

**(21) BR 112019023869-7 A2**



\* B R 1 1 2 0 1 9 0 2 3 8 6 9 A 2 \*

**(22) Data do Depósito:** 11/05/2018

**(43) Data da Publicação Nacional:** 09/06/2020

**República Federativa do Brasil**  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(54) Título:** VARIANTES DE SULFAMIDASE (SGSH), VETORES, COMPOSIÇÕES E MÉTODOS E USOS PARA TRATAR MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IIIA (MPS IIIA)

(51) Int. Cl.: C12N 9/14; C12N 9/16; C12N 15/11; C12N 15/52; C12N 15/86; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 12/05/2017 US 62/505.423.

(71) Depositante(es): THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA.

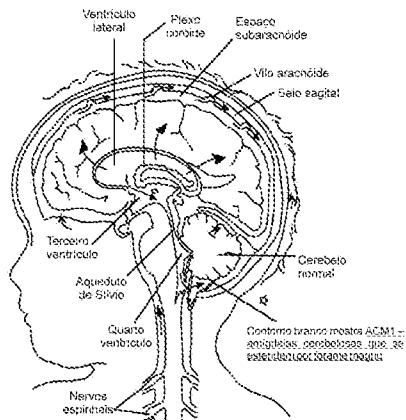
(72) Inventor(es): BEVERLY L. DAVIDSON; YONG HONG CHEN.

(86) Pedido PCT: PCT US2018032454 de 11/05/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/209317 de 15/11/2018

(85) Data da Fase Nacional: 12/11/2019

**(57) Resumo:** A invenção refere-se à sulfamidase (SGSH) e variantes de SGSH. As SGSH e variantes de SGSH podem ser entregues por meio de uma partícula de vírus adeno-associado recombinante (rAAV) no sistema nervoso central de um mamífero (SNC) para transduzir células do SNC que entram em contato com o líquido cefalorraquidiano (LCR). Os mamíferos-alvo para administração de SGSH e variante de SGSH incluem mamíferos com uma deficiência ou defeito na expressão ou função de SGSH.



**“VARIANTES DE SULFAMIDASE (SGSH), VETORES, COMPOSIÇÕES E  
MÉTODOS E USOS PARA TRATAR MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IIIA  
(MPS IIIA)”**

**INFORMAÇÕES RELACIONADAS AO PEDIDO**

[0001] Este pedido de patente reivindica o benefício e a prioridade para o pedido de patente nº US 62/505.423, depositado em 12 de maio de 2017. Todo o conteúdo do pedido acima é no presente documento expressamente incorporado por referência, incluindo todo o texto, tabelas e desenhos.

**INTRODUÇÃO**

[0002] A mucopolissacaridose tipo IIIA (MPS IIIA) é uma doença de armazenamento lisossômico causada pela deficiência de sulfamidase. A MPS IIIA, causada por mutações na sulfamidase (SGSH), é caracterizada por neurodegeneração progressiva acompanhada de perda de habilidades sociais e comportamento agressivo, hiperatividade e distúrbios do sono. As características somáticas são geralmente leves e variáveis. Para corrigir a patologia cerebral em doenças de armazenamento lisossômico, nosso grupo e outros introduziram com sucesso genes que codificam as enzimas ausentes no cérebro. A base deste método de terapia genética está na secreção eficiente de enzimas lisossômicas. Depois que a enzima é efetivamente secretada pelas células corrigidas pelos genes, ela pode potencialmente ser absorvida pelas células próximas, resultando em correção cruzada.

**SUMÁRIO**

[0003] Como divulgado no presente documento, uma sulfamidase modificada (SGSH) melhorou a secreção e a absorção, para fornecer maior benefício terapêutico para o tratamento com MPS IIIA. Os efeitos da mutação de cinco locais diferentes de manose-6-fosforilação (M6P) na SGSH foram avaliados. A eficiência da secreção foi variável e as modificações afetaram a secreção de células transduzidas ou

transfetadas. Uma modificação específica do local M6P, N264Q, resultou em níveis elevados de secreção de SGSH.

[0004] Estudos posteriores mostraram que a modificação do local SGSH M6P forneceu vários atributos valiosos adicionais. Primeiro, a modificação não apenas aumentou a secreção enzimática, mas também diminuiu o acúmulo de enzimas nas células, que, se houvesse acúmulo, poderiam transmitir disfunção lisossômica secundária. Segundo, essa variante de SGSH foi processada corretamente nas células e amadureceu até a forma ativa no lisossomo. Terceiro, surpreendentemente, essa variante de SGSH parece ser absorvida mais eficientemente pelas células, possivelmente usando um receptor diferente daquele usado para a SGSH normal e não modificada. Como resultado, espera-se que essa SGSH modificada seja superior à SGSH do tipo selvagem em terapia gênica ou terapia de reposição enzimática para pacientes com MPS IIIA. Nos estudos de modelo animal da MPS IIIA divulgados no presente documento, essa SGSH modificada foi superior à SGSH do tipo selvagem em termos de proporcionar um benefício cognitivo e/ou uma redução nos déficits cognitivos nos animais de MPS IIIA, presumivelmente devido a um ou mais dos atributos.

[0005] De acordo com a invenção, são fornecidos métodos de entrega de sulfamidase (SGSH) ao sistema nervoso central de um mamífero. Em uma modalidade, um método inclui administrar ao sistema nervoso central (SNC) do mamífero uma partícula de vírus adenoassociado recombinante (rAAV) compreendendo uma variante de ácido nucleico que codifica sulfamidase (SGSH) eficaz para transduzir células que entram em contato com o líquido cefalorraquidiano (CSF) do mamífero, de modo que as células expressem e secretem a variante de sulfamidase (SGSH) no mamífero.

[0006] De acordo com a invenção, são fornecidos métodos de tratamento de uma doença em um mamífero causada por uma deficiência ou defeito na expressão ou função de sulfamidase (SGSH). Em uma modalidade, um método inclui administrar ao sistema nervoso central (SNC) do

mamífero uma partícula de vírus adenoassociado recombinante (rAAV) compreendendo um ácido nucleico que codifica uma variante de sulfamidase (SGSH) de uma maneira eficaz para transduzir células que contatam o SNC do mamífero, em que a célula expressa e secreta a variante de sulfamidase (SGSH), de modo a tratar a doença.

[0007] De acordo com a invenção, são fornecidos métodos de entrega de sulfamidase (SGSH) ao sistema nervoso central de um mamífero. Em uma modalidade, um método inclui administrar ao parênquima cerebral do mamífero, espaço subaracnóideo e/ou espaço intratecal uma partícula de vírus adenoassociado recombinante (rAAV) compreendendo um ácido nucleico que codifica uma variante de sulfamidase (SGSH) de uma maneira eficaz para transduzir células do parênquima cerebral ou células que entram em contato com o líquido cefalorraquidiano (LCR) do mamífero, de modo que as células expressem e secretem a variante de SGSH no mamífero.

[0008] De acordo com a invenção, são fornecidos métodos de tratamento de uma doença em um mamífero causada por uma deficiência ou defeito na expressão ou função de sulfamidase (SGSH). Em uma modalidade, um método inclui administrar ao parênquima cerebral do mamífero, espaço subaracnóideo e/ou espaço intratecal uma partícula de vírus adenoassociado recombinante (rAAV) compreendendo um ácido nucleico que codifica uma variante de sulfamidase (SGSH) inserida entre um par de repetições terminais invertidas de AAV de maneira eficaz para transduzir células do parênquima cerebral ou células que entram em contato com o líquido cefalorraquidiano (LCR) do mamífero, em que a célula expressa e secreta a variante de SGSH, de modo a tratar a doença.

[0009] Nos métodos da invenção, a administração ou entrega pode ser no ventrículo cerebral. Nos métodos da invenção, a administração ou entrega da partícula de rAAV pode ser no ventrículo cerebral do mamífero, espaço subaracnóideo e/ou espaço intratecal. Nos métodos da invenção, a administração ou entrega pode ser para um ventrículo cerebral

lateral. Nos métodos da invenção, a administração ou entrega pode ser em células ependimárias, células piais, células endoteliais, células do ventrículo cerebral, células meníngicas, células gliais e/ou neurônios.

[0010] Nos métodos da invenção, as células às quais o rAAV é administrado ou entregue secretam a variante de SGSH no SNC do dito mamífero. Nos métodos da invenção, as células às quais o rAAV é administrado ou entregue secretam a variante de SGSH no LCR do dito mamífero.

[0011] Nos métodos da invenção, as células ependimárias, piais, endoteliais, do ventrículo cerebral, meníngicas, gliais e/ou neurônio expressam a variante de SGSH e/ou células ependimárias, piais, endoteliais, do ventrículo cerebral, meníngicas, gliais e/ou neurônio secretam a variante de SGSH no LCR.

[0012] Nos métodos da invenção, uma partícula ou partículas de rAAV incluem uma proteína do capsídeo de AAV e um genoma de vetor no qual o ácido nucleico que codifica uma variante de sulfamidase (SGSH) é inserido entre um par de repetições terminais invertidas de AAV (ITRs).

[0013] Nos métodos da invenção, a proteína do capsídeo do AAV pode ser derivada ou selecionada do grupo que consiste em proteínas de capsídeo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-rh74, AAV-rh10 e AAV-2i8 VP1, VP2 e/ou VP3 ou uma sequência da capsídeo com 70% ou mais de identidade em relação às sequências de capsídeos AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-rh74, AAV-Rh10 ou AAV-2i8 VP1, VP2 e/ou VP3.

[0014] Nos métodos da invenção, um ou mais dos pares de ITRs de AAV podem ser derivados, compreender ou consistir em um ITR de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV- rh74, AAV-rh10 ou AAV-2i8, ou um ITR com 70% ou mais de

identidade em relação à sequência de ITR de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-rh74, AAV-Rh10 ou AAV-2i8.

[0015] Nos métodos da invenção, o ácido nucleico que codifica uma variante de sulfamidase (SGSH) inclui ainda um elemento de controle de expressão que modula a expressão do ácido nucleico. Em certas modalidades, um elemento de controle de expressão compreende um promotor. Em certas modalidades, um elemento de controle de expressão compreende um elemento intensificador.

[0016] Em modalidades particulares, um elemento de controle de expressão compreende um intensificador de CMV, promotor de actina beta de frango, promotor de CAG e/ou uma sequência com 80% ou mais de identidade em relação ao intensificador de CMV estabelecido na SEQ ID NO:2 e/ou uma sequência com 80% ou mais identidade em relação ao promotor de CAG estabelecido na SEQ ID NO:3.

[0017] Nos métodos da invenção, o ácido nucleico pode ainda incluir um ou mais de um ítron, uma sequência polinucleotídica de carga e/ou sinal poli A, ou uma combinação dos mesmos.

[0018] Em certas modalidades, uma pluralidade de partículas de rAAV são administradas ou entregues ao sujeito.

[0019] Em certas modalidades, as partículas de rAAV são administradas em uma dose de cerca de  $1 \times 10^6$  a cerca de  $1 \times 10^{18}$  gv/kg.

[0020] Em certas modalidades, as partículas de rAAV são administradas em uma dose de cerca de  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^{17}$ , cerca de  $1 \times 10^8$ - $1 \times 10^{16}$ , cerca de  $1 \times 10^9$ - $1 \times 10^{15}$ , cerca de  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{14}$ , cerca de  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{13}$ , cerca de  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{13}$ , cerca de  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{13}$ , a cerca de  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{11}$ , cerca de  $1 \times 10^{11}$ - $1 \times 10^{12}$ , cerca de  $1 \times 10^{12}$ - $1 \times 10^{13}$  ou cerca de  $1 \times 10^{13}$ - $1 \times 10^{14}$  genomas vetor por quilograma (gv/kg) do mamífero.

[0021] Em certas modalidades, as partículas de rAAV são administradas a uma dose de cerca de 0,5-4 ml de  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^{16}$  gv/ml.

[0022] Em certas modalidades, um método da invenção inclui ainda a administração de uma pluralidade de capsídeos vazios de AAV. Em certas modalidades, as partículas de rAAV são formuladas com capsídeos vazios de AAV para administração.

[0023] Em certas modalidades, os capsídeos vazios de AAV são administrados ou formulados com um excesso de 1,0 a 100 vezes de partículas de vetor de rAAV. Em certas modalidades, os capsídeos vazios de AAV são administrados ou formulados com um excesso de cerca de 1,0 a 100 vezes de capsídeos vazios de AAV em partículas de rAAV.

[0024] Em certas modalidades, as partículas de rAAV formuladas com capsídeos vazios de AAV são apropriadas para administração ou entrega a um mamífero.

[0025] Em certas modalidades, os capsídeos vazios de AAV são formulados para administração ou entrega a um mamífero.

[0026] Em certas modalidades, a entrega ou administração compreende injeção intraventricular e/ou injeção intraparenquimatoso.

[0027] Em certas modalidades, a partícula de rAAV é injetada em um único local no cérebro. Em certas modalidades, a partícula de rAAV é injetada em 1 a 5 locais no cérebro.

[0028] Em certas modalidades, a partícula de rAAV é administrada ao: ventrículo lateral rostral; e/ou ventrículo lateral caudal; e/ou ventrículo lateral direito; e/ou ventrículo lateral esquerdo; e/ou ventrículo lateral rostral direito; e/ou ventrículo lateral rostral esquerdo; e/ou ventrículo lateral caudal direito; e/ou ventrículo lateral caudal esquerdo.

[0029] Em certas modalidades, a partícula de rAAV é administrada em doses únicas ou múltiplas a qualquer cisterna magna do mamífero, espaço intraventricular, ventrículo cerebral, espaço subaracnóideo, espaço intratecal e/ou epêndima.

[0030] Em certas modalidades, um método fornece

expressão da variante de SGSH ou função de SGSH aumentada ao SNC. Em certas modalidades, um método aumenta a expressão variante de SGSH para entre cerca de 5 a 50% da expressão de SGSH normal. Em certas modalidades, um método aumenta a expressão da variante de SGSH para acima de 50% da expressão de SGSH normal.

[0031] Em certas modalidades, um método inibe, diminui ou reduz déficits ou defeitos cognitivos devido a um defeito ou deficiência de SGSH endógeno no dito mamífero.

[0032] Em certas modalidades, um método aumenta, melhora, preserva, restaura ou resgata a perda de função cognitiva ou perda de aprendizado espacial devido a um defeito ou deficiência de SGSH endógeno no dito mamífero.

[0033] Em certas modalidades, um método aumenta, melhora, preserva, restaura ou resgata déficits de memória ou defeitos do mamífero.

[0034] Em certas modalidades, um método aumenta, preserva, restaura ou resgata a função ou viabilidade do neurônio.

[0035] Em certas modalidades, um método aumenta, preserva, restaura ou resgata a função ou viabilidade dos neurônios corticais.

[0036] Em certas modalidades, um método aumenta, preserva, restaura ou resgata a função ou viabilidade dos neurônios motores corticais.

[0037] Em certas modalidades, um método inibe, diminui ou impede a degeneração ou morte de neurônios.

[0038] Em certas modalidades, um método inibe, diminui ou impede a degeneração ou morte de neurônios corticais.

[0039] Em certas modalidades, um método inibe, diminui ou impede a degeneração ou morte de neurônios motores corticais.

[0040] Em certas modalidades, um método melhora, reduz ou diminui um sintoma ou efeito adverso do defeito ou deficiência de

SGSH.

[0041] Em certas modalidades, um método estabiliza, evita a piora ou reverte um sintoma ou efeito adverso do defeito ou deficiência de SGSH.

[0042] Em certas modalidades, um sintoma ou efeito adverso é um sintoma em estágio inicial ou tardio; um sintoma de comportamento, personalidade ou linguagem; um sintoma da função motora; e/ou um sintoma cognitivo.

[0043] Em certas modalidades, um método fornece maior secreção da variante de SGSH por células transduzidas em comparação com a secreção da SGSH não variante estabelecida como SEQ ID NO:1.

[0044] Em certas modalidades, um método fornece maior absorção da variante de SGSH por células não transduzidas em comparação com absorção de SGSH não variante estabelecida como SEQ ID NO:1.

[0045] Em certas modalidades, um método inibe ou diminui a produção ou o acúmulo secundário de enzimas (por exemplo, betaglucuronidase) nas células.

[0046] Indivíduos da invenção, incluindo mamíferos. Em uma modalidade, um mamífero é um mamífero não roedor. Em outra modalidade, um mamífero é um primata, cavalo, ovelha, cabra, porco ou cachorro. Em outra modalidade, um mamífero é um primata.

[0047] Em outra modalidade, um primata é humano. Em um aspecto, um humano é uma criança. Em um aspecto particular, uma criança tem entre cerca de 1 a 8 anos de idade.

[0048] Os indivíduos da invenção incluem mamíferos, como primatas e humanos, que exibem uma perda ou expressão ou função endógena reduzida de SGSH.

[0049] Os sujeitos da invenção incluem mamíferos, como primatas e humanos que são homozigotos (*Sgsh*<sup>-/-</sup>) ou heterozigotos (*Sgsh*<sup>+/+</sup>) com relação à expressão ou função perdida ou reduzida de SGSH.

[0050] Os métodos da invenção incluem o tratamento de qualquer doença ou distúrbio causado por ou associado a uma deficiência ou defeito na expressão ou função de SGSH.

[0051] Em certas modalidades, um método inclui administrar um ou mais agentes imunossupressores. Em modalidades particulares, e o agente imunossupressor é administrado antes ou contemporaneamente à administração ou entrega da dita partícula de rAAV.

[0052] Em certas modalidades, um agente imunossupressor é um agente anti-inflamatório.

[0053] Em certas modalidades, uma variante de SGSH é mamífera. Em aspectos particulares, uma variante de SGSH é uma SGSH de primata, cavalo, ovelha, cabra, porco ou cachorro.

[0054] Em certas modalidades, uma variante de SGSH é humana.

[0055] Em certas modalidades, uma variante de SGSH exibe maior secreção por células transduzidas em comparação com SGSH não variante estabelecida como SEQ ID NO:1.

[0056] Em certas modalidades, uma variante de SGSH exibe absorção aumentada pelas células em comparação com absorção de SGSH não variante estabelecida como SEQ ID NO:1.

[0057] Em certas modalidades, a absorção de variantes de SGSH pelas células não requer receptor de manose-6-fosfato.

[0058] Em certas modalidades, uma variante de SGSH é distribuída para células não transduzidas no SNC.

[0059] Em certas modalidades, uma variante de SGSH é distribuída para células do SNC não transduzidas por meio de líquido cefalorraquidiano (LCR).

[0060] Em certas modalidades, uma variante de SGSH é distribuída para células do SNC não transduzidas localizadas distalmente às células transduzidas.

[0061] Em certas modalidades, uma SGSH é absorvida pelas ditas células do SNC.

[0062] Em certas modalidades, uma variante de SGSH é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO:1.

[0063] Em certas modalidades, uma variante de SGSH comprehende uma variante da SEQ ID NO:1.

[0064] Em certas modalidades, uma variante de SGSH é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO:1 com uma substituição de aminoácidos na posição 264.

[0065] Em certas modalidades, uma variante de SGSH é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO:1 com uma substituição de asparagina (N)->glutamina (Q) na posição 264.

[0066] Em certas modalidades, uma variante de SGSH comprehende a SEQ ID NO:1 com uma substituição de aminoácidos na posição 264.

[0067] Em certas modalidades, uma variante de SGSH comprehende a SEQ ID NO:1 com uma substituição de asparagina (N) -> glutamina (Q) na posição 264.

#### **DESCRÍÇÃO DOS DESENHOS**

[0068] A Figura 1 mostra as abordagens de entrega de AAV para terapia com LSD. Injeção no parênquima cerebral e líquido cefalorraquidiano (LCR). Para alguns sorotipos, transdução eficaz de epêndima para distribuição do LCR nas células neurais subjacentes.

[0069] A Figura 2 mostra a avaliação da secreção de enzimas lisossômicas *in vitro*.

[0070] A Figura 3 mostra que a SGSH nativa é pouco secretada.

[0071] A Figura 4A mostra a lista de modificações da SGSH M6P.

[0072] A Figura 4B mostra que a modificação do local

M6P de SGSH melhora a secreção.

[0073] A Figura 5A mostra as propriedades SGSHv4 (meio).

[0074] A Figura 5B mostra as propriedades de SGSHv4 (lisado celular).

[0075] A Figura 6A mostra a expressão de SGSH no lisado celular.

[0076] A Figura 6B mostra a quantificação da expressão de SGSH.

[0077] A Figura 6C mostra um Western blot representativo (de quatro réplicas biológicas) indicando os níveis de proteína SGSH e SGSHv4 nas frações F1, F2, F3 e F4 isoladas após centrifugação em gradiente. LAMP1, Bip e Grasp 65 foram utilizados para identificar o enriquecimento dos marcadores lisossomáticos, ER e Golgi, respectivamente. O asterisco (\*) indica SGSH não glicosilada, a ponta da seta indica SGSH glicosilada; PNF é a fração pós-nuclear.

[0078] A Figura 7 mostra que a SGSHv4 possui absorção independentemente do M6PR.

[0079] A Figura 8A mostra que a SGSHv4 é totalmente processada após a absorção (imuno-histologia da SGSH).

[0080] A Figura 8B mostra que a SGSHv4 é totalmente processada após a absorção (expressão de SGSH).

[0081] A Figura 9 mostra a terapia genética com SGSHv4 em camundongos de MPSIIIA e que o AAV4 tem como alvo o ependimário do camundongo.

[0082] A Figura 10 mostra o AAV.SGSHv4 impactando as leituras de doenças através do Labirinto Aquático de Morris: fase de aquisição.

[0083] A Figura 11A mostra que a SGSHv4 melhora os déficits cognitivos (tempo no quadrante-alvo).

[0084] A Figura 11B mostra que a SGSHv4 melhora os déficits cognitivos (distância no quadrante-alvo).

[0085] A Figura 12 mostra a atividade de SGSH no LCR.

[0086] A Figura 13 mostra a atividade de SGSH no cérebro.

[0087] A Figura 14 mostra o impacto de AAV.SGSHv4 em enzimas secundárias através da atividade de  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -glu) no LCR.

[0088] A Figura 15 mostra a atividade da  $\beta$ -glu no cérebro.

[0089] A Figura 16A mostra a quantificação de GAG no parênquima a partir de tecidos colhidos contralateralmente ao local da injeção: hipocampo (HPC), estriado (Str), córtex occipital (OccCx) e cerebelo (Cb). n = 4-6. Os dados representam  $\pm$  DP médio. \*p <0,05; \*\*p <0,01, \*\*\*p <0,001; \*\*\*\*p <0,0001. ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey.

[0090] A Figura 16B mostra a astrocitose glial medida por imunorreatividade para GFAP em seções coletadas dos hemisférios unilaterais ao local da injeção. Fotomicrografias representativas são do córtex (Cx) e estriado (Str); n = 3 camundongos por grupo, três seções/camundongo. Barra de escala, 100  $\mu$ m. As inserções mostram glia isolada imunorreativa à GFAP.

[0091] As Figuras 16C e 16D mostram medidas de análise de imagem de limiar da fração da área total positiva para a imunorreatividade à GFAP nas camadas cortical (C) e estriada (D). Os dados representam média  $\pm$  SEM, três camundongos/grupo e três seções/camundongo. Para cada seção, as análises foram realizadas em três campos aleatórios (100  $\mu$ m x 100  $\mu$ m) nas camadas corticais indicadas e 12 campos aleatórios (100  $\mu$ m x 100  $\mu$ m) nas estriadas. \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,0001, teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

#### **Descrição Detalhada**

[0092] São fornecidos no presente documento métodos e usos para administrar a um mamífero, necessitando de um método descrito no presente documento, que se beneficiaria do aumento da atividade ou expressão de SGSH, por exemplo, em um sujeito que exibe uma perda ou expressão ou função endógena reduzida de SGSH. Assim, em uma modalidade, a atividade ou expressão de SGSH é reduzida em comparação com a SGSH normal ou a SGSH está ausente em um mamífero. Em uma modalidade específica, um mamífero que precisa de SGSH tem ou está em risco de ter MPS IIIA.

[0093] Em certas modalidades, são fornecidos no presente documento métodos de tratamento de uma doença em mamíferos causada por uma deficiência ou defeito na atividade ou expressão de SGSH, administrando diretamente a um tecido ou fluido do sistema nervoso central, um vetor, como partículas de rAAV que direcionam a expressão de proteína com atividade de SGSH (dita no presente documento como partículas de rAAV-SGSH), opcionalmente a variante de SGSH exibindo secreção maior que a do tipo selvagem por células transduzidas por vetor e/ou maior que a absorção de SGSH do tipo selvagem por células não transduzidas. São aqui divulgados os dados que mostram a administração/entrega de rAAV-SGSH no cérebro e/ou medula espinhal em um modelo animal que é eficaz para fornecer expressão de SGSH, secreção de SGSH de células transduzidas e ampla distribuição de SGSH em várias regiões do cérebro/SNC e absorção pelas células.

[0094] Em modalidades adicionais, um método ou uso descrito no presente documento é usado para tratar, prevenir, inibir, reduzir, diminuir ou atrasar o número, gravidade, frequência, progressão ou início de um ou mais sintomas de deficiência de SGSH.

[0095] Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas ao cérebro. Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas ao fluido espinhal cerebral (LCR) do dito mamífero.

[0096] Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas ao sistema ventricular. Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas no ventrículo cerebral.

[0097] Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas ao parênquima cerebral, espaço subaracnóideo e/ou intratecal. Em certas modalidades, partículas de rAAV-SGSH são administradas à cisterna magna, espaço intraventricular, espaço subaracnóideo, espaço intratecal e/ou epêndima do dito mamífero.

[0098] Em ainda outras modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas no ventrículo lateral rostral; e/ou administrado ao ventrículo lateral caudal; e/ou administrado no ventrículo lateral direito; e/ou administrado no ventrículo lateral esquerdo; e/ou administrado no ventrículo lateral rostral direito; e/ou administrado no ventrículo lateral rostral esquerdo; e/ou administrado no ventrículo lateral caudal direito; e/ou administrado no ventrículo lateral caudal esquerdo.

[0099] Ainda em modalidades adicionais, as partículas de rAAV-SGSH são administradas de modo que as partículas de AAV entrem em contato e transduzam células do SNC, como células ependimárias do dito mamífero. Tais células do SNC transduzidas (por exemplo, células ependimárias) expressam a SGSH codificada e a SGSH é secretada pelas células. Em modalidades particulares, a SGSH é expressa e/ou no LCR, cérebro (por exemplo, estriado, tálamo, medula, cerebelo, córtex occipital, córtex frontal e/ou córtex pré-frontal, medula espinhal) e/ou SNC. Em modalidades particulares, a SGSH é secretada no LCR, cérebro (por exemplo, estriado, tálamo, medula, cerebelo, córtex occipital, córtex frontal e/ou córtex pré-frontal, medula espinhal) e/ou SNC. Em modalidades particulares, a SGSH é secretada no LCR, cérebro (por exemplo, estriado, tálamo, medula, cerebelo, córtex occipital, córtex frontal e/ou córtex pré-frontal, medula espinhal) e/ou SNC, e é absorvida por células de SNC não transduzidas.

[0100] Qualquer mamífero adequado pode ser tratado

por um método ou uso descrito no presente documento. Tipicamente, um mamífero precisa de um método descrito no presente documento, que é suspeito de ter ou que tem uma deficiência ou defeito na atividade ou expressão de SGSH.

[0101] Exemplos não limitativos de mamíferos incluem seres humanos, primatas não humanos (por exemplo, macacos, gibões, chimpanzés, orangotangos, macacos, macacos do gênero *Macaca* e similares), animais domésticos (por exemplo, cães e gatos), animais de fazenda (por exemplo, cavalos, vacas, cabras, ovelhas, porcos) e animais experimentais (por exemplo, camundongo, rato, coelho, cobaia). Em certas modalidades, um mamífero é um humano. Em certas modalidades, um mamífero é um mamífero não roedor (por exemplo, humano, porco, cabra, ovelha, cavalo, cachorro ou semelhante). Em certas modalidades, um mamífero não roedor é um humano. Um mamífero pode ter qualquer idade ou estágio de desenvolvimento (por exemplo, adulto, adolescente, criança, bebê ou mamífero no útero). Um mamífero pode ser macho ou fêmea. Em certas modalidades, um mamífero pode ser um modelo de doença animal, por exemplo, modelos animais utilizados para o estudo de uma deficiência ou defeito na expressão ou função de SGSH.

[0102] Os mamíferos (indivíduos) tratados por um método ou composição descrito no presente documento incluem adultos (18 anos ou mais) e crianças (menos de 18 anos). As crianças variam de 1 a 2 anos de idade ou de 2 a 4, 4 a 6, 6 a 18, 8 a 10, 10 a 12, 12 a 15 e 15 a 18 anos. As crianças também incluem bebês. Os bebês geralmente variam de 1 a 12 meses de idade.

[0103] Em certas modalidades, um mamífero é homozigoto (*Sgsh*<sup>/-</sup>) em relação à expressão ou função perdida ou reduzida de SGSH. Em certas modalidades, um mamífero é heterozigoto (*Sgsh*<sup>+/-</sup>) em relação à expressão ou função perdida ou reduzida de SGSH.

[0104] O vírus adenoassociado (AAV) é um pequeno

vírus não patogênico da família parvoviridae. Até o momento, vários AAVs sorologicamente distintos foram identificados e mais de uma dúzia foram isolados de humanos ou primatas. O AAV é distinto de outros membros dessa família por depender de um vírus auxiliar para replicação.

[0105] Foi demonstrado que os genomas de AAV se integram de maneira estável aos genomas celulares do hospedeiro; possuem uma ampla gama de hospedeiros; transduzem células em divisão e em não divisão *in vitro* e *in vivo* e mantêm altos níveis de expressão dos genes transduzidos. As partículas virais do AAV são estáveis ao calor, resistentes a solventes, detergentes, alterações no pH, temperatura e podem ser purificadas em coluna e/ou concentradas em gradientes de CsCl ou por outros meios. O genoma do AAV compreende um ácido desoxirribonucleico de fita simples (ssDNA), com sentido positivo ou negativo. Na ausência de um vírus auxiliar, o AAV pode integrar-se de maneira específica do locus, por exemplo, no braço q do cromossomo 19. O genoma de aproximadamente 5 kb do AAV consiste em um segmento de DNA de fita simples de polaridade mais ou menos. As extremidades do genoma são repetições terminais invertidas curtas (ITRs) que podem se dobrar em estruturas em grampo de cabelo e servir como a origem da replicação viral do DNA.

[0106] Um "genoma" de AAV refere-se a uma sequência de ácidos nucleicos recombinante que é finalmente empacotada ou encapsulada para formar uma partícula de AAV. Uma partícula de AAV geralmente compreende um genoma de AAV empacotado com proteínas do capsídeo. Nos casos em que plasmídeos recombinantes são utilizados para construir ou fabricar vetores recombinantes, o genoma do vetor não inclui a porção do "plasmídeo" que não corresponde à sequência do genoma do vetor do plasmídeo recombinante. Essa porção do genoma não vetorial do plasmídeo recombinante é chamada de "esqueleto plasmídico", importante para a clonagem e amplificação do plasmídeo, um processo necessário para a propagação e a produção de vírus recombinantes, mas não é ele próprio

empacotado ou encapsulado nas partículas de vírus (por exemplo, AAV). Assim, um vetor "genoma" refere-se ao ácido nucleico que é empacotado ou encapsulado por proteínas de vírus e, no caso de AAV, um capsídeo ou proteínas de capsídeo.

[0107] O virião do AAV (partícula) é uma partícula icosaédrica não envelopada com aproximadamente 25 nm de diâmetro. A partícula de AAV compreende uma simetria icosaédrica composta por três proteínas do capsídeo relacionadas, VP1, VP2 e VP3, que interagem para formar o capsídeo. O ORF correto frequentemente codifica as proteínas do capsídeo VP1, VP2 e VP3. Essas proteínas são frequentemente encontradas na razão de 1:1:10, respectivamente, mas podem estar em razões variadas e são todas derivadas do ORF do lado direito. As proteínas do capsídeo VP1, VP2 e VP3 diferem entre si pelo uso de splicing alternativo e um códon inicial incomum. A análise de exclusão mostrou que a remoção ou alteração de VP1, que é traduzida de uma mensagem emendada alternativamente, resulta em um rendimento reduzido de partículas infecciosas. Mutações na região de codificação de VP3 resultam na falha na produção de qualquer DNA de progênie de fita simples ou partículas infecciosas.

[0108] Uma partícula de AAV é uma partícula viral que compreende um capsídeo de AAV. Em certas modalidades, o genoma de uma partícula de AAV codifica um, dois ou todos os polipeptídeos VP1, VP2 e VP3.

[0109] O genoma da maioria dos AAVs nativos geralmente contém dois quadros de leitura abertos (ORFs), às vezes chamados de ORF esquerdo e ORF direito. O ORF esquerdo codifica frequentemente as proteínas Rep não estruturais, Rep 40, Rep 52, Rep 68 e Rep 78, que estão envolvidas na regulação da replicação e transcrição, além da produção de genomas de progênie de fita simples. Duas das proteínas Rep foram associadas à integração preferencial dos genomas de AAV em uma região do braço q do cromossomo humano 19. Demonstrou-se que Rep68/78 possui atividade de ligação a NTP, bem como atividades de helicase de DNA e

RNA. Algumas proteínas Rep possuem um sinal de localização nuclear, bem como vários locais de fosforilação potenciais. Em certas modalidades, o genoma de um AAV (por exemplo, um rAAV) codifica algumas ou todas as proteínas Rep. Em certas modalidades, o genoma de um AAV (por exemplo, um rAAV) não codifica as proteínas Rep. Em certas modalidades, uma ou mais das proteínas Rep podem ser entregues em trans e, portanto, não são incluídas em uma partícula de AAV compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo.

[0110] As extremidades do genoma do AAV compreendem pequenas repetições terminais invertidas (ITR) que têm o potencial de se dobrar em estruturas em grampo de cabelo em forma de T que servem como a origem da replicação viral do DNA. Por conseguinte, o genoma de um AAV compreende uma ou mais (por exemplo, um par de) sequências de ITR que flanqueiam um genoma de DNA viral de cadeia simples. As sequências de ITR geralmente têm um comprimento de cerca de 145 bases cada. Dentro da região ITR, foram descritos dois elementos que são considerados centrais para a função da ITR, um motivo de repetição do GAGC e o local de resolução do terminal (trs). Foi mostrado que o motivo de repetição vincula Rep quando o ITR está em uma conformação linear ou em grampo de cabelo. Pensa-se que esta ligação posicione Rep68/78 para clivagem nos trs, ocorrendo de maneira específica do local e da fita. Além de seu papel na replicação, esses dois elementos parecem ser centrais para a integração viral. Contido no locus de integração do cromossomo 19, há um local de ligação ao Rep com um trs adjacente. Esses elementos demonstraram ser funcionais e necessários para a integração específica do locus.

[0111] Em certas modalidades, um AAV (por exemplo, um rAAV) compreende duas ITRs. Em certas modalidades, um AAV (por exemplo, um rAAV) compreende um par de ITRs. Em certas modalidades, um AAV (por exemplo, um rAAV) compreende um par de ITRs que flanqueiam (isto é, estão em cada extremidade 5 e 3) de um polinucleotídeo que pelo menos

codifica um polipeptídeo com função ou atividade de SGSH.

[0112] O termo "vetor" refere-se à molécula de ácido nucleico transportadora pequena, um plasmídeo, vírus (por exemplo, vetor AAV) ou outro veículo que pode ser manipulado por inserção ou incorporação de um ácido nucleico. Os vetores como vetores AAV podem ser usados para introduzir/transferir polinucleotídeos para as células, de modo que o polinucleotídeo nele seja transcrito e subsequentemente traduzido pelas células.

[0113] Um "vetor de expressão" é um vetor especializado que contém uma sequência de genes ou ácidos nucleicos com as regiões reguladoras necessárias para a expressão em uma célula hospedeira. Uma sequência de ácidos nucleicos de vetor geralmente contém pelo menos uma origem de replicação para propagação em uma célula e, opcionalmente, elementos adicionais, como uma sequência polinucleotídica heteróloga, elemento de controle de expressão (por exemplo, um promotor, intensificador), íntron, ITR(s), poliadenilação sinal.

[0114] Um vetor viral é derivado de ou com base em um ou mais elementos de ácido nucleico que compreendem um genoma viral. Os vetores virais particulares incluem vetores de vírus adenoassociado (AAV).

[0115] Como divulgado no presente documento, são fornecidos vetores (por exemplo, AAV) compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma variante de SGSH que exibe maior secreção que a SGSH de tipo selvagem quando expressa por células transduzidas por vetor. Como divulgado no presente documento, também são fornecidos vetores (por exemplo, AAV) compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma variante de SGSH que exibe maior absorção do que a SGSH de tipo selvagem (por exemplo, SEQ ID NO:1) por células não transduzidas. Também são fornecidos no presente documento vetores (por exemplo, AAV) compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma variante de SGSH que exibe maior secreção do que a SGSH de tipo selvagem (por

exemplo, SEQ ID NO:1) quando expressa por células transduzidas por vetores e que exibe maior absorção do que a SGSH de tipo selvagem (por exemplo, SEQ ID NO:1) por células não transduzidas.

[0116] O termo "recombinante", como um modificador de vetor, como vetores virais recombinantes, por exemplo, vetores de lenti ou parvo-vírus (por exemplo, AAV), bem como um modificador de sequências, como polinucleotídeos e polipeptídeos recombinantes, significa que as composições foram manipuladas (ou seja, projetadas) de uma maneira que geralmente não ocorre na natureza. Um exemplo particular de um vetor recombinante, como um vetor AAV, seria o local em que um polinucleotídeo que não está normalmente presente no genoma viral do tipo selvagem (por exemplo, AAV) é inserido no genoma viral. Um exemplo de um polinucleotídeo recombinante seria onde um ácido nucleico (por exemplo, gene) que codifica um polipeptídeo de SGSH é clonado em um vetor, com ou sem regiões 5', 3' e/ou íntron que o gene normalmente está associado ao vírus (por exemplo, AAV). Embora o termo "recombinante" nem sempre seja usado no presente documento em referência a vetores, como vetores virais e AAV, bem como sequências como polinucleotídeos, as formas "recombinantes" incluindo polinucleotídeos, ácidos nucleicos, transgenes. etc. são expressamente incluídas, apesar de qualquer omissão.

[0117] Um "vetor" viral recombinante ou "vetor AAV recombinante" é derivado do genoma do tipo selvagem de um vírus, como o AAV, usando métodos moleculares para remover o genoma do tipo selvagem do vírus (por exemplo, AAV) e substituindo-o por um não ácido nucleico negativo, tal como uma sequência de ácidos nucleicos que codifica SGSH. Tipicamente, para o AAV, uma ou ambas as sequências de repetição terminal invertida (ITR) do genoma do AAV são retidas no vetor de rAAV. Um vetor viral "recombinante" (por exemplo, rAAV) é diferenciado de um genoma viral (por exemplo, AAV), uma vez que todo ou parte do genoma viral foi substituído por uma sequência não nativa em relação ao viral (por exemplo, AAV) ácido

nucleico genômico, como a sequência de ácidos nucleicos que codifica SGSH. A incorporação de uma sequência não nativa define, portanto, o vetor viral (por exemplo, AAV) como um vetor "recombinante", que no caso do AAV pode ser chamado de "vetor de rAAV".

[0118] Um vetor AAV (por exemplo, vetor de rAAV) pode ser empacotado e é no presente documento referido como uma "partícula AAV" para infecção subsequente (transdução) de uma célula, *ex vivo*, *in vitro* ou *in vivo*. Quando um vetor AAV recombinante é encapsulado ou empacotado em uma partícula de AAV, a partícula também pode ser dita como "partícula de rAAV". Em certas modalidades, uma partícula de AAV é uma partícula de rAAV. Uma partícula de rAAV geralmente compreende um vetor de rAAV, ou uma porção dele. Uma partícula de rAAV pode ser uma ou mais partículas de rAAV (por exemplo, uma pluralidade de partículas de AAV). As partículas de rAAV tipicamente compreendem proteínas que encapsulam ou empacotam o genoma do vetor de rAAV (por exemplo, proteínas do capsídeo). Nota-se que a referência a um vetor de rAAV também pode ser usada para fazer referência a uma partícula de rAAV.

[0119] Qualquer partícula de AAV adequada (por exemplo, partícula de rAAV) pode ser usada para um método ou uso no presente documento. Uma partícula de rAAV e/ou genoma nela incluído, pode ser derivada de qualquer sorotipo ou cepa de AAV adequada. Uma partícula de rAAV e/ou genoma nela incluído, pode ser derivada de dois ou mais sorotipos ou cepas de AAV. Por conseguinte, um rAAV pode compreender proteínas e/ou ácidos nucleicos, ou porções dos mesmos, de qualquer sorotipo ou cepa de AAV, em que a partícula de AAV é adequada para infecção e/ou transdução de uma célula de mamífero. Exemplos não limitativos de sorotipos de AAV incluem AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-rh74, AAV-rh10 ou AAV-2i8.

[0120] Em certas modalidades, uma pluralidade de partículas de rAAV compreende partículas de, ou derivadas da mesma cepa ou

sorotipo (ou subgrupo ou variante). Em certas modalidades, uma pluralidade de partículas de rAAV compreende uma mistura de duas ou mais partículas diferentes de rAAV (por exemplo, de diferentes sorotipos e/ou cepas).

[0121] Como usado no presente documento, o termo "sorotipo" é uma distinção usada para se referir a um AAV que possui um capsídeo que é sorologicamente distinto de outros sorotipos de AAV. A distinção sorológica é determinada com base na falta de reatividade cruzada entre anticorpos para um AAV em comparação com outro AAV. Tais diferenças de reatividade cruzada são geralmente devidas a diferenças nas sequências de proteínas do capsídeo/determinantes antigênicos (por exemplo, devido a diferenças de sequência de VP1, VP2 e/ou VP3 nos sorotipos de AAV). Apesar da possibilidade de que as variantes do AAV, incluindo as variantes do capsídeo, não sejam sorologicamente distintas de um AAV de referência ou outro sorotipo AAV, elas diferem em pelo menos um resíduo de nucleotídeo ou aminoácido em comparação com o sorotipo de referência ou outro AAV.

[0122] Em certas modalidades, uma partícula de rAAV exclui certos sorotipos. Em uma modalidade, uma partícula de rAAV não é uma partícula de AAV4. Em certas modalidades, uma partícula de rAAV é antigenicamente ou imunologicamente distinta do AAV4. A distinção pode ser determinada por métodos padrão. Por exemplo, ELISA e Western blots podem ser usados para determinar se uma partícula viral é antigenicamente ou imunologicamente distinta do AAV4. Além disso, em certas modalidades, uma partícula de rAAV2 retém o tropismo tecidual distinto do AAV4.

[0123] Em certas modalidades, um vetor de rAAV baseado em um primeiro genoma de sorotipo corresponde ao sorotipo de uma ou mais das proteínas do capsídeo que empacotam o vetor. Por exemplo, o sorotipo de um ou mais ácidos nucleicos de AAV (por exemplo, ITRs) que compreende o genoma do vetor AAV corresponde ao sorotipo de um capsídeo que compreende a partícula de rAAV.

[0124] Em certas modalidades, um genoma do vetor de

rAAV pode ser baseado em um genoma do sorotipo AAV (por exemplo, AAV2) distinto do sorotipo de uma ou mais proteínas da capsídeo do AAV que empacotam o vetor. Por exemplo, um genoma de vetor de rAAV pode compreender ácidos nucleicos derivados de AAV2 (por exemplo, ITRs), enquanto que pelo menos uma ou mais das três proteínas do capsídeo são derivadas de um sorotipo diferente, por exemplo, um sorotipo de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 ou AAV-2i8 ou variante do mesmo.

[0125] Em certas modalidades, uma partícula de rAAV ou um genoma de vetor relacionado a um sorotipo de referência tem um polinucleotídeo, polipeptídeo ou subsequência do mesmo que compreende ou consiste em uma sequência de pelo menos 60% ou mais (por exemplo, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc.) de identidade em relação a um polinucleotídeo, polipeptídeo ou subsequência de uma partícula de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 ou AAV-2i8. Em modalidades particulares, uma partícula de rAAV ou um genoma de vetor relacionado a um sorotipo de referência tem uma capsídeo ou sequência ITR que compreende ou consiste em uma sequência de pelo menos 60% ou mais (por exemplo, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc.) de identidade em relação a um capsídeo ou sequência de ITR de um sorotipo de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 ou AAV-2i8.

[0126] Em certas modalidades, um método no presente documento compreende uso, administração ou entrega de uma partícula de rAAV9. Em certas modalidades, um método no presente documento compreende uso, administração ou entrega de uma partícula de rAAV2.

[0127] Em certas modalidades, uma partícula de rAAV9 compreende um capsídeo AAV9. Em certas modalidades, uma partícula de

rAAV9 compreende uma ou mais proteínas do capsídeo (por exemplo, VP1, VP2 e/ou VP3) que são pelo menos 60%, 65%, 70%, 75% ou mais idênticas, por exemplo, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc., até 100% idênticas a uma proteína capsídica correspondente de uma partícula AAV9 nativa ou do tipo selvagem. Em certas modalidades, uma partícula de rAAV9 compreende proteínas da capsídeo VP1, VP2 e VP3 que são pelo menos 75% ou mais idênticas, por exemplo, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5% etc., até 100% idênticas a uma proteína do capsídeo correspondente de uma partícula AAV9 nativa ou do tipo selvagem. Em certas modalidades, uma partícula de rAAV9 é uma variante de uma partícula AAV9 nativa ou do tipo selvagem. Em alguns aspectos, uma ou mais proteínas do capsídeo de uma variante do AAV9 têm 1, 2, 3, 4, 5, 5-10, 10-15, 15-20 ou mais substituições de aminoácidos em comparação com as proteínas do capsídeo de uma partícula AAV9 nativa ou de tipo selvagem.

[0128] Em certas modalidades, uma partícula de rAAV2 compreende um capsídeo AAV2. Em certas modalidades, uma partícula de rAAV2 compreende uma ou mais proteínas do capsídeo (por exemplo, VP1, VP2 e/ou VP3) que são pelo menos 60%, 65%, 70%, 75% ou mais idênticas, por exemplo, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc., até 100% idênticas a uma proteína capsídica correspondente de uma partícula AAV2 nativa ou do tipo selvagem. Em certas modalidades, uma partícula de rAAV2 compreende proteínas da capsídeo VP1, VP2 e VP3 que são pelo menos 75% ou mais idênticas, por exemplo, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc., até 100% idênticas a uma proteína do capsídeo correspondente de uma partícula AAV2 nativa ou do tipo selvagem. Em certas modalidades, uma partícula de rAAV2 é uma variante de uma partícula AAV2

nativa ou do tipo selvagem. Em alguns aspectos, uma ou mais proteínas do capsídeo de uma variante do AAV2 têm 1, 2, 3, 4, 5, 5-10, 10-15, 15-20 ou mais substituições de aminoácidos em comparação com as proteínas do capsídeo de uma partícula AAV2 nativa ou de tipo selvagem.

[0129] Em certas modalidades, uma partícula de rAAV comprehende uma ou duas ITRs (por exemplo, um par de ITRs) que são pelo menos 75% ou mais idênticas, por exemplo, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc., até 100% idênticas às ITRs correspondentes de um AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-rh74, AAV-rh10 ou AAV-2i8 nativo ou do tipo selvagem, desde que retenham uma ou mais funções de ITR desejadas (por exemplo, capacidade de formar um grampo de cabelo, o que permite a replicação do DNA; integração do DNA do AAV no genoma da célula hospedeira; e/ou empacotamento, se desejado).

[0130] Em certas modalidades, uma partícula de rAAV9 comprehende uma ou duas ITRs (por exemplo, um par de ITRs) que são pelo menos 75% ou mais idênticas, por exemplo, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc., até 100% idênticas às ITRs correspondentes de uma partícula AAV2 nativa ou do tipo selvagem, desde que mantenham uma ou mais funções de ITR desejadas (por exemplo, capacidade de formar um grampo de cabelo, o que permite a replicação do DNA; integração do DNA AAV no genoma da célula hospedeira; e/ou embalagem, se desejado).

[0131] Em certas modalidades, uma partícula de rAAV2 comprehende uma ou duas ITRs (por exemplo, um par de ITRs) que são pelo menos 75% ou mais idênticas, por exemplo, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc., até 100% idênticas às ITRs correspondentes de uma partícula AAV2 nativa ou do tipo selvagem, desde que mantenham uma

ou mais funções de ITR desejadas (por exemplo, capacidade de formar um grampo de cabelo, o que permite a replicação do DNA; integração do DNA AAV no genoma da célula hospedeira; e/ou embalagem, se desejado).

[0132] Uma partícula de rAAV pode compreender uma ITR com qualquer número adequado de repetições "GAGC". Em certas modalidades, uma ITR de uma partícula AAV2 compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ou mais repetições de "GAGC". Em certas modalidades, uma partícula de rAAV2 compreende uma ITR compreendendo três repetições "GAGC". Em certas modalidades, uma partícula de rAAV2 compreende uma ITR que possui menos de quatro repetições "GAGC". Em certas modalidades, uma partícula de rAAV2 compreende uma ITR que possui mais de quatro repetições "GAGC". Em certas modalidades, uma ITR de uma partícula de rAAV2 compreende um local de ligação Rep em que o quarto nucleotídeo nas duas primeiras repetições "GAGC" é um C em vez de um T.

[0133] Um comprimento adequado de exemplo de DNA pode ser incorporado em vetores de rAAV para empacotamento/encapsidação em uma partícula de rAAV pode cerca de 5 quilobases (kb) ou menos. Em modalidades particulares, o comprimento do DNA é menor que cerca de 5 kb, menor que cerca de 4,5 kb, menor que cerca de 4 kb, menor que cerca de 3,5 kb, menor que cerca de 3 kb ou menor que cerca de 2,5 kb.

[0134] Os vetores AAV recombinantes que incluem um polinucleotídeo que direciona a expressão de um polipeptídeo podem ser gerados usando técnicas recombinantes adequadas conhecidas na técnica (por exemplo, ver Sambrook et al., 1989). Os vetores AAV recombinantes são tipicamente empacotados em partículas de AAV competentes para transdução e propagados usando um sistema de empacotamento viral de AAV. Uma partícula de AAV competente para transdução é capaz de se ligar e entrar em uma célula de mamífero e subsequentemente entregar uma carga de ácido nucleico (por exemplo, um gene heterólogo) ao núcleo da célula. Assim, uma partícula intacta de rAAV que é competente para a transdução é configurada

para transduzir uma célula de mamífero. Uma partícula de rAAV configurada para transduzir uma célula de mamífero geralmente não é competente para replicação e requer maquinaria de proteína adicional para se autorreplicar. Assim, uma partícula de rAAV que está configurada para transduzir uma célula de mamífero é projetada para se ligar e entrar em uma célula de mamífero e entregar um ácido nucleico à célula, em que o ácido nucleico para entrega é frequentemente posicionado entre um par de ITRs de AAV no genoma de rAAV.

[0135] As células hospedeiras adequadas para a produção de partículas de AAV competentes para transdução incluem, mas não estão limitadas a, micro-organismos, células de levedura, células de inseto e células de mamífero que podem ser, ou foram, utilizadas como receptores de vetores rAAV heterólogos. Podem ser utilizadas células da linha celular humana estável, HEK293 (prontamente disponível através, por exemplo, da American Type Culture Collection sob o Número de Acesso ATCC CRL1573). Em certas modalidades, uma linha celular de rim embrionário humano modificado (por exemplo, HEK293), que é transformada com fragmentos de DNA do adenovírus tipo 5 e expressa os genes adenovirais E1a e E1b é usada para gerar partículas de AAV recombinantes. A linha celular HEK293 modificada é prontamente transfetada e fornece uma plataforma particularmente conveniente para produzir partículas de rAAV. Os métodos para gerar partículas de AAV de alto título capazes de transduzir células de mamíferos são conhecidos na técnica. Por exemplo, as partículas do AAV podem ser produzidas conforme estabelecido em Wright, 2008 e Wright, 2009.

[0136] Em certas modalidades, as funções auxiliares de AAV são introduzidas na célula hospedeira por transfecção da célula hospedeira com uma construção auxiliar de AAV, antes ou simultaneamente à transfecção de um vetor de expressão de AAV. Assim, às vezes, as construções auxiliares de AAV são usadas para fornecer pelo menos expressão transitória dos genes rep e/ou cap de AAV para complementar as

funções ausentes de AAV necessárias para a transdução produtiva de AAV. As construções auxiliares do AAV geralmente não possuem ITRs do AAV e não podem se replicar nem empacotar. Essas construções podem estar na forma de plasmídeo, fago, transposição, cosmídeo, vírus ou virião. Foram descritas várias construções auxiliares de AAV, como os plasmídeos comumente usados pAAV/Ad e pIM29 + 45 que codificam produtos de expressão Rep e Cap. São conhecidos vários outros vetores que codificam produtos de expressão Rep e/ou Cap.

[0137] Um "transgene" é usado no presente documento para se referir convenientemente a um ácido nucleico/polinucleotídeo que se destina ou foi introduzido em uma célula ou organismo. Os transgenes incluem qualquer ácido nucleico, como um gene que codifica um polipeptídeo ou proteína (por exemplo, SGSH), e geralmente são heterólogos em relação às sequências genômicas de AAV que ocorrem naturalmente.

[0138] O termo "transduzir" refere-se à introdução de um ácido nucleico em uma célula ou organismo hospedeiro por meio de um vetor (por exemplo, uma partícula de AAV). A introdução de um transgene SGSH em uma célula por uma partícula de rAAV pode, portanto, ser denominada "transdução" da célula. O transgene pode ou não ser integrado no ácido nucleico genômico de uma célula transduzida. Se um transgene introduzido se integrar ao ácido nucleico (DNA genômico) da célula ou organismo receptor, ele pode ser mantido de forma estável nessa célula ou organismo e posteriormente transmitido ou herdado pelas células ou organismos da progênie da célula ou organismo receptor. Finalmente, o transgene introduzido pode existir na célula receptora ou no organismo hospedeiro de maneira cromossômica extra ou apenas transitória. Uma "célula transduzida" é, portanto, uma célula na qual o transgene foi introduzido por meio de transdução. Assim, uma célula "transduzida" é uma célula na qual, ou uma descendência dela, na qual um transgene foi introduzido. Uma célula transduzida pode ser propagada, transgene transcrita e a proteína codificada

expressa. Para usos e métodos de terapia gênica, uma célula transduzida pode estar em um mamífero.

[0139] Células não transduzidas referem-se àquelas em que um vetor AAV não foi introduzido. A secreção de SGSH por células transduzidas pode ser absorvida por células não transduzidas, proporcionando um benefício para essas células. Assim, a secreção de SGSH pelas células transduzidas e a subsequente distribuição (distribuição) a outras regiões do SNC via líquido cefalorraquidiano ou vasculatura podem fornecer SGSH que, por sua vez, é absorvido pelas células não transduzidas.

[0140] Como no presente documento utilizado, o termo proteína ou polipeptídeo sulfamidase (SGSH) inclui variantes, tais como SGSH com uma ou mais substituições, deleções e/ou adições/inserções de aminoácidos. Em modalidades particulares, uma variante de SGSH é a SEQ ID NO:1 com uma ou mais substituições, deleções e/ou adições/inserções. Em outras modalidades particulares, uma variante de SGSH é a SEQ ID NO:1 com 1 a 5 substituições de aminoácidos. Em modalidades mais particulares, uma variante de SGSH é a SEQ ID NO:1 com uma substituição de aminoácido na posição 264, tal como uma substituição de asparagina (N) por glutamina (Q).

[0141] O polipeptídeo SGSH com atividade de SGSH refere-se a uma proteína SGSH ou sua variante que exibe pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou cerca de 100% ou mais da atividade ou função da SGSH de tipo selvagem humano da SEQ ID NO:1, utilizando um ensaio adequado. Em certas modalidades, uma variante de SGSH refere-se a uma proteína SGSH que exibe pelo menos uma secreção de 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou cerca de 100% maior de células transduzidas do que a secreção da SGSH humana da SEQ ID NO:1. Em certas modalidades, uma variante de SGSH refere-se a uma proteína SGSH que exibe uma absorção de

pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou 100% maior por células do que a absorção da SGSH humana da SEQ ID NO:1.

[0142] Uma SGSH pode compreender uma forma variante de um polipeptídeo SGSH que retém pelo menos atividade parcial ou total ou ainda maior da SGSH. A SGSH e suas variantes podem ser obtidas de qualquer organismo adequado (por exemplo, de um mamífero, de um humano, de um mamífero não humano, por exemplo, de um cão, porco, vaca ou semelhante). Em certas modalidades, uma variante de SGSH tem pelo menos 60% de identidade, pelo menos 70% de identidade, pelo menos 75% de identidade, pelo menos 80% de identidade, pelo menos 85% de identidade, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos 96% de identidade, pelo menos 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade ou 99% de identidade em relação à proteína SGSH estabelecida na SEQ ID NO:1.

[0143] Em certas modalidades, uma partícula de rAAV compreende uma proteína da capsídeo de AAV e um transgene/ácido nucleico que codifica SGSH. Em certas modalidades, uma partícula de rAAV compreende uma proteína da capsídeo de AAV e um ácido nucleico que direciona a expressão e/ou secreção de um polipeptídeo SGSH. Uma sequência de aminoácidos de SGSH humana representativa é representada na SEQ ID NO:1.

[0144] Em certas modalidades, uma partícula de rAAV compreende uma proteína da capsídeo de AAV e um transgene/ácido nucleico que codifica um polipeptídeo SGSH. Em certas modalidades, uma partícula de rAAV compreende uma proteína da capsídeo de AAV e um transgene/ácido nucleico que direciona a expressão e/ou secreção de um polipeptídeo SGSH. Em certas modalidades, um ácido nucleico sendo administrado codifica SGSH. Em certas modalidades, um polipeptídeo SGSH tem pelo menos 60% de

identidade, pelo menos 70% de identidade, pelo menos 75% de identidade, pelo menos 80% de identidade, pelo menos 85% de identidade, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos pelo menos 96% de identidade, pelo menos 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade ou pelo menos 99% de identidade em relação à proteína estabelecida na SEQ ID NO:1.

[0145] Em certas modalidades, um método ou uso inclui a administração ou entrega de partículas de rAAV-SGSH a um mamífero e, opcionalmente, a administração de um ou mais agentes imunossupressores ao mamífero. Em certas modalidades, um método ou uso inclui a administração ou entrega de partículas de rAAV-SGSH a um mamífero e, opcionalmente, a administração de 2, 3, 4 ou mais agentes imunossupressores ao mamífero.

[0146] Em certas modalidades, um agente imunossupressor é um agente anti-inflamatório. Em certas modalidades, um agente imunossupressor é micofenolato, ou um derivado do mesmo. Um exemplo de um derivado de micofenolato é o micofenolato mofetil (MMF). Em certas modalidades, um agente imunossupressor é a ciclosporina ou um derivado da mesma.

[0147] Em certas modalidades, um agente imunossupressor é administrado antes, durante e/ou após a administração de partículas de rAAV-SGSH a um mamífero. Em certas modalidades, um agente imunossupressor é administrado simultaneamente com a administração de partículas de rAAV-SGSH a um mamífero. Em certas modalidades, um agente imunossupressor é administrado após a administração de partículas de rAAV-SGSH a um mamífero.

[0148] Uma partícula de rAAV e/ou agente imunossupressor pode ser formulada em qualquer formulação adequada para uma via de administração específica. Várias formulações farmaceuticamente aceitáveis estão disponíveis comercialmente e podem ser obtidas por um médico.

[0149] Uma partícula de rAAV pode ser administrada por qualquer via adequada. Em certas modalidades, um método ou uso inclui a administração de partículas de rAAV-SGSH no sistema nervoso central (SNC) de um mamífero. Em certas modalidades, o sistema nervoso central inclui cérebro, medula espinhal e líquido espinhal cerebral (LCR). Em certas modalidades, um método ou uso inclui a administração de partículas de rAAV-SGSH no cérebro ou medula espinhal ou LCR de um mamífero. Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas a uma porção do cérebro ou medula espinhal.

[0150] Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas ao parênquima cerebral, espaço subaracnóideo e/ou espaço intratecal. Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas a uma ou mais da cisterna magna, espaço intraventricular, ventrículo cerebral, espaço subaracnóide e/ou epêndima do dito mamífero.

[0151] Em outras modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas ao sistema ventricular. Em ainda outras modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas a um ou mais ventrículos laterais rostrais; e/ou ventrículo lateral caudal; e/ou ventrículo lateral direito; e/ou ventrículo lateral esquerdo; e/ou ventrículo lateral rostral direito; e/ou ventrículo lateral rostral esquerdo; e/ou ventrículo lateral caudal direito; e/ou ventrículo lateral caudal esquerdo.

[0152] Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas a uma ou mais células que entram em contato com o LCR em um mamífero, por exemplo, entrando em contato com células com partículas de rAAV-SGSH. Exemplos não limitativos de células que entram em contato com o LCR incluem células ependimárias, células piais, células endoteliais e/ou células meníngeas. Em certas modalidades, partículas de rAAV-SGSH são administradas a células ependimárias. Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são entregues às células ependimárias, por exemplo, entrando em contato com células ependimárias

com partículas de rAAV-SGSH.

[0153] Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas/entregues localmente. "Entrega local" refere-se à entrega diretamente em um local de destino dentro de um mamífero (por exemplo, diretamente em um tecido ou fluido). Por exemplo, as partículas de rAAV-SGSH podem ser entregues localmente por injeção direta em um órgão, tecido ou local anatômico especificado. Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são entregues ou administradas por injeção direta no cérebro, medula espinhal ou um tecido ou fluido do mesmo (por exemplo, LCR, como células ependimárias, células piais, células endoteliais e/ou células meníngeas). Por exemplo, partículas de rAAV-SGSH podem ser entregues diretamente, por injeção direta, no LCR, cisterna magna, espaço intraventricular, ventrículo cerebral, espaço subaracnóideo e/ou espaço intratecal; e/ou ependimária; e/ou ventrículo lateral rostral; e/ou ventrículo lateral caudal; e/ou ventrículo lateral direito; e/ou ventrículo lateral esquerdo; e/ou ventrículo lateral rostral direito; e/ou ventrículo lateral rostral esquerdo; e/ou ventrículo lateral caudal direito; e/ou ventrículo lateral caudal esquerdo.

[0154] Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são entregues a um tecido, fluido ou célula do cérebro ou medula espinhal por injeção direta em um tecido ou fluido do cérebro ou medula espinhal. Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são entregues a um tecido ou fluido do cérebro ou medula espinhal por injeção estereotática.

[0155] Em certas modalidades, uma ou mais partículas de rAAV-SGSH são entregues ou administradas por injeção direta no cérebro, medula espinhal ou parte dela, ou um tecido ou fluido do mesmo (por exemplo, CSF como epêndima). Em um aspecto particular, as partículas de rAAV-SGSH transduzem células ependimárias, células piais, células endoteliais e/ou células meníngeas.

[0156] Em certas modalidades, um método ou uso inclui a administração de partículas de rAAV ao cérebro ou medula espinhal, ou parte

dela, de um mamífero onde as partículas de rAAV estão configuradas para transduzir células do cérebro ou medula espinhal do mamífero e expressão direta do polipeptídeo com SGSH atividade no cérebro ou medula espinhal do mamífero. Em certas modalidades, a SGSH é expressa e/ou detectada em um tecido nervoso central (por exemplo, cérebro, por exemplo, estriado, tálamo, medula, cerebelo, córtex occipital, córtex pré-frontal) distal ao local da administração. Em certas modalidades, a SGSH está presente ou detectada amplamente em um tecido nervoso central (por exemplo, cérebro, por exemplo, estriado, tálamo, medula, cerebelo, córtex occipital e/ou córtex pré-frontal) que reflete a distribuição para fora do local de administração e opcionalmente ao longo de um tecido nervoso central (por exemplo, cérebro, por exemplo, estriado, tálamo, medula, cerebelo, córtex occipital e/ou córtex pré-frontal) que pode ser absorvido por outras células (por exemplo, não transduzidas).

[0157] Uma quantidade eficaz de partículas de rAAV, como partículas de rAAV-SGSH, pode ser determinada empiricamente. A administração pode ser efetuada em uma ou mais doses, contínua ou intermitentemente ao longo do curso do tratamento. As doses eficazes de administração podem ser determinadas pelos especialistas na técnica e podem variar de acordo com o sorotipo AAV, título viral e o peso, condição e espécie de mamífero sendo tratado. Administrações únicas e múltiplas (por exemplo, 1 a 5 ou mais) podem ser realizadas com o nível de dose, o alvo e o momento selecionados pelo médico assistente. Podem ser administradas doses múltiplas conforme necessário para manter a atividade enzimática adequada, por exemplo.

[0158] Em certas modalidades, uma pluralidade de partículas de rAAV-SGSH é administrada. Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas a uma dose de cerca de  $1 \times 10^5$  a cerca de  $1 \times 10^{18}$  gv/ml em cerca de 1 a cerca de 5 ml; a uma dose de cerca de 1 a cerca de 3 ml de  $1 \times 10^7$  a cerca de  $1 \times 10^{16}$  gv/ml; ou em uma dose de cerca de 1 a cerca de 2 ml de  $1 \times 10^8$  a cerca de  $1 \times 10^{15}$  gv/ml. Em certas modalidades,

as partículas de rAAV-SGSH são administrados em uma dose de cerca de  $1 \times 10^8$  a cerca de  $1 \times 10^{15}$  gv/kg do peso corporal do mamífero a ser tratado.

[0159] Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas a uma dose de cerca de  $1 \times 10^6$  a cerca de  $1 \times 10^{18}$  gv/kg. Por exemplo, partículas de rAAV-SGSH podem ser administradas a uma dose de cerca de 0,1 a 5 ml de  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^{16}$  gv/ml, cerca de 0,5 a 5 ml de  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^{16}$  gv/ml, cerca de 1-5 ml de  $1 \times 10^5$  - $1 \times 10^{16}$  gv/ml, cerca de 1 a 3 ml de  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^{14}$  gv/ml ou uma dose de cerca de 1 a 2 ml de  $1 \times 10^8$  - $1 \times 10^{13}$  gv/ml.

[0160] Em certas modalidades, as partículas de rAAV-SGSH são administradas a uma dose de cerca de  $1 \times 10^8$  gv/kg, cerca de  $5 \times 10^8$  gv/kg, cerca de  $1 \times 10^9$  gv/kg, cerca de  $5 \times 10^9$  gv/kg, cerca de  $1 \times 10^{10}$  gv/kg, cerca de  $5 \times 10^{10}$  gv/kg, cerca de  $1 \times 10^{11}$  gv/kg, cerca de  $5 \times 10^{11}$  gv/kg, cerca de  $1 \times 10^{12}$  gv/kg, cerca de  $5 \times 10^{12}$  gv/kg, cerca de  $1 \times 10^{13}$  gv/kg, cerca de  $5 \times 10^{13}$  gv/kg, cerca de  $1 \times 10^{14}$  gv/kg, cerca de  $5 \times 10^{14}$  gv/kg ou cerca de  $1 \times 10^{15}$  gv/kg de corpo peso do mamífero a ser tratado.

[0161] Como no presente documento utilizado, o termo "farmaceuticamente aceitável" e "fisiologicamente aceitável" significa uma composição, formulação, líquido ou sólido biologicamente aceitável, ou mistura dos mesmos, que é adequada para uma ou mais vias de administração, entrega ou contato *in vivo*. Uma composição "farmaceuticamente aceitável" ou "fisiologicamente aceitável" é um material que não é biologicamente ou de outro modo indesejável, por exemplo, o material pode ser administrado a um sujeito sem causar efeitos biológicos indesejáveis substanciais. Essa composição, formulações e composições "farmaceuticamente aceitáveis" e "fisiologicamente aceitáveis" podem ser estéreis. Tais formulações e composições farmacêuticas podem ser usadas, por exemplo, na administração de uma partícula de rAAV-SGSH a um indivíduo.

[0162] Essas formulações e composições incluem solventes (aquosos ou não aquosos), soluções (aquosas ou não aquosas),

emulsões (por exemplo, óleo em água ou água em óleo), suspensões, xaropes, elixires, meios de dispersão e suspensão, revestimentos, agentes isotônicos e promotores ou retardadores de absorção, compatíveis com a administração farmacêutica ou contato ou entrega *in vivo*. Solventes, soluções e suspensões aquosas e não aquosas podem incluir agentes de suspensão e espessantes. Compostos ativos suplementares (por exemplo, conservantes, antibacterianos, antivirais e antifúngicos) também podem ser incorporados nas formulações e composições.

[0163] As composições farmacêuticas contêm tipicamente um excipiente farmaceuticamente aceitável. Tais excipientes incluem qualquer agente farmacêutico que não induza a produção de anticorpos prejudiciais ao indivíduo que recebe a composição e que possa ser administrado sem toxicidade indevida. Excipientes farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, sorbitol, Tween 80 e líquidos como água, solução salina, glicerol e etanol. Os sais farmaceuticamente aceitáveis podem ser incluídos nos mesmos, por exemplo, sais de ácidos minerais, tais como cloridratos, bromidratos, fosfatos, sulfatos e similares; e os sais de ácidos orgânicos, tais como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos e similares. Além disso, substâncias auxiliares, como surfactantes, agentes umectantes ou emulsificantes, substâncias tampão de pH e similares, podem estar presentes nesses veículos.

[0164] As composições farmacêuticas podem ser formuladas para serem compatíveis com uma via específica de administração ou entrega, conforme estabelecido neste documento ou conhecido por um indivíduo versado na técnica. Assim, as composições farmacêuticas incluem veículos, diluentes ou excipientes adequados para administração ou entrega por várias vias.

[0165] As formas farmacêuticas adequadas para injeção ou infusão de partículas de rAAV, como partículas de rAAV-SGSH, podem incluir soluções ou dispersões aquosas estéreis que são adaptadas para a

preparação extemporânea de soluções ou dispersões estéreis injetáveis ou infusíveis, opcionalmente encapsuladas em lipossomas. Em todos os casos, a forma final deve ser um fluido estéril e estável nas condições de fabricação, uso e armazenamento. O veículo ou veículo líquido pode ser um solvente ou meio de dispersão líquida compreendendo, por exemplo, água, etanol, um poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicóis líquidos e semelhantes), óleos vegetais, ésteres de glicerila não tóxicos e suas misturas adequadas. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pela formação de lipossomas, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões ou pelo uso de surfactantes. Agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, tampões ou sais (por exemplo, cloreto de sódio) podem ser incluídos. A absorção prolongada de composições injetáveis pode ser provocada pelo uso nas composições de agentes que retardam a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[0166] As soluções ou suspensões de partículas de rAAV-SGSH podem opcionalmente incluir um ou mais dos seguintes componentes: um diluente estéril, como água para injeção, solução salina, como solução salina tamponada com fosfato (PBS), CSF artificial, surfactantes, óleos fixos, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido e similares), glicerina ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos e antifúngicos tais como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico e similares; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tais como ácido etilenodiaminotratacético; tampões como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste da tonicidade como cloreto de sódio ou dextrose.

[0167] As formulações farmacêuticas, composições e sistemas de entrega apropriados para as composições, métodos e utilizações da presente invenção são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20<sup>a</sup> ed, Mack Publishing Co., Easton., PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18<sup>a</sup> ed, Mack

Publishing Co., Easton, PA;: The Merck Index (1996) 12<sup>a</sup> Ed, Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel e Stoklosa, cálculos farmacêuticos (2001) 11<sup>a</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; e Poznansky et al., Drug Delivery Systems (1980), RL Juliano, ed., Oxford, NY, páginas 253-315).

[0168] As partículas de rAAV, tais como partículas de rAAV-SGSH, e suas composições podem ser formuladas na forma de unidade de dosagem para facilitar a administração e uniformidade de dosagem. A forma de unidade de dosagem como no presente documento utilizada refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para um indivíduo a ser tratado; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico necessário. As formas unitárias de dosagem dependem da quantidade de partículas de rAAV (por exemplo, partículas de rAAV-SGSH) consideradas necessárias para produzir o efeito desejado (ou efeitos desejados). A quantidade necessária pode ser formulada em uma dose única ou pode ser formulada em várias unidades de dosagem. A dose pode ser ajustada para uma concentração adequada de partículas de rAAV, opcionalmente combinada com um agente anti-inflamatório e embalada para uso.

[0169] Em uma modalidade, as composições farmacêuticas incluirão material genético suficiente (partículas de rAAV) para fornecer uma quantidade terapeuticamente eficaz, ou seja, uma quantidade suficiente para reduzir ou melhorar os sintomas ou um efeito adverso de um estado de doença em questão ou uma quantidade suficiente para conferir o desejado benefício.

[0170] Uma "forma de dosagem unitária", conforme no presente documento utilizada, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para o sujeito a ser tratado; cada unidade

contendo uma quantidade predeterminada opcionalmente em associação com um veículo farmacêutico (excipiente, diluente, veículo ou agente de carga) que, quando administrado em uma ou mais doses, é calculado para produzir um efeito desejado (por exemplo, efeito profilático ou terapêutico). As formas de dosagem unitária podem estar dentro, por exemplo, de ampolas e frascos, que podem incluir uma composição líquida ou uma composição em estado liofilizado ou liofilizado; um veículo líquido estéril, por exemplo, pode ser adicionado antes da administração ou entrega *in vivo*. As formas de dosagem unitária individuais podem ser incluídas em kits ou recipientes de doses múltiplas. Assim, por exemplo, as partículas de rAAV-SGSH e suas composições farmacêuticas podem ser embaladas em forma de dosagem unitária única ou múltipla para facilitar a administração e uniformidade da dosagem.

[0171] As formulações contendo partículas de rAAV-SGSH contêm tipicamente uma quantidade eficaz, sendo a quantidade eficaz prontamente determinada por um indivíduo versado na técnica. As partículas de rAAV-SGSH podem tipicamente variar de cerca de 1% a cerca de 95% (p/p) da composição, ou até mais, se adequado. A quantidade a ser administrada depende de fatores como idade, peso e condição física do mamífero ou do sujeito humano considerado para tratamento. As dosagens eficazes podem ser estabelecidas por um versado na técnica através de ensaios de rotina que estabelecem curvas de resposta à dose.

[0172] Em certas modalidades, um método inclui a administração de uma pluralidade de partículas de rAAV-SGSH a um mamífero, conforme estabelecido neste documento, em que gravidade, frequência, progressão ou tempo de início de um ou mais sintomas de deficiência ou defeito na expressão ou função de SGSH (por exemplo, MPSIIIA) são diminuídos, reduzidos, prevenidos, inibidos ou retardados. Em certas modalidades, um método inclui a administração de uma pluralidade de partículas de rAAV-SGSH a um mamífero para tratar um sintoma ou efeito

adverso de MPSIIIA. Em certas modalidades, um método inclui a administração de uma pluralidade de partículas de rAAV-SGSH a um mamífero para estabilizar, atrasar ou impedir o agravamento ou a progressão ou reverter um sintoma ou efeito adverso de MPSIIIA.

[0173] Em certas modalidades, um método inclui a administração de uma pluralidade de partículas de AAV-SGSH ao sistema nervoso central, ou parte dele, conforme estabelecido neste documento, de um mamífero e gravidade, frequência, progressão ou tempo de início de um ou mais sintomas de uma deficiência ou o defeito na expressão ou função de SGSH (por exemplo, MPSIIIA) é diminuído, reduzido, prevenido, inibido ou atrasado em pelo menos cerca de 5 a cerca de 10, cerca de 10 a cerca de 25, cerca de 25 a cerca de 50 ou cerca de 50 a cerca de 100 dias.

[0174] Em certas modalidades, um sintoma ou efeito adverso compreende um sintoma de estágio inicial ou de estágio tardio; um sintoma de comportamento, personalidade ou linguagem; distúrbios de sono; e/ou um sintoma cognitivo.

[0175] Exemplos de sintomas/efeitos adversos precoces de MPSIIIA tratáveis de acordo com os métodos e usos no presente documento incluídos incluem melhorias ou lentidão ou prevenção da progressão ou agravamento de problemas de fala e comportamento atrasados. Outros sintomas da MPSIIIA incluem reduzir ou corrigir inquietação, comportamento agressivo ou destrutivo ou ansiedade. Em alguns casos, os sintomas incluem transtorno do espectro do autismo, uma condição caracterizada por dificuldade nas interações sociais e na comunicação. Outros sintomas da MPSIIIA incluem distúrbios do sono. À medida que a MPSIIIA avança, outros sintomas incluem inibição, perda ou agravamento da capacidade intelectual e/ou desenvolvimento, bem como regressão do desenvolvimento ou perda de habilidades adquiridas anteriormente. Nos estágios posteriores da MPSIIIA, as pessoas podem desenvolver convulsões e distúrbios do movimento. Os métodos e usos da invenção incluem aqueles

direcionados ao tratamento ou aprimoramento, ou redução da gravidade ou frequência de um ou de todos os sintomas anteriores de MPSIIIA.

[0176] Os termos "polinucleotídeo", "ácido nucleico" e "transgene" são usados no presente documento de forma intercambiável para se referir a todas as formas de ácido nucleico, oligonucleotídeos, incluindo ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) e seus polímeros. Os polinucleotídeos incluem DNA genômico, cDNA e DNA antissenso, e mRNA, rRNA, tRNA spliced ou não spliced e DNA ou RNA inibidor (RNAi, por exemplo, (sh)RNA de grampo de cabelo pequeno ou curto, microRNA (miRNA), interferências pequenas ou curtas (si)RNA, RNA trans-splicing ou RNA antissentido). Os polinucleotídeos podem incluir polinucleotídeos de ocorrência natural, sintéticos e intencionalmente modificados ou alterados (por exemplo, ácido nucleico variante). Os polinucleotídeos podem ser de cadeia simples, cadeia dupla ou triplex, linear ou circular e podem ter qualquer comprimento adequado. Ao discutir polinucleotídeos, uma sequência ou estrutura de um polinucleotídeo específico pode ser no presente documento descrita de acordo com a convenção de fornecer a sequência na direção de 5 a 3.

[0177] Um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo geralmente compreende um quadro de leitura aberto que codifica o polipeptídeo. Salvo indicação em contrário, uma sequência de ácidos nucleicos específica também inclui substituições de códons degeneradas.

[0178] Os ácidos nucleicos podem incluir um ou mais elementos de controle de expressão ou reguladores operacionalmente ligados ao quadro de leitura aberto, em que o um ou mais elementos reguladores são configurados para direcionar a transcrição e tradução do polipeptídeo codificado pelo quadro de leitura aberto em uma célula de mamífero. Exemplos não limitativos de controle de expressão/elementos reguladores incluem sequências de iniciação de transcrição (por exemplo, promotores, intensificadores, uma caixa TATA e similares), sequências de iniciação de tradução, sequências de estabilidade de mRNA, sequências poli A, sequências

poli A, sequências secretórias e semelhantes. Elementos de controle/controle de expressão podem ser obtidos a partir do genoma de qualquer organismo adequado.

[0179] Um "promotor" refere-se a uma sequência de nucleotídeos, geralmente a montante (5') de uma sequência de codificação, que direciona e/ou controla a expressão da sequência de codificação, fornecendo o reconhecimento da RNA polimerase e outros fatores necessários para a transcrição adequada. "Promotor" inclui um promotor mínimo que é uma sequência curta de DNA composta por uma caixa TATA e, opcionalmente, outras sequências que servem para especificar o local de iniciação da transcrição, ao qual são adicionados elementos reguladores para o controle da expressão.

[0180] Um "intensificador" é uma sequência de DNA que pode estimular a atividade de transcrição e pode ser um elemento inato do promotor ou um elemento heterólogo que aprimora o nível ou a especificidade do tecido da expressão. É capaz de operar em qualquer orientação (5'-> 3' ou 3'-> 5') e pode ser capaz de funcionar mesmo quando posicionado a montante ou a jusante do promotor.

[0181] Os promotores e/ou intensificadores podem ser derivados na sua totalidade a partir de um gene nativo, ou ser compostos por diferentes elementos derivados de diferentes elementos encontrados na natureza, ou mesmo ser compostos por segmentos de DNA sintético. Um promotor ou intensificador pode compreender sequências de DNA que estão envolvidas na ligação de fatores proteicos que modulam/controlam a eficácia da iniciação da transcrição em resposta a estímulos, condições fisiológicas ou de desenvolvimento.

[0182] Exemplos não limitativos incluem promotor precoce de SV40, promotor LTR de vírus de tumor mamário de camundongo; principal promotor tardio de adenovírus (Ad MLP); um promotor do vírus herpes simplex (HSV), um promotor do citomegalovírus (CMV), como a região do

promotor imediato do CMV (CMVIE), um promotor do vírus do sarcoma rous (RSV), promotores pol II, promotores pol III, promotores sintéticos, promotores híbridos, e similar. Além disso, sequências derivadas de genes não virais, como o gene da metalotioneína murina, também serão úteis no presente documento. Os promotores constitutivos exemplares incluem os promotores dos seguintes genes que codificam certas funções constitutivas ou de "manutenção": hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), di-hidrofolato redutase (DHFR), adenosina desaminase, fosfoglicerol quinase (PGK), piruvato quinase, fosfoglicerina, fosfoglicerina, fosfoglicerina, fosfoglicerina promotor e outros promotores constitutivos conhecidos dos especialistas na técnica. Além disso, muitos promotores virais funcionam constitutivamente em células eucarióticas. Estes incluem: os promotores iniciais e finais do SV40; as repetições terminais longas (LTRs) do vírus da leucemia Moloney e outros retrovírus; e o promotor da timidina-quinase do vírus Herpes Simplex, entre muitos outros. Por conseguinte, qualquer um dos promotores constitutivos acima mencionados pode ser usado para controlar a transcrição de uma inserção genética heteróloga.

[0183] Os transgenes sob controle de promotores induzíveis são expressos apenas ou em maior grau na presença de um agente indutor (por exemplo, a transcrição sob controle do promotor de metalotioneína aumenta muito na presença de certos íons metálicos). Os promotores induzíveis incluem elementos responsivos (REs) que estimulam a transcrição quando seus fatores indutores estão ligados. Por exemplo, existem REs para fatores séricos, hormônios esteroides, ácido retinoico e AMP cíclico. Os promotores contendo um ER específico podem ser escolhidos para obter uma resposta induzível e, em alguns casos, o próprio ER pode ser ligado a um promotor diferente, conferindo assim indutibilidade ao gene recombinante. Assim, selecionando um promotor adequado (constitutivo versus induzível; forte versus fraco), é possível controlar a existência e o nível de expressão de um polipeptídeo na célula geneticamente modificada. Se o gene que codifica o

polipeptídeo estiver sob o controle de um promotor indutível, a entrega do polipeptídeo *in situ* é desencadeada pela exposição da célula geneticamente modificada *in situ* a condições para permitir a transcrição do polipeptídeo, por exemplo, por injeção intraperitoneal de indutores específicos dos promotores induzíveis que controlam a transcrição do agente. Por exemplo, a expressão *in situ* por células geneticamente modificadas de um polipeptídeo codificado por um gene sob o controle do promotor de metalotioneína, é aprimorada entrando em contato com as células geneticamente modificadas com uma solução contendo os íons metálicos apropriados (isto é, induzindo) *in situ*.

[0184] Um ácido nucleico/transgene é "operacionalmente ligado" quando é colocado em um relacionamento funcional com outra sequência de ácidos nucleicos. Um ácido nucleico/transgene que codifica um polipeptídeo, ou uma expressão de direcionamento de ácido nucleico de um polipeptídeo SGSH (por exemplo, um polipeptídeo com atividade de SGSH) pode incluir um promotor indutível ou um promotor específico de tecido para controlar a transcrição do polipeptídeo codificado.

[0185] Em certas modalidades, promotores específicos ou SNC induzíveis, intensificadores e similares, são empregados nos métodos e usos descrito no presente documentos. Exemplos não limitativos de promotores específicos do SNC incluem aqueles isolados dos genes da proteína básica de mielina (MBP), proteína do ácido fibrilar glial (GFAP) e enolase específica de neurônio (NSE). Exemplos não limitativos de promotores indutíveis incluem elementos responsivos ao DNA para ecdisona, tetraciclina, hipóxia e IFN.

[0186] Em certas modalidades, um elemento de controle de expressão compreende um intensificador de CMV. Em certas modalidades, um elemento de controle de expressão compreende um promotor de beta-actina. Em certas modalidades, um elemento de controle de expressão compreende um promotor de beta-actina de frango. Em certas modalidades, um elemento de controle de expressão compreende um intensificador de CMV

e um promotor de beta-actina de frango.

[0187] Como usado no presente documento, os termos "modificar" ou "variante" e variações gramaticais dos mesmos, significam que um ácido nucleico, polipeptídeo ou subsequência do mesmo se desvia de uma sequência de referência. As sequências modificadas e variantes podem, portanto, ter substancialmente a mesma, maior ou menor expressão, atividade ou função que uma sequência de referência, mas pelo menos reter atividade ou função parcial da sequência de referência. Um tipo particular de variante é uma proteína mutante, que se refere a uma proteína codificada por um gene que possui uma mutação, por exemplo, uma mutação sem sentido ou sem sentido na SGSH.

[0188] Uma variante "ácido nucleico" ou "polinucleotídeo" refere-se a uma sequência modificada que foi geneticamente alterada em comparação com o tipo selvagem. A sequência pode ser geneticamente modificada sem alterar a sequência da proteína codificada. Alternativamente, a sequência pode ser geneticamente modificada para codificar uma proteína variante, por exemplo, uma proteína SGSH variante. Uma variante de ácido nucleico ou polinucleotídeo também pode se referir a uma sequência de combinação que foi modificada por códon para codificar uma proteína que ainda retém pelo menos a identidade parcial da sequência de uma sequência de referência, como a sequência de proteína do tipo selvagem, e também foi modificada por códon para codificar uma proteína variante. Por exemplo, alguns códons dessa variante de ácido nucleico serão alterados sem alterar os aminoácidos de uma proteína SGSH codificada por esse meio, e alguns códons da variante de ácido nucleico serão alterados, o que por sua vez altera os aminoácidos de uma proteína SGSH codificada por esse meio.

[0189] Os termos "proteína" e "polipeptídeo" são usados no presente documento de forma intercambiável. Os "polipeptídeos" codificados por um "ácido nucleico" ou "polinucleotídeo" ou "transgene" divulgados neste documento incluem sequências SGSH nativas parciais ou

completas, como nas proteínas polimórficas funcionais e de tipo selvagem de ocorrência natural, subsequências funcionais (fragmentos), e suas variantes de sequência, desde que o polipeptídeo retenha algum grau de atividade de SGSH .Por conseguinte, em métodos e usos da invenção, tais polipeptídeos codificados por sequências de ácidos nucleicos não precisam ser idênticos à proteína SGSH endógena que é defeituosa ou cuja atividade, função ou expressão é insuficiente, deficiente ou ausente em um tratamento mamífero.

[0190] Exemplos não limitativos de modificações incluem uma ou mais substituições de nucleotídeos ou aminoácidos (por exemplo, cerca de 1 a cerca de 3, cerca de 3 a cerca de 5, cerca de 5 a cerca de 10, cerca de 10 a cerca de 15, cerca de 15 a cerca de 20, cerca de 20 para cerca de 25, cerca de 25 a cerca de 30, cerca de 30 a cerca de 40, cerca de 40 a cerca de 50, cerca de 50 a cerca de 100, cerca de 100 a cerca de 150, cerca de 150 a cerca de 200, cerca de 200 a cerca de 200, cerca de 200 a cerca de 250, cerca de 250 a cerca de 500, cerca de 500 a cerca de 750, cerca de 750 a cerca de 1000 ou mais nucleotídeos ou resíduos).

[0191] Um exemplo de uma modificação de aminoácidos é uma substituição ou uma exclusão conservadora de aminoácidos. Em modalidades particulares, uma sequência modificada ou variante (por exemplo, SGSH) retém pelo menos parte de uma função ou atividade da sequência não modificada (por exemplo, SGSH do tipo selvagem). Em outras modalidades particulares, uma sequência modificada ou variante (por exemplo, SGSH) exibe secreção melhorada pelas células em comparação com a sequência não modificada (por exemplo, SGSH do tipo selvagem). Em ainda outras modalidades particulares, uma sequência modificada ou variante (por exemplo, SGSH) exibe absorção melhorada pelas células em comparação com a absorção da sequência não modificada (por exemplo, SGSH do tipo selvagem).

[0192] Outro exemplo de uma modificação de aminoácidos é um peptídeo alvo introduzido em uma proteína do capsídeo de uma partícula de AAV. Foram identificados peptídeos que direcionam vetores

de rAAV para o sistema nervoso central, como células endoteliais vasculares. Assim, por exemplo, as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos do cérebro podem ser alvo das partículas de rAAV modificadas. As proteínas do capsídeo portadoras de partículas de rAAV-SGSH modificadas para incluir esses peptídeos podem ser usadas para introduzir SGSH no sistema nervoso central (por exemplo, o cérebro, medula espinhal, etc.), conforme estabelecido no presente documento.

[0193] Um rAAV assim modificado pode se ligar preferencialmente a um tipo de tecido (por exemplo, tecido do SNC) sobre outro tipo de tecido (por exemplo, tecido do fígado). Em certas modalidades, um AAV portador de uma proteína do capsídeo modificada pode "atingir" o tecido do epitélio vascular cerebral, ligando-se a um nível superior a uma proteína do capsídeo não modificada comparável. Por exemplo, um AAV com uma proteína do capsídeo modificada pode se ligar ao tecido epitelial vascular do cérebro em um nível 50% a 100% maior que um rAAV não modificado.

[0194] Um "fragmento de ácido nucleico" é uma porção de uma dada molécula de ácido nucleico. O ácido desoxirribonucleico (DNA) na maioria dos organismos é o material genético, enquanto o ácido ribonucleico (RNA) está envolvido na transferência de informações contidas no DNA para as proteínas. Fragmentos e variantes das sequências nucleotídicas e proteínas divulgadas ou proteínas de comprimento parcial codificadas por ela também são abrangidas pela presente invenção. Por "fragmento" ou "porção" entende-se um comprimento completo ou menor que o comprimento total da sequência de nucleotídeos que codifica ou a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo ou proteína. Em certas modalidades, o fragmento ou porção é biologicamente funcional (ou seja, retém 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% da atividade ou função da SGSH do tipo selvagem).

[0195] Uma "variante" de uma molécula é uma sequência que é substancialmente semelhante à sequência da molécula nativa.

Para sequências nucleotídicas, as variantes incluem aquelas que, devido à degeneração do código genético, codificam a sequência de aminoácidos idêntica da proteína nativa. Variantes alélicas de ocorrência natural como essas podem ser identificadas com o uso de técnicas de biologia molecular, como, por exemplo, com reação em cadeia da polimerase (PCR) e técnicas de hibridação. Sequências nucleotídicas variantes também incluem sequências nucleotídicas derivadas sinteticamente, como aquelas geradas, por exemplo, usando mutagênese dirigida ao local, que codifica a proteína nativa, bem como aquelas que codificam um polipeptídeo com substituições de aminoácidos. Geralmente, as variantes de sequência nucleotídica da invenção terão pelo menos 40%, 50%, 60% a 70%, por exemplo, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, para 79%, geralmente pelo menos 80%, por exemplo, 81% -84%, pelo menos 85%, por exemplo, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, identidade de sequência de 94%, 95%, 96%, 97% a 98%, à sequência nucleotídica nativa (endógena). Em certas modalidades, a variante é biologicamente funcional (ou seja, retém 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% da atividade ou função da SGSH do tipo selvagem).

[0196] "Variações conservadoras" de uma sequência de ácidos nucleicos específica refere-se às sequências de ácidos nucleicos que codificam sequências de aminoácidos idênticas ou essencialmente idênticas. Devido à degeneração do código genético, um grande número de ácidos nucleicos funcionalmente idênticos codifica qualquer polipeptídeo. Por exemplo, os códons CGT, CGC, CGA, CGG, AGA e AGG codificam todos os aminoácidos arginina. Assim, em todas as posições em que uma arginina é especificada por um códon, o códon pode ser alterado para qualquer um dos códons correspondentes descritos sem alterar a proteína codificada. Tais variações de ácido nucleico são "variações silenciosas", que são uma espécie de "variações conservativamente modificadas". Cada sequência de ácidos nucleicos no presente documento descrita que codifica um polipeptídeo

também descreve todas as variações silenciosas possíveis, exceto onde indicado em contrário. Um indivíduo versado na técnica reconhecerá que cada códon de um ácido nucleico (exceto ATG, que normalmente é o único códon de metionina) pode ser modificado para produzir uma molécula funcionalmente idêntica por técnicas padrão. Por conseguinte, cada "variação silenciosa" de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo está implícita em cada sequência descrita.

[0197] O termo "identidade substancial" das sequências polinucleotídicas significa que um polinucleotídeo compreende uma sequência que possui pelo menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% ou 79%, ou pelo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% ou 89% ou pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, ou 94%, ou mesmo pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência, em comparação com uma sequência de referência usando um dos programas de alinhamento descritos usando parâmetros padrão. Um indivíduo versado na técnica reconhecerá que esses valores podem ser ajustados adequadamente para determinar a identidade correspondente de proteínas codificadas por duas sequências de nucleotídeos, levando em consideração a degenerescência do códon, a similaridade de aminoácidos, o posicionamento da estrutura de leitura e similares. Identidade substancial de sequências de aminoácidos para esses fins normalmente significa identidade de sequência de pelo menos 70%, pelo menos 80%, 90% ou mesmo pelo menos 95%.

[0198] O termo "identidade substancial" no contexto de um polipeptídeo indica que um polipeptídeo compreende uma sequência com pelo menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% ou 79% ou 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% ou 89% ou pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, ou 94%, ou mesmo 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência em relação à sequência de referência em uma janela de comparação especificada. Uma indicação de que duas sequências polipeptídicas são substancialmente idênticas é que um polipeptídeo é

imunologicamente reativo com anticorpos criados contra o segundo polipeptídeo. Assim, um polipeptídeo é substancialmente idêntico a um segundo polipeptídeo, por exemplo, onde os dois peptídeos diferem apenas por uma substituição conservadora.

[0199] A invenção fornece kits com material de embalagem e um ou mais componentes no mesmo. Um kit inclui tipicamente um rótulo ou bula, incluindo uma descrição dos componentes ou instruções para uso *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*, dos componentes nele contidos. Um kit pode conter uma coleção de tais componentes, por exemplo, um ácido nucleico, vetor recombinante, partículas de rAAV-SGSH e, opcionalmente, um segundo ativo, como outro composto, agente, medicamento ou composição.

[0200] Um kit refere-se a uma estrutura física que abriga um ou mais componentes do kit. O material de embalagem pode manter os componentes esterilmente e pode ser feito de material comumente usado para tais fins (por exemplo, papel, fibra de papelão ondulado, vidro, plástico, papel alumínio, ampolas, frascos, tubos, etc.).

[0201] Etiquetas ou inserções podem incluir informações de identificação de um ou mais componentes, quantidades de doses, farmacologia clínica do (s) ingrediente (s) ativo (s), incluindo mecanismo de ação, farmacocinética e farmacodinâmica. As etiquetas ou inserções podem incluir informações que identificam o fabricante, números de lote, local e data de fabricação, datas de validade. Etiquetas ou inserções podem incluir informações que identificam as informações do fabricante, números de lote, local e data do fabricante. Etiquetas ou inserções podem incluir informações sobre uma doença para a qual um componente do kit pode ser usado. As etiquetas ou inserções podem incluir instruções para o clínico ou o sujeito sobre o uso de um ou mais componentes do kit em um método, uso ou protocolo de tratamento ou regime terapêutico. As instruções podem incluir quantidades de dosagem, frequência ou duração e instruções para a prática de qualquer um dos métodos, usos, protocolos de tratamento ou regimes

profiláticos ou terapêuticos descritos no presente documento.

[0202] As etiquetas ou inserções podem incluir informações sobre qualquer benefício que um componente possa proporcionar, como um benefício profilático ou terapêutico. Etiquetas ou bulas podem incluir informações sobre possíveis efeitos colaterais adversos, complicações ou reações, como avisos ao paciente ou clínico sobre situações em que não seria apropriado usar uma composição específica. Efeitos colaterais adversos ou complicações também podem ocorrer quando o sujeito tem, está ou está tomando atualmente um ou mais medicamentos que podem ser incompatíveis com a composição, ou o sujeito tem, estará ou está atualmente passando por outro protocolo de tratamento ou regime terapêutico que seria incompatível com a composição e, portanto, as instruções podem incluir informações sobre essas incompatibilidades.

[0203] As etiquetas ou inserções incluem "material impresso", por exemplo, papel ou papelão, ou separado ou afixado a um componente, um kit ou material de embalagem (por exemplo, uma caixa) ou anexado a uma ampola, tubo ou frasco contendo um componente do kit. As etiquetas ou inserções podem incluir adicionalmente um meio legível por computador, como uma etiqueta impressa com código de barras, um disco, um disco óptico como CD ou DVD-ROM/RAM, DVD, MP3 ou uma mídia de armazenamento elétrico, como RAM e ROM ou híbridos, como mídia de armazenamento magnético/óptico, memória FLASH, híbridos e cartões do tipo memória.

[0204] O termo "sobre" no presente documento utilizado refere-se a valores dentro de 10% (mais ou menos) de um valor de referência.

[0205] Os termos "tratar" e "tratamento" se referem ao tratamento terapêutico e a medidas profiláticas ou preventivas, em que o objetivo é prevenir, inibir, reduzir ou diminuir uma alteração ou distúrbio fisiológico indesejado, como desenvolvimento, progressão ou agravamento da doença. Para os fins desta invenção, os resultados clínicos benéficos ou

desejados incluem, mas não estão limitados a, alívio dos sintomas, diminuição da extensão da doença, estabilização de um sintoma (isto é, não piorando ou progredindo) ou efeito adverso da doença, atraso ou lentidão da progressão da doença, melhoria ou paliação do estado da doença e remissão (parcial ou total), detectável ou indetectável. “Tratamento” também pode significar prolongar a sobrevida em comparação com a sobrevida esperada se não estiver recebendo tratamento. Aqueles que precisam de tratamento incluem aqueles que já estão com a condição ou distúrbio, bem como os predispostos (por exemplo, conforme determinado por um teste genético), como aqueles identificados como homozigotos (*Sgsh*<sup>-/-</sup>) com relação à expressão perdida ou reduzida de SGSH ou função ou heterozigoto (*Sgsh*<sup>+/+</sup>) com relação à expressão ou função perdida ou reduzida de SGSH.

[0206] Os termos "compreendendo", "tendo", "incluindo" e "contendo" devem ser interpretados como termos em aberto (isto é, significando "incluindo, mas não se limitando a"), a menos que indicado de outra forma.

[0207] Todos os métodos e usos descritos no presente documento podem ser realizados em qualquer ordem adequada, a menos que indicado de outra forma no presente documento ou claramente contradito pelo contexto. O uso de todo e qualquer exemplo ou linguagem exemplar (por exemplo, "como" ou "por exemplo") no presente documento fornecido, visa meramente iluminar melhor a invenção e não representa uma limitação no escopo da invenção, a menos que seja reivindicado de outra forma. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretada como indicando qualquer elemento não reivindicado como essencial para a prática da invenção.

[0208] Todas as características no presente documento divulgadas podem ser combinadas em qualquer combinação. Cada característica divulgada na especificação pode ser substituída por uma característica alternativa que serve a uma mesma finalidade, equivalente ou similar. Assim, a menos que expressamente indicado de outra forma, as

características divulgadas (por exemplo, ácido nucleico modificado, vetor, plasmídeo, uma sequência de vetor recombinante (por exemplo, rAAV), genoma do vetor ou partícula de rAAV) são um exemplo de um gênero de características equivalentes ou similares.

[0209] Conforme usado neste documento, as formas "um", "uma" e "o/a" incluem referentes singular e plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Assim, por exemplo, a referência a "um ácido nucleico" inclui uma pluralidade de tais ácidos nucleicos, a referência a "um vetor" inclui uma pluralidade de tais vetores e a referência a "um vírus" ou "partícula de AAV ou rAAV" inclui uma pluralidade de tais vírions/partículas de AAV ou rAAV.

[0210] A citação de faixas de valores neste documento visa apenas servir como um método abreviado de se referir individualmente a cada valor separado dentro do intervalo, a menos que indicado de outra forma no presente documento, e cada valor separado é incorporado ao relatório descritivo como se fosse no presente documento recitado individualmente.

[0211] Por conseguinte, todos os valores numéricos ou intervalos numéricos incluem números inteiros dentro desses intervalos e frações dos valores ou números inteiros dentro dos intervalos, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Assim, para ilustrar, a referência a 80% ou mais de identidade inclui 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% etc., bem como 81,1%, 81,2%, 81,3%, 81,4%, 81,5% etc., 82,1%, 82,2%, 82,3%, 82,4%, 82,5%, etc., e assim por diante.

[0212] A referência a um número inteiro com mais (maior) ou menor que inclui qualquer número maior ou menor que o número de referência, respectivamente. Assim, por exemplo, uma referência a menos de 100 inclui 99, 98, 97 etc. até o número um (1); e menos de 10, inclui 9, 8, 7, etc. até o número um (1).

[0213] Como usado no presente documento, todos os

valores ou intervalos numéricos incluem frações dos valores e números inteiros dentro desses intervalos e frações dos números inteiros dentro desses intervalos, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Assim, para ilustrar, a referência a um intervalo numérico, como 1 a 10, inclui 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, além de 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, etc. e assim por diante. A referência a um intervalo de 1-50 inclui, portanto, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc., até 50 inclusive, inclusive 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, etc., 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, etc. e assim por diante.

[0214] A referência a uma série de intervalos inclui intervalos que combinam os valores dos limites de diferentes intervalos dentro da série. Assim, para ilustrar a referência a uma série de intervalos, por exemplo, de 1 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 75, 75 a 100, 100 a 150, 150 a 200, 200 a 250, 250 a 300, 300 a 400, 400 a 500, 500 a 750, 750 a 1.000, 1.000 a 1.500, 1.500 a 2.000, 2.000 a 2.500, 2.500 a 3.000, 3.000 a 3.500, 3.500 a 4.000, 4.000 a 4.500, 4.500 a 5.000, 5.500 a 6.000, 6.000 a 7.000, 7.000 a 8.000 ou 8.000 a 9.000, inclui intervalos de 10 a 20, 10 a 50, 30 a 50, 50 a 100, 100 a 300, 100 a 1.000, 1.000 a 3.000, 2.000 a 4.000, 4.000 a 6.000, etc.

[0215] A invenção é geralmente divulgada no presente documento usando linguagem afirmativa para descrever as inúmeras modalidades e aspectos. A invenção também inclui especificamente modalidades nas quais um determinado assunto é excluído, no todo ou em parte, como substâncias ou materiais, etapas e condições do método, protocolos ou procedimentos. Por exemplo, em certas modalidades ou aspectos da invenção, materiais e/ou etapas do método são excluídos. Assim, mesmo que a invenção geralmente não seja no presente documento expressa em termos daquilo que a invenção não inclui aspectos que não são expressamente excluídos na invenção, são, no entanto, divulgados no presente documento.

[0216] Um número de modalidades da invenção foi

descrito. No entanto, um indivíduo versado na técnica, sem se afastar do espírito e escopo da invenção, pode fazer várias alterações e modificações da invenção para adaptá-la a vários usos e condições. Consequentemente, os exemplos a seguir pretendem ilustrar, mas não limitar, o escopo da invenção reivindicada.

### **EXEMPLOS**

#### **EXEMPLO 1**

##### **Material e métodos**

##### **Construção de enzimas lisossômicas e vetores de expressão de variantes relativas**

[0217] Os genes SGSH, TPP1 e p-glu humanos foram amplificados por PCR a partir da biblioteca de cDNA humano e clonados no plasmídeo esqueleto de AAV. As variantes de SGSH foram construídas por sobreposição de PCR.

##### **Ensaio de atividade de enzimas lisossômicas**

[0218] O ensaio da atividade das enzimas lisossômicas foi medido por substratos fluorogênicos. A atividade de SGSH foi medida por um protocolo de duas etapas (ver, por exemplo, Karpova et al. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 19: 278-285 (1996)). Resumidamente, a primeira etapa envolveu a incubação de 10 ml de amostra com 20 ml de substrato de 4-metilumbelifera (MU)-αGlcNs (5 mM em tampão barbital/acetato 29 mM, pH 6,5) por 17 horas a 37 °C. A segunda etapa continuou com a incubação da amostra com 10 µl de α-glicosidase (10 U/ml em BSA a 0,2%) por 24 horas a 37 °C. A reação foi encerrada adicionando 200 µl de tampão de parada (tampão de carbonato 500 mM com 0,025% de Triton X-100, pH 10,7). 4-MU foi usado como padrão. A fluorescência foi medida com excitação de 390 nm e emissão de 460 nm.

[0219] A atividade de TPP1 foi testada por uma modificação dos métodos descritos anteriormente (ver, por exemplo, Tian, et al. *Journal of Biological Chemistry* 281: 6559-6572 (2006); Katz, ML et al. *Science*

*Translational Medicine* 7: 313ra180 (2015)). Resumidamente, 10 µl da amostra foram incubados com 90 µl de substrato Ala-Ala-Phe 7-amido-4-metilcumarina (250 µM em tampão de citrato de sódio 100 mM, com NaCl 150 mM, e Triton X-100 a 0,1%, pH 4,0, Sigma) a 37 °C. O TPP1 recombinante purificado foi utilizado como padrão (presente de P. Lobel, Universidade Estadual de Nova Jersey). As placas foram lidas com um filtro de emissão de 460 nm.

[0220] A atividade de β-glu foi ensaiada com 4-MU-β-D-glicuronídeo (10 mM em tampão acetato 100 mM, pH 4,8, Sigma) como substrato (ver, por exemplo, Liu, et al. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25: 9321-9327 (2005)). Foi adicionado tampão de parada (tampão de carbonato 500 mM com Triton X-100 a 0,025%, pH 10,7) para finalizar a reação após 1 h de incubação a 37 °C. 4-MU foi usado como padrão. A fluorescência foi medida com excitação de 390 nm e emissão de 460 nm.

#### **Estudo de secreção de enzimas lisossômicas *in vitro***

[0221] A passagem mais baixa das células HEK 293 foi mantida em meio DMEM com 10% de FBS. 24 horas antes da transfecção,  $4 \times 10^4$  células foram semeadas em placas de 96 poços em meio de 100 ml. As células foram transfetadas com 100 ng de plasmídeo usando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Após um período de transfecção fixo (24 h, 48 h ou 72 h com base em diferentes experiências), 100 µl do meio condicionado foram colhidos. As células foram coletadas por adição de 100 ml de tampão lisado (Triton X-100 a 0,1% em solução salina normal com coquetel inibidor de protease completo, Roche). As enzimas lisossômicas solúveis foram liberadas das células por sonicação por 2 s duas vezes em gelo. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 21x10 3 g durante 15 min a 4 °C. Foram utilizados 10 µl de amostra do meio condicionado ou do lisado celular para o ensaio de atividade enzimática. As mesmas amostras também foram usadas para análise de Western blot.

#### **Western blot**

[0222] 20 µl da amostra do lisado celular ou do meio foram carregados em gel de SDS-PAGE 4-12% e transferidos para a membrana de PVDF de 0,45 µm. Camundongo com anticorpo primário anti-SGSH 1:2000 (presente na Shire); anticorpo secundário HRP marcado com anti-camundongo de cabra, 1:20.000 (sinalização celular). Os blots foram desenvolvidos usando o sistema de detecção de manchas Western ECL Plus (GE Healthcare) e expostos a filmes para imagens. A quantificação de proteínas foi realizada usando o sistema de imagens ChemiDoc TM (Biorad).

#### **Estudo de absorção de enzimas SGSH**

[0223] As células de fibroblastos de MPS IIIA humanas foram mantidas em meio DMEM com 10% de FBS. 1,0x10<sup>5</sup> células foram semeadas em placa de 24 poços. Após 24 h depois, quando as células atingiram 90% de confluência, o meio foi alterado para 300 µl de meio condicionado contendo atividade SGSH de 100 nmol/17 h/ml derivada de células HEK 293 transfectadas com plasmídeo wtSGSH ou SGSHv4 e na ausência ou presença de M6P (concentração final de 10 mM). Após 6 horas de incubação, o meio condicionado foi removido e as células foram lavadas com 500 ml de HBSS com Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> três vezes. As células foram colhidas e processadas para o ensaio de atividade ou transferência de Western. As mesmas células também foram processadas para imuno-histologia.

#### **Microscopia de imunofluorescência**

[0224] As células foram lavadas com 500 µl de HBSS com Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> três vezes e fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 10 min à temperatura ambiente e bloqueadas e permeabilizadas (soro de cabra a 10% e Triton X-100 a 0,1% em PBS) por 1 h em temperatura ambiente. As células foram incubadas com anticorpo primário anti-SGSH de camundongo (1:200) em PBS contendo soro de cabra a 2% durante a noite a 4 °C, depois anticorpo secundário conjugado com Alexa (Invitrogen) a 1:2.000 por 1 h à temperatura ambiente. As células foram cobertas com material de montagem Fluoro-Gel (Electron Microscopy Sciences) e analisadas por microscopia

fluorescente (Leica Microsystems).

### **Animais, administração de vetores de AAV e coleta de tecidos**

[0225] Camundongos de MPS IIIA em cepa B6.Cg-Sgsh<sup>mps3a</sup>/PstJ, portando uma mutação espontânea no locus Sgsh, foi adquirida no The Jackson Laboratory (ver, por exemplo, Bhattacharyya, et al. *Glycobiology* 11: 99-103 (2001); Bhaumik et al. *Glycobiology* 9: 1389-1396 (1999)), mantida em uma instalação de animais e seguindo um protocolo IACUC aprovado. Os vetores AAV4 que codificam a enzima SGSH ou SGSHv4 em peso foram produzidos por transfeção tripla em células HEK 293 e purificação por CsCl. Anestesiados com isoflurano, camundongos MPS IIIA com oito semanas de idade (*Sgsh*<sup>-/-</sup>) ou heterozigotos (*Sgsh*<sup>+/+</sup>) foram anestesiados. O vetor AAV ( $5 \times 10^{10}$  gp) foi injetado estereotaxicamente nos ventrículos laterais (A/P -2,18 mm, M/L-2,9 mm, D/V-3,5 mm). Os camundongos foram sacrificados após a conclusão do teste comportamental. O LCR foi coletado por capilar de vidro através de cisterna magna sob microscópio de dissecação. Após a coleta do LCR, o camundongo foi perfundido com PBS frio e as regiões do cérebro foram colhidas. Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em 200 µl de tampão de homogeneização gelado (Triton X-100 a 0,1% em solução salina normal com coquetel inibidor de protease completo, Roche) para o ensaio de atividades enzimáticas.

### **Labirinto aquático de Morris**

[0226] O labirinto aquático de Morris foi realizado como descrito anteriormente (ver, por exemplo, Vorhees, CV & Williams, MT *Nature Protocols* 1: 848-858 (2006)). Resumidamente, uma piscina de 100 cm de diâmetro foi preenchida com  $\frac{3}{4}$  cheio de água, nublado com óxido de titânio (IV) (Sigma). A piscina foi arbitrariamente dividida em quadrantes. Uma plataforma transparente foi colocada 0,5 cm abaixo da superfície da água em um quadrante (denominado quadrante-alvo). Os ratos passaram por uma fase de aquisição de 5 dias. Eles receberam nossos testes todos os dias durante a

fase de aquisição. Em cada tentativa, os ratos foram liberados na água de frente para a parede. Eles tiveram 60 segundos para localizar a plataforma e permaneceram na plataforma por 15 segundos. Se isso não foi alcançado, eles foram orientados para a plataforma. Em cada tentativa, a latência para encontrar a plataforma foi registrada. O teste da sonda foi realizado no 6º dia. A plataforma foi removida e a posição inicial estava no quadrante oposto ao alvo. A duração do teste foi de 60 segundos. O tempo gasto e a distância percorrida no quadrante-alvo foram registrados. Os dados foram analisados pelo software de rastreamento comportamental Any-labirinto (ANY-labirinto).

## **EXEMPLO 2**

### **SGSH nativa é relativamente pouco secretada**

[0227] Para comparar o potencial secretor de SGSH com a tripeptidil peptidase 1 (TPP1) e ( $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -glu), as células HEK 293 foram transfectadas com plasmídeos de expressão idênticos, exceto a sequência de codificação da proteína recombinante (Fig. 2). Após 72 horas, a atividade da enzima lisossômica nos meios coletados e lisados celulares foi analisada. Como mostrado na Fig. 3, menos de 20% da atividade de SGSH foi detectada nos meios em comparação com o lisado celular, enquanto nas células que expressam TPP1 ou  $\beta$ -glu, aproximadamente 50% e 75-80% foram secretados, respectivamente. Esse achado foi refletido na avaliação dos níveis totais de proteína por western blot (Fig. 3).

### **SGSH variante mostra melhora da secreção e absorção**

[0228] A modificação pós-tradução da manose ou M6P nas enzimas lisossômicas ocorre nas cadeias laterais dos oligossacarídeos ligados a N. A SGSH tem cinco sequências potenciais de consenso de N-glicosilação (Asn-Xaa-Ser/Thr), com o glicano aceitando o resíduo Asn nas posições de aminoácidos 41, 142, 151, 264 e 413. Cinco variantes da enzima SGSH foram construídas com Asn-a-Gln sequencialmente substituído, como indicado (Fig. 4A), e suas propriedades secretoras e de absorção avaliadas.

[0229] A maioria das variantes de SGSH eram

indistinguíveis da proteína do tipo selvagem, uma atividade enzimática perdida variante (SGSHv3) (Fig. 4B) e uma variante, SGSHv4, mostraram aproximadamente o dobro dos níveis de atividade SGSH nos meios. Além disso, as células que expressam SGSHv4 apresentaram níveis mais baixos de atividade de SGSH nas células; ~60% das células transfectadas do tipo selvagem. Esses dados indicam que a SGSHv4 melhora a secreção e ao mesmo tempo reduz a sobrecarga de SGSH adicional dentro das células transfectadas (Fig. 4B).

[0230] As células HEK 293 foram transfectadas com plasmídeos que expressam o tipo selvagem ou SGSH v4, e a atividade enzimática e os níveis de proteína nos meios e lisados celulares foram monitorados 24, 48 e 72 horas depois para monitorar a secreção enzimática temporalmente. As células transfectadas com plasmídeos que expressam variantes de SGSHv4 secretam SGSH com mais eficiência do que aquelas transfectadas com plasmídeos que expressam a enzima do tipo selvagem em todos os momentos. Às 24 h, havia quase quatro vezes mais enzima no meio das células transfectadas com SGSHv4 em comparação com as células transfectadas com vetores de expressão de SGSH de tipo selvagem (Fig. 5A). Por outro lado, os níveis celulares de atividade de SGSH foram mais baixos para células que expressam SGSH de tipo selvagem e SGSHv4 em todos os momentos (Fig. 5B). As transferências Western de lisados celulares mostraram níveis reduzidos de SGSH precursor em células que expressam SGSHv4 (Figs. 6A, 6B), apoiando a noção de que mais do precursor é secretado vs. retido e processado em enzima madura (como ocorre com o vetor de expressão de SGSH do tipo selvagem). O menor peso molecular de SGSHv4 nas formas precursora e madura é presumivelmente devido aos níveis reduzidos de fosforilação como resultado da perda do local M6P.

#### **Absorção de SGSHv4 é independente do M6PR**

[0231] O princípio subjacente à correção cruzada por terapia gênica requer que a enzima seja efetivamente secretada a partir de

células superexpressas (transduzidas) e também que a enzima secretada possa ser endocitose (absorvida) por células não traduzidas. Como tal, foi analisada a absorção de tipo selvagem e SGSHv4 nos fibroblastos dos pacientes com MPS IIIA. O meio condicionado das células HEK 293 que expressam SGSH ou SGSHv4 do tipo selvagem foi aplicado aos fibroblastos dos pacientes por 6 horas e, em seguida, as células coletadas e a atividade nos lisados celulares avaliados. Surpreendentemente, o produto expresso em SGSHv4, N264Q, foi absorvido de forma mais eficiente pelos fibroblastos dos pacientes em comparação com a SGSH do tipo selvagem, com > 60% da entrada da SGSH N264Q entrando nas células, contra <40% da SGSH do tipo selvagem (Fig. 7). Além disso, na presença de 10 mM de M6P, a absorção de SGSH do tipo selvagem foi bloqueada, mas não o N264Q (Fig. 7). É importante ressaltar que a SGSH do tipo selvagem e N264Q é processada para a enzima madura uma vez internalizada, suportando a entrega lisossômica (Figs. 8A, 8B).

**AAV.SGSHv4 melhorou as propriedades terapêuticas *in vivo*.**

[0232] Para comparar SGSHv4 a SGSH *in vivo*, os camundongos modelo MPS IIIA foram injetados intraventricularmente com vetores AAV4 codificando os diferentes transgenes (AAV.SGSH e AAV.SGSHv4), na mesma dose; O AAV4 em camundongos tem como alvo células ependimárias exclusivamente (Fig. 9) (Davidson et al. *PNAS USA* 97: 3428-3432 (2000); Liu et al. *J. Neurosci.* 25: 9321-9327 (2005)). Os camundongos foram analisados usando o labirinto aquático Morris para desempenho comportamental, com o aprendizado espacial avaliado pela latência para encontrar a plataforma invisível (Fig. 10). Em camundongos MPS IIIA tratados com AAV.SGSHv4, a latência no dia 5 foi equivalente a companheiros de ninhada heterozigotos normais, e ambos os grupos tiveram desempenho significativamente melhor que os camundongos com doença não tratada. Em contraste, os camundongos tratados com SGSH foram

semelhantes aos ratos com doenças não tratadas (Fig. 10). Camundongos de MPS IIIA tratados com AAV. A SGSHv4 também apresentou desempenho semelhante aos seus companheiros de ninhada heterozigotos ao avaliar o tempo gasto e a distância percorrida no quadrante-alvo, enquanto os camundongos de MPS IIIA tratados com AAV.SGSH se comportaram de maneira semelhante aos camundongos com doenças não tratadas (Fig. 11A, 11B). Os dados mostram que a injeção intraventricular de AAV. A SGSHv4, mas não a AAV.SGSH, é suficiente para corrigir o aprendizado espacial e os déficits de memória em camundongos de MPS IIIA.

**Atividade de SGSH elevada e tratamento com AAV.SGSHv4 melhorado dos níveis secundários de enzimas lisossômicas.**

[0233] A atividade de SGSH no LCR de camundongos tratados com AAV.SGSHv4 atingiu 80% dos níveis heterozigotos, que eram aproximadamente o dobro dos camundongos tratados com AAV4.SGSH (Fig. 12). Para avaliar a extensão da difusão, foram dissecadas amostras do hipocampo, estriado, córtex occipital e cerebelo e avaliada a atividade enzimática. Os tecidos de MPS IIIA não tratados têm ~1-4% dos níveis heterozigotos. Os camundongos de MPS IIIA tratados com AAV.SGSHv4 ou AAV.SGSH aumentaram a atividade de SGSH em comparação com camundongos de MPS IIIA não tratados, no entanto, as regiões cerebrais dos camundongos tratados com AAV.SGSHv4 foram aproximadamente duas vezes as dos tecidos dos camundongos tratados com AAV.SGSH. A atividade de SGSH em camundongos tratados com AAV.SGSHv4 foi de 35%, 14,5%, 16% e 14% dos níveis heterozigotos no hipocampo, estriado, córtex occipital e cerebelo, respectivamente (Fig. 13).

[0234] Há elevação significativa da atividade de  $\beta$ -glu no cérebro de camundongos de MPS IIIA, que é secundária à deficiência de SGSH (ver, por exemplo, Bhaumik et al. *Glycobiology* 9: 1389-1396 (1999)). A atividade de  $\beta$ -glu no LCR de camundongos de MPS IIIA foi de 160% dos

níveis heterozigotos, que diminuíram para 120% dos níveis heterozigotos após a transferência do gene AAV.SGSHv4, contra 147% dos níveis heterozigotos após o tratamento com AAV.SGSH (Fig. 14). No parênquima cerebral, as atividades de  $\beta$ -glu de camundongos MPS IIIA foram significativamente maiores do que as de camundongos heterozigotos e representaram 185%, 242%, 237% e 190% dos níveis heterozigotos de hipocampo, estriado, córtex occipital e cerebelo, respectivamente. AAV. O SGSHv4 diminuiu os níveis de atividade da  $\beta$ -glu para 120% e 166% dos níveis heterozigotos no hipocampo e no estriado, o que é significativamente menor do que o encontrado nos lisados teciduais dos camundongos tratados com AAV.SGSH (163% no hipocampo e 207% no estriado, em relação aos níveis heterozigotos). As atividades de  $\beta$ -glu no córtex occipital e no cerebelo de camundongos MPS IIIA tratados com AAV.SGSHv4 diminuíram em comparação com camundongos MPS IIIA não tratados e inferiores aos camundongos tratados com AAV.SGSH, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre si (Fig. .15).

### **EXEMPLO 3**

[0235] A AAV.SGSHv4 alivia a neuropatologia em camundongos de MPS IIIA. Os camundongos (8 semanas de idade) foram injetados com AAV. SGSH ou AAV.HSNv4 no ventrículo lateral. Os animais foram sacrificados 14 semanas depois e os tecidos foram colhidos para análise do impacto nas leituras neuropatológicas. Os dados são mostrados nas Figs. 16A-16D.

### **EXEMPLO 4**

[0236] A SGSH nativa é pouco secretada. Por outro lado, os dados mostram que a SGSHv4 modificada exibiu aumento da secreção e absorção celular pelas células. A AAV.SGSHv4 também produziu níveis elevados de enzimas no SNC *in vivo* e melhorou a penetração no parênquima. A AAV.SGSHv4 foi superior à AAV.SGSH não modificada em termos de correção de déficits comportamentais no modelo de camundongos de MPS IIIA. Por conseguinte, a variante de SGSH no presente documento exemplificada

exibiu um ou mais dos seguintes atributos: secreção celular aprimorada; biodistribuição melhorada *in vivo* no SNC, indicando melhor absorção e correção cruzada de células espectadoras. Além disso, os níveis de fosforilação da beta-glucuronidase, outra hidrolase lisossômica solúvel, foram alterados pela SGSHv4.

[0237] A SGSH não modificada/não variante ou do tipo selvagem exemplificadora é apresentada como SEQ ID NO:1 abaixo:

	10	20	30	40	50
	MSCPVPACCA	LLLVLGLCRA	RPRNALLLA	DDGGFESGAY	NNSAIATPHL
	60	70	80	90	100
	DALARRSLLF	RNAFTSVSSC	SPSRASLLTG	LPQHQNGMYG	LHQDVHHFNS
	110	120	130	140	150
	FDKVRSLPLL	LSQAGVRTGI	IGKKHVGPET	VYPFDFAYTE	ENGSQLQVGR
	160	170	180	190	200
	NITRIKLLVR	KFLQTQDDRP	FFLYVAFHDP	HRCGHSQPQY	GTFCEKFGNG
	210	220	230	240	250
	ESGMGRIPDW	TPQAYDPLDV	LVPYFVPNTP	AARADLAAQY	TTVGRMDQGV
	260	270	280	290	300
	GLVLQELRDA	GVLNDTLVIF	TSDNGIPFPS	GRTNLYWPGT	AEPLLVSSPE
	310	320	330	340	350
	HPKRWGQVSE	AYVSLLDLTP	TILDWFSIPIY	PSYAIFGSKT	IHLTGRSLLP
	360	370	380	390	400
	ALEAEPLWAT	VFGSQSHHEV	TMSYPMRSVQ	HRHFRLVHNL	NFKMPFPIDQ

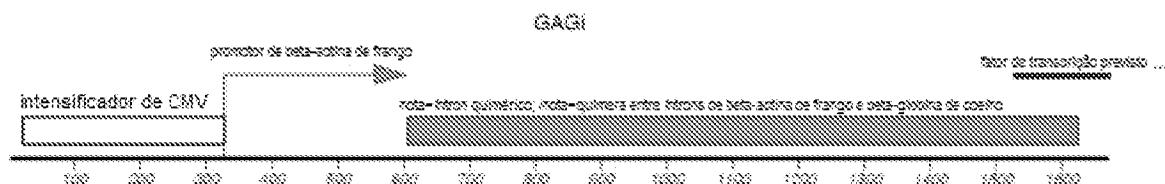
	410	420	430	440	450
DFYVSPTFQD	LLNRTTAGQP		TGWYKDLRHY		YYRARWELYD
RSRDPHETQN					
	460	470	480	490	500
LATDPRFAQL	LEMLRDQLAK		WQWETHDPWV		CAPDGVLEEK
LSPQCQPLHN					

EL

Intensificador de CMC exemplificador como apresentado na SEQ ID NO:2 abaixo:

gcgttacataacttacggtaaatggccgcctggctgaccgcacgcacccc  
 cgcccattgacgtcaataatgacgtatgtccatagtaacgccaatagggacttccattgacgtcaatgggtg  
 gagttttacggtaactgcccacttggcagttacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgta  
 aatgacggtaatggccgcctggcattatgcccagttacatgaccctatggacttcctacttggcagttacatct  
 acgttattagtcatcgctattaccatgg

Promotor de CAG exemplificador como apresentado na SEQ ID NO:3 abaixo:



<u>Tipo</u>	<u>Inicio</u>	<u>Fim</u>	<u>Descrição</u>
misc_feature	1	1672	/nota=promotor de CAG
regulador	22	327	/nota=intensificador de CMV
promotor	328	605	/nota=promotor de beta-actina de frango

ítron	607	1624	/nota=ítron quimérico/nota=quimera entre ítrons de beta- actina de frango e beta- globulina de coelho
regulador	1528	1672	/nota=locais de fator de transcrição previstos
regulador	1575	1672	/nota=local de ligação de fator de transcrição previsto iowa

ATAGCCCATATATGGAGTTCCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC  
 CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTAT  
 GTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGA  
 GTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC  
 AAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT  
 ATGCCCAAGTACATGACCTTATGGGACTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG  
 TATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCA  
 CTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTGTATTTATTTATTT  
 TTAATTATTTGTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGC  
 GCCAGGGCGGGCGGGCGGGCGAGGGCGGGGGCGGGCGAGGGCG  
 AGAGGTGCGCGGCAGCCAATCAGAGCGCGCGCTCCGAAAGTTCC  
 TTATGGCGAGGCAGGCAGGCAGGCAGGCAGGCAGGCAGGCAGGCAG  
 GGCAGGGCGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTCGCCCCGTGCCCGCTC  
 CGCCGCCGCCCTCGGCCGCCGCCGCCCTGACTGACCGCGTTACTC  
 CCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGCTGTAATTAGC  
 GCTTGGTTAATGACGGCTTGTCTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTG  
 AGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGAGCGCCGCGTGC  
 CGTGCCTGAGCGCTGCCGCCGCCGCCCTTGTGCGCTCCGCGCTGC  
 CCGCCGGCTGTGAGCGCTGCCGCCGCCGCCGCCCTTGTGCGCTCC  
 GCAGTGTGCGCGAGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTGCCCGCGCTGC

GGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCAGGGGTGTGCGTG  
GGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGCGCGTCGGTCGGCTGCAACCCCCC  
CTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCGGCTCGGGTGC  
GGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGCTGCCGTGCCGGCGGGGGGG  
TGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGCGGGCGGGGCCCTCGGGCCGG  
GGAGGGCTCGGGGGAGGGCGCGGCCCGGAGCGCCGGCGCT  
GTCGAGGCGCGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTATGGTAATCGTGC  
GAGGGCGCAGGGACTTCCTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTG  
GGAGGCGCCGCCGCACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCG  
GCGCCGGCAGGAAGGAAATGGCGGGGAGGGCCTCGTGCCTGCCGC  
GCCGCCGTCCCCCTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGCTGTCCGCCGG  
CGGCTGCCTCGGGGGGACGGGCAGGGCGGGTTGGCTGGCTGGCG  
TGTGACCGGGCGCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTATGCCTTCTT  
TTCCCTACAGCTCTGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATT  
TGGCAA

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Método para entregar sulfamidase (SGSH) ao sistema nervoso central de um mamífero **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar ao sistema nervoso central (SNC) do mamífero uma partícula de vírus adeno-associado recombinante (rAAV) compreendendo um ácido nucleico que codifica a variante de sulfamidase (SGSH) eficaz para transduzir células que entram em contato com o líquido cefalorraquidiano (LCR) do mamífero, de modo que as células expressem e secretem a variante de sulfamidase (SGSH) no mamífero.

2. Método para tratar uma doença em um mamífero causada por uma deficiência ou defeito na expressão ou função de sulfamidase (SGSH) **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar ao sistema nervoso central (SNC) do mamífero uma partícula de vírus adeno-associado recombinante (rAAV) compreendendo um núcleo ácido que codifica uma variante de sulfamidase (SGSH) de uma maneira eficaz para transduzir células que entram em contato com o SNC do mamífero, em que a célula expressa e secreta a variante de sulfamidase (SGSH) de modo a tratar a doença.

3. Método para entregar sulfamidase (SGSH) ao sistema nervoso central de um mamífero **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar ao parênquima cerebral do mamífero, espaço subaracnóideo e/ou espaço intratecal uma partícula de vírus adeno-associado recombinante (rAAV) compreendendo um ácido nucleico que codifica uma variante de sulfamidase (SGSH) de uma maneira eficaz para transduzir as células ou células do parênquima cerebral que entram em contato com o líquido cefalorraquidiano (CSF) do mamífero, de modo que as células expressem e secretem a variante de SGSH no mamífero.

4. Método para tratar uma doença em um mamífero causada por uma deficiência ou defeito na expressão ou função de sulfamidase (SGSH) **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar ao parênquima cerebral do mamífero, espaço subaracnóide e/ou espaço intratecal

uma partícula de vírus adeno-associado recombinante (rAAV) compreendendo um ácido nucleico que codifica uma variante de sulfamidase (SGSH) inserida entre um par de repetições terminais invertidas de AAV de maneira eficaz para transduzir células ou células do parênquima cerebral que entram em contato com o líquido cefalorraquidiano (CSF) do mamífero, em que a célula expressa e secreta a variante de SGSH de modo a tratar a doença.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que a administração é ao ventrículo cerebral.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o a partícula rAAV compreende uma proteína do capsídeo do AAV e o ácido nucleico é inserido entre um par de repetições terminais invertidas do AAV (ITRs).

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que a proteína do capsídeo do AAV é derivada ou selecionada do grupo que consiste em AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-rh74, AAV-rh10 e proteínas de capsídeo VP1, VP2 e/ou VP3 da AAV-2i8 ou uma sequência de capsídeos com 70% ou mais de identidade em relação às sequências de capsídeos AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-rh74, AAV-Rh10 ou VP1, VP2 e/ou VP3 da AAV-2i8.

8. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o um ou mais dos pares de ITRs é derivado, compreende ou consiste em uma AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV -rh74, AAV-rh10 ou AAV-2i8 ITR, ou uma ITR com 70% ou mais de identidade em relação à sequência AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-rh74, AAV-Rh10 ou ITR da AAV-2i8.

9. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ainda um elemento de controle de expressão.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o elemento de controle de expressão compreende um promotor.

11. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o elemento de controle de expressão compreende um elemento intensificador.

12. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o elemento de controle de expressão compreende um intensificador de CMV, promotor de beta-actina de frango, promotor de CAG e/ou uma sequência com 80% ou mais de identidade em relação ao intensificador de CMV estabelecido na SEQ ID NO: 2 e/ou uma sequência com 80% ou mais de identidade em relação ao promotor de CAG estabelecido na SEQ ID NO: 3.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico compreende ainda um ou mais de um ítron, uma sequência polinucleotídica de carga e/ou sinal poli A ou uma combinação dos mesmos.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 12, **caracterizado** pelo fato de que uma pluralidade de partículas de rAAV é administrada.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que as partículas de rAAV são administradas a uma dose de cerca de  $1 \times 10^6$  a cerca de  $1 \times 10^{18}$  gv/kg.

16. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que as partículas de rAAV são administradas a uma dose de cerca de  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^{17}$ , cerca de  $1 \times 10^8$ - $1 \times 10^{16}$ , cerca de  $1 \times 10^9$ - $1 \times 10^{15}$ , cerca de  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{14}$ , cerca de  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{14}$ , cerca de  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{13}$ , cerca de  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{13}$ , cerca de  $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{11}$ , cerca de  $1 \times 10^{11}$ - $1 \times 10^{12}$ , cerca de

$1 \times 10^{12}$ - $1 \times 10^{13}$  ou cerca de  $1 \times 10^{13}$ - $1 \times 10^{14}$  genomas vetoriais por quilograma (gv/kg) do mamífero.

17. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que as partículas de rAAV são administradas a uma dose de cerca de 0,5 a 4 ml de  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^{16}$  gv/ml.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 17, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda administrar uma pluralidade de capsídeos vazios de AAV.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato de que os capsídeos vazios de AAV são formulados com as partículas de rAAV administradas ao mamífero.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 ou 19, **caracterizado** pelo fato de que os capsídeos vazios de AAV são administrados ou formulados com um excesso de 1,0 a 100 vezes de partículas de vetor de rAAV.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 ou 19, **caracterizado** pelo fato de que os capsídeos vazios de AAV são administrados ou formulados com excesso de cerca de 1,0 a 100 vezes de capsídeos vazios de AAV em partículas de rAAV.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, **caracterizado** pelo fato de que a entrega ou administração compreende injeção intraventricular e/ou injeção intraparenquimatosa.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar ou entregar a partícula de rAAV ao ventrículo cerebral do mamífero, espaço subaracnóideo e/ou espaço intratecal.

24. Método, de acordo com a reivindicação 5 ou 23, **caracterizado** pelo fato de que o ventrículo cerebral compreende um ventrículo lateral.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, **caracterizado** pelo fato de que as células compreendem células ependimárias, piais, endoteliais, do ventrículo cerebral, meníngeo, gliais e/ou neurônios.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizado** pelo fato de que as células secretam a variante de SGSH no SNC do dito mamífero.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizado** pelo fato de que as células secretam a variante de SGSH no LCR do dito mamífero.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que a célula ependimária, pial, endotelial, do ventrículo cerebral, meníngea, glial e/ou neurônio expressa a variante de SGSH e/ou em que a célula ependimária, pial, endotelial, do ventrículo cerebral, meníngea, glial e/ou neurônio secreta a variante de SGSH no LCR.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que fornece função de SGSH ou expressão variante de SGSH aumentada ao SNC.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, **caracterizado** pelo fato de que a partícula de rAAV é injetada em um único local no cérebro.

31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, **caracterizado** pelo fato de que a partícula de rAAV é injetada em 1 a 5 locais no cérebro.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, **caracterizado** pelo fato de que a partícula de rAAV é administrada ao: ventrículo lateral rostral; e/ou ventrículo lateral caudal; e/ou ventrículo lateral direito; e/ou ventrículo lateral esquerdo; e/ou ventrículo lateral rostral direito; e/ou ventrículo lateral rostral esquerdo; e/ou ventrículo lateral caudal direito; e/ou ventrículo lateral caudal esquerdo.

33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, **caracterizado** pelo fato de que a partícula de rAAV é administrada em doses únicas ou múltiplas a qualquer cisterna magna, espaço intraventricular, ventrículo cerebral, espaço subaracnóideo, espaço intratecal e/ou epêndima do mamífero.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que aumenta a expressão variante de SGSH para entre cerca de 5 a 50% da expressão normal de SGSH.

39. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que aumenta a expressão variante de SGSH para acima de 50% da expressão normal de SGSH.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que inibe, diminui ou reduz déficits ou defeitos cognitivos devido a um defeito ou deficiência de SGSH endógeno no dito mamífero.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que aumenta, melhora, preserva, restaura ou resgata a perda da função cognitiva ou a perda de aprendizado espacial devido a um defeito ou deficiência de SGSH endógeno no dito mamífero.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que aumenta, melhora, preserva, restaura ou resgata déficits ou defeitos de memória do mamífero.

43. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que fornece maior secreção da variante de SGSH por células transduzidas em comparação com a secreção da SGSH não variante estabelecida como SEQ ID

NO:1.

44. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que fornece maior absorção da variante de SGSH por células não transduzidas em comparação com a absorção de SGSH não variante estabelecida como SEQ ID NO:1.

45. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que inibe ou diminui a produção ou o acúmulo secundário de enzimas nas células.

46. Método, de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que a enzima secundária é beta-glucuronidase.

47. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 46, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que aumenta, preserva, restaura ou resgata a função ou viabilidade do neurônio.

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 46, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que aumenta, preserva, restaura ou resgata a função ou viabilidade dos neurônios corticais.

49. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 46, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que aumenta, preserva, restaura ou resgata a função ou viabilidade do neurônio motor cortical.

50. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 46, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que inibe, diminui ou impede a degeneração ou morte de neurônios.

51. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 46, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que inibe, diminui ou impede a degeneração ou morte de neurônios corticais.

52. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 46, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que inibe,

diminui ou impede a degeneração ou morte de neurônios motores corticais.

53. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 46, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que melhora, reduz ou diminui um sintoma ou efeito adverso do defeito ou deficiência de SGSH.

54. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que estabiliza, evita o agravamento ou a reversão de um sintoma ou efeito adverso do defeito ou deficiência de SGSH.

55. Método, de acordo com as reivindicações 53 ou 54, **caracterizado** pelo fato de que o sintoma ou efeito adverso compreende um sintoma de estágio inicial ou de estágio tardio; um sintoma de comportamento, personalidade ou linguagem; um sintoma da função motora; e/ou um sintoma cognitivo.

56. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 55, **caracterizado** pelo fato de que o mamífero é um mamífero não roedor.

57. Método, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado** pelo fato de que o mamífero não roedor é um primata, cavalo, ovelha, cabra, porco ou cachorro.

58. Método, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado** pelo fato de que o mamífero não roedor é um primata.

59. Método, de acordo com a reivindicação 57, **caracterizado** pelo fato de que o primata é humano.

60. Método, de acordo com a reivindicação 59, **caracterizado** pelo fato de que o humano é uma criança.

61. Método, de acordo com a reivindicação 60, **caracterizado** pelo fato de que a criança tem entre cerca de 1 a cerca de 8 anos de idade.

62. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 61, **caracterizado** pelo fato de que o mamífero, primata ou humano exibe uma perda ou redução da expressão ou função endógena de SGSH.

63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 61, **caracterizado** pelo fato de que o mamífero, primata ou humano é homozigoto ( $Sgsh^{-/-}$ ) ou heterozigoto ( $Sgsh^{+/-}$ ) em relação à expressão ou função perdida ou reduzida de SGSH.

64. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 63, **caracterizado** pelo fato de que a doença é causada por uma deficiência ou defeito na expressão ou função de SGSH.

65. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 64, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda a administração de um ou mais agentes imunossupressores.

66. Método, de acordo com a reivindicação 65, **caracterizado** pelo fato de que o dito agente imunossupressor é administrado antes ou contemporaneamente à administração ou entrega do dito vetor.

67. Método, de acordo com a reivindicação 65, **caracterizado** pelo fato de que o agente imunossupressor é um agente anti-inflamatório.

68. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 67, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH é mamífera.

69. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 67, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH é uma SGSH de primata, cavalo, ovelha, cabra, porco ou cão.

70. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 67, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH é humana.

71. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 70, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH

exibe maior secreção por células transduzidas em comparação com SGSH não variante estabelecida como SEQ ID NO:1.

72. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 71, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH exibe absorção aumentada pelas células em comparação com absorção de SGSH não variante estabelecida como SEQ ID NO:1.

73. Método, de acordo com a reivindicação 72, **caracterizado** pelo fato de que a absorção da variante de SGSH pelas células não requer receptor de manose-6-fosfato.

74. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 73, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH é distribuída para células não transduzidas no SNC.

75. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 73, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH é distribuída para células do SNC não transduzidas por meio de líquido cefalorraquidiano (LCR).

76. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 73, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH é distribuída para células do SNC não transduzidas localizadas distalmente às células transduzidas.

77. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 74 a 76, **caracterizado** pelo fato de que a SGSH é absorvida pelas ditas células do SNC.

78. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 77, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO:1.

79. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 77, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH comprehende uma variante da SEQ ID NO:1.

80. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 77, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO:1 tendo uma substituição de aminoácidos na posição 264.

81. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 77, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO:1 tendo uma substituição de asparagina (N)->glutamina (Q) na posição 264.

82. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 77, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH comprehende a SEQ ID NO:1 tendo uma substituição de aminoácidos na posição 264.

83. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 77, **caracterizado** pelo fato de que a variante de SGSH comprehende a SEQ ID NO:1 tendo uma substituição de asparagina (N)->glutamina (Q) na posição 264.

FIG. 1

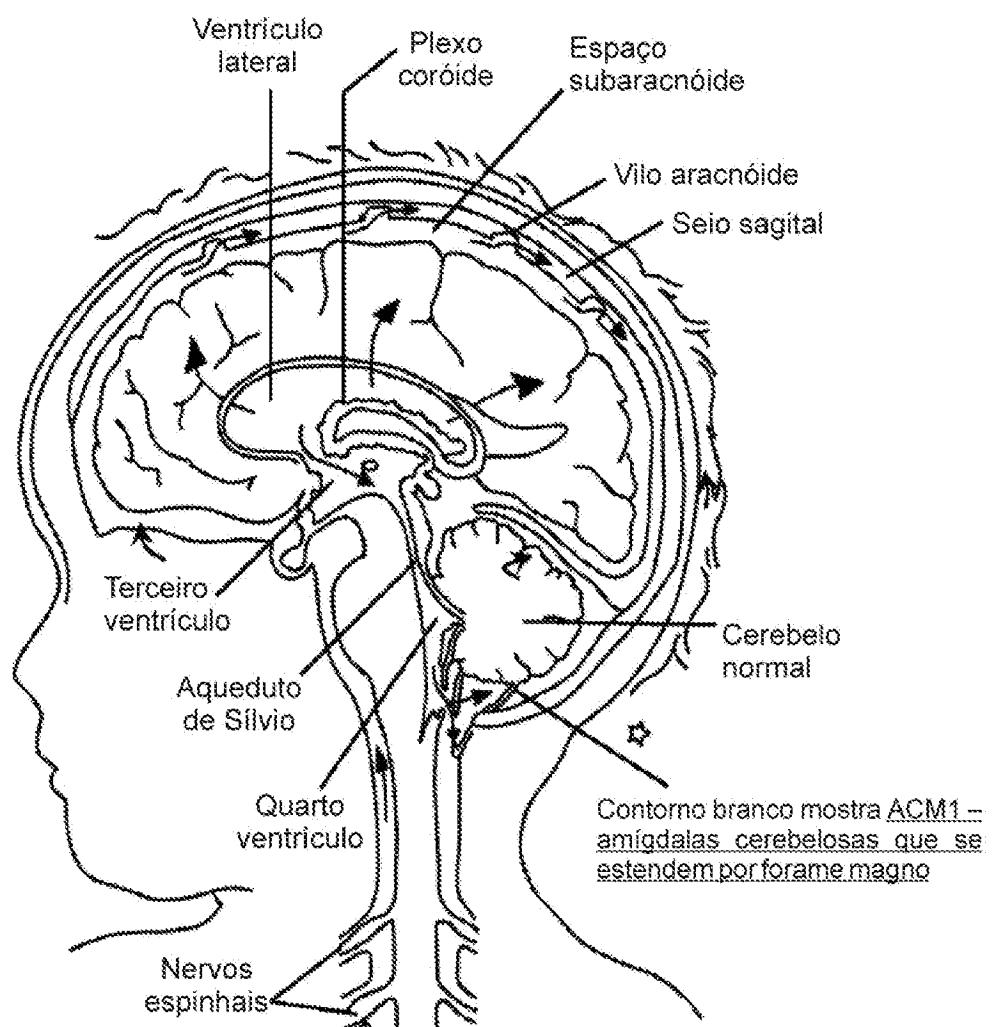


FIG. 2

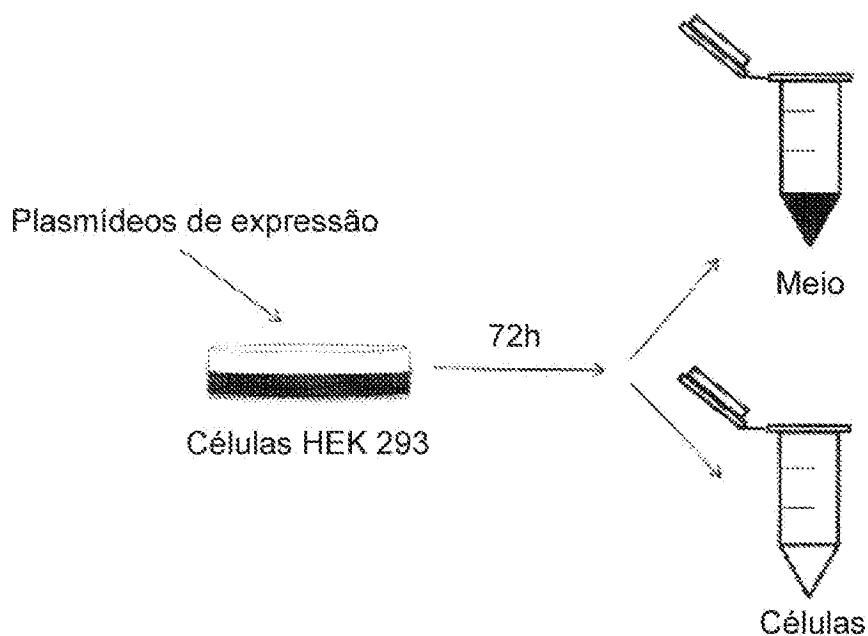
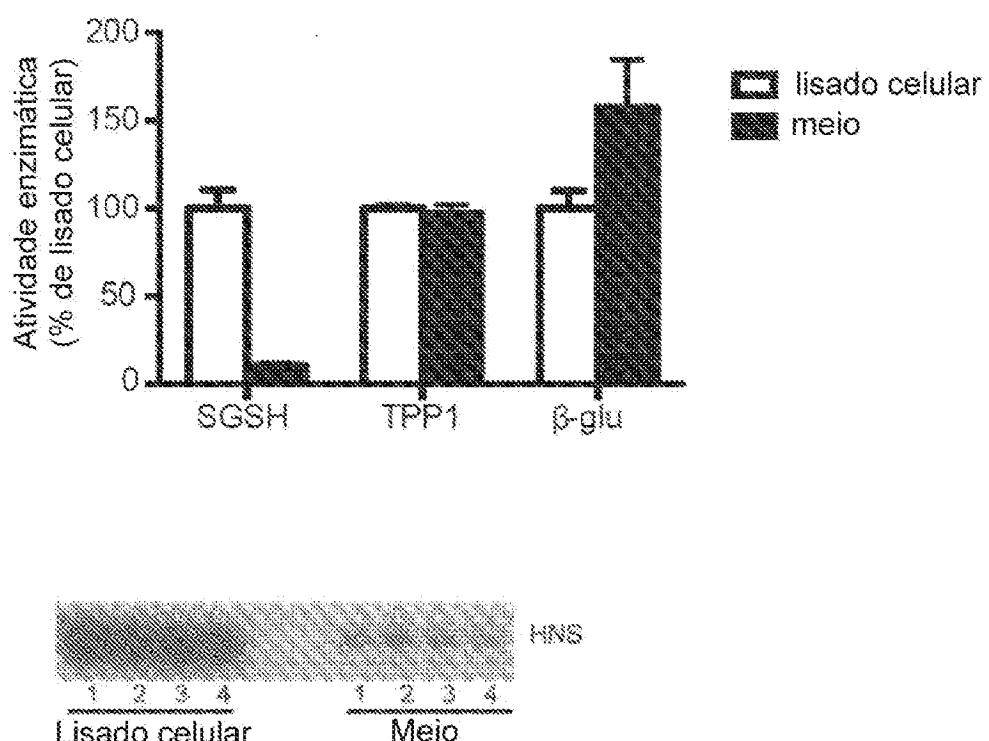
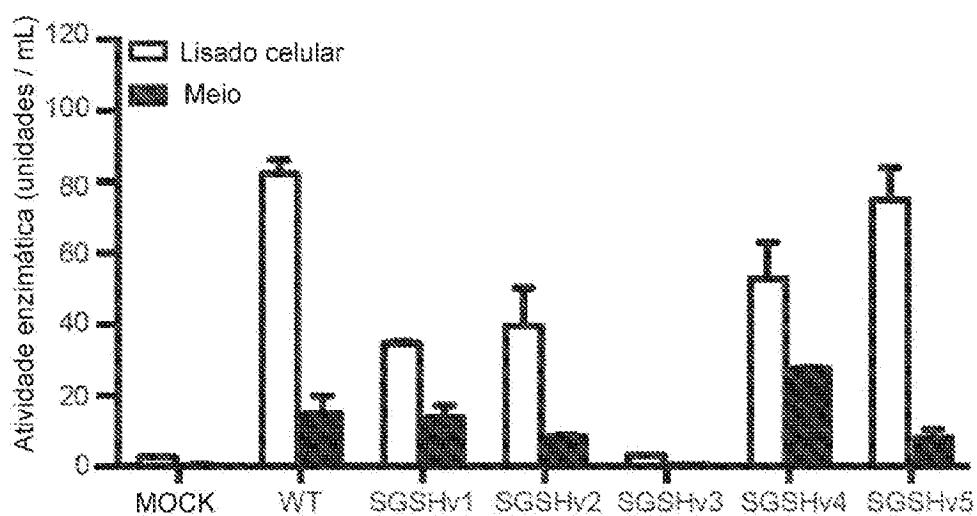


FIG. 3



**FIG. 4A**

Variantes	SGSHv1	SGSHv2	SGSHv3	SGSHv4	SGSHv5
Alterações AA	N41Q	N142Q	N151Q	N264Q	N413Q

**FIG. 4B**

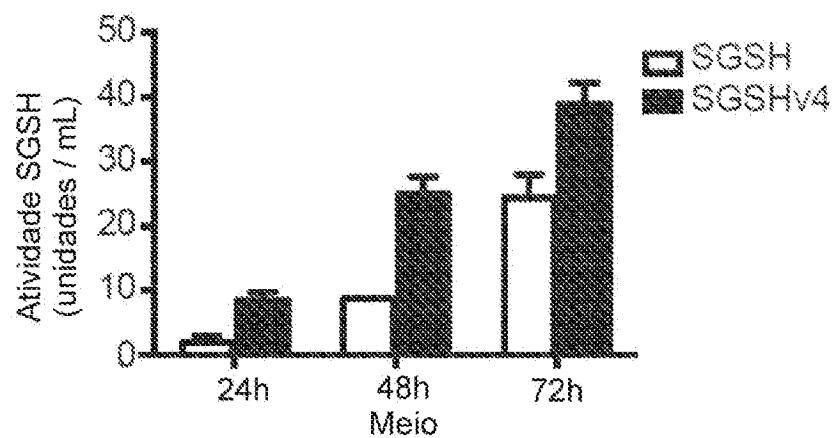
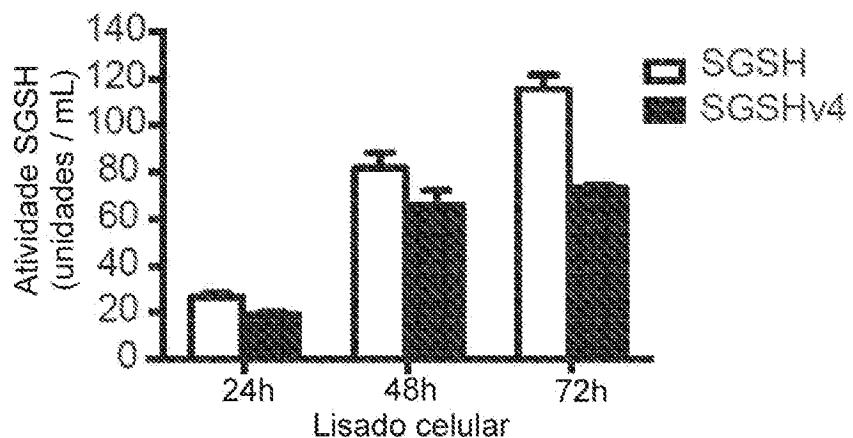
**FIG. 5A****FIG. 5B**

FIG. 6A

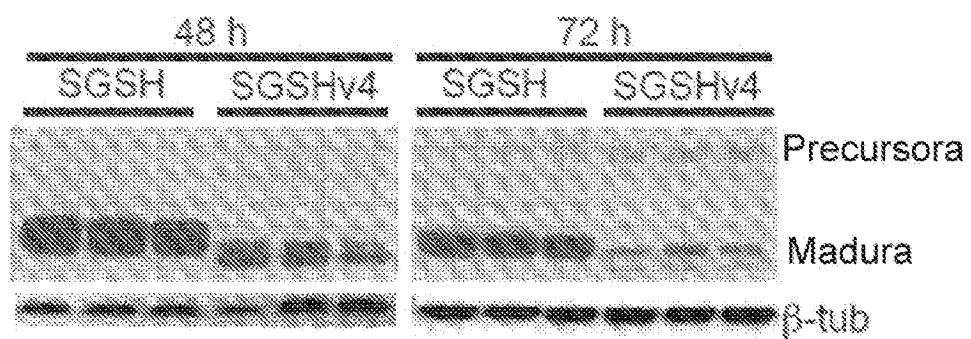
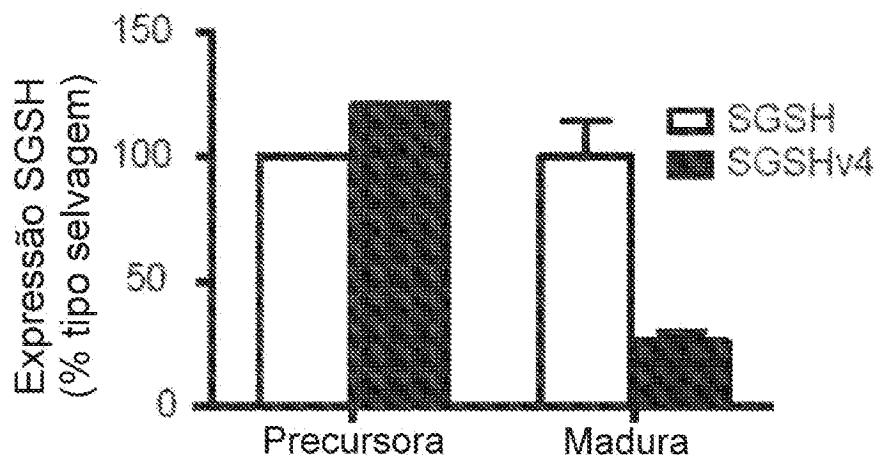


FIG. 6B



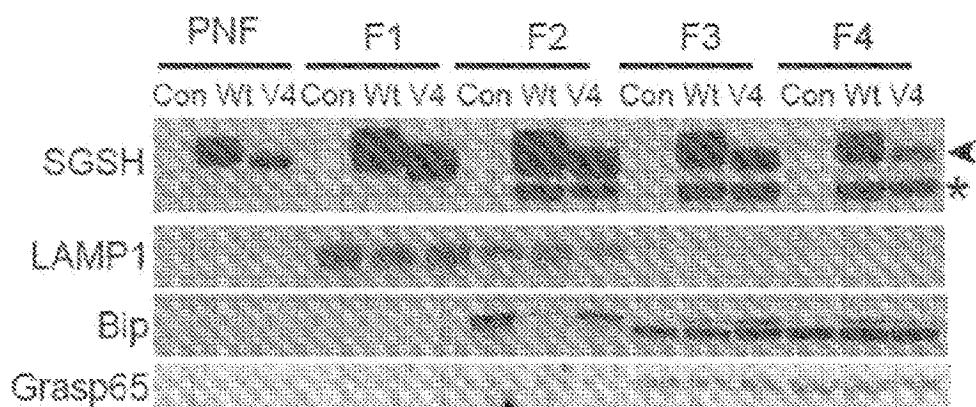
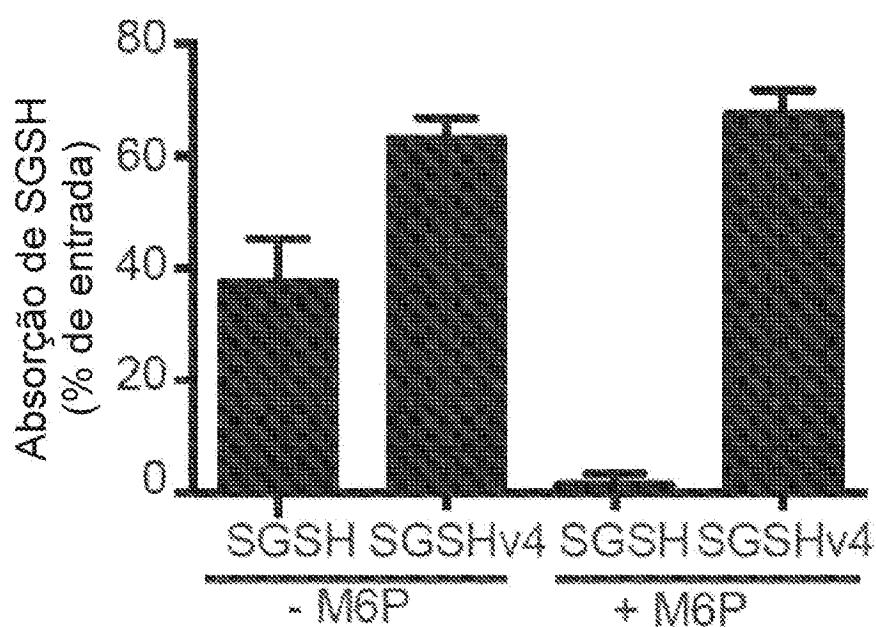
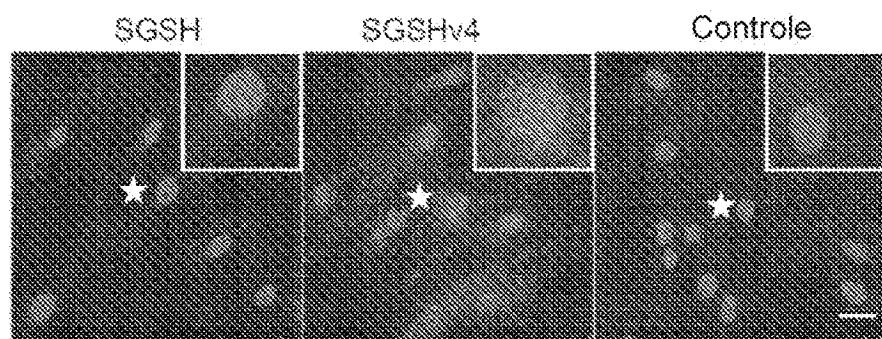
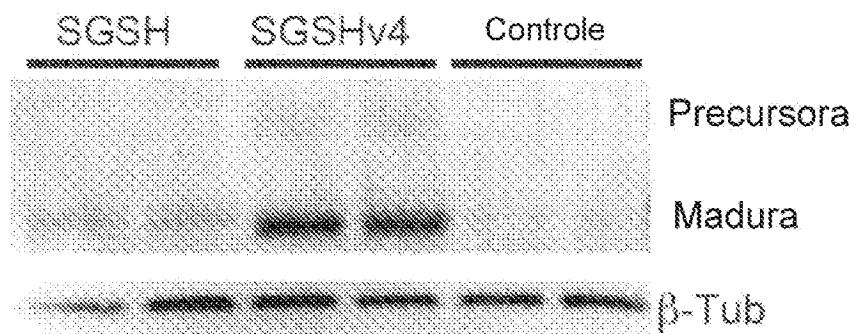
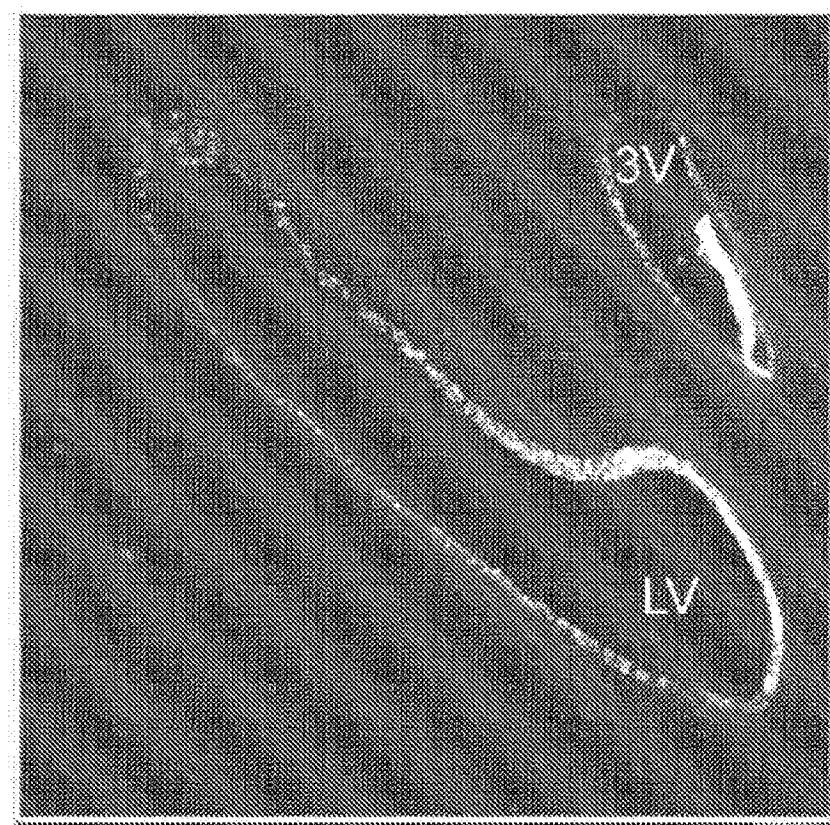
**FIG. 6C**

FIG. 7



**FIG. 8A****FIG. 8B**

**FIG. 9**



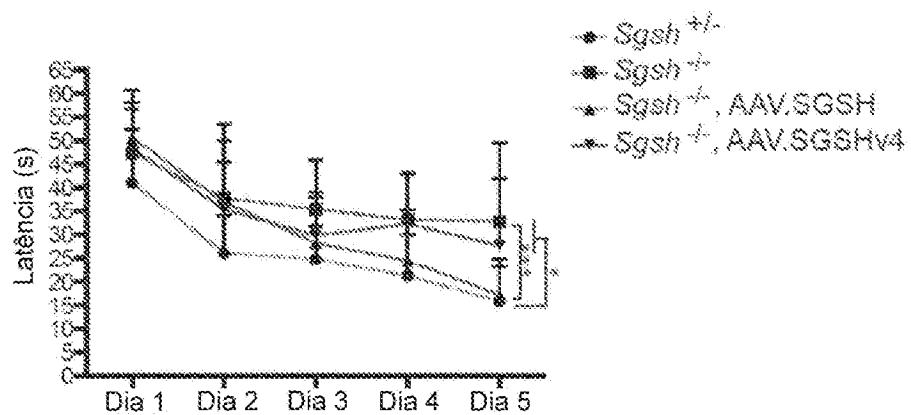
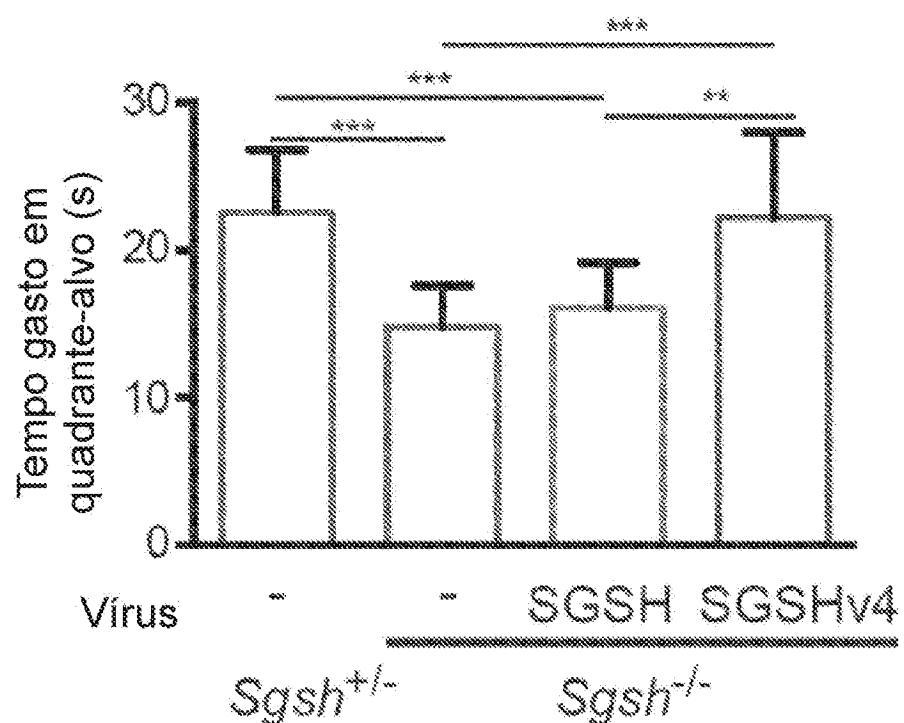
**FIG. 10**

FIG. 11A



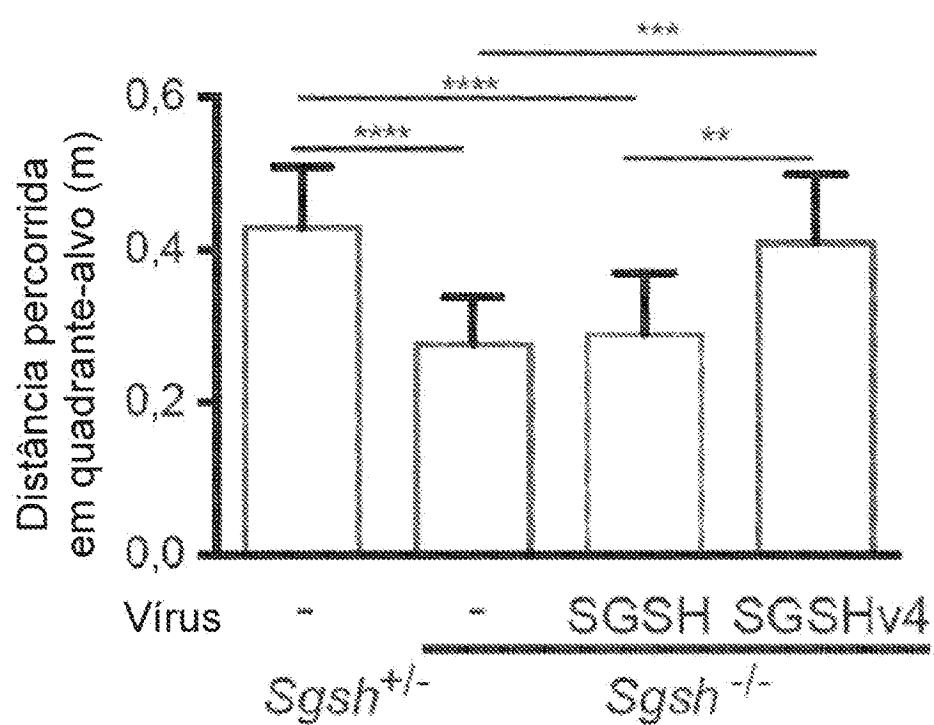
**FIG. 11B**

FIG. 12

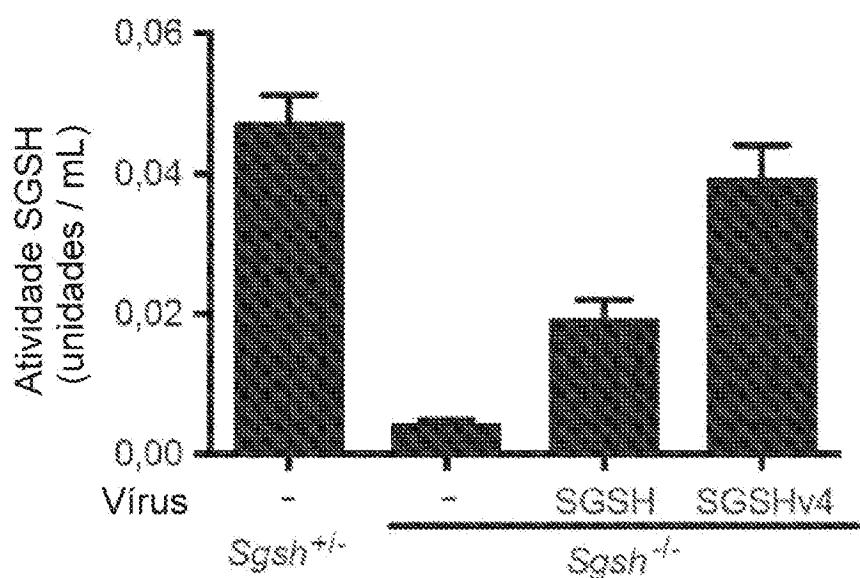


FIG. 13

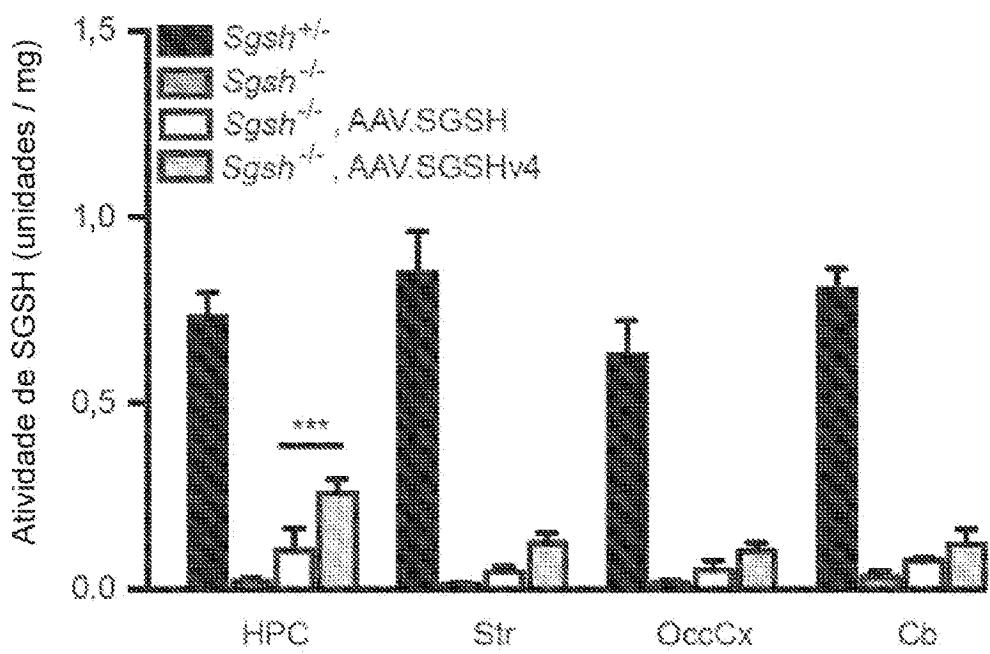


FIG. 14

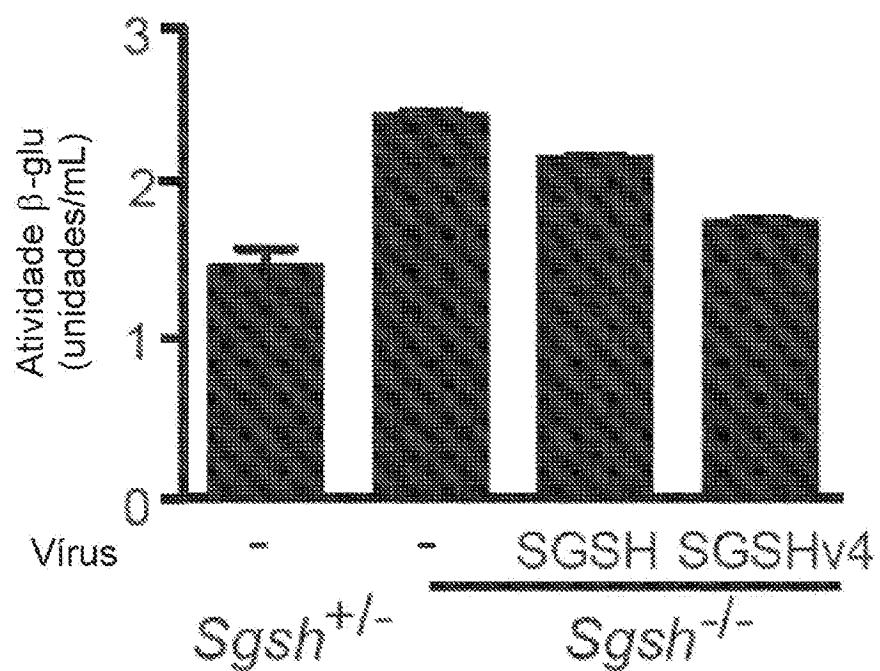
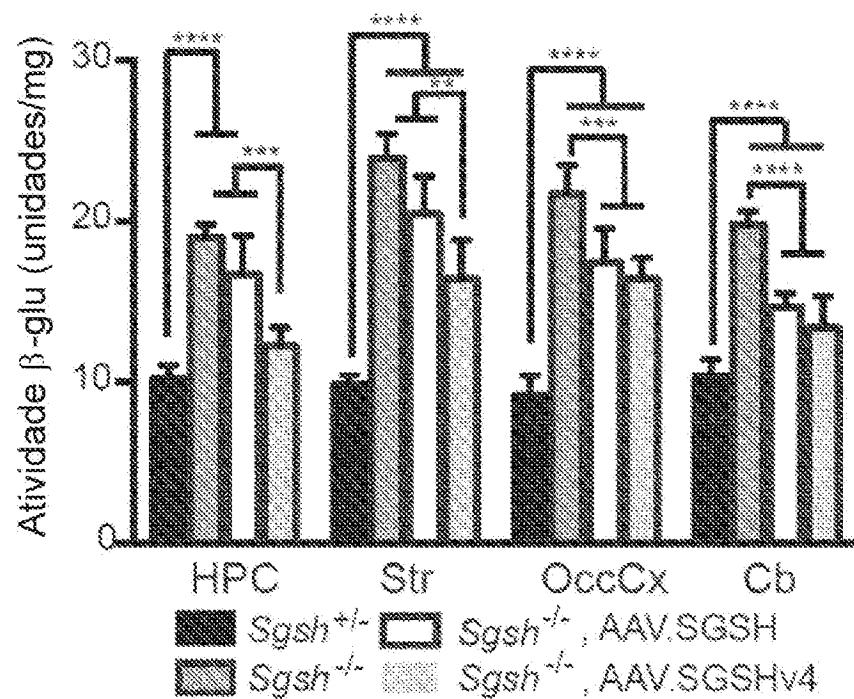
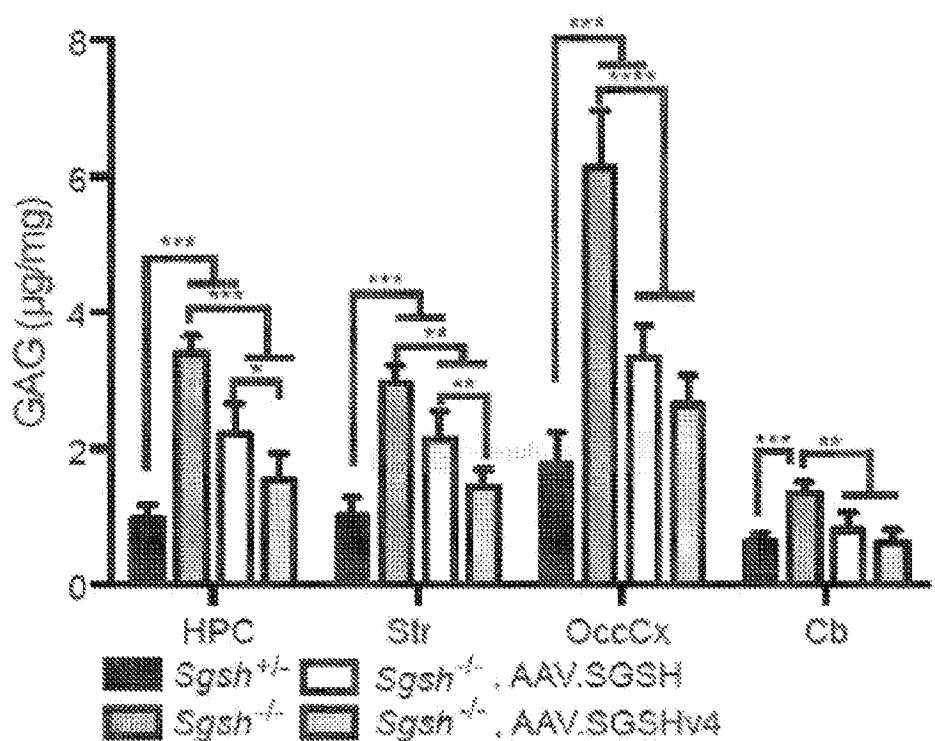


FIG. 15



**FIG. 16A**

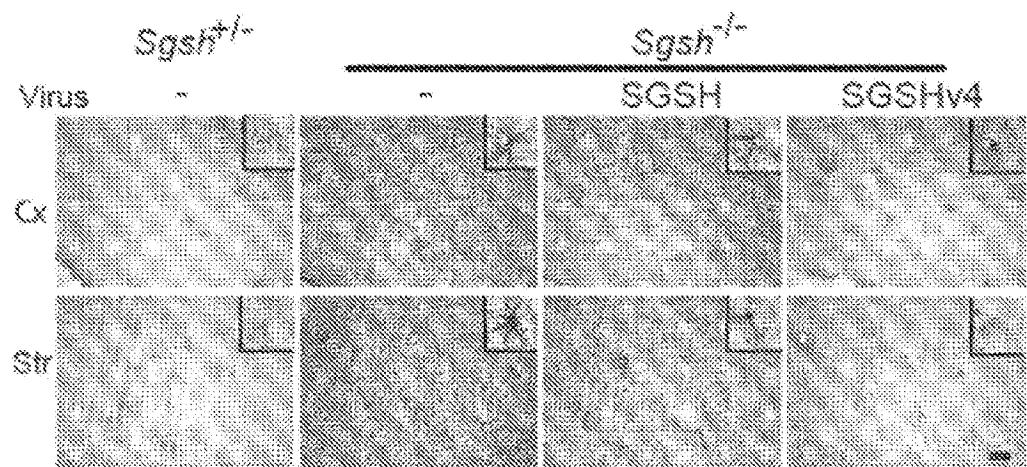
**FIG. 16B**

FIG. 16C

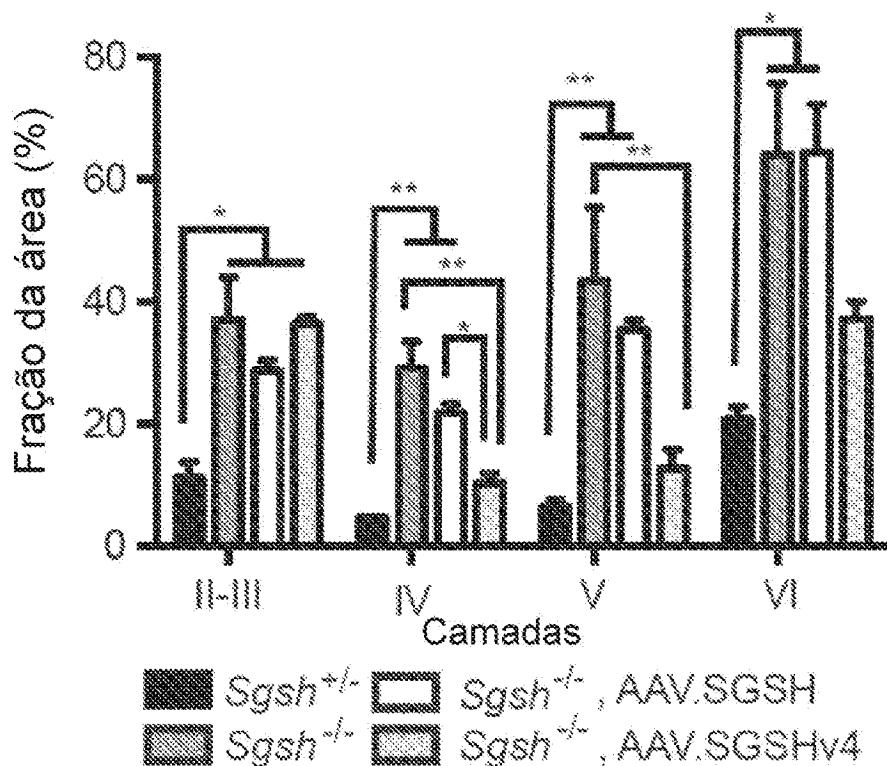
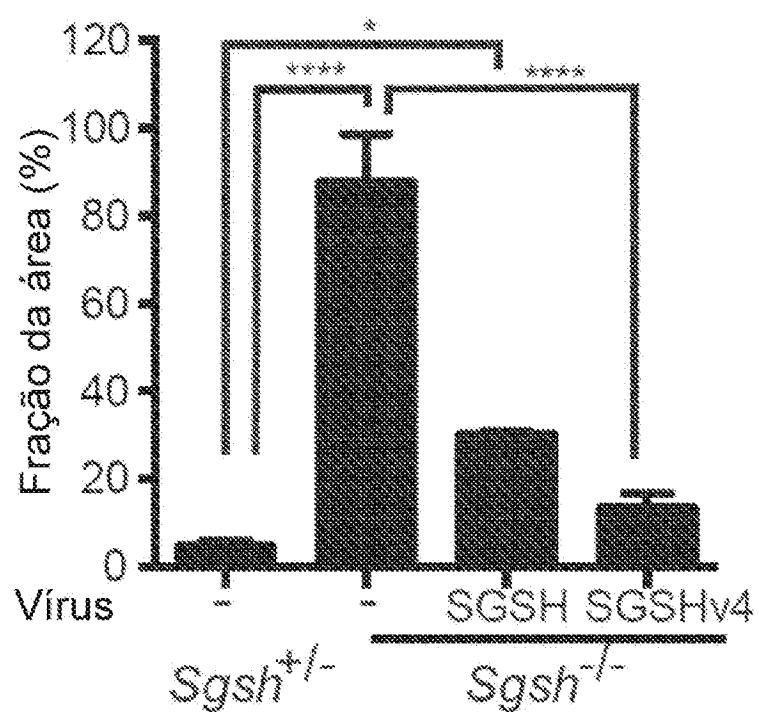


FIG. 16D



**RESUMO****“VARIANTES DE SULFAMIDASE (SGSH), VETORES, COMPOSIÇÕES E MÉTODOS E USOS PARA TRATAR MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IIIA (MPS IIIA)”**

A invenção refere-se à sulfamidase (SGSH) e variantes de SGSH. As SGSH e variantes de SGSH podem ser entregues por meio de uma partícula de vírus adeno-associado recombinante (rAAV) no sistema nervoso central de um mamífero (SNC) para transduzir células do SNC que entram em contato com o líquido cefalorraquidiano (LCR). Os mamíferos-alvo para administração de SGSH e variante de SGSH incluem mamíferos com uma deficiência ou defeito na expressão ou função de SGSH.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

**Código de Controle**

Campo 1



Campo 2



**Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequência.txt
- Data de Geração do Código: 12/11/2019
- Hora de Geração do Código: 18:32:18
- Código de Controle:
  - Campo 1: 76CD07988C265453
  - Campo 2: A9805E24850E94B7