cápside de AAV2 E548A, cápside de AAV2 N708A, cápside de AAV V708K, cápside de AAV de cabra, cápside químérica de AAV1/AAV2, cápside de AAV bovino, cápside de AAV de ratón, cápside de rAAV2/HBoV1, o una cápside de AAV descrita en la patente de Estados Unidos n.º 8 283 151 o la publicación internacional n.º WO/2003/042397. En realizaciones adicionales, una partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de un serotipo de AAV de los clados A-F.

60 Se usan diferentes serotipos de AAV para optimizar la transducción de células diana particulares o para abordar tipos de células específicos dentro de un tejido diana particular (por ejemplo, un tejido enfermo). Una partícula de rAAV puede comprender proteínas víricas y ácidos nucleicos víricos del mismo serotipo o un serotipo mixto. Por ejemplo, una partícula de rAAV puede contener una o más ITR y cápside derivada del mismo serotipo de AAV, o una partícula 65 de rAAV puede contener una o más ITR derivadas de un serotipo de AAV diferente que la cápside de la partícula de

rAAV. En determinadas realizaciones, una partícula de rAAV contiene una cápside de AAV8 y una o más (por ejemplo, 2) ITR de AAV2.

Producción de partículas de AAV

- 5 Numerosos métodos son conocidos en la técnica para la producción de vectores rAAV, incluyendo transfección, producción de líneas celulares estables y sistemas de producción de virus híbridos infecciosos que incluyen híbridos de adenovirus-AAV, híbridos de herpesvirus-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 víricas de rAAV requieren; 1) células hospedadoras adecuadas, 2) función de virus auxiliar adecuada, 3) genes y productos génicos rep y cap de AAV; 4) un ácido nucleico (tal como un ácido nucleico terapéutico) flanqueado por al menos una secuencia ITR de AAV (por ejemplo, un genoma de AAV que codifica GNPTAB); y 5) medios y componentes de medios adecuados para soportar la producción de rAAV. En algunas realizaciones, la célula hospedadora adecuada es una célula hospedadora de primate. En algunas realizaciones, la célula hospedadora adecuada es una línea celular derivada de ser humano tal como células HeLa, A549, 293 o Perc.6. En algunas realizaciones, la función de virus auxiliar adecuada se proporciona por adenovirus natural o mutante (tal como adenovirus sensible a la temperatura), virus del herpes (VHS), baculovirus o una construcción plasmídica que proporciona funciones auxiliares. En algunas realizaciones, los productos génicos rep y cap de AAV pueden ser de cualquier serotipo de AAV. En general, pero no obligatoriamente, el producto genético rep de AAV es del mismo serotipo que las ITR del genoma del vector rAAV siempre que los productos génicos rep puedan funcionar para replicarse y empaquetar el genoma de rAAV. Se pueden usar medios adecuados conocidos en la técnica para la producción de vectores rAAV. Estos medios incluyen, sin limitación, medios producidos por Hyclone Laboratories y JRH incluyendo medio de Eagle modificado (MEM), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), formulaciones personalizadas tales como las descritas en la patente de Estados Unidos n.º 6 566 118 y medios SFM SF-900 II como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6 723 551. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV se proporcionan por adenovirus o VHS. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV se proporcionan por baculovirus y la célula hospedadora es una célula de insecto (por ejemplo, células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9)).
- 30 Un método para producir partículas de rAAV es el método de transfección triple. En resumen, un plásmido que contiene un gen rep y un gen de la cápside, junto con un plásmido adenovírico auxiliar, puede transfectarse (por ejemplo, usando el método de fosfato de calcio) en una línea celular (por ejemplo, células HEK-293), y el virus puede recogerse y opcionalmente purificarse. Por tanto, en algunas realizaciones, la partícula de rAAV se produjo por transfección triple de un ácido nucleico que codifica el vector rAAV, un ácido nucleico que codifica rep y cap de AAV, y un ácido nucleico que codifica funciones víricas auxiliares de AAV en una célula hospedadora, en donde la transfección de los ácidos nucleicos en las células hospedadoras genera una célula hospedadora que puede producir partículas de rAAV.
- 40 En algunas realizaciones, las partículas de rAAV pueden producirse por un método de línea celular productora (véase Martin *et al.*, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269; publicación PG de Estados Unidos n.º US2004/0224411; y Liu, X.L. *et al.* (1999) *Gene Ther.* 6:293-299). En resumen, una línea celular (por ejemplo, una línea celular 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 un promotor-secuencia de ácido nucleico heteróloga (por ejemplo, GNPTAB). Las líneas celulares pueden cribarse para seleccionar un clon principal para la producción de rAAV, que luego puede expandirse a un biorreactor de producción e infectarse con un virus auxiliar (por ejemplo, un adenovirus o VHS) para iniciar la producción de rAAV. Posteriormente, puede recogerse el virus, puede inactivarse (por ejemplo, mediante calor) y/o eliminarse los adenovirus y pueden purificarse las partículas de rAAV. Por tanto, en algunas realizaciones, la partícula de rAAV se produjo mediante una línea celular productora que comprende uno o más de ácido nucleico que codifica el vector rAAV, ácido nucleico que codifica rep y cap de AAV y ácido nucleico que codifica funciones víricas auxiliares de AAV. Como se describe en este documento, el método de línea celular productora puede ser ventajoso para la producción de partículas de rAAV con un genoma sobredimensionado, en comparación con el método de transfección triple.
- 55 En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV se mantienen de manera estable en la línea celular productora. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV se introduce en uno o más plásmidos en una línea celular para generar una línea celular productora. En algunas realizaciones, rep de AAV, cap de AAV y el genoma de rAAV se introducen en una célula en el mismo plásmido. En otras realizaciones, rep de AAV, cap de AAV y el genoma de rAAV se introducen en una célula en diferentes plásmidos. En algunas realizaciones, una línea celular transfectada de forma estable con un plásmido mantiene el plásmido múltiples pases de la línea celular (por ejemplo, 5, 10, 20, 30, 40, 50 o más de 50 pases de la célula). Por ejemplo, el o los plásmidos pueden replicarse según se replica la célula, o el o los plásmidos pueden integrarse en el genoma celular. Se ha identificado una diversidad de secuencias que posibilitan 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 o los 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 comúnmente usados en células de mamífero incluyen, sin limitación, blasticidina, G418, higromicina B, zeocina, puromicina y derivados de los mismos. Los métodos para

introducir ácidos nucleicos en una célula son conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, transducción vírica, transfección catiónica (por ejemplo, usando un polímero catiónico tal como DEAE-dextrano o un lípido catiónico tal como lipofectamine), transfección con fosfato de calcio, microinyección, bombardeo de 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 de AAV y/o el genoma de rAAV se integran de manera estable en el genoma de la línea celular productora. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica los genes rep y cap de AAV y/o el genoma de rAAV se introduce en uno o más plásmidos en una línea celular para generar una línea celular productora. En algunas realizaciones, rep de AAV, cap de AAV y el genoma de rAAV se introducen en una célula en el mismo plásmido. En otras realizaciones, rep de AAV, cap de AAV y el genoma de rAAV se introducen en una célula en diferentes plásmidos. En algunas realizaciones, el o los 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 líneas celulares hospedadoras son conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse selección repetida (por ejemplo, a través del uso de un marcador de selección) para seleccionar células que han integrado un ácido nucleico que contiene un marcador de selección (y los genes cap y rep de AAV y/o un genoma de rAAV). En otras realizaciones, los ácidos nucleicos pueden integrarse de una manera específica de sitio en una línea celular para generar una línea celular productora. Varios sistemas de recombinación específicos de sitio son conocidos en la técnica, 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 línea celular productora deriva de una línea celular de primate (por ejemplo, una línea celular de primate no humano, tal como una línea celular Vero o FRhL-2). En algunas realizaciones, la línea celular deriva de una línea celular humana. En algunas realizaciones, la línea 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 de AAV y/o el genoma de rAAV sobredimensionado en una línea celular para generar una línea celular productora, la línea celular es una línea celular HeLa, 293, A549 o Perc.6® (Crucell), o un derivado de la misma.

En algunas realizaciones, la línea celular productora está adaptada para el crecimiento en suspensión. Como se conoce en la técnica, típicamente las células dependientes de anclaje no pueden crecer en suspensión sin un sustrato, tal como microesferas microportadoras. Adaptar una línea celular para que crezca en suspensión puede incluir, por ejemplo, cultivar la línea celular en un cultivo giratorio con una pala de agitación, usando un medio de cultivo que carezca de iones de calcio y magnesio para evitar la aglutinación (y opcionalmente un agente antiespumante), usando un recipiente de cultivo recubierto con un compuesto siliconizante y seleccionar células en el 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 de la ATCC (disponible en www.atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20suspension-40.aspx) y referencias citadas en el mismo.

En algunos aspectos, se divulga un método para producir cualquier partícula de rAAV como se divulga en este documento, que comprende (a) cultivar una célula hospedadora en una condición en que se producen partículas de rAAV, en donde la célula hospedadora comprende (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en donde cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación y/o encapsidación de AAV; (ii) un provector de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un ácido nucleico heterólogico como se describe en este documento flanqueado por al menos una ITR de AAV, y (iii) una función auxiliar de AAV; y (b) recuperar las partículas de rAAV producidas por la célula hospedadora. En algunas realizaciones, dicha al menos una ITR de AAV se selecciona del grupo que consiste en ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón o similares. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el serotipo de AAV es AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10 o AAVrh10. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, dicha proteína de encapsidación se selecciona del grupo que consiste en proteínas de encapsidación de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV de cabra, AAV1/AAV2 químérico, AAV bovino o rAAV2/HBoV1 de cápside de AAV de ratón o mutantes de las mismas. En algunas realizaciones, la proteína de encapsidación es una proteína de la cápside de AAV8. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside de AAV8 y un genoma recombinante que comprende ITR de AAV2, y ácido nucleico que codifica un transgén/ácido nucleico terapéutico (por ejemplo, ácido nucleico que codifica GNPTAB).

Los medios de cultivo de producción de rAAV adecuados pueden complementarse con suero o proteínas recombinantes derivadas de suero a un nivel de un 0,5 %-20 % (v/v o p/v). Como alternativa, como se conoce en la técnica, pueden producirse vectores rAAV en condiciones sin suero, que también pueden denominarse medios sin productos derivados de animales. Un experto en la materia puede apreciar que los medios comerciales o

personalizados diseñados para soportar la producción de vectores rAAV también pueden complementarse con uno o más componentes de cultivo celular conocidos en la técnica incluyendo, sin limitación, glucosa, vitaminas, aminoácidos y/o factores de crecimiento, para aumentar la concentración de rAAV en los cultivos de producción.

- 5 Los cultivos de producción de rAAV pueden cultivarse en una diversidad de condiciones (sobre un amplio intervalo de temperatura, durante períodos de tiempo variables, y similares) adecuadas para la célula hospedadora particular que se esté utilizando. Como se conoce en la técnica, los cultivos de producción de rAAV incluyen cultivos dependientes de fijación que pueden cultivarse en recipientes adecuados dependientes de fijación tales como, por ejemplo, frascos rodantes, filtros de fibra hueca, microportadores y biorreactores de lecho compactado o de lecho fluido. Los cultivos de producción de vectores rAAV también pueden incluir células hospedadoras adaptadas a suspensión tales como células HeLa, 293, y SF-9, que pueden cultivarse de una diversidad de formas incluyendo, por ejemplo, matraces giratorios, biorreactores de depósito agitado y sistemas desechables tales como el sistema de bolsa Wave.

- 10 15 Las partículas de vector rAAV para el uso de la invención pueden recogerse a partir de cultivos de producción de rAAV mediante lisis de las células hospedadoras del cultivo de producción o recogiendo los medios usados del cultivo de producción, siempre que las células se cultiven en condiciones conocidas en la técnica para provocar la liberación de partículas de rAAV al medio desde células intactas, como se describe más completamente en la patente de Estados Unidos n.º 6 566 118). Los métodos adecuados de lisis de células también son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, múltiples ciclos de congelación/descongelación, sonicación, microfluidización y tratamiento con productos químicos, tales como detergentes y/o proteasas.

- 20 25 30 En una realización adicional, se purifican las partículas de rAAV. El término "purificado", como se usa en este documento, incluye una preparación de partículas de rAAV desprovistas de al menos algunos de los otros componentes que también pueden estar presentes cuando las partículas de rAAV se producen de manera natural o se preparan inicialmente a partir de los mismos. Por tanto, por ejemplo, pueden prepararse partículas de rAAV aisladas usando una técnica de purificación para Enriquecerlas a partir de una mezcla de procedencia, tal como un lisado de cultivo o 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 DNase (DRP) o copias genómicas (gc) presentes en una solución, o mediante la infectividad, o puede medirse con respecto a una segunda sustancia potencialmente interferente presente en la mezcla de procedencia, tales como contaminantes, incluyendo contaminantes de cultivo de producción o contaminantes del proceso, incluyendo virus auxiliares, componentes del medio y similares.

- 35 40 En algunas realizaciones, la extracción del cultivo de producción de rAAV se aclara para eliminar los desechos de las células hospedadoras. En algunas realizaciones, la extracción del cultivo de producción se aclara mediante filtración a través de una serie de filtros de lecho profundo que incluyen, por ejemplo, un filtro Millistak+ HC Pod de Millipore de calidad DOHC, un filtro Millistak+ HC Pod de Millipore de calidad A1HC y un filtro de membrana hidrófila de 0,2 µm Filter Opticap XL1O Millipore Express SHC. El aclarado también puede conseguirse mediante una diversidad de 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 mayor conocido en la técnica

- 45 En algunas realizaciones, la extracción del cultivo de producción de 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 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 de ambiente a 37 °C durante un periodo de 30 minutos a varias horas.

- 50 55 Las partículas de rAAV pueden aislarse o purificarse usando una o más de las siguientes etapas de purificación: centrifugación en equilibrio; filtración de intercambio aniónico de flujo continuo; filtración de flujo tangencial (TFF) para concentrar las partículas de rAAV; captura de rAAV por cromatografía en apatita; inactivación por calor de virus auxiliar; captura de rAAV por cromatografía de interacción hidrófoba; intercambio de tampón por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC); nanofiltración; y captura de rAAV por cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de afinidad. Estas etapas pueden usarse solas, en diversas combinaciones o en diferentes órdenes. En algunas realizaciones, el método comprende todas las etapas en el orden descrito a continuación. Los métodos para purificar partículas de rAAV se encuentran, por ejemplo, en Xiao *et al.*, (1998) Journal of Virology 72:2224-2232; patentes de Estados Unidos números 6 989 264 y 8 137 948; y documento WO 2010/148143.

V. Métodos de tratamiento

- 60 65 Las referencias a métodos de tratamiento en los siguientes párrafos de esta descripción deben interpretarse como referencias a las partículas de rAAV y composiciones farmacéuticas de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del organismo humano (o animal) por terapia.
- Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos de tratamiento de la mucolipidosis de tipo II y/o mucolipidosis de tipo III o de aumento del tamaño corporal, aumento del contenido mineral óseo o aumento de la

densidad mineral ósea en un mamífero con mucolipidosis de tipo II o mucolipidosis de tipo III. Estos métodos se basan en parte en el descubrimiento descrito en este documento de que la expresión mediada por AAV de GNPTAB puede mejorar los síntomas de MLII, tales como los deterioros del crecimiento óseo, en un modelo de ratón de la enfermedad. Como se describe anteriormente, ambas enfermedades están provocadas por mutaciones de pérdida de función en el gen GNPTAB, que codifica las subunidades alfa y beta catalíticas de la GlcNAc-1-fosfotransferasa.

Se sabe que MLII es un trastorno recesivo autosómico provocado por mutaciones en GNPTAB. La actividad GNPTAB es necesaria para añadir manosa-6-fosfato a las proteínas, marcándolas de este modo para su tráfico al lisosoma. En ausencia de actividad GNPTAB, las proteínas lisosómicas (por ejemplo, hidrolasas lisosómicas) en su lugar se secretan de forma extracelular. Como resultado, las sustancias que normalmente se descomponen en los lisosomas, tales como glucosaminoglucanos, lípidos y oligosacáridos, se acumulan en las células, lo que da lugar a la presencia de grandes inclusiones. La MLII también se ha denominado enfermedad de células I, debido a la presencia de estas células de inclusión ("células I"), que pueden identificarse mediante microscopio. Los síntomas de MLII suelen presentarse poco después del nacimiento y pueden incluir anomalías esqueléticas, baja estatura, tono muscular débil, falta de tono muscular (hipotonía), hernias (por ejemplo, abdomen sobresaliente, hernias umbilicales), dislocación de cadera y deformidades articulares, cardiomegalia, engrosamiento e insuficiencia de la válvula mitral, engrosamiento mucoso progresivo de las vías respiratorias, sonidos tontos y/o ruidosos en la respiración, infecciones respiratorias frecuentes, estreñimiento, diarrea, retrasos en el desarrollo de las habilidades motoras gruesas y finas y retrasos en el desarrollo, particularmente en las habilidades del habla y motoras, deficiencias cognitivas. Estos síntomas son debilitantes para los pacientes con MLII, que típicamente no son capaces de caminar independientemente y no sobreviven después de la infancia.

Al igual que MLII, MLIII es conocida en la técnica como un trastorno recesivo autosómico provocado por mutaciones en GNPTAB. Sin embargo, en comparación con MLII, MLIII típicamente es el resultado de mutaciones de pérdida de función más débiles en GNPTAB y, de ese modo, se caracteriza por fenotipos de enfermedad más leves. Los síntomas de MLIII pueden no ser completamente evidentes hasta los 3-5 años de edad y son bastante variables en cuanto a gravedad, viviendo algunos pacientes más allá de los 60, mientras que otros no sobreviven más allá de la infancia. Los síntomas de MLIII típicamente incluyen anomalías esqueléticas, baja estatura, valvulopatía aórtica, coagulación en la córnea, agrandamiento leve de los órganos, pérdida de movilidad y anomalías articulares. MLIII también se ha denominado seudopolidistrofia de Hurler. Para una descripción más detallada y las mutaciones específicas encontradas en pacientes con MLII y MLIII, véase, por ejemplo, Paik, K.H., et al. (2005) Hum. Mutat. 26(4):308-14.

Diversas pruebas diagnósticas para MLII y MLIII son conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, se puede diagnosticar MLII y/o MLIII midiendo la actividad de una o más enzimas lisosómicas en una muestra de suero u otra muestra del paciente (por ejemplo, una muestra de piel o fibroblastos cultivados). La actividad de determinadas enzimas lisosómicas en suero puede ser de 5 a 20 veces mayor en pacientes con MLII que en pacientes normales. Asimismo, en MLIII, la actividad sérica de estas enzimas puede elevarse hasta 10 veces. Estas enzimas pueden incluir, sin limitación, beta-D-hexosaminidasa (código EC 3.2.1.52), beta-D-glucuronidasa (código EC 3.2.1.31), beta-D-galactosidasa (código EC 3.2.1.23), alfa-L-fucosidasa (código EC 3.2.1.51) y alfa-D-manosidasa (código EC 3.2.1.24). Por el contrario, estas actividades en fibroblastos cultivados pueden ser insuficientes. En algunas realizaciones, la actividad N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa puede medirse para diagnosticar MLII o MLIII. En algunas realizaciones, un paciente cuya muestra presenta una actividad N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa de menos de un 1 % en comparación con la actividad de una muestra de paciente normal, puede diagnosticarse con MLII. En algunas realizaciones, un paciente cuya muestra presenta una actividad N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa entre un 1 %-10 % en comparación con la actividad de una muestra de paciente normal, puede diagnosticarse con MLII.

En algunas realizaciones, MLII y/o MLIII pueden diagnosticarse secuenciando el locus GNPTAB (por ejemplo, la secuencia codificante, secuencias promotoras/de intrón o cualquier otra secuencia de control) para mutaciones. MLII y MLIII también pueden caracterizarse por polisacáridos en orina y/o glucosaminoglucanos en orina aumentados, pero estos síntomas pueden no ser específicos de MLII y MLIII. En algunas realizaciones, MLII y/o MLIII pueden diagnosticarse de forma prenatal examinando una muestra coriónica, por ejemplo, una biopsia del trofoblasto (véase, por ejemplo, Poenaru, L., et al. (1984) Am. J. Hum. Genet. 36(6):1379-85). Como se describe anteriormente, en MLII, las células I de una muestra del paciente (por ejemplo, fibroblastos) también pueden identificarse mediante microscopia.

En algunas realizaciones, puede someterse a prueba un tratamiento para MLII y/o MLIII (por ejemplo, un vector de genoterapia de la presente divulgación) para determinar la eficacia terapéutica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un tratamiento para MLII y/o MLIII puede provocar un incremento del aumento de la altura corporal, el contenido mineral óseo, la densidad mineral ósea, o puede provocar una mejora de uno o más síntomas de MLII y/o MLIII como se describe en este documento. La eficacia de la administración de rAAV puede controlarse mediante varios criterios como se describe en este documento. Por ejemplo, después del tratamiento en un sujeto usando métodos de la presente invención, el sujeto puede evaluarse para, por ejemplo, una mejora y/o estabilización y/o retardo en la progresión de uno o más signos o síntomas de la patología mediante uno o más parámetros clínicos, incluyendo los descritos en este documento. Ejemplos de dichas pruebas son conocidos en la técnica, e incluyen medidas objetivas, así como subjetivas (por ejemplo, notificadas por el sujeto).

- En algunas realizaciones, puede medirse la expresión de GNPTAB para supervisar la eficacia terapéutica. Medir la expresión de GNPTAB puede referirse a medir la expresión de ARNm y/o proteína de GNPTAB. Diversos métodos para medir la expresión de ARNm y/o proteína son conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitación, qPCR, transferencia de Northern, sec. de ARN, PCR semicuantitativa, transferencia de Western, espectrometría de masas, ELISA, etc.
- En algunas realizaciones, la actividad de una o más enzimas lisosómicas incluyendo, sin limitación, beta-D-hexosaminidasa (código EC 3.2.1.52), beta-D-glucuronidasa (código EC 3.2.1.31), beta-D-galactosidasa (código EC 3.2.1.23), alfa-L-fucosidasa (código EC 3.2.1.51) y alfa-D-manosidasa (código EC 3.2.1.24), puede medirse en una muestra del paciente (por ejemplo, una muestra de suero) para supervisar la eficacia terapéutica. Una disminución en la actividad de la enzima lisosómica en suero puede indicar eficacia.
- En algunas realizaciones, una mejora en la función de las articulaciones o las extremidades puede indicar eficacia. En algunas realizaciones, una mejora del habla puede indicar eficacia. En algunas realizaciones, una mejora en la función motora puede indicar eficacia. En algunas realizaciones, una tasa de crecimiento aumentada (por ejemplo, un incremento del aumento de altura corporal) puede indicar eficacia. En algunas realizaciones, como se describe en los ejemplos de este documento, la densidad mineral ósea, el contenido mineral óseo y/o el crecimiento (por ejemplo, la altura) pueden evaluarse para supervisar la eficacia terapéutica. Los métodos para supervisar la altura son bien conocidos por los expertos en la materia. Las pruebas para supervisar la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo (por ejemplo, pruebas de densitometría ósea) también son bien conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, como se describe en este documento) y pueden incluir, sin limitación, exploración de absorciometría de rayos X de doble energía (DEXA), exploración de absorciometría de rayos X de doble energía periférica (P-DEXA), absorciometría de fotón doble (DPA) y tomografía computarizada (CT).
- En algunas realizaciones, puede someterse a prueba un tratamiento para MLII y/o MLIII (por ejemplo, un vector de genoterapia de la presente divulgación) en un modelo animal. Los modelos animales para MLII y MLIII son conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, un tratamiento para MLII y/o MLIII puede someterse a prueba en un modelo de ratón, tal como el modelo de ratón modificado genéticamente descrito en los ejemplos de este documento. En algunas realizaciones, un tratamiento para MLII puede someterse a prueba en un modelo felino para MLII (véase Mazrier, H., et al. (2003) J. Hered. 94(5):363-73 o Bosshard, N.U., et al. (1996) Vet. Pathol. 33(1): 1-13 para descripciones adicionales).
- La selección de un vector rAAV y composición particular depende de varios factores diferentes incluyendo, aunque sin limitación, los antecedentes médicos del ser humano individual y los rasgos de la afección y el individuo que se está tratando. La evaluación de dichos rasgos y el diseño de una pauta terapéutica apropiada es en última instancia responsabilidad del médico prescriptor.
- En algunos aspectos, la invención proporciona una partícula de rAAV de la presente divulgación para su uso en métodos de tratamiento de MLII y/o MLIII. El rAAV puede administrarse a un tejido particular de interés, o puede administrarse sistémicamente. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz de rAAV puede administrarse por vía parenteral. Las vías de administración parenteral pueden incluir, sin limitación, intravenosa, intraperitoneal, intraósea, intraarterial, intracerebral, intramuscular, intratecal, subcutánea, intracerebroventricular, intrahepática, etc. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz de rAAV puede administrarse a través de una vía de administración. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz de rAAV puede administrarse a través de una combinación de más de una vía de administración. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz de rAAV se administra a una ubicación. En otras realizaciones, una cantidad eficaz de rAAV puede administrarse a más de una ubicación.
- Se administra una cantidad eficaz de 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 en general es satisfacer o superar este nivel de transducción. En algunos casos, este nivel de transducción puede conseguirse mediante la transducción de tan solo aproximadamente un 1 a un 5 % de las células diana del tipo de tejido deseado, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 20 % de las células del tipo de tejido deseado, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 50 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 80 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 95 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 99 % de las células del tipo de tejido deseado. La composición de rAAV puede administrarse mediante una o más administraciones, durante el mismo procedimiento o espaciadas por días, semanas, meses o años. Puede usarse una o más de cualquiera de las vías de administración descritas en este documento. En algunas realizaciones, pueden usarse múltiples vectores para tratar al ser humano.
- Los métodos para identificar células transducidas por partículas víricas de AAV son conocidos en la técnica; por ejemplo, puede usarse inmunohistoquímica o el uso de un marcador tal como proteína fluorescente verde potenciada para detectar la transducción de partículas víricas; por ejemplo, partículas víricas que comprenden una cápside de rAAV con una o más sustituciones aminoacídicas.

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

Se administra una cantidad eficaz de rAAV (de acuerdo con la invención, 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 en general es satisfacer o superar este nivel de transducción.

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

En algunas realizaciones, una composición de rAAV de la presente divulgación puede usarse para administración a un ser humano. En algunas realizaciones, una composición de rAAV de la presente divulgación puede usarse para administración pediátrica. Sin el deseo de quedar ligados a teoría alguna, debido a que muchos de los síntomas de MLII y MLIII son de naturaleza del desarrollo (por ejemplo, defectos en el crecimiento, las extremidades y las articulaciones; retrasos en el habla y motores), puede ser particularmente ventajoso tratar la MLII y/o MLIII tan pronto como sea posible en la vida. En algunas realizaciones, se administra una cantidad eficaz de rAAV (de acuerdo con la invención, en forma de partículas) a un paciente que es de 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 o menos de tres años de edad.

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

VI. Kits o artículos de fabricación

Los vectores de rAAV, partículas y/o composiciones farmacéuticas como se describen en este documento pueden estar contenidos dentro de un kit o artículo de fabricación, por ejemplo, diseñado para su uso en uno de los métodos de la invención como se describe en este documento.

En general, el sistema comprende una aguja, 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 aguja para el suministro 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 su uso en los métodos de la invención incluyen los descritos en este documento, por ejemplo, uno o más líquidos, comprendiendo cada uno una cantidad eficaz de uno o más vectores como se describe en este documento, y uno o más líquidos que comprenden uno o más agentes terapéuticos.

En algunas realizaciones, el kit comprende un solo 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, tampón, excipiente o cualquier otro líquido descrito en este documento o conocido en la técnica adecuada para suministrar, diluir, estabilizar, tamponar o transportar de otro modo una composición de vector rAAV de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el kit comprende uno o más tampones, por ejemplo, una solución acuosa de pH tamponado. Ejemplos de tampones pueden incluir, sin limitación, tampones fosfato, citrato, Tris, HEPES y otros ácidos orgánicos.

En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente. 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 de rAAV de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el recipiente también puede contener un líquido y/u otro agente terapéutico.

5 En algunas realizaciones, el kit comprende un agente terapéutico adicional con una composición de rAAV de la presente divulgación. En algunas realizaciones, la composición de rAAV y el agente terapéutico adicional pueden estar mezclados. En algunas realizaciones, la composición de rAAV y el agente terapéutico adicional pueden mantenerse separados. En algunas realizaciones, la composición de rAAV y el agente terapéutico adicional pueden estar en el mismo recipiente. En algunas realizaciones, la composición de rAAV y el agente terapéutico adicional pueden estar en diferentes recipientes. En algunas realizaciones, la composición de rAAV y el agente terapéutico adicional pueden administrarse simultáneamente. En algunas realizaciones, la composición de rAAV y el agente terapéutico adicional pueden administrarse el mismo día. En algunas realizaciones, la composición de 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 desde la administración del agente terapéutico adicional.

10 15 En algunas realizaciones, el kit comprende un agente terapéutico para suprimir transitoriamente el sistema inmunitario antes de la administración de AAV. En algunas realizaciones, los pacientes se inmunosuprimen de forma transitoria poco antes y después de la inyección del virus para inhibir la respuesta de linfocitos T a las partículas de 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.

20 25 30 Las partículas de rAAV y/o composiciones 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 este documento) de composiciones de partículas de rAAV. En algunas realizaciones, las instrucciones de uso incluyen instrucciones de acuerdo con uno de los métodos descritos en este 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 mamífero (por ejemplo, un ser humano) una cantidad eficaz de partículas de rAAV, por ejemplo, para tratar la mucolipidosis de tipo II (ML II) y/o mucolipidosis de tipo III (ML III), aumentar el tamaño corporal, aumentar el contenido mineral óseo y/o aumentar la densidad mineral ósea.

VII. Modelos animales no humanos (no forman parte de la invención)

35 La solicitud divulga modelos animales no humanos de mucolipidosis II. Ratones mutantes para GNPTAB que pueden generarse mediante microinyección de clones de células madre embrionarias (ES) en blastocistos hospedadores usando métodos convencionales. En resumen, la alteración dirigida del locus GNPTAB de ratón (por ejemplo, se eliminó del exón 12 al exón 20) puede realizarse mediante recombinación homóloga con un vector de remplazo que contiene un gen indicador o marcador de selección. Toda la descendencia se genotípó mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa en ADN de corte de la cola. Todos los ratones usados en este estudio eran machos identificados como ratones naturales (+/+) o heterocigóticos (+/-) u homocigóticos (-/-). En algunos aspectos, al menos un alelo del gen GNPTAB comprende una eliminación ubicada entre los exones 12 y 20. En algunos aspectos, al menos un alelo del gen GNPTAB comprende una eliminación que abarca los exones 12 y 20. En algunas realizaciones, la eliminación comprende una eliminación de uno o más de los exones 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. En algunos aspectos, una parte del gen GNPTAB se remplaza por un gen que codifica un indicador y/o marcador de selección.

40 45 50 En algunos aspectos, el marcador de selección confiere resistencia a neomicina. En algunos aspectos, el animal es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un conejo, un gato, un perro, un cerdo, un mono). En algunos aspectos, el mamífero es un roedor (por ejemplo, un ratón, una rata, un hámster, un cobaya). En algunos aspectos, el animal es inmunocompetente o inmunodeficiente. En algunos aspectos, el modelo animal comprende un animal modificado genéticamente. Otros modelos de ratón de ML II se proporcionan por Gelfman *et al.*, (Invest. Optham. Visual Sci. 2007, 48:5221-5228) y Paton, L. *et al.*, (J Biol Chem. 2014, 289(39):26709-21).

55 60 En algunos aspectos, la solicitud divulga un método para evaluar un agente para el tratamiento de la mucolipidosis II (ML II), que comprende administrar el agente al modelo animal como se describe en este documento, en donde la mejora de uno o más síntomas de ML II indica que el agente puede proporcionar tratamiento beneficioso de ML II. En algunos aspectos, el síntoma de ML II es peso corporal disminuido, densidad ósea disminuida, contenido mineral óseo disminuido, defectos esqueléticos, deficiencias cognitivas, retrasos en el desarrollo de habilidades motoras gruesas y finas, pérdida de audición, falta de tono muscular, abdomen sobresaliente, hernias umbilicales, engrosamiento mucoso progresivo de las vías respiratorias, infecciones respiratorias frecuentes, engrosamiento e insuficiencia de la válvula mitral, estreñimiento y/o diarrea. En algunos aspectos, el agente es una molécula pequeña, un polipéptido, un anticuerpo, un ácido nucleico o una partícula vírica recombinante.

Ejemplos

65 La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Se entiende que los ejemplos y realizaciones que se describen en este documento tienen únicamente propósitos ilustrativos.

Ejemplo 1: Generación y caracterización de ratones con inactivación de GNPTAB

La mucolipidosis de tipo II (ML de tipo II o ML-II, también conocida como enfermedad de células I; entrada de OMIM n.º 252500) es un trastorno recesivo autosómico del almacenamiento lisosómico provocado por la deficiencia de N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (GNPTAB). La presencia de numerosos cuerpos de inclusión en el citoplasma de los fibroblastos, la falta de mucopolisacariduria, las actividades enzimáticas lisosómicas aumentadas en suero y la actividad GlcNAc-fosfotransferasa disminuida son características distintivas de esta enfermedad. Para estudiar la patología de ML de tipo II, se desarrolló y caracterizó un ratón con inactivación (KO) de GNPTAB.

Métodos**Generación de construcciones de AAV2/8-GNPTAB**

Se amplificó la secuencia codificante de GNPTAB de ratón y se optimizaron los codones para su expresión en ratones por Genescrypt (Piscataway, NJ, EE. UU.). Debido al gran tamaño del ADNc de GNPTAB y a la capacidad limitada de AAV, el ADNc no encaja en ningún vector disponible. Por lo tanto, se diseñó un nuevo casete de expresión que contiene versiones acortadas del potenciador de CMV y el promotor de beta-actina de pollo, así como un intrón muy pequeño. La expresión de ARNm de GNPTAB de longitud completa se confirmó mediante infección transitoria de células HEK293 *in vitro* seguida de RT-PCR cuantitativa. Este AAV2/8-GNPTAB se purificó, se almacenó a -70 °C y se usó a una concentración de $2,5 \times 10^{12}$ partículas resistentes a DNase/ml. Para estos estudios se usaron las secuencias potenciadoras y promotoras acortadas.

Animales

Se generaron ratones mutantes para GNPTAB mediante microinyección de clones de células madre embrionarias (ES) en blastocistos hospedadores usando métodos convencionales. En resumen, la alteración dirigida del locus GNPTAB de ratón (se eliminó del exón 12 al exón 20) se realizó mediante recombinación homóloga con un vector de remplazo que contiene un gen de resistencia a neomicina. Los ratones usados en este estudio eran de fondo genético mixto (129/Sv y C57BL/6). Toda la descendencia se genotípó mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa en ADN de corte de la cola. Todos los ratones usados en este estudio eran machos identificados como ratones naturales (+/+) o heterocigóticos (+/-) u homocigóticos (-/-).

Los ratones se alojaron en grupos de 2-5 por jaula en una sala de colonias en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. La dieta para roedores (Harlan Teklad n.º 8604, Madison, WI, EE. UU.) y el agua estuvieron disponibles a voluntad. El cuidado de los animales se llevó a cabo de acuerdo con las directrices descritas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Academy Press, Washington DC, 1996).

Inyecciones de vector

Se realizó una sola inyección i.v. bilateral de PBS o AAV-GNPTAB en ratones GNPTAB KO de 6 semanas de edad. Un grupo de ratones naturales o heterocigóticos a los que se inyectó PBS sirvió como grupo de control. Cada ratón al que se inyectó AAV-GNPTAB recibió 3×10^{11} partículas de vector. Para reducir o eliminar la respuesta inmunitaria, se inyectó anticuerpo antílgando de CD40 (MR1) en solitario de acuerdo con el protocolo de Halbert *et al.*, (1998) J. Virol. 72:9795-9805.

Auxología

Todos los ratones se examinaron semanalmente midiendo el peso corporal total (g) y la longitud corporal (distancia desde la nariz al ano, mm), usando un calibre digital electrónico.

Histología

Los ratones naturales y GNPTAB^{-/-} a los 10 meses de edad se sedaron y se perfundieron a través del corazón con PBS. Despues de la perfusión, se retiraron los fémures, se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4 %, se descalcificaron con EDTA 0,5 M y se incluyeron en parafina. Las secciones de fémur (4 µm) se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se usó Aperio ScanScope AT (v101.0) para explorar el portaobjetos y el análisis en 4 °C. Los tejidos se incluyeron y cortaron para TEM o hematoxilina y eosina (H&E).

Análisis ultraestructural

Los ratones naturales y KO se decapitaron y las glándulas salivales se retiraron y se fijaron por inmersión en glutaraldehído al 2,5 % en PBS durante la noche a 4 °C. Las glándulas salivales se deshidrataron y a continuación se lavaron en tampón PBS durante 30 min más seguido de fijación posterior con tetróxido de osmio al 1 % durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras se deshidrataron mediante una serie progresiva de alcohol y se incluyeron en Epon 812. Se cortaron secciones en serie semidelgadas a 2,5 µm (Leica ultracut UCT), se tiñeron con azul de toluidina

y se observaron en un microscopio óptico. La observación en microscopia electrónica de transmisión se realizó con un microscopio Mirgagni (FEI).

Ensayo de enzimas lisosómicas

Se extrajo sangre y las muestras se centrifugaron 15 min (8000 xg) y el plasma se almacenó a -70 °C. Las actividades de las enzimas lisosómicas en plasma se midieron en el Departamento de Patología Química, Centro Médico Samsung, Corea del Sur. En ML II, no se pudo medir la actividad de GlcNAc-fosfotransferasa específica. Por tanto, se realizó un diagnóstico basado en la enzima lisosómica en plasma elevada.

Análisis DEXA

Se midieron la densidad mineral ósea (BMD), el contenido mineral óseo (BMC) y la masa magra en ratones anestesiados con el densitómetro óseo de rayos X pDEXA Sabre. Después de administrar la anestesia, se registró el peso de cada ratón y a continuación el ratón se colocó en el escáner DEXA. Para el análisis de los datos, se definió una región que comprendía todo el cuerpo del ratón.

PCR instantánea

La reacción en cadena de la polimerasa instantánea se realiza para cuantificar los niveles de ARNm de GNPTAB usando un sistema ABI PRISM 7900HT y ensayos de expresión génica Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los niveles de ARNm se expresan con respecto al nivel de GAPDH. Se usa el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para analizar los datos usando el programa informático SDS2.3 (Applied Biosystems).

Análisis estadístico

Se usó GraphPad Prism versión 5 para el análisis estadístico y dibujar las figuras y las tablas. La significación de las diferencias se determinó mediante una prueba de la *t* de Student para datos independientes y una prueba ANOVA unidireccional. Salvo que se especifique de otro modo, todos los datos se presentan como la media ± ETM.

Resultados

Se usó una estrategia de captura génica para generar ratones GNPTAB KO. Como se ilustra en la figura 1A, se usó recombinación homóloga con un vector de remplazo que contenía el gen de resistencia a neomicina entre el exón 12 y 20 para generar los ratones. Como se muestra en la figura 1B, la presencia de la captura génica en el gen GNPTAB de los clones ES se confirmó mediante análisis de transferencia de Southern.

Se realizó un análisis fenotípico exhaustivo en animales naturales, heterocigóticos y homocigóticos. Los ratones KO podían distinguirse visualmente de las crías de la misma camada naturales (WT) por su tamaño pequeño. El peso corporal medio (figura 2A) y la longitud (figura 2B) estaban reducidos significativamente en los ratones KO. En consonancia con su pequeño tamaño, los ratones homocigóticos presentaron una forma facial tosca (figura 2C).

Como se muestra en la figura 3A, en cartílago normal, el espacio lagunar claro rodeaba los condrocitos. El citoplasma contenía una sola vacuola transparente. En ratones KO, los condrocitos femorales eran notablemente hipertróficos y llenaban completamente sus lagunas agrandadas (figura 3B). El citoplasma de los condrocitos hipertróficos estaba distendido por microvacuolas abundantes que contenían cantidades escasas de material anfófilo finamente granular. Hubo menos contracción relacionada con la fijación de los condrocitos, que llenaron las lagunas agrandadas. Esto contrasta con los condrocitos naturales, que contenían una sola vacuola grande transparente y lagunas solo parcialmente llenas.

Los ácinos de las glándulas salivales exocrinas, que consisten en células secretoras de tipo mucoso y seroso, presentaron amplia vacuolización en ratones KO cuando se examinaron por microscopía óptica (Gelfman *et al.*, 2007, Invest. Optham. Visual Sci. 48:5221-5228). Para obtener información sobre la patología subyacente, se analizó la glándula salival submandibular por microscopía electrónica (EM).

Se observaron fácilmente células secretoras tanto de tipo mucoso como seroso en los ratones naturales (figura 4A-C). Por el contrario, la arquitectura general de la glándula salival submandibular de los ratones KO estaba tan extremadamente alterada que dificultó en gran medida la identificación de las células serosas en las secciones de EM (figura 4D-F). Las células secretoras de tipo mucoso se compactaron con grandes vacuolas unidas a la membrana que contenían material heterogéneo (figura 4E, F). Las grandes vacuolas se llenaron con material citoplasmático no degradado que se acumuló en las células mucosas KO y estaban rodeadas por una sola membrana. Estas observaciones indican que probablemente representan autolisomas formados por fusión de compartimentos autofágicos con lisosomas.

Los pacientes con ML-II presentan niveles muy elevados de enzimas lisosómicas en sus sueros debido a la incapacidad de sintetizar el marcador de reconocimiento manosa-6-fosfato que es esencial para dirigir apropiadamente

estas enzimas a los lisosomas. Este defecto de tráfico provoca hipersecreción de las enzimas en la sangre. Las figuras 5A-5D muestran que, en comparación con los ratones naturales, los ratones KO presentaban niveles muy aumentados de enzimas lisosómicas, tales como N-acetilglucosaminidasa (figura 5A), β -hexosaminidasa A (figura 5B), β -galactosidasa (figura 5C), y β -glucuronidasa (figura 5D). Se esperaría este fenotipo si la actividad GlcNAc-1-fosfotransferasa fuera defectuosa en los ratones homocigóticos, coherente con las observaciones en seres humanos.

En resumen, estos experimentos demuestran que los ratones GNPTAB KO presentaban claras diferencias fenotípicas en comparación con ratones naturales, particularmente con respecto al crecimiento, la morfología de las glándulas salivales y los niveles de enzimas lisosómicas. Estos resultados indican que los ratones GNPTAB KO representan un sistema modelo en que estudiar los tratamientos terapéuticos para ML-II.

Ejemplo 2: Evaluación de la administración de GNPTAB mediada por AAV en ratones GNPTAB KO

Debido a que los pacientes con ML-II muestran retraso del crecimiento, un objetivo principal de este estudio fue evaluar la eficacia de la administración de GNPTAB mediada por AAV que puede promover el crecimiento en un modelo de ML-II. Por lo tanto, se analizaron los fenotipos de los ratones naturales, heterocigóticos para GNPTAB y GNPTAB KO, en comparación con los ratones GNPTAB KO a los que se inyectó AAV-GNPTAB.

Como se muestra en las figuras 6A y 6B, todas las evaluaciones analíticas se llevaron a cabo durante dos períodos posteriores a la inyección: la primera comenzó 16 semanas después de la inyección (con una edad de 12 semanas), la segunda comenzó 32 semanas después de la inyección (con una edad de 38 semanas). Se añadió análisis auxológico 6 semanas después de la inyección.

Se construyó un plásmido que contenía un casete de expresión que expresaba el ADNc de GNPTAB de ratón regulado por el potenciador de CMV/promotor de CBA y una señal de poliA de BGH (figura 7A). La GNPTAB de longitud completa estaba bajo el control del potenciador de CMV/promotor de CBA acortado como se describe en este documento. Los análisis de PCR cuantitativa instantánea de hígados de ratones GNPTAB KO a los que se inyectó AAV2/8-GNPTAB indicaron expresión específica y elevada de AAV-GNPTAB. Como era de esperar, cualquier ARNm de AAV-GNPTAB estaba ausente en las muestras de las crías de la misma camada de control (figura 7B).

Como prueba inicial para determinar si la transferencia génica mediada por AAV afecta al metabolismo de una manera fisiológicamente relevante, se supervisó el aumento de peso durante 32 semanas después de la inyección. Como se muestra en la figura 8A, no se observó ningún efecto para el tratamiento de AAV-GNPTAB en ratones KO. La figura 8B muestra que no se observó diferencia entre los ratones KO de control y tratados con AAV-GNPTAB en términos de aumento de peso.

A continuación, se evaluó la eficacia de atenuación del fenotipo de enanismo de los ratones KO. Se observó una mejora en el enanismo después de 6 semanas de terapia en ratones KO a los que se inyectó AAV-GNPTAB, mostrando un aumento en el tamaño corporal (figuras 9A, 9B y tabla 1 a continuación).

Tabla 1. Cambio de altura

Genotipo	Altura inicial (mm)	Relación de aumento de altura (altura después del intervalo indicado/altura inicial)	
		Altura después de 6 semanas	Altura después de 32 semanas
Natural (+/+) Heterocigótico (+/-)	84,31 0,885 84,83 0,475	\pm 1,06 ± 0,011 \pm 1,07 ± 0,008	1,11 ± 0,008 1,11 ± 0,005
Inactivación de GNPTAB (-/-) Inactivación de GNPTAB (-/-) + AAV-GNPTAB	76,09 2,483 75,10 1,964	\pm 1,04 ± 0,012 \pm 1,07 ± 0,009	1,09 ± 0,015 1,11 ± 0,017

Los valores representados son la media ± ETM.

A continuación, se midieron la densidad mineral ósea (BMD), el contenido mineral óseo (BMC) y la composición corporal. DEXA es una técnica de obtención de imágenes basada en rayos X para la determinación de la composición mineral ósea y corporal (como masa de grasa corporal). La transferencia de AAV-GNPTAB indujo aumentos relativos en BMC y BMD en ratones KO a los que se inyectó AAV. Las figuras 10A-10C muestran los datos de BMD sin procesar obtenidos antes de la inyección (figura 10A) y la relación relativa en BMD (figuras 10B, 10C) comparados antes y

después de la inyección. Estos datos también se proporcionan en la tabla 2 a continuación. Estos resultados demuestran un efecto significativo de la transferencia génica sobre la densidad mineral ósea.

Tabla 2. Cambio en la densidad mineral ósea (BMD)

Genotipo	Relación de aumento de altura (altura después del intervalo indicado/altura inicial)		
	BMD inicial (g/cm ²)	BMD después de 16 semanas	BMD después de 32 semanas
Natural (+/+) 5	0,055 ± 0,001	1,139 ± 0,017	1,124 ± 0,032
Heterocigótico (+/-)	0,056 ± 0,001	1,137 ± 0,016	1,140 ± 0,007
Inactivación de GNPTAB (-/-)	0,050 ± 0,002	1,156 ± 0,011	1,157 ± 0,012
Inactivación de GNPTAB (-/-) + AAV-GNPTAB	0,048 ± 0,001	1,219 ± 0,013	1,236 ± 0,044

Los valores representados son la media ± ETM.

Asimismo, los datos sin procesar del contenido mineral óseo (BMC) mostraron un fuerte efecto de genoterapia (figura 11A). Los datos de la relación (figura 11B, 11C) también se acercaron a un efecto significativo en el crecimiento óseo. Estos datos también se proporcionan en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Cambio en el contenido mineral óseo (BMC)

Genotipo	Relación de aumento de altura (altura después del intervalo indicado/altura inicial)		
	BMD inicial (g/cm ²)	BMD después de 16 semanas	BMD después de 32 semanas
Natural (+/+) 10	0,575 ± 0,016	1,172 ± 0,047	1,123 ± 0,073
Heterocigótico (+/-)	0,565 ± 0,018	1,197 ± 0,045	1,116 ± 0,042
Inactivación de GNPTAB (-/-)	0,448 ± 0,027	1,272 ± 0,044	1,228 ± 0,049
Inactivación de GNPTAB (-/-) + AAV-GNPTAB	0,386 ± 0,016	1,560 ± 0,080	1,551 ± 0,096

Los valores representados son la media ± ETM.

A continuación, el análisis del contenido magro corporal usando un escáner DEXA reveló que la masa magra también se redujo en los ratones KO (figura 12A). Como se muestra en la figura 12B, 32 semanas después de la inyección, los ratones de control mostraron una disminución significativa en el porcentaje de masa magra en comparación con los datos de antes de la inyección. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la masa magra en los ratones KO tratados con AAV-GNPTAB. Estos datos también se proporcionan en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4. Cambio en el porcentaje de masa magra

Genotipo	% de masa magra inicial	% de masa magra después de 32 semanas
Natural (+/+) 15	86,56 ± 0,627	78,98 ± 3,425
Heterocigótico (+/-)	87,44 ± 0,321	69,5 ± 3,429
Inactivación de GNPTAB (-/-)	85,86 ± 0,548	70,2 ± 3,313
Inactivación de GNPTAB (-/-) + AAV-GNPTAB	84,3 ± 0,665	84,7 ± 0,7087

Los valores representados son la media ± ETM.

En resumen, los ratones GNPTAB KO no lograron prosperar y tuvieron una densidad ósea débil, como es el caso en ML de tipo II. Usando este modelo, se examinó el potencial de genoterapia usando un vector de AAV para el tratamiento de ML de tipo II. Se descubrió que GNPTAB sobreexpresada protegía parcialmente la alteración del crecimiento óseo en ratones KO. En conjunto, el suministro sistémico de GNPTAB a través de vectores AAV fue altamente eficaz y representa una estrategia prometedora para la corrección de la patología ósea en ML de tipo II.

SECUENCIAS

30

Todas las secuencias polipeptídicas se presentan del extremo N al extremo C salvo que se indique de otro modo.
 Todas las secuencias nucleicas se presentan de 5' a 3' salvo que se indique de otro modo.

GNPTAB

5

Secuencia proteínica de GNPTAB humana (SEQ ID NO:1)

```
MILKILLQRQTYTCLSHRYGLYVCFLGVVVTIVSAFQFGEVVLENSRDQYHVLFD SYRDNIAGKSFQNRLC
LMPIDVVYTWVNNTDLELLKELQQLRQEQQMEEEQKAMREIILGKNTTEPTKKSEKQLECLLTHCIKVPMLV
LDPPALPANITLKEPLPSLYPSFHSASDIFNVAKPKNPSTNVSVVVFDSIKDVEDAHSGLLKGNRSQTWWRG
YLTIDKEVPGILVLMQDLAFLSGFPPTFKETNQLKTKLPEBNLSSKVKLQLYSEAVALLKLNNPKDFQEL
NKQTKKNMIDGKELTISPAYLILWDLALSQSQSKQDEDISASRPFEDNEPLRYSLSIERHAPWVRNIFIVT
NGQIPSWLNLDNPRVTTIVTHQDVFRNLSHLPTFSSPAIESHTRIEGLSQKFIIYIINEDVMFGKDWPDDF
YSHSKGQKVYLTDNPPVNCAGCPGSWKDGCFDKACNNSCADWGGDCSGNSCCSRYIAGGGGTGSIIGVG
QWQFQGGGINSVSYCNQGCAWSLADKFCQACNVLSCGFD&GDCGQDMFHELYKVILLFQTHYIIPKG
ECLPYFSEARVAKRGVEGAYSDNPIIRHASTIAKWKTIHLIMRGMNATTIHFNLTFQNTNDEEFKMQIT
VEVDTREGPKLNSTAQKGYENLVSPITLLPEAEIIFEDIPKEKRPPKFKRNIDVNSTRAQEEVKIPVNI
SLPLPKDAQLSINTLQLQERBCDTLKGYNLSKSALLRSFLMNSQHAKIKRNQAIITDETMSLVAQPKQV
HKSILPNSLCVUSERLQLRTFFFAVSVKVNGHDQGQNPPDLETTARFRVEHTNTQKTIQGMVTKEPESLIV
PLESQMTKEKKITGKEKENSKMEENAENHIGVTEVLLGRKLQHYTDSYLGFLPWEKKKYFQDLLDEEESL
KTQLAYFTDSKNTGRQLKDTFADSLRYVNKILNSKFGTSRKVPAHMPHMIDRIVMQLQDMFPEEFQK
SFHKVRHSEDMQFAFSYFYIILMSAVQPLNISQVFBEDVTDQSGVLSDRERITLATRHEPLSLQDLTGL
EHMLINCSDKMLPADITQLNNIIPPTQESYYDPNLPPTVKSLSVTCNPVTDKIKHAKDKNKYRFEIMGEEE
IAFKMIRTNVSHVVGQLODDIRKKNFRKFCVCLNDNIDHNRKQAOQTVKAVALRDFYESMFPIPSQFELPREYRN
RFLNMHBLQEWRAYRDKLKFWTHCVLATLIMFTIFSFFAEQLIAALKRKFPPRRRIHKEASPNIHV
```

Secuencia proteínica de GNPTAB de ratón (SEQ ID NO:2)

```
MILKILLQRQTYTCLSHRYGLYVCFLGVVVTIVSAFQFGEVVLENSRDQYHVLFD SYRDNIAGKSFQNRLC
LMPIDVVYTWVNNTDLELLKELQQLRQEQQMEEEQKAMREIILGKNTTEPTKKSEKQLECLLTHCIKVPMLV
LDPPPLPANCTLKEPLPTLYPSFHAASDMFNVAKPKNPSTNVSVVVFDSIKDVEDAHAGPFKGSQKMVRA
YLTIDKEAPGLVLMQGLAFLSGFPPTFKETSQLKTKLPEKLSSKIKLRLYSEAVALLKLNNPKDFQEL
NKQTKKNMIDGKELTISPAYLILWDLALSQSQSKQDEDISASRPFEDNBEPLRYSLSIERHAPWVRNIFIVT
NGQIPSWLNLDNPRVTTIVTRQDIFQNLSHLPTFSSPAIESHTRIEGLSQKFIIYIINEDVMFGKDWPDDF
YSHSKGQKVYLTDNPPVNCAGCPGSWKDGCFDKACNNSCADWGGDCSGNTAGNRFVAGGGGTGNIAG
QWQFQGGGINTSYCNQGCAWSLADKFCQACNVLSCGFDAGDCGQDMFHELYKVILLFQTHYVVPFRG
EYLSYFSFANIAARRCVECTYSNDPIIRHASTIAKWKTIHLIMRGMNATTIYFNLTQLQANDEEFKIQIA
VEVDTREAPKLNSTIQRAYESLVSPTVPLPQADVPFEDVPKEKFPKIRRAUVNATGRFQEEVKIPPVNI
SLPKEAQVRLSNLQLQERGDTLKGYNLSKSALLRSFLGNSLDTKIKPQARTDETKGNLEVPQENPSH
RRPHGFAGEHRSERWTAPARTVTVKGRDHALNPPPVLETNARLAQPTLGVTSKENLSPLIVPPESHLPK
EEEEDRAEGNAVPVKELVGEGLLQCNYPGFLPWEKKKYFQDLLDEEESLRTQLAYFTDSKHTGRQLKDTF
ADSLRYVNKILNSKFGFTSRKVPAHMPRMIDRIVMQLQDMFPEEFQKTSFHKVRSEDMQFAFSYFYI
MSAVQPLNISQVFBEDVTDQSGVLSDRERITLATRHEPLSLQDLTGLEHMLINCSDKMLPANIQLNNI
PPTQEAYYDPNLPPTVKSLSVTCNPVTDKIKHAKDKNKYRFEIMGEEEIAFKMIRTNVSHVVGQLODDIR
KNPRKFVCLNDNIDHMRKDARTVKAVALRDFYESMFPIPSQFELPREYRNRFJMMHELQEWRAYRDKLKFW
THCVLATLIIIFTIFSFFAEQLIAALKRKFPPRRRIHKEASPNIHV
```

ES 2 991 277 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENZYME CORPORATION

5 <120> Vectores víricos adenoasociados para tratar la mucolipidosis de tipo II

<130> 159792012640

10 <140> Aún No Asignado

<141> Concurrentemente con el Mismo

<150> US 62/267,502

<151> 2015-12-15

15

<160> 2

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

20 <210> 1

<211> 1256

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 1

Met Leu Phe Lys Leu Leu Gln Arg Gln Thr Tyr Thr Cys Leu Ser His
1 5 10 15

Arg Tyr Gly Leu Tyr Val Cys Phe Leu Gly Val Val Val Thr Ile Val
20 25 30

30 Ser Ala Phe Gln Phe Gly Glu Val Val Leu Glu Trp Ser Arg Asp Gln
35 40 45

Tyr His Val Leu Phe Asp Ser Tyr Arg Asp Asn Ile Ala Gly Lys Ser
50 55 60

55 Phe Gln Asn Arg Leu Cys Leu Pro Met Pro Ile Asp Val Val Tyr Thr
65 70 75 80

Trp Val Asn Gly Thr Asp Leu Glu Leu Leu Lys Glu Leu Gln Gln Val
85 90 95

90 Arg Glu Gln Met Glu Glu Glu Gln Lys Ala Met Arg Glu Ile Leu Gly
100 105 110

105 Lys Asn Thr Thr Glu Pro Thr Lys Lys Ser Glu Lys Gln Leu Glu Cys
115 120 125

125 Leu Leu Thr His Cys Ile Lys Val Pro Met Leu Val Leu Asp Pro Ala
130 135 140

135 Leu Pro Ala Asn Ile Thr Leu Lys Asp Leu Pro Ser Leu Tyr Pro Ser
145 150 155 160

155 Phe His Ser Ala Ser Asp Ile Phe Asn Val Ala Lys Pro Lys Asn Pro
165 170 175

175 Ser Thr Asn Val Ser Val Val Val Phe Asp Ser Thr Lys Asp Val Glu
180 185 190

190 Asp Ala His Ser Gly Leu Leu Lys Gly Asn Ser Arg Gln Thr Val Trp
195 200 205

205 Arg Gly Tyr Leu Thr Thr Asp Lys Glu Val Pro Gly Leu Val Leu Met
210 215 220

220 Gln Asp Leu Ala Phe Leu Ser Gly Phe Pro Pro Thr Phe Lys Glu Thr
225 230 235 240

240 Asn Gln Leu Lys Thr Lys Leu Pro Glu Asn Leu Ser Ser Lys Val Lys
245 250 255

255 Leu Leu Gln Leu Tyr Ser Glu Ala Ser Val Ala Leu Leu Lys Leu Asn

ES 2 991 277 T3

	260	265	270
	Asn Pro Lys Asp Phe Gln Glu Leu Asn Lys Gln Thr Lys Lys Asn Met		
	275	280	285
5	Thr Ile Asp Gly Lys Glu Leu Thr Ile Ser Pro Ala Tyr Leu Leu Trp		
	290	295	300
	Asp Leu Ser Ala Ile Ser Gln Ser Lys Gln Asp Glu Asp Ile Ser Ala		
	305	310	315
	Ser Arg Phe Glu Asp Asn Glu Glu Leu Arg Tyr Ser Leu Arg Ser Ile		
	320	325	330
10	Glu Arg His Ala Pro Trp Val Arg Asn Ile Phe Ile Val Thr Asn Gly		
	335	340	345
	Gln Ile Pro Ser Trp Leu Asn Leu Asp Asn Pro Arg Val Thr Ile Val		
	350	355	360
	Thr His Gln Asp Val Phe Arg Asn Leu Ser His Leu Pro Thr Phe Ser		
15	365	370	375
	Ser Pro Ala Ile Glu Ser His Ile His Arg Ile Glu Gly Leu Ser Gln		
	380	385	390
	Lys Phe Ile Tyr Leu Asn Asp Asp Val Met Phe Gly Lys Asp Val Trp		
	395	405	410
20	Pro Asp Asp Phe Tyr Ser His Ser Lys Gly Gln Lys Val Tyr Leu Thr		
	405	420	425
	Trp Pro Val Pro Asn Cys Ala Glu Gly Cys Pro Gly Ser Trp Ile Lys		
	415	435	440
25	Asp Gly Tyr Cys Asp Lys Ala Cys Asn Asn Ser Ala Cys Asp Trp Asp		
	425	450	455
	Gly Gly Asp Cys Ser Gly Asn Ser Gly Gly Ser Arg Tyr Ile Ala Gly		
	435	465	470
	Gly Gly Gly Thr Gly Ser Ile Gly Val Gly Gln Pro Trp Gln Phe Gly		
	445	485	490
30	Gly Gly Ile Asn Ser Val Ser Tyr Cys Asn Gln Gly Cys Ala Asn Ser		
	455	500	505
	Trp Leu Ala Asp Lys Phe Cys Asp Gln Ala Cys Asn Val Leu Ser Cys		
	460	515	520
35	Gly Phe Asp Ala Gly Asp Cys Gly Gln Asp His Phe His Glu Leu Tyr		
	480	530	535
	Lys Val Ile Leu Leu Pro Asn Gln Thr His Tyr Ile Ile Pro Lys Gly		
	545	550	555
	Glu Cys Leu Pro Tyr Phe Ser Phe Ala Glu Val Ala Lys Arg Gly Val		
	560	565	570
40	Glu Gly Ala Tyr Ser Asp Asn Pro Ile Ile Arg His Ala Ser Ile Ala		
	575	580	585
	Asn Lys Trp Lys Thr Ile His Leu Ile Met His Ser Gly Met Asn Ala		
	590	595	600
	Thr Thr Ile His Phe Asn Leu Thr Phe Gln Asn Thr Asn Asp Glu Glu		
45	605	610	615
	Phe Lys Met Gln Ile Thr Val Glu Val Asp Thr Arg Glu Gly Pro Lys		
	640	625	630
	Leu Asn Ser Thr Ala Gln Lys Gly Tyr Glu Asn Leu Val Ser Pro Ile		
	655	645	650
50	Thr Leu Leu Pro Glu Ala Glu Ile Leu Phe Glu Asp Ile Pro Lys Glu		
	670	660	665
	Lys Arg Phe Pro Lys Phe Lys Arg His Asp Val Asn Ser Thr Arg Arg		
	685	675	680
	Ala Gln Glu Glu Val Lys Ile Pro Leu Val Asn Ile Ser Leu Leu Pro		
55	700	690	695
	Lys Asp Ala Gln Leu Ser Leu Asn Thr Leu Asp Leu Gln Leu Glu His		
	720	705	710
	Gly Asp Ile Thr Leu Lys Gly Tyr Asn Leu Ser Lys Ser Ala Leu Leu		

ES 2 991 277 T3

	725	730	735
	Arg Ser Phe Leu Met Asn Ser Gln His Ala Lys Ile Lys Asn Gln Ala		
	740	745	750
5	Ile Ile Thr Asp Glu Thr Asn Asp Ser Leu Val Ala Pro Gln Glu Lys		
	755	760	765
	Gln Val His Lys Ser Ile Leu Pro Asn Ser Leu Gly Val Ser Glu Arg		
	770	775	780
	Leu Gln Arg Leu Thr Phe Pro Ala Val Ser Val Lys Val Asn Gly His		
	785	790	795
10	Asp Gln Gly Gln Asn Pro Pro Leu Asp Leu Glu Thr Thr Ala Arg Phe		
	805	810	815
	Arg Val Glu Thr His Thr Gln Lys Thr Ile Gly Gly Asn Val Thr Lys		
	820	825	830
15	Glu Lys Pro Pro Ser Leu Ile Val Pro Leu Glu Ser Gln Met Thr Lys		
	835	840	845
	Glu Lys Lys Ile Thr Gly Lys Glu Lys Glu Asn Ser Arg Met Glu Glu		
	850	855	860
	Asn Ala Glu Asn His Ile Gly Val Thr Glu Val Leu Leu Gly Arg Lys		
	865	870	875
20	Leu Gln His Tyr Thr Asp Ser Tyr Leu Gly Phe Leu Pro Trp Glu Lys		
	885	890	895
	Lys Lys Tyr Phe Gln Asp Leu Leu Asp Glu Glu Glu Ser Leu Lys Thr		
	900	905	910
25	Gln Leu Ala Tyr Phe Thr Asp Ser Lys Asn Thr Gly Arg Gln Leu Lys		
	915	920	925
	Asp Thr Phe Ala Asp Ser Leu Arg Tyr Val Asn Lys Ile Leu Asn Ser		
	930	935	940
	Lys Phe Gly Phe Thr Ser Arg Lys Val Pro Ala His Met Pro His Met		
	945	950	955
30	Ile Asp Arg Ile Val Met Gln Glu Leu Gln Asp Met Phe Pro Glu Glu		
	965	970	975
	Phe Asp Lys Thr Ser Phe His Lys Val Arg His Ser Glu Asp Met Gln		
	980	985	990
35	Phe Ala Phe Ser Tyr Phe Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Val Gln Pro Leu		
	995	1000	1005
	Asn Ile Ser Gln Val Phe Asp Glu Val Asp Thr Asp Gln Ser Gly Val		
	1010	1015	1020
	Leu Ser Asp Arg Glu Ile Arg Thr Leu Ala Thr Arg Ile His Glu Leu		
	1025	1030	1035
40	Pro Leu Ser Leu Gln Asp Leu Thr Gly Leu Glu His Met Leu Ile Asn		
	1045	1050	1055
	Cys Ser Lys Met Leu Pro Ala Asp Ile Thr Gln Leu Asn Asn Ile Pro		
	1060	1065	1070
	Pro Thr Gln Glu Ser Tyr Tyr Asp Pro Asn Leu Pro Pro Val Thr Lys		
45	1075	1080	1085
	Ser Leu Val Thr Asn Cys Lys Pro Val Thr Asp Lys Ile His Lys Ala		
	1090	1095	1100
	Tyr Lys Asp Lys Asn Lys Tyr Arg Phe Glu Ile Met Gly Glu Glu		
	1105	1110	1115
50	Ile Ala Phe Lys Met Ile Arg Thr Asn Val Ser His Val Val Gly Gln		
	1125	1130	1135
	Leu Asp Asp Ile Arg Lys Asn Pro Arg Lys Phe Val Cys Leu Asn Asp		
	1140	1145	1150
	Asn Ile Asp His Asn His Lys Asp Ala Gln Thr Val Lys Ala Val Leu		
55	1155	1160	1165
	Arg Asp Phe Tyr Glu Ser Met Phe Pro Ile Pro Ser Gln Phe Glu Leu		
	1170	1175	1180
	Pro Arg Glu Tyr Arg Asn Arg Phe Leu His Met His Glu Leu Gln Glu		

ES 2 991 277 T3

	1185	1190	1195	1200
	Trp Arg Ala Tyr Arg Asp Lys Leu Lys Phe Trp Thr His Cys Val Leu			
	1205	1210	1215	
5	Ala Thr Leu Ile Met Phe Thr Ile Phe Ser Phe Phe Ala Glu Gln Leu			
	1220	1225	1230	
	Ile Ala Leu Lys Arg Lys Ile Phe Pro Arg Arg Arg Ile His Lys Glu			
	1235	1240	1245	
	Ala Ser Pro Asn Arg Ile Arg Val			
	1250	1255		
10				
	<210> 2			
	<211> 1235			
	<212> PRT			
15	<213> Mus musculus			
	<400> 2			
	Met Leu Leu Lys Leu Leu Gln Arg Gln Thr Tyr Thr Cys Leu Ser His			
	1	5	10	15
20	Arg Tyr Gly Leu Tyr Val Cys Phe Val Gly Val Val Val Thr Ile Val			
	20	25	30	
	Ser Ala Phe Gln Phe Gly Glu Val Val Leu Glu Trp Ser Arg Asp Gln			
	35	40	45	
	Tyr His Val Leu Phe Asp Ser Tyr Arg Asp Asn Ile Ala Gly Lys Ser			
25	50	55	60	
	Phe Gln Asn Arg Leu Cys Leu Pro Met Pro Ile Asp Val Val Tyr Thr			
	65	70	75	80
	Trp Val Asn Gly Thr Asp Leu Glu Leu Leu Lys Glu Leu Gln Gln Val			
	85	90	95	
30	Arg Glu His Met Glu Glu Glu Gln Arg Ala Met Arg Glu Thr Leu Gly			
	100	105	110	
	Lys Asn Thr Thr Glu Pro Thr Lys Lys Ser Glu Lys Gln Leu Glu Cys			
	115	120	125	
	Leu Leu Thr His Cys Ile Lys Val Pro Met Leu Val Leu Asp Pro Pro			
35	130	135	140	
	Leu Pro Ala Asn Cys Thr Leu Lys Asp Leu Pro Thr Leu Tyr Pro Ser			
	145	150	155	160
	Phe His Ala Ala Ser Asp Met Phe Asn Val Ala Lys Pro Lys Asn Pro			
	165	170	175	
40	Ser Thr Asn Val Ser Val Val Val Phe Asp Thr Thr Lys Asp Val Glu			
	180	185	190	
	Asp Ala His Ala Gly Pro Phe Lys Gly Ser Lys Gln Met Val Trp			
	195	200	205	
	Arg Ala Tyr Leu Thr Thr Asp Lys Glu Ala Pro Gly Leu Val Leu Met			
45	210	215	220	
	Gln Gly Leu Ala Phe Leu Ser Gly Phe Pro Pro Thr Phe Lys Glu Thr			
	225	230	235	240
	Ser Gln Leu Lys Thr Lys Leu Pro Glu Lys Leu Ser Ser Lys Ile Lys			
	245	250	255	
50	Leu Leu Arg Leu Tyr Ser Glu Ala Ser Val Ala Leu Leu Lys Leu Asn			
	260	265	270	
	Asn Pro Lys Gly Phe Gln Glu Leu Asn Lys Gln Thr Lys Lys Asn Met			
	275	280	285	
	Thr Ile Asp Gly Lys Glu Leu Thr Ile Ser Pro Ala Tyr Leu Leu Trp			
55	290	295	300	
	Asp Leu Ser Ala Ile Ser Gln Ser Lys Gln Asp Glu Asp Val Ser Ala			
	305	310	315	320
	Ser Arg Phe Glu Asp Asn Glu Glu Leu Arg Tyr Ser Leu Arg Ser Ile			

ES 2 991 277 T3

	325	330	335
	Glu Arg His Ala Pro Trp Val Arg Asn Ile Phe Ile Val Thr Asn Gly		
	340	345	350
5	Gln Ile Pro Ser Trp Leu Asn Leu Asp Asn Pro Arg Val Thr Ile Val		
	355	360	365
	Thr His Gln Asp Ile Phe Gln Asn Leu Ser His Leu Pro Thr Phe Ser		
	370	375	380
10	Ser Pro Ala Ile Glu Ser His Ile His Arg Ile Glu Gly Leu Ser Gln		
	385	390	395
	400		
	Lys Phe Ile Tyr Leu Asn Asp Asp Val Met Phe Gly Lys Asp Val Trp		
	405	410	415
	Pro Asp Asp Phe Tyr Ser His Ser Lys Gly Gln Lys Val Tyr Leu Thr		
	420	425	430
15	Trp Pro Val Pro Asn Cys Ala Glu Gly Cys Pro Gly Ser Trp Ile Lys		
	435	440	445
	Asp Gly Tyr Cys Asp Lys Ala Cys Asn Asn Ser Ala Cys Asp Trp Asp		
	450	455	460
	Gly Gly Asp Cys Ser Gly Asn Thr Ala Gly Asn Arg Phe Val Ala Gly		
	465	470	475
	480		
20	Gly Gly Gly Thr Gly Asn Ile Gly Ala Gly Gln His Trp Gln Phe Gly		
	485	490	495
	Gly Gly Ile Asn Thr Ile Ser Tyr Cys Asn Gln Gly Cys Ala Asn Ser		
	500	505	510
25	Trp Leu Ala Asp Lys Phe Cys Asp Gln Ala Cys Asn Val Leu Ser Cys		
	515	520	525
	Gly Phe Asp Ala Gly Asp Cys Gly Gln Asp His Phe His Glu Leu Tyr		
	530	535	540
	Lys Val Thr Leu Leu Pro Asn Gln Thr His Tyr Val Val Pro Lys Gly		
	545	550	555
	560		
30	Glu Tyr Leu Ser Tyr Phe Ser Phe Ala Asn Ile Ala Arg Arg Gly Val		
	565	570	575
	Glu Gly Thr Tyr Ser Asp Asn Pro Ile Ile Arg His Ala Ser Ile Ala		
	580	585	590
35	Asn Lys Trp Lys Thr Ile His Leu Ile Met His Ser Gly Met Asn Ala		
	595	600	605
	Thr Thr Ile Tyr Phe Asn Leu Thr Leu Gln Asn Ala Asn Asp Glu Glu		
	610	615	620
	Phe Lys Ile Gln Ile Ala Val Glu Val Asp Thr Arg Glu Ala Pro Lys		
	625	630	635
	640		
40	Leu Asn Ser Thr Thr Gln Lys Ala Tyr Glu Ser Leu Val Ser Pro Val		
	645	650	655
	Thr Pro Leu Pro Gln Ala Asp Val Pro Phe Glu Asp Val Pro Lys Glu		
	660	665	670
45	Lys Arg Phe Pro Lys Ile Arg Arg His Asp Val Asn Ala Thr Gly Arg		
	675	680	685
	Phe Gln Glu Glu Val Lys Ile Pro Arg Val Asn Ile Ser Leu Leu Pro		
	690	695	700
	Lys Glu Ala Gln Val Arg Leu Ser Asn Leu Asp Leu Gln Leu Glu Arg		
	705	710	715
	720		
50	Gly Asp Ile Thr Leu Lys Gly Tyr Asn Leu Ser Lys Ser Ala Leu Leu		
	725	730	735
	Arg Ser Phe Leu Gly Asn Ser Leu Asp Thr Lys Ile Lys Pro Gln Ala		
	740	745	750
55	Arg Thr Asp Glu Thr Lys Gly Asn Leu Glu Val Pro Gln Glu Asn Pro		
	755	760	765
	Ser His Arg Arg Pro His Gly Phe Ala Gly Glu His Arg Ser Glu Arg		
	770	775	780
	Trp Thr Ala Pro Ala Glu Thr Val Thr Val Lys Gly Arg Asp His Ala		

ES 2 991 277 T3

	785	790	795	800
	Leu Asn Pro Pro Pro Val Leu Glu Thr Asn Ala Arg Leu Ala Gln Pro			
	805	810	815	
5	Thr Leu Gly Val Thr Val Ser Lys Glu Asn Leu Ser Pro Leu Ile Val			
	820	825	830	
	Pro Pro Glu Ser His Leu Pro Lys Glu Glu Ser Asp Arg Ala Glu			
	835	840	845	
	Gly Asn Ala Val Pro Val Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg Arg Leu Gln			
	850	855	860	
10	Gln Asn Tyr Pro Gly Phe Leu Pro Trp Glu Lys Lys Tyr Phe Gln			
	865	870	875	880
	Asp Leu Leu Asp Glu Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gln Leu Ala Tyr Phe			
	885	890	895	
	Thr Asp Ser Lys His Thr Gly Arg Gln Leu Lys Asp Thr Phe Ala Asp			
15	900	905	910	
	Ser Leu Arg Tyr Val Asn Lys Ile Leu Asn Ser Lys Phe Gly Phe Thr			
	915	920	925	
	Ser Arg Lys Val Pro Ala His Met Pro His Met Ile Asp Arg Ile Val			
	930	935	940	
20	Met Gln Glu Leu Gln Asp Met Phe Pro Glu Glu Phe Asp Lys Thr Ser			
	945	950	955	960
	Phe His Lys Val Arg His Ser Glu Asp Met Gln Phe Ala Phe Ser Tyr			
	965	970	975	
	Phe Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Val Gln Pro Leu Asn Ile Ser Gln Val			
25	980	985	990	
	Phe His Glu Val Asp Thr Asp Gln Ser Gly Val Leu Ser Asp Arg Glu			
	995	1000	1005	
	Ile Arg Thr Leu Ala Thr Arg Ile His Asp Leu Pro Leu Ser Leu Gln			
	1010	1015	1020	
30	Asp Leu Thr Gly Leu Glu His Met Leu Ile Asn Cys Ser Lys Met Leu			
	1025	1030	1035	1040
	Pro Ala Asn Ile Thr Gln Leu Asn Asn Ile Pro Pro Thr Gln Glu Ala			
	1045	1050	1055	
	Tyr Tyr Asp Pro Asn Leu Pro Pro Val Thr Lys Ser Leu Val Thr Asn			
35	1060	1065	1070	
	Cys Lys Pro Val Thr Asp Lys Ile His Lys Ala Tyr Lys Asp Lys Asn			
	1075	1080	1085	
	Lys Tyr Arg Phe Glu Ile Met Gly Glu Glu Glu Ile Ala Phe Lys Met			
	1090	1095	1100	
40	Ile Arg Thr Asn Val Ser His Val Val Gly Gln Leu Asp Asp Ile Arg			
	1105	1110	1115	1120
	Lys Asn Pro Arg Lys Phe Val Cys Leu Asn Asp Asn Ile Asp His Asn			
	1125	1130	1135	
	His Lys Asp Ala Arg Thr Val Lys Ala Val Leu Arg Asp Phe Tyr Glu			
45	1140	1145	1150	
	Ser Met Phe Pro Ile Pro Ser Gln Phe Glu Leu Pro Arg Glu Tyr Arg			
	1155	1160	1165	
	Asn Arg Phe Leu His Met His Glu Leu Gln Glu Trp Arg Ala Tyr Arg			
	1170	1175	1180	
50	Asp Lys Leu Lys Phe Trp Thr His Cys Val Leu Ala Thr Leu Ile Ile			
	1185	1190	1195	1200
	Phe Thr Ile Phe Ser Phe Phe Ala Glu Gln Ile Ile Ala Leu Lys Arg			
	1205	1210	1215	
	Lys Ile Phe Pro Arg Arg Arg Ile His Lys Glu Ala Ser Pro Asp Arg			
55	1220	1225	1230	
	Ile Arg Val			
	1235			

REIVINDICACIONES

1. Una partícula vírica adenoasociada recombinante (rAAV) para su uso en un método para tratar la mucolipidosis de tipo II (ML II) o la mucolipidosis de tipo III (ML III) en un mamífero,
 5 en donde la partícula de rAAV comprende un vector rAAV, en donde el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (GNPTAB), al menos una repetición terminal invertida (ITR) de AAV y un intrón de virus diminuto de ratones (MVM),
 10 en donde GNPTAB está unida de forma funcional a un promotor, en donde el promotor es un potenciador de citomegalovirus (CMV)/promotor de beta-actina de pollo (CBA),
 en donde el potenciador de CMV es un potenciador acortado y el promotor de CBA es un promotor de CBA truncado.
2. La partícula de rAAV para el uso de la reivindicación 1, en donde el tratamiento mejora uno o más síntomas de ML II o ML III, en donde el uno o más síntomas de ML II o ML III son defectos esqueléticos, deficiencias cognitivas, retrasos en el desarrollo de habilidades motoras gruesas y finas, pérdida de audición, falta de tono muscular, abdomen sobresaliente, hernias umbilicales, engrosamiento mucoso progresivo de las vías respiratorias, infecciones respiratorias frecuentes, engrosamiento e insuficiencia de la válvula mitral, estreñimiento o diarrea.
 15
3. La partícula de rAAV para el uso de la reivindicación 1, en donde el tratamiento retarda la progresión de uno o más síntomas de ML II o ML III, en donde el uno o más síntomas de ML II o ML III son defectos esqueléticos, deficiencias cognitivas, retrasos en el desarrollo de habilidades motoras gruesas y finas, pérdida de audición, falta de tono muscular, abdomen sobresaliente, hernias umbilicales, engrosamiento mucoso progresivo de las vías respiratorias, infecciones respiratorias frecuentes, engrosamiento e insuficiencia de la válvula mitral, estreñimiento o diarrea.
 20
4. La partícula de AAV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde
 25 a) la GNPTAB es una GNPTAB humana; y/o
 b) la GNPTAB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; y/o
 c) la GNPTAB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.
5. La partícula de AAV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el vector comprende:
 a) una secuencia de poliadenilación preferiblemente en donde la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina; y/o
 b) dos ITR.
 30
6. La partícula de AAV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la repetición terminal de AAV es una ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón.
 35
7. La partícula de AAV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la partícula de AAV comprende:
 40 a) una cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV de cabra, AAV1/AAV2 químico, AAV bovino, AAV de ratón o rAAV2/HBoV1; y/o
 b) una o más ITR y cápside derivada del mismo serotipo de AAV; o una o más ITR derivadas de un serotipo de AAV
 45 diferente del de la cápside de las partículas víricas de rAAV, preferiblemente en donde la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV8 y en donde el vector comprende ITR de AAV2.
8. La partícula de AAV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la partícula de rAAV se produce transfectando una célula hospedadora con ácido nucleico que codifica el vector rAAV y ácido nucleico que codifica las funciones rep y cap de AAV, y proporcionando ácido nucleico que codifica funciones auxiliares de AAV.
 50
9. La partícula de AAV para el uso de la reivindicación 8, en donde las funciones auxiliares de AAV se proporcionan transfectando la célula hospedadora con ácido nucleico que codifica las funciones auxiliares de AAV, preferiblemente, en donde las funciones auxiliares de AAV se proporcionan infectando la célula hospedadora con un virus auxiliar de AAV que proporciona las funciones auxiliares de AAV, preferiblemente, en donde el virus auxiliar de AAV es un adenovirus, un virus del herpes simple o un baculovirus.
 55
10. La partícula de AAV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la partícula de rAAV se produce por una célula productora de AAV que comprende ácido nucleico que codifica el vector rAAV y ácido nucleico que codifica las funciones rep y cap de AAV, y proporcionando ácido nucleico que codifica funciones auxiliares de AAV.
 60
11. La partícula de AAV para el uso de la reivindicación 10, en donde la célula productora de AAV comprende ácido nucleico que codifica funciones auxiliares de AAV, preferiblemente, en donde las funciones auxiliares de AAV se proporcionan infectando las células productoras de AAV con un virus auxiliar de AAV que proporciona las funciones auxiliares de AAV, preferiblemente, en donde el virus auxiliar de AAV es un adenovirus, un virus del herpes simple o un baculovirus.
 65

12. La partícula de AAV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el mamífero es un ser humano, preferiblemente en donde el ser humano es un sujeto pediátrico o un adulto joven.
- 5 13. La partícula de AAV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la partícula de rAAV se administra por vía intravenosa, intraperitoneal, intraarterial, intramuscular, subcutánea o intrahepática, preferiblemente en donde la partícula de rAAV se administra por vía intravenosa.
- 10 14. La partícula de AAV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el rAAV se administra a más de una ubicación, y/o en donde se repite la administración.
- 15 15. La partícula de AAV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde las partículas víricas de rAAV están en una composición farmacéutica, preferiblemente en donde la composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

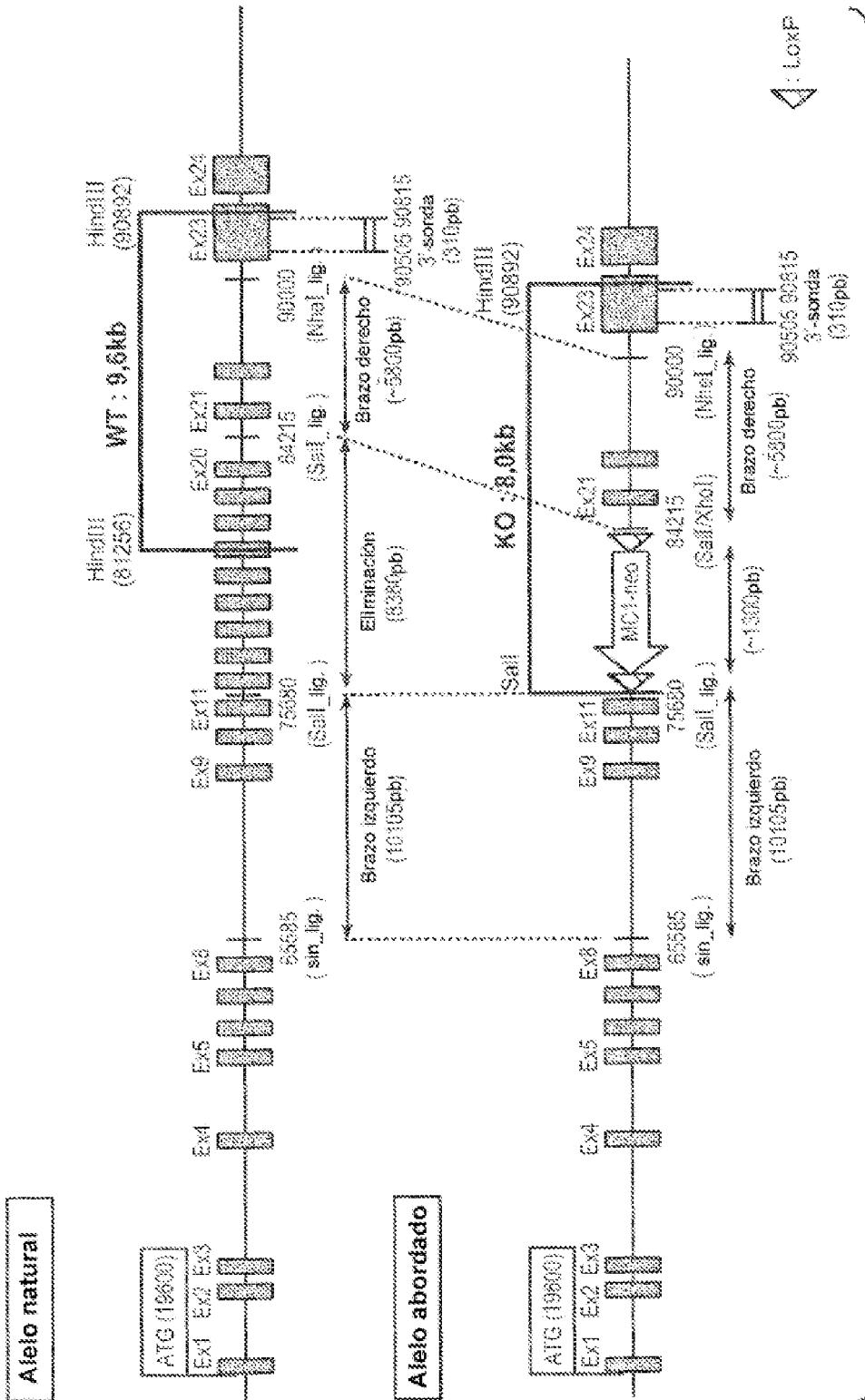
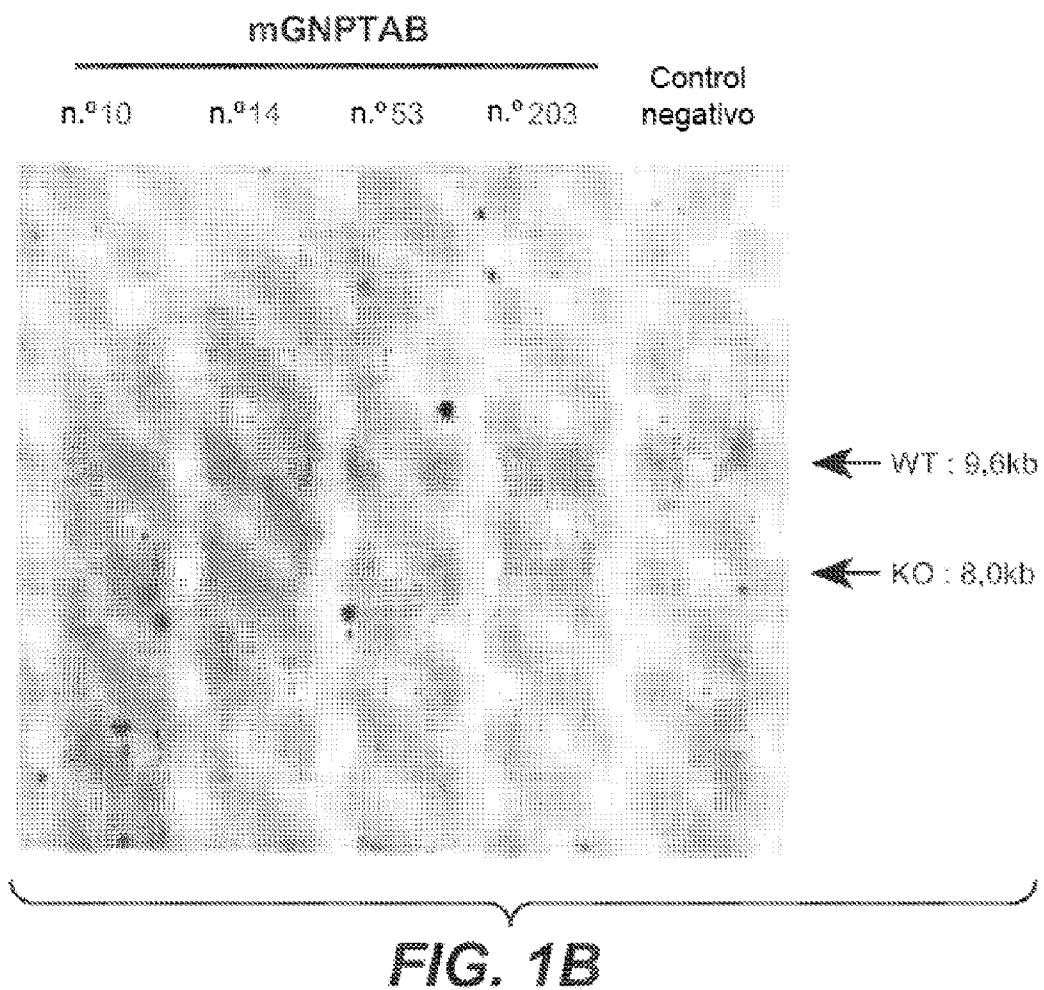


FIG. 1A



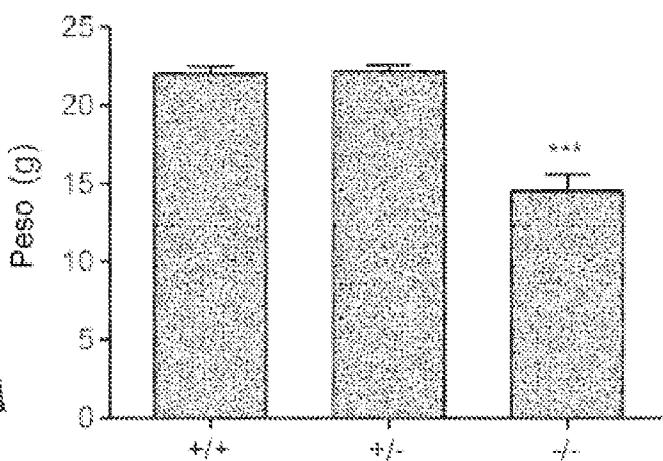


FIG. 2A

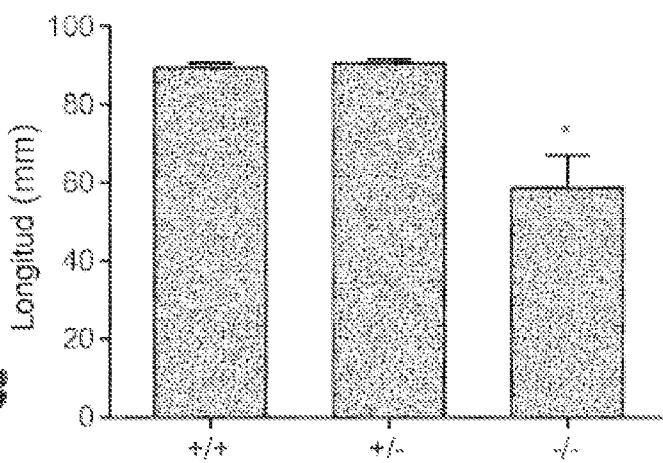


FIG. 2B



FIG. 2C

FIG. 3B

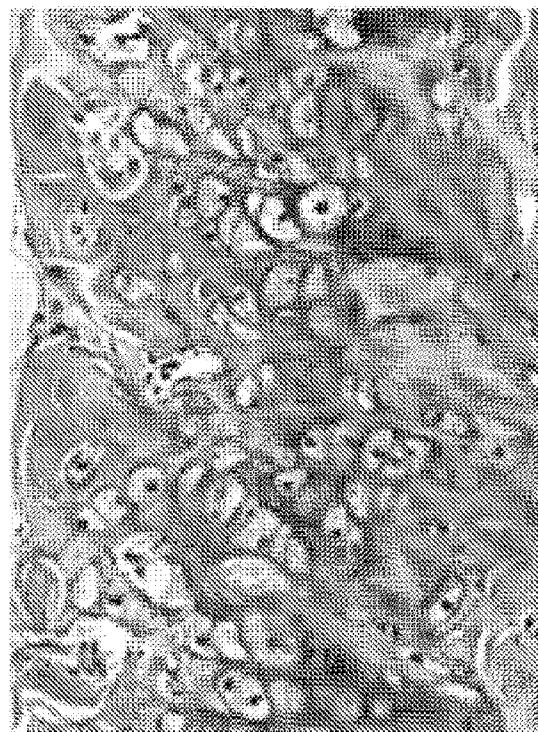


FIG. 3A

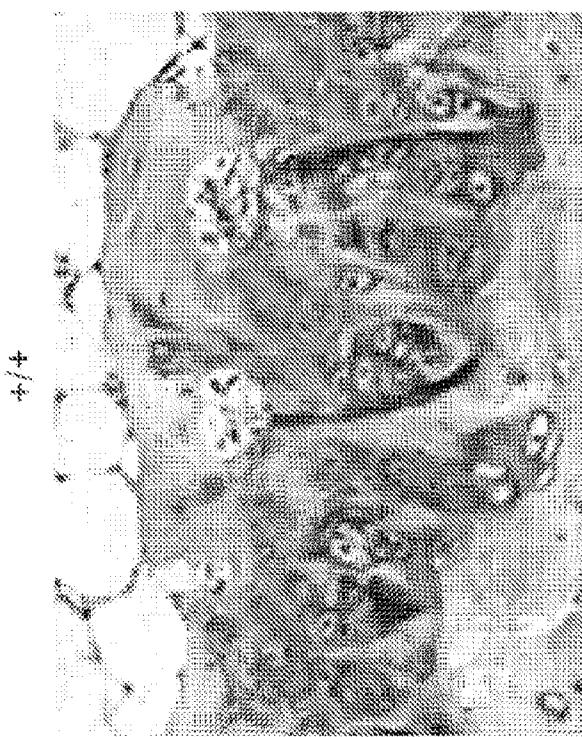
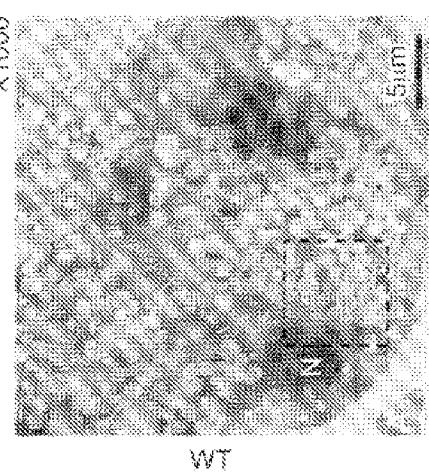
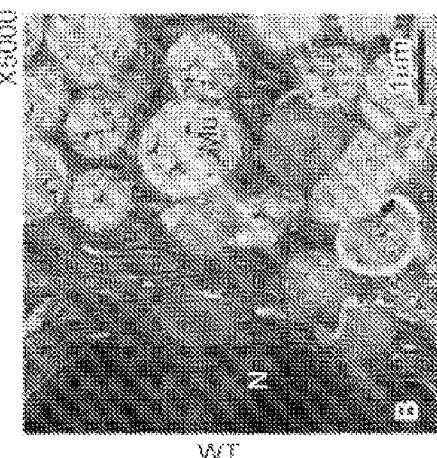


FIG. 4A



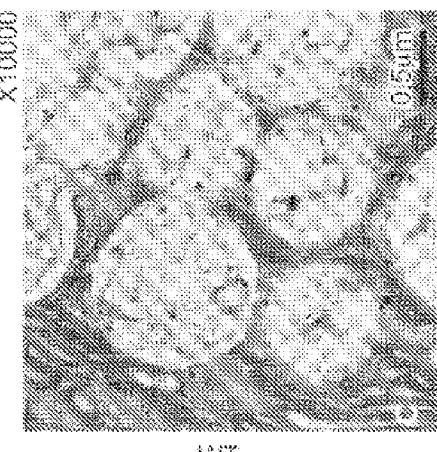
WT

FIG. 4B

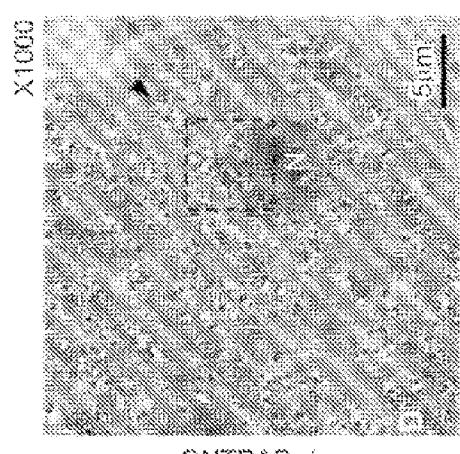


WT

FIG. 4C

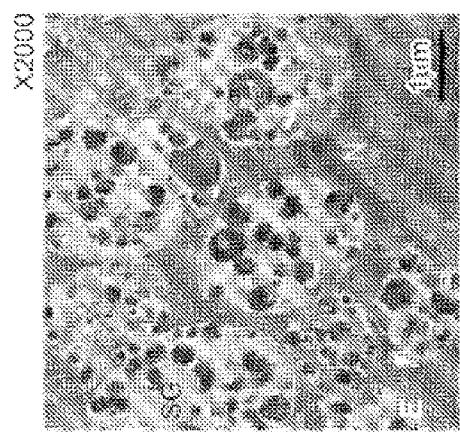


WT



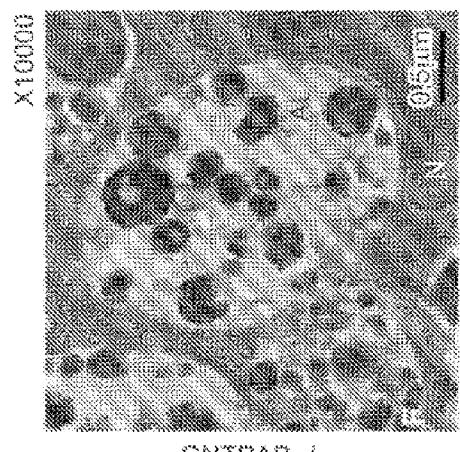
GNTPAS -/-

FIG. 4D



GNTPAS -/-

FIG. 4E



GNTPAS -/-

FIG. 4F

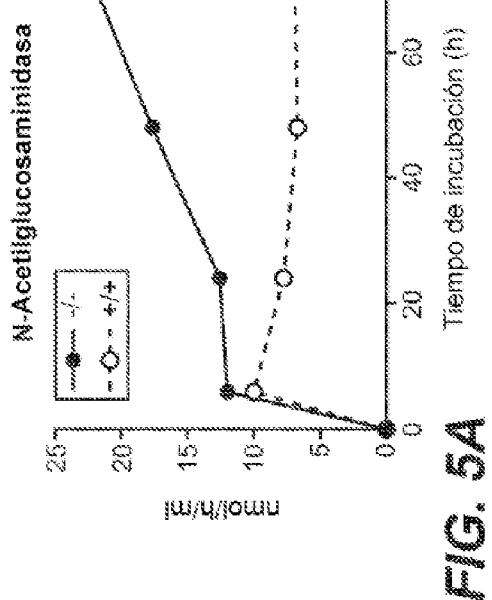


FIG. 5A

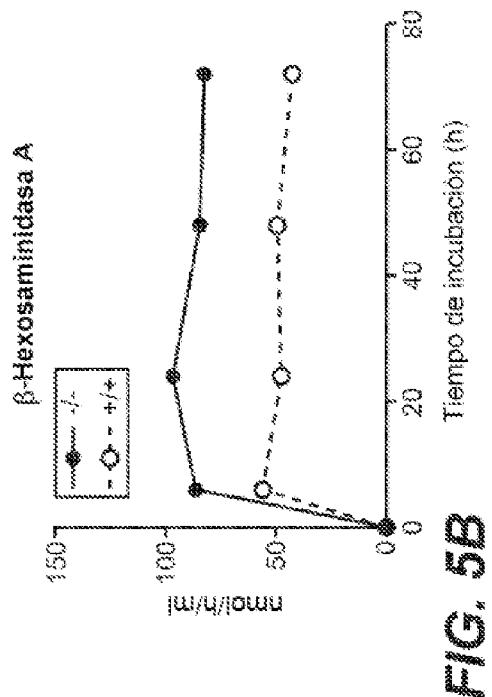


FIG. 5B

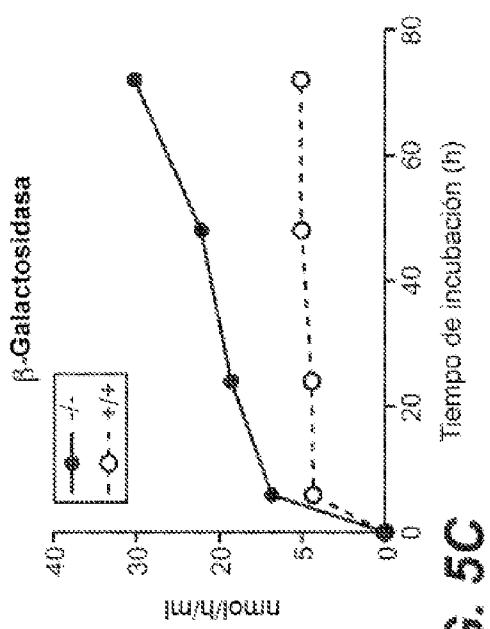


FIG. 5C

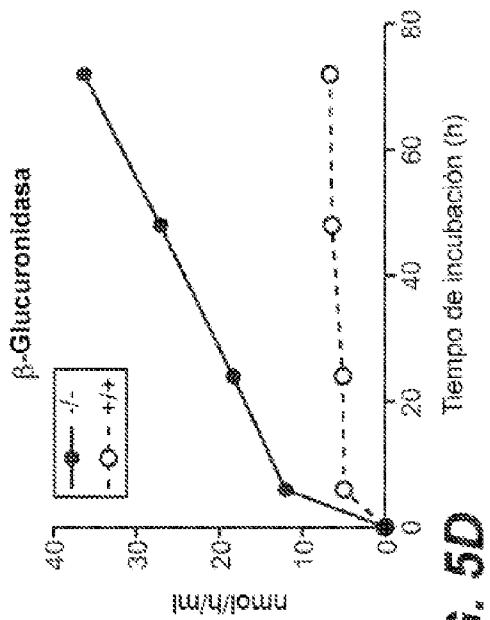
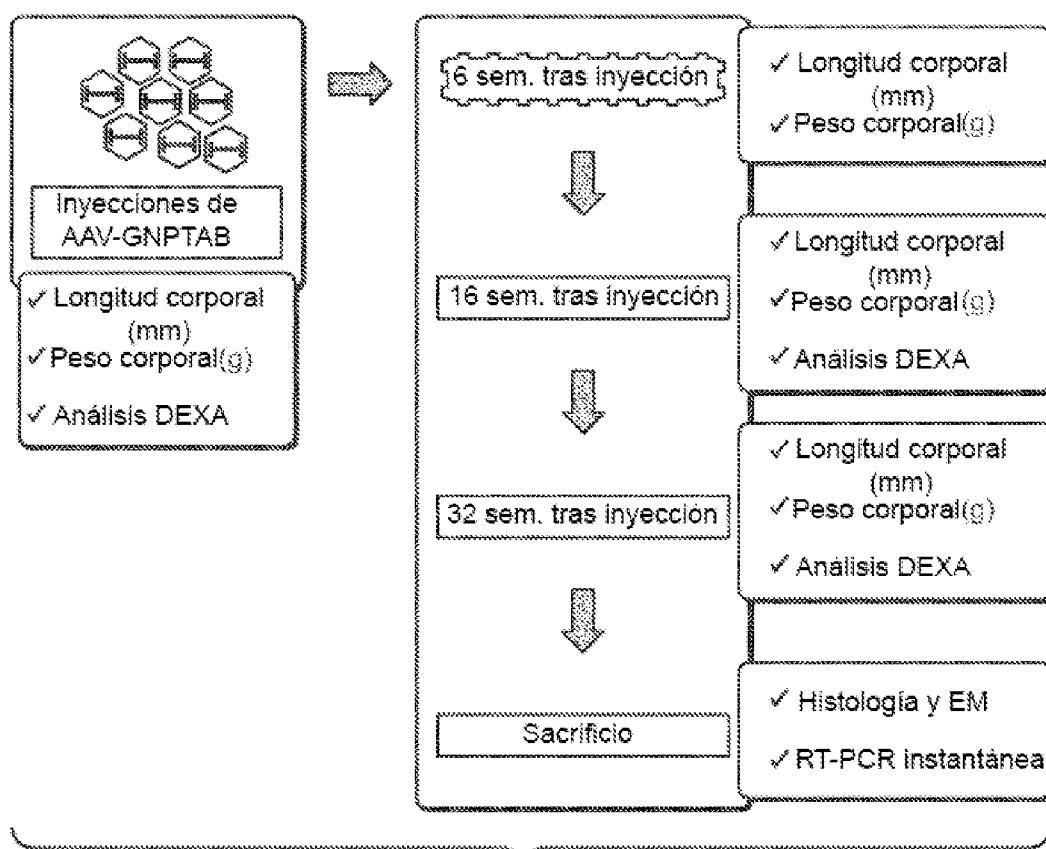


FIG. 5D

**FIG. 6A**

Animales	Tratamiento	Edad al morir
Naturales (n=5)	PBS (Placebo)	
Heterocigóticos (n=5)	PBS (Placebo)	Todos los ratones a las 38 sem.
De tipo KO (n=5)	PBS (Placebo)	(tratamiento a largo plazo)
De tipo KO (n=4)	3E11dmps AAV-GNPTAB	

FIG. 6B

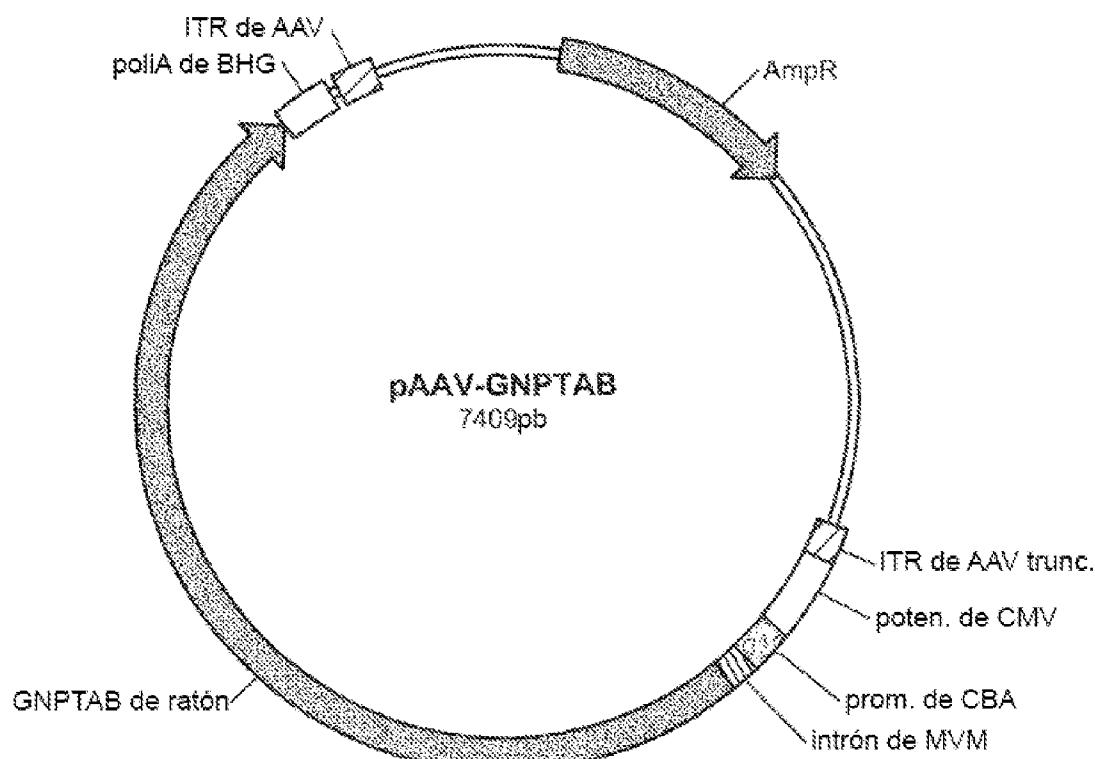


FIG. 7A

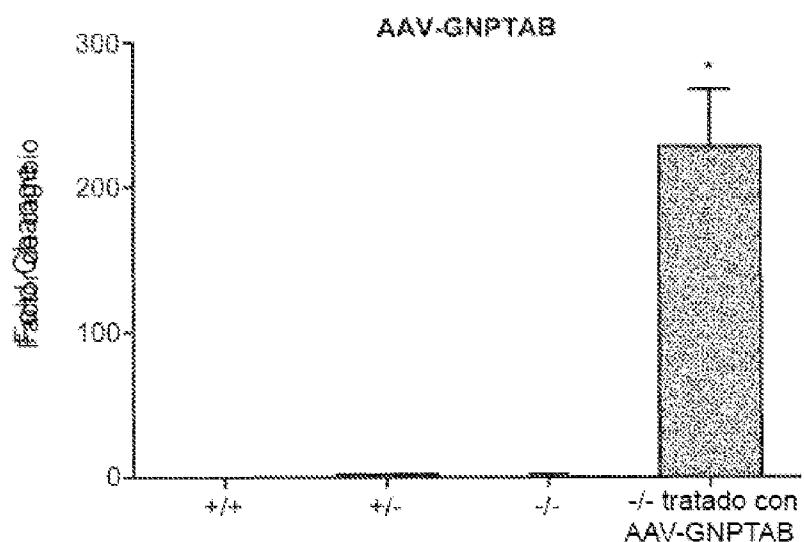


FIG. 7B

FIG. 8A

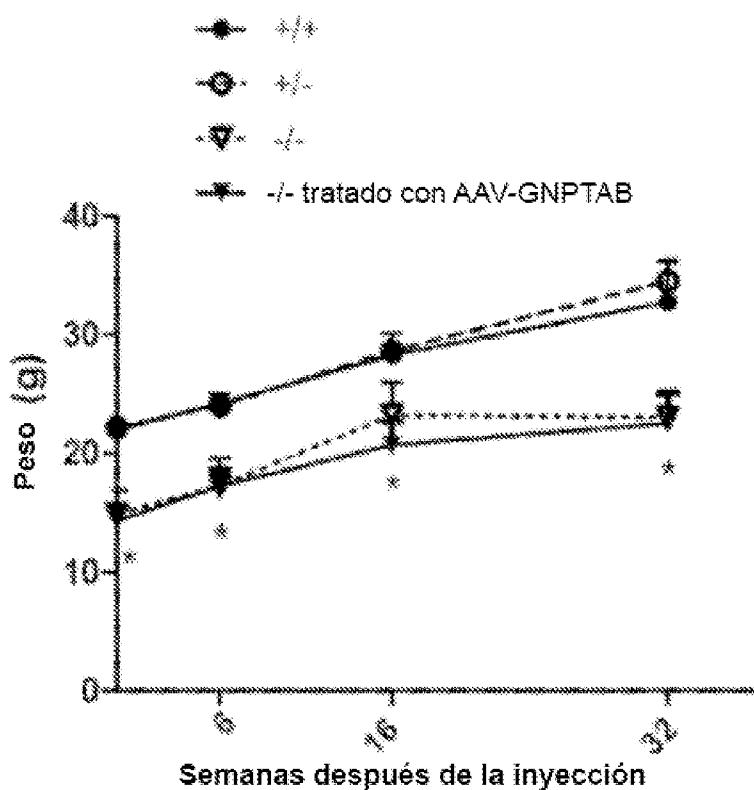
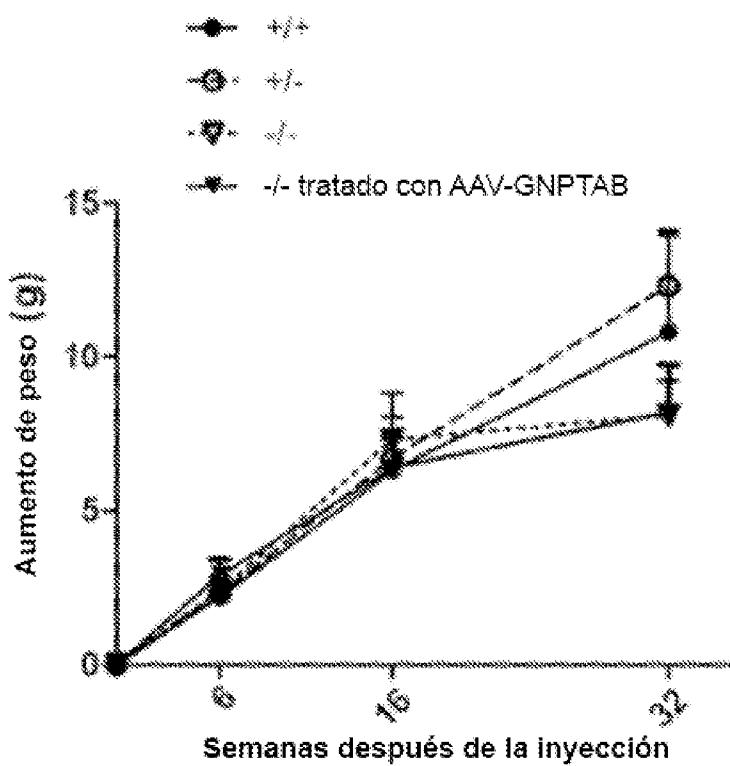


FIG. 8B



-/- tratado con
AAV-GNPTAB

+/- +/+ -/-

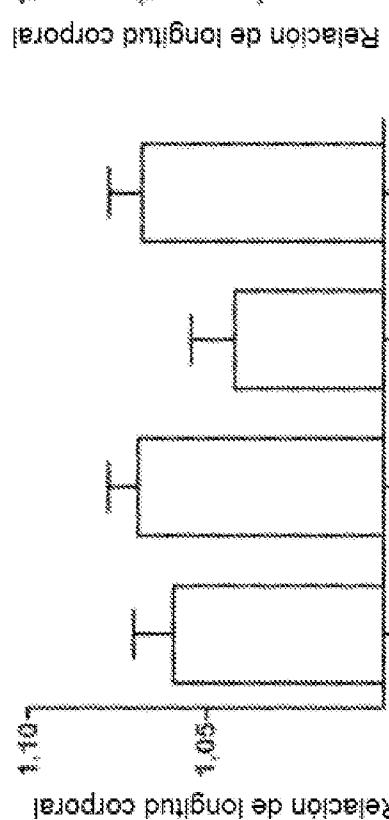


FIG. 9A

-/- tratado con
AAV-GNPTAB

+/- +/+ -/-

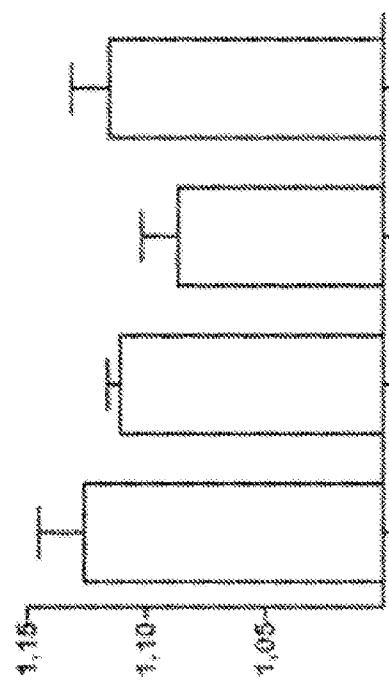


FIG. 9B

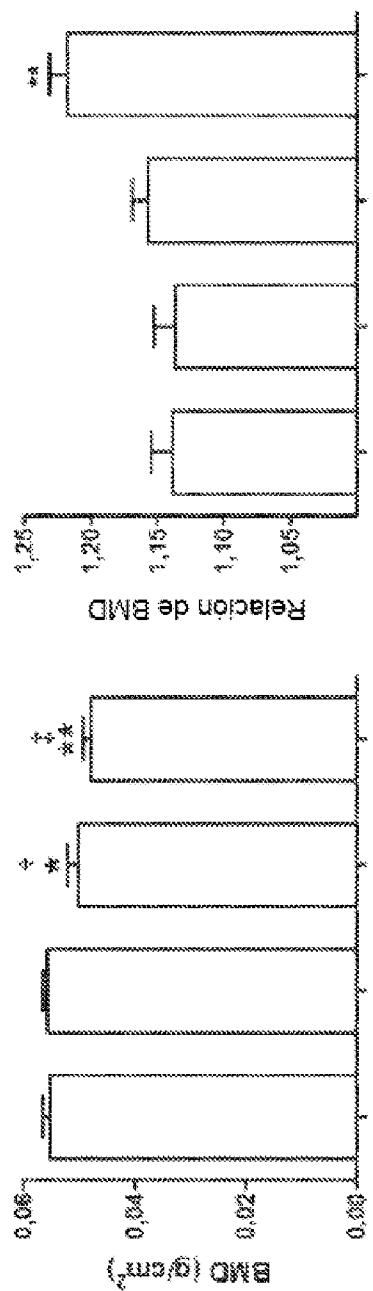


FIG. 10A

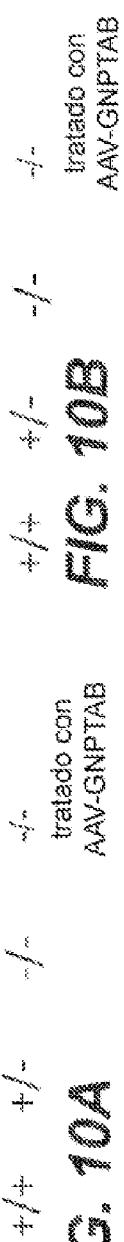


FIG. 10B

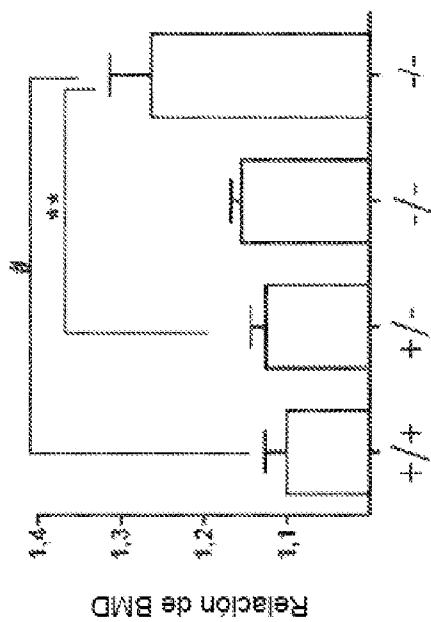
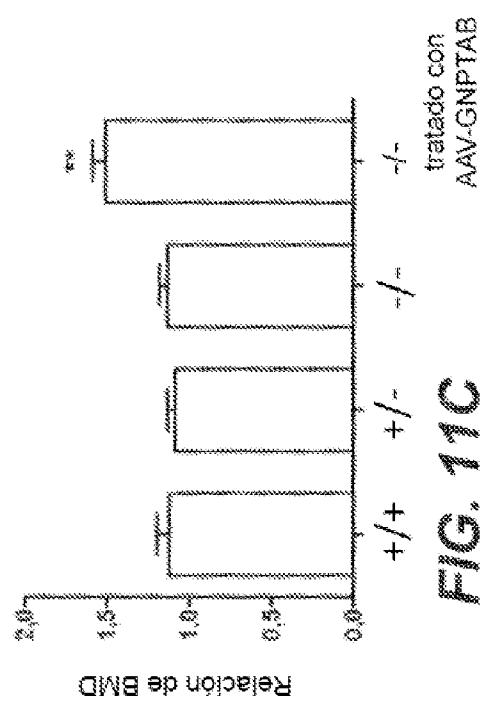
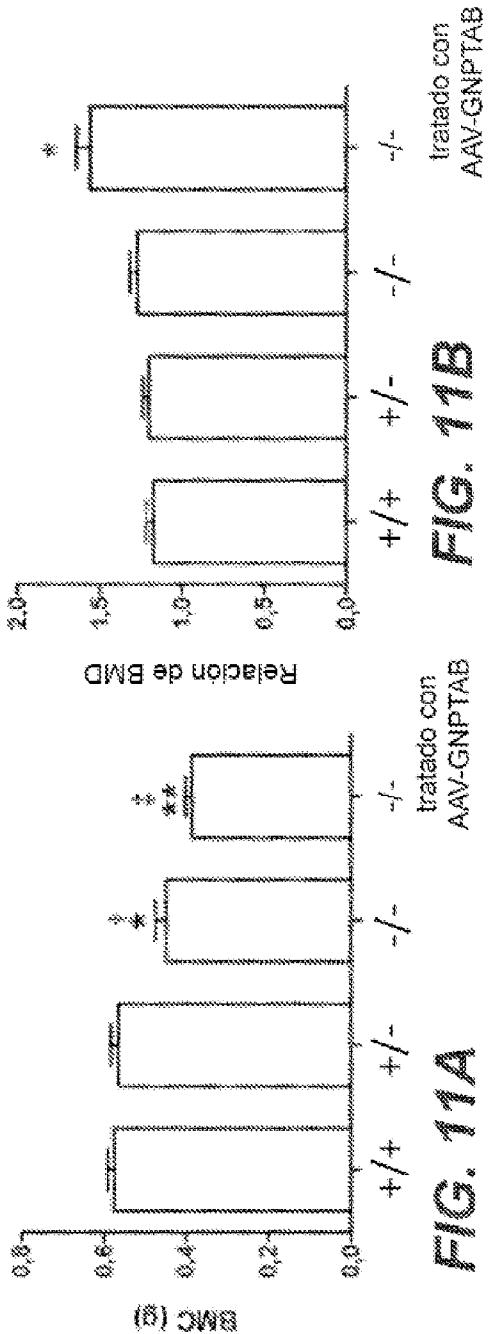


FIG. 10C

tratado con
AAV-GNPTAB



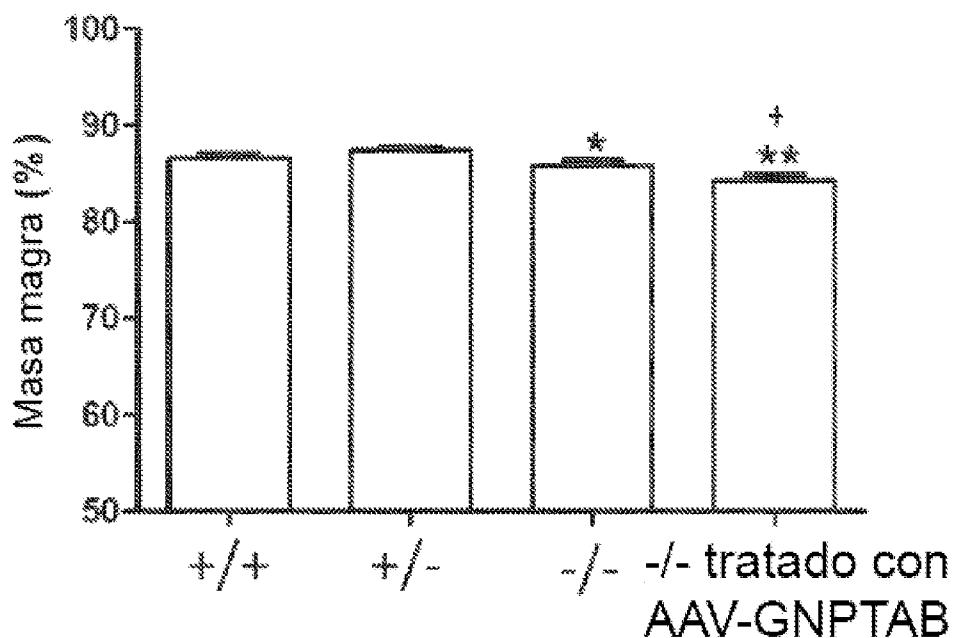


FIG. 12A

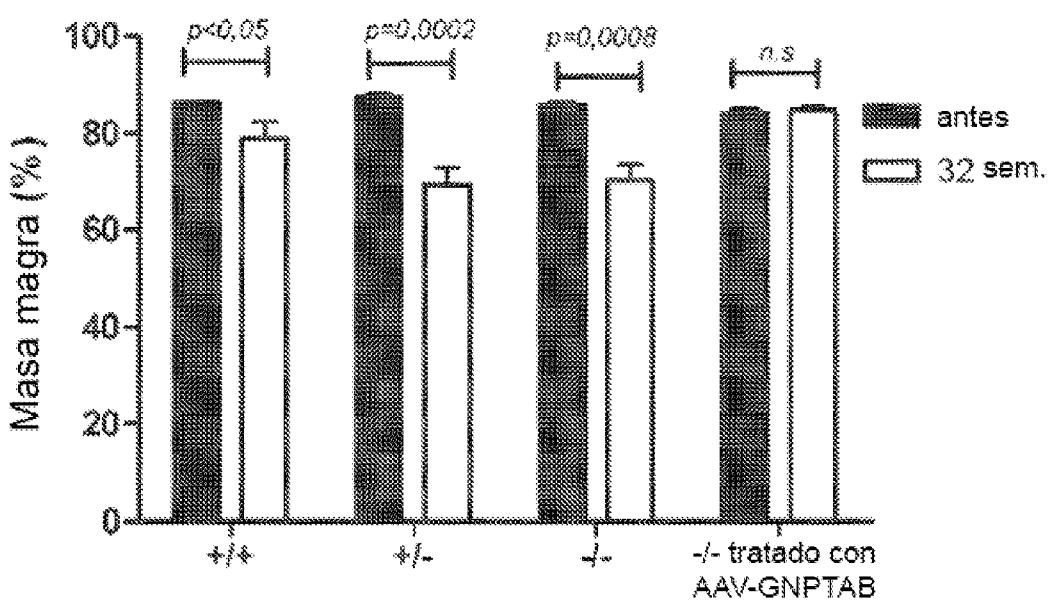


FIG. 12B