

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 895 263**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2015.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**C07K 14/775** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**A61P 5/00** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2018** **PCT/GB2018/050347**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2018** **WO18146473**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2018** **E 18705462 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.09.2021** **EP 3579849**

54 Título: **Un ácido nucleico que comprende la secuencia de genes IDS y una repetición en tándem de la secuencia de genes de apolipoproteína E**

30 Prioridad:

**07.02.2017 GB 201701968**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.02.2022**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MANCHESTER (100.0%)**  
**Oxford Road**  
**Manchester M13 9PL, GB**

72 Inventor/es:

**BIGGER, BRIAN y**  
**GLEITZ, HÉLÈNE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 895 263 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Un ácido nucleico que comprende la secuencia de genes IDS y una repetición en tándem de la secuencia de genes de apolipoproteína E

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención se refiere a terapias génicas de células madre para el tratamiento de la mucopolisacaridosis (MPS) II.

Antecedentes de la invención

- La mucopolisacaridosis tipo II (MPS II, OMIM#309900), o síndrome de Hunter, es un trastorno de almacenamiento lisosómico ligado al cromosoma X pediátrico causado por mutaciones en el gen IDS, que conduce a deficiencias en la enzima iduronato-2-sulfatasa (EC 3.1.6.13). Esta insuficiencia de la enzima IDS, a su vez, afecta el catabolismo tanto del heparán sulfato (HS) como del dermatán sulfato, lo que posteriormente conduce a su acumulación no regulada en el compartimento lisosómico de todas las células (1). La MPS II afecta a 1.3 por cada 100,000 varones nacidos vivos (2-4) e históricamente se ha clasificado como atenuada o grave. Sin embargo, recientemente la mayoría de las perspectivas clínicas han descrito un continuo entre dos extremos, dependiendo de la gravedad de los síntomas (4). MPS II es una enfermedad crónica y progresiva de múltiples sistemas que afecta a una multitud de órganos como el cerebro, el corazón, el esqueleto y las articulaciones. Las manifestaciones clínicas en las formas más leves de MPS II incluyen anomalías esqueléticas graves, conocidas como disostosis múltiple, baja estatura, rigidez articular y hepatoesplenomegalia, acompañadas de síntomas cardiorrespiratorios (4, 5). La MPS II severa también presenta neurodegeneración progresiva, seguida de muerte en la adolescencia debido a enfermedad obstructiva de las vías respiratorias e insuficiencia cardíaca (4, 6, 7).

- La terapia de reemplazo enzimático (ERT), en la que la enzima de reemplazo exógena se administra por vía intravenosa y se internaliza por células que utilizan el receptor de manosa-6-fosfato, se ha utilizado para tratar los síntomas somáticos en pacientes con MPS II independientemente de la gravedad de la enfermedad (8, 9). Sin embargo, la barrera hematoencefálica (BHE) impide que las enzimas que circulan en el torrente sanguíneo lleguen al SNC, lo que reduce considerablemente los beneficios terapéuticos para las dos terceras partes de los pacientes con MPS II que se ven afectados cognitivamente. Además, se han reportado reacciones anafilácticas severas a la enzima de reemplazo (9, 10), así como anticuerpos neutralizantes a la enzima (11), lo que puede disminuir la eficacia del tratamiento (12).

- No se ha diseñado ni aprobado ninguna terapia actual específicamente para tratar los síntomas neurológicos en MPS II, aunque se está desarrollando una amplia variedad de estrategias. En particular, la terapia génica es una posibilidad terapéutica atractiva para un trastorno monogénico como MPS II. La terapia génica con células madre utilizando vectores lentivirales (LV) de segunda generación (13) y la inyección directa de diversos vectores adenoasociados (AAV) en el SNC (5, 14, 15) han arrojado resultados prometedores. Sin embargo, la ampliación desde el cerebro del ratón hasta el cerebro humano es el principal obstáculo, al igual que la distribución adecuada del vector terapéutico en todo el tejido cerebral.

- El trasplante alogénico de células madre, aunque se recomienda para tratar síntomas neurológicos en MPS I Hurler (16-18), ha sido muy variable en el tratamiento del SNC en MPS II y está asociado con altas tasas de morbilidad y mortalidad causadas principalmente por rechazo y enfermedad de injerto contra huésped (19, 20). Se ha sugerido que el nivel de enzima entregado por un alotrasplante, aunque suficiente para eliminar el material de almacenamiento primario en los órganos periféricos, puede ser demasiado bajo en el cerebro y, por lo tanto, es el factor limitante para la corrección neurológica completa (21, 22). De hecho, se ha demostrado que los niveles de enzimas suprafisiológicas en las células madre y progenitoras hematopoyéticas transducidas por el LV (HSPC) y su progenie corrigen las manifestaciones de enfermedades neurológicas en la leucodistrofia metacromática, MPS I y MPS IIIA (21, 23-25). Esto conduce a una reconstitución de las poblaciones de macrófagos y microglías del receptor por células derivadas de HSPC de donantes modificadas genéticamente, que sintetizan y secretan enzimas lisosomales para corregir de forma cruzada las células vecinas (22). Además, las células microgliales corregidas que se originan a partir de progenitores mieloides también pueden contribuir significativamente al recambio de la microglía del SNC, aunque existe controversia con respecto a su mantenimiento y renovación en el SNC de adultos.

- El grado de eficacia de los enfoques de terapia génica de células madre para tratar el SNC parece depender en gran medida del nivel de enzima producida y secretada por las HSC y su progenie (22, 23). Por lo general, se encuentran altos niveles de enzima en el torrente sanguíneo, pero la microvasculatura densa de la BHE impide que ingresen al SNC (26).

- El principal obstáculo en el tratamiento de la neuropatología de las enfermedades que involucran al SNC es evitar la BHE. Una de esas estrategias es tomar como diana a las proteínas para que se trasladen al SNC a través de un proceso conocido como transcitososis, que explota los receptores ubicados en la superficie de la BHE, como el receptor de transferrina (TfR) y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (27). La familia LDLR son receptores de la superficie celular que se unen a complejos de alipoproteína (Apo) y los dirigen a los lisosomas (28). Los complejos de Apo se unen al LDLR en la superficie de la BHE y se someten a transcitososis al lado abluminal antes de ser liberados

de forma previa a la captación por neuronas y astrocitos (29). Varios estudios han explotado esta tecnología mínimamente invasiva fusionando péptidos del dominio de unión a LDLR con enzimas de interés, y han demostrado una entrega eficiente de estas construcciones quiméricas a través de la BHE en modelos animales (29-33).

5 Buscamos aprovechar esta tecnología para tratar de manera eficiente la patología cerebral y el deterioro cognitivo en MPS II fusionando el dominio de unión al receptor de la alipoproteína E humana (ApoE) como una repetición en tándem del gen IDS por medio de un conector flexible invariante en el C-terminal en un vector lentiviral de 3ª generación. Esto permite que las HSPC que se corrigen ex vivo expresen niveles suprafisiológicos de enzima IDS que pueden evitar preferentemente la BHE en animales trasplantados, aumentando así los niveles de enzima que llegan al parénquima cerebral desde el torrente sanguíneo.

10 Un objeto de la presente invención es superar uno o más de los problemas asociados con las terapias propuestas anteriormente para MPSII. También es un objeto de la presente invención proporcionar un tratamiento eficaz para MPSII. Idealmente, tal tratamiento sería relativamente fácil de administrar y tendría un perfil toxicológico bajo. También sería deseable que dicho tratamiento pudiera superar u obviar los problemas relacionados con la administración de tratamientos que necesitan cruzar la barrera hematoencefálica.

15 Resumen de la invención

La invención se describe mediante las reivindicaciones adjuntas de esta memoria descriptiva. Se describe un ácido nucleico que comprende una secuencia del gen iduronato-2-sulfatasa (IDS) y una secuencia del gen de la apolipoproteína E (ApoEII).

20 El ácido nucleico puede comprender además una secuencia conectora intermedia ubicada entre la secuencia de IDS y la secuencia de ApoEII.

La secuencia de IDS puede ser una secuencia de codón optimizado de la secuencia de IDS de tipo silvestre.

La repetición de la secuencia de ApoEII puede ser cadena arriba y/o cadena abajo de la secuencia IDS.

25 La secuencia IDS puede comprender la secuencia según SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2 o una secuencia derivada que tiene al menos un 90% de homología de la misma. Cuando la secuencia es una secuencia derivada, preferiblemente tiene al menos un 93% de homología de la misma. Aún más preferido, la secuencia puede ser una secuencia derivada que tiene al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de homología con SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2.

La secuencia de ApoEII puede comprender una o más secuencias según SEQ ID No. 3 o una secuencia derivada que tiene al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de homología de la misma.

30 La secuencia conectora intermedia puede comprender la secuencia según SEQ ID No. 4 o una secuencia derivada que tiene al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de homología de la misma.

El ácido nucleico divulgado es adecuado para aumentar el nivel en plasma, o la estabilidad en plasma, de la enzima en un individuo.

35 El ácido nucleico puede comprender además una secuencia conectora intermedia ubicada entre la secuencia de enzima y la secuencia de ApoEII.

La secuencia de enzima puede ser una secuencia de codón optimizado de la secuencia de enzima.

La repetición de la secuencia de ApoEII está en forma de repetición en tándem. La repetición de la secuencia de ApoEII puede ser cadena arriba y/o cadena abajo de la secuencia de enzima.

40 La secuencia de ApoEII puede comprender una o más secuencias según SEQ ID No. 3 o una secuencia derivada que tiene al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de homología de la misma.

La secuencia conectora intermedia puede comprender la secuencia según SEQ ID No. 4 o una secuencia derivada que tiene al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de homología de la misma.

45 La enzima puede ser deficiente o estar presente en niveles plasmáticos bajos en individuos que padecen enfermedad por almacenamiento lisosómico. La enfermedad por almacenamiento lisosómico puede comprender mucopolisacaridosis tipo II (MPS II).

50 El ácido nucleico puede ser un ADN, ARN, ADNc o ANP y puede ser recombinante o sintético. Puede ser monocatenario o bicatenario. La secuencia de ácido nucleico se puede derivar mediante clonación, por ejemplo, utilizando técnicas de clonación molecular estándar que incluyen digestión de restricción, ligación, electroforesis en gel (por ejemplo, como se describe en Sambrook et al; Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbour laboratory Press). La secuencia de ácido nucleico puede aislarse o amplificarse usando tecnología de PCR. Tal tecnología puede emplear cebadores basados en la secuencia de la secuencia de ácido nucleico que se va a

amplificar. Con la información de secuencia proporcionada, el experto en la materia puede utilizar las técnicas de clonación disponibles para producir una secuencia de ácido nucleico o un vector adecuado para la transducción en una célula.

- 5 La secuencia de ácido nucleico IDS optimizada por codones puede optimizarse de varias formas para permitir una expresión o actividad mejorada. Por ejemplo, la secuencia puede haberse optimizado seleccionando los codones más comunes en células humanas y/o reduciendo una o más estructuras secundarias y horquillas que pueden surgir en el ARNm formado posteriormente y/o insertando una secuencia Kozak en el sitio de inicio de ATG.

- 10 Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico se provee de, en o como parte de un vector de expresión. Preferiblemente, se puede proveer como un vector de terapia génica, preferiblemente que sea adecuado para la transducción ex vivo en células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) que posteriormente se devuelven al cuerpo de un mamífero para su expresión. El vector puede ser viral o no viral (por ejemplo, un plásmido). Los vectores virales incluyen los derivados de lentivirus, adenovirus, virus adenoasociado (AAV) que incluyen formas mutadas, retrovirus, virus del herpes, virus vacuna, MMLV, GaLV, virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS), VIH, virus de la viruela y SV40. Un vector viral es preferiblemente de replicación defectuosa, aunque se prevé que puede ser de replicación deficiente, de replicación competente o condicional. Un vector viral puede persistir típicamente en un estado extracromosómico sin integrarse en el genoma de las células neurales diana. Un vector viral preferido es un vector lentivirus. El vector viral puede modificarse para eliminar cualquier secuencia no esencial y estas serán evidentes para el destinatario experto.

- 20 El vector viral tiene la capacidad de entrar en una célula. Sin embargo, un vector no viral, como un plásmido, puede complejarse con un agente para facilitar su absorción por una célula diana. Dichos agentes incluyen agentes policationicos. Alternativamente, puede usarse un sistema de entrega tal como un sistema de entrega basado en liposomas.

- 25 También se divulga que el vector es preferiblemente adecuado para uso in o ex vivo o in vitro, y preferiblemente es adecuado para uso en un ser humano. Del modo más preferible, el vector es adecuado para transducir células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) ex vivo.

- 30 El vector comprenderá preferiblemente una o más secuencias reguladoras para dirigir la expresión del ácido nucleico. Una secuencia reguladora puede incluir un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico IDS y ApoEII, un potenciador, una señal de terminación de la transcripción, una secuencia de poliadenilación, un origen de replicación, un sitio de restricción de ácido nucleico y un sitio de recombinación homóloga. Un vector también puede incluir un marcador seleccionable, por ejemplo, para determinar la expresión del vector en un sistema de crecimiento (por ejemplo, una célula bacteriana) o en una célula diana.

- 35 "Enlazado operativamente" significa que la secuencia de ácido nucleico está asociada funcionalmente con la secuencia a la que está enlazada operativamente, de tal manera que están enlazadas de tal manera que afectan la expresión o función entre sí. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico unida operativamente a un promotor tendrá un patrón de expresión influenciado por el promotor.

- También se divulgan células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) para uso en el tratamiento, manejo, retraso de la progresión o normalización de la mucopolisacaridosis tipo II (MPS II) en un individuo, donde las HSPC se han eliminado del paciente, transducidas ex vivo con el ácido nucleico como se describe anteriormente en el presente documento, y las HSPC transducidas se administran al individuo.

- 40 Mientras que el aspecto anterior de las HSPC utiliza preferiblemente las HSPC autólogas (cuando se han eliminado por primera vez del paciente o del individuo), las HSPC alogénicas también se pueden utilizar, eliminando por lo tanto la necesidad de que las HSPC se eliminen del paciente o del individuo, se transduzcan ex vivo y luego se administren al paciente o individuo. Las HSPC alogénicas pueden derivarse de la sangre umbilical.

También se divulga una composición que comprende:

- 45 a) una primera fracción que comprende iduronato-2-sulfatasa (IDS); y  
b) una segunda fracción que comprende una repetición en tándem de la apolipoproteína E (ApoEII)

La segunda fracción puede estar cadena arriba y/o cadena debajo de la primera fracción.

La primera y segunda fracción pueden tener una fracción conectora intermedia ubicada entre ellas.

- 50 La secuencia de aminoácidos de la primera fracción puede comprender la secuencia según SEQ ID No. 5 o una secuencia derivada que tenga al menos un 90% de homología de la misma. Cuando la secuencia es una secuencia derivada, preferiblemente tiene al menos un 93% de homología de la misma. Aún más preferido, la secuencia puede ser una secuencia derivada que tenga al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de homología con SEQ ID No. 5.

La secuencia de aminoácidos de la segunda fracción puede comprender una o más secuencias según SEQ ID No. 7 o una secuencia derivada que tiene al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos al menos un 99% de homología de la misma.

- 5 La secuencia de aminoácidos de la fracción conectora intermedia puede comprender la secuencia según SEQ ID No. 8 o una secuencia derivada que tiene al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de homología de la misma.

La composición es para uso en el tratamiento, manejo, retraso de la progresión o normalización del desarrollo de mucopolisacaridosis tipo II (MPS II) en un individuo.

- 10 El término 'secuencia de genes' pretende cubrir las secuencias de ácidos nucleicos que en general son capaces de expresarse en la proteína requerida, incluidas las secuencias genómicas y las secuencias en las que uno o más elementos no codificantes (como intrones) no están presentes, incluidos ADNc.

En todas las divulgaciones anteriores, las composiciones, ácidos nucleicos, vectores, polipéptidos y células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) son para uso en el tratamiento, manejo, retraso de la progresión o normalización de mucopolisacaridosis tipo II (MPS II) o síndrome de Hunters.

- 15 Las composiciones, ácidos nucleicos, vectores y polipéptidos pueden ser líquidos o sólidos, por ejemplo, un polvo, gel o pasta. Preferiblemente, una composición, ácido nucleico, vectores, polipéptidos y células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) es un líquido, preferiblemente un líquido inyectable. Tal líquido inyectable será preferiblemente adecuado para administración intravenosa e intracraneal.

- 20 Las composiciones, ácidos nucleicos, vectores y polipéptidos de los aspectos precedentes de la divulgación pueden comprender además un excipiente, adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable y proporcionar una formulación.

- 25 Por "farmacéuticamente aceptable" se incluye que la formulación es estéril y libre de pirógenos. Los vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica de la farmacia. El vehículo o vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los agentes de la divulgación y no perjudiciales para los destinatarios de los mismos. Normalmente, los vehículos serán agua o solución salina que serán estériles y libres de pirógenos; sin embargo, pueden usarse otros vehículos aceptables.

En terapia humana, las formulaciones de la (s) divulgación (es) se pueden administrar solas, pero generalmente se administrarán mezcladas con un excipiente farmacéutico diluyente o vehículo adecuado seleccionado con respecto a la vía de administración pretendida y la práctica farmacéutica estándar.

- 30 Las formulaciones de la (s) divulgación (es) también se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea, o pueden administrarse mediante técnicas de infusión. Se utilizan de la mejor manera en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer que la solución sea isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben tener pH regulado adecuadamente (preferiblemente un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se logra fácilmente mediante técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

- 35 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, reguladores de pH, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del destinatario pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o multidosas, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en un estado secado por congelamiento (liofilizado) lo que solo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo anteriormente descrito.

También se divulga un ácido nucleico incorporado en un vector viral para su uso en el tratamiento de MPS II o síndrome de Hunters, en donde el vector viral comprende la secuencia génica que codifica una proteína deficiente que está implicada en la enfermedad y que está ligada a una repetición en tándem de la secuencia del gen de la apolipoproteína E (ApoEII), en donde la proteína es IDS.

- 50 El vector se transduce preferiblemente, ex vivo, con una población de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) y las HSPC transducidas se administran a un individuo que padece la enfermedad.

El vector puede comprender una secuencia para un conector flexible invariante entre la secuencia del gen que codifica la proteína deficiente y la repetición en tándem de la secuencia del gen de la apolipoproteína E (ApoEII).

La secuencia del gen de repetición en tándem de ApoEII puede comprender la secuencia según SEQ ID No. 3 o secuencias variantes que tienen hasta un 95%, hasta un 96%, hasta un 97%, hasta un 98% o hasta un 99% de homología de la misma, mientras que la secuencia conectora flexible invariante puede comprender la secuencia según SEQ ID No. 4 o secuencias variantes que tienen hasta 95%, hasta 96%, hasta 97%, hasta 98% o hasta 99% de homología de la misma.

Se divulga además una combinación de un ácido nucleico que comprende una secuencia del gen iduronato-2-sulfatasa (IDS) y una repetición de la secuencia del gen de la apolipoproteína E (ApoEII) y una o más células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC), en donde el ácido nucleico es capaz de transducir las HSPC.

Las HSPC serán preferiblemente autólogas, es decir que se derivan del individuo al que se van a administrar las HSPC transducidas. Alternativamente, las HSPC pueden ser alogénicas, es decir que se derivan de un individuo diferente de aquel al que se van a administrar las HSPC transducidas.

Sorprendente y ventajosamente, los presentes inventores han demostrado con éxito que fusionando el dominio de unión al destinatario de la alipoproteína E humana (ApoE) como una repetición en tándem al gen IDS por medio de un conector flexible invariante en el C-terminal en un vector lentiviral de 3ª generación, tratan eficazmente la patología cerebral y el deterioro cognitivo en MPS II. Esto permite que las HSPC que se corrigen ex vivo expresen niveles suprafisiológicos de enzima IDS que pueden evitar preferentemente la BHE en animales trasplantados, aumentando así los niveles de enzima que llegan al parénquima cerebral desde el torrente sanguíneo.

En este documento, la referencia a "un" o "una" incluye dentro de su alcance tanto el singular como el plural, es decir, uno o más.

A menos que se indique lo contrario, las características de cada divulgación se aplican a las otras divulgaciones, mutatis mutandis.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta especificación, las palabras "comprenden" y "contienen" y sus variaciones significan "que incluyen, entre otros," y no pretenden excluir (ni excluyen) otras fracciones, aditivos, componentes, números enteros o pasos. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, la memoria descriptiva debe entenderse como que contempla tanto la pluralidad como la singularidad, a menos que el contexto requiera lo contrario.

Rasgos, números enteros, características, compuestos, fracciones químicas o grupos descritos junto con un aspecto, forma de realización o ejemplo particular de la divulgación deben entenderse como aplicables a cualquier otro aspecto, forma de realización o ejemplo descritos en este documento a menos que sea incompatible con el mismo.

#### Descripción detallada de la invención

Se ilustrarán ahora aspectos y formas de realización de la presente invención, a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas.

La Figura 1 muestra la generación y validación de una nueva enzima IDS que cruza la barrera hematoencefálica in vitro. (a) Representación esquemática que muestra los vectores lentivirales pCCL que codifican el gen IDS humano optimizado por codón, o el gen IDS humano seguido de un conector flexible y la secuencia del péptido ApoEII como una repetición en tándem. Ambos vectores lentivirales son dirigidos por el promotor CD11b humano. (b) Representación esquemática y secuencias del conector invariante y la repetición en tándem de ApoEII añadidas en el extremo C-terminal del gen IDS. (c) Gráficos que muestran la actividad de la enzima IDS intracelular medida en una línea celular microglial humana (CHME3) después de la transfección con 2 µg de ADN plasmídico de LV.IDS o LV.IDS.ApoEII durante 24 horas, y medida 48 horas después de la transfección. n=3. (d) Actividad de la enzima IDS secretada medida en células microgliales humanas transfectadas (CHME3) con 2 µg de ADN plasmídico de LV.IDS o LV.IDS.ApoEII durante 24 horas, y medida 48 horas después de la transfección. n = 3. (e) Actividad de la enzima IDS secretada medida en células microgliales humanas transfectadas (CHME3) con 2 µg de ADN plasmídico de LV.IDS o LV.IDS.ApoEII durante 24 horas, y se midió 48 horas después de la transfección. n = 3 ANOVA unidireccional, \*\*=p<0.01 frente a no transfectados. (F) Captación de IDS o IDS.ApoEII del medio en células bEND.3 después de 24 horas, n=3 pocillos/condición (G) Captación mediada por destinatario de IDS o IDS.ApoEII a M6PR o LDLR 24 horas después del bloqueo con M6P de 7.5 mM o 50 µg/ml de apoE recombinante humana durante 4 horas, n=3 pocillos/condición. Los datos se muestran como media ± SEM, ANOVA bidireccional, \*p <0.05, \*\*=p <0.01, \*\*\*\*=p <0.0001 las comparaciones se indican entre paréntesis;

La Figura 2 muestra que LV.IDS y LV.IDS.ApoEII mejoran la actividad IDS específica del cerebro y expresan niveles suprafisiológicos de IDS activos en órganos periféricos. (a) Representación esquemática de la estrategia de terapia génica con células madre. A ratones MPS II de 6-8 semanas de edad acondicionados con busulfano se trasplantaron 4x10<sup>5</sup> lin-HSC transducidas con LV.IDS o LV.IDS.ApoEII en una MOI de 100, o 1x10<sup>7</sup> células de médula ósea totales. (b) Gráfico que muestra el número de copias del vector y (c) Gráfico que muestra la actividad de la enzima IDS se midió en HSC transducidas a partir de ensayos de unidades formadoras de colonias en el trasplante. (d) El gráfico que muestra el quimerismo del donante en los glóbulos blancos se midió mediante citometría de flujo a las 4 semanas

después del trasplante en todos los ratones trasplantados. (e) Gráfico que muestra el número de copias del vector y (f) Gráfico que muestra la actividad de la enzima IDS se midió en órganos tomados a los 8 meses de edad, incluyendo BM, glóbulos blancos/plasma, bazo y cerebro, de ratones de control y tratados (n=6). (l) El gráfico que muestra la actividad de la enzima IDS se midió en el corazón del control tomado a los 8 meses de edad. (g) Gráfico que muestra la correlación entre VCN y actividad enzimática en ratones individuales en médula ósea, glóbulos blancos/plasma, bazo y cerebro (n=6) (M) Correlación entre la actividad enzimática de IDS en plasma y la proteína IDS medida por ELISA. Se analizaron los niveles de actividad de la enzima lisosomal  $\beta$ -hexosaminidasa en el plasma (N), el bazo (O) y el cerebro (P) de ratones de 8 meses de edad. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, ANOVA unidireccional, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs. MPSII, se indican otras comparaciones por paréntesis;

La Figura 3 muestra que LV.IDS.ApoEII corrige anomalías cognitivas en ratones MPS II, y todos los trasplantes mejoran la coordinación y el equilibrio. (a) Representación esquemática de la prueba del laberinto en Y. Los ratones se colocan en el centro y se les permite explorar libremente durante 10 minutos. (b) El gráfico que muestra la alternancia espontánea en el laberinto en Y se midió en ratones de control y tratados a los 8 meses de edad, y (c) El gráfico que muestra el número total de entradas se registró como una medida indirecta de la actividad locomotora. (d) Representación de la varilla giratoria en aceleración. (e) Gráfico que muestra los ratones de control y tratados de 8 meses de edad se probaron 3 veces en la varilla giratoria de aceleración durante un máximo de 300 segundos (4-4 rpm durante 300 segundos);

La Figura 4 muestra que LV.IDS.ApoEII normaliza las citocinas asociadas con la neuroinflamación en ratones de 8 meses de edad. (a) - (c) Se realizaron gráficos que muestran matrices de perlas de citocinas que miden MIP-1a, MCP-1, IL-1 $\alpha$  y RANTES en lisado de cerebro entero de ratones de 8 meses usando citometría de flujo (n=6). (e) Gráficos que muestran las cantidades relativas totales del HS total. (f) análisis composicional de disacáridos de HS de ratones de control y tratados (n=6) analizados a partir de muestras de cerebro. (g) Imágenes representativas de secciones de 30  $\mu$ m de la corteza motora (M2) y el cuerpo estriado teñidas con isolectina B4 (ILB4) para identificar la microglía activada, 40x. Se contaron cuatro secciones de 30  $\mu$ m por ratón de la corteza (h) y estriado (i) para el número de células positivas para ILB4 (de aproximadamente 0.26 mm a -1.94 mm de bregma), n=3/grupo. Barra de escala: 50  $\mu$ m. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, ANOVA unidireccional, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  vs. MPSII, se indican otras comparaciones por paréntesis;

La Figura 5 muestra que WT-HSCT, LV.IDS y LV.IDS.ApoEII normalizan anomalías esqueléticas graves en ratones MPS II. (a) Imágenes de rayos X de cráneos de ratones MPS II tratados y de control a los 8 meses de edad. (b) Gráfico que muestra el ancho del arco cigomático (c) Gráfico que muestra el ancho del húmero. (d) Gráfico que muestra el ancho del fémur se analizó utilizando el software ImageJ (n=5-11); Matrices de perlas de citocinas que midieron (E) MCP-1, (F) MIP-1a y (G) RANTES y se realizaron en lisados de hígado de ratones de 8 meses de edad usando citometría de flujo, n=4-6. Expresión génica de (H) Nppb y (I) Myh7 en corazones de animales de control y tratados con MPS II (WT n=3, MPS II n=4, WT-HSCT, LV.IDS y LV.IDS.ApoEII n=6). (J) Se midieron los títulos de anticuerpos IgG específicos de IDS en plasma. (K) Se determinaron los anticuerpos IgG totales contra IDS en muestras de plasma mediante ELISA (Pos. Control n=1, control negativo n=6, LV.IDS/LV.IDS.ApoEII n=6). Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, ANOVA unidireccional, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  frente a MPSII;

La Figura 6 muestra que la acumulación primaria de heparán sulfato y su patrón de sulfatación en el cerebro está completamente normalizado a los niveles de WT usando LV.IDS.ApoEII, sin LV.IDS. (A) Se analizaron las cantidades relativas totales de HS y (B) el análisis de disacárido de composición de HS de los ratones de control y tratados a partir de muestras de cerebro, n=6/grupo. (C) Imágenes representativas de secciones cerebrales de 30  $\mu$ m de la corteza motora (M2), putamen caudado (ambos a aproximadamente -0.46 mm de bregma), hipocampo (CA3) y amígdala (ambos a aproximadamente -1.22 mm de bregma) de ratones de control y tratados teñidos con NeuN (núcleos neuronales; verde) y LAMP2 (compartimento lisosómico; rojo), n=6/grupo, 40x, se realizaron ajustes no lineales por igual en todas las imágenes para reducir el fondo; gamma 0.72, niveles de entrada 0-190. Barra de escala: 50  $\mu$ m. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, ANOVA unidireccional, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs. MPSII, se indican otras comparaciones por paréntesis;

La Figura 7 muestra que LV.IDS.ApoEII normaliza la astrogliosis en ratones MPS II de 8 meses de edad. (A) Imágenes representativas de secciones cerebrales de 30  $\mu$ m de la corteza motora (M2, aprox. -0.46 mm desde bregma), putamen caudado (aprox. -0.46 mm desde bregma), hipocampo (CA3) y amígdala (ambos aprox. -1.22 mm desde bregma) de ratones de control y tratados teñidos con GFAP (proteína ácida fibrilar glial; verde) y LAMP2 (compartimento lisosómico; rojo), n=6/grupo, 40x, se realizaron ajustes no lineales por igual en todas las imágenes para reducir el fondo; gamma 0.72, niveles de entrada 0-190. Barra de escala: 50  $\mu$ m. La inmunofluorescencia de GFAP se cuantificó en la corteza (B) y la amígdala (C) de ratones MPS II de 8 meses de edad, n=3/grupo, AU: unidades arbitrarias. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, ANOVA unidireccional, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  frente a MPSII, otras comparaciones se indican por paréntesis;

La Figura 8 muestra un diagrama esquemático que ilustra el mecanismo de acción propuesto de la enzima IDS.ApoEII en ratones MPS II que permite que IDS.ApoEII corrija el fenotipo cognitivo en ratones MPS II. El residuo de ApoEII permite que el IDS permanezca activo durante más tiempo en el plasma, lo que aumenta el tiempo de circulación y aumenta las posibilidades de cruzar al SNC, mientras que el IDS no modificado se degrada rápidamente a una forma inactiva. Dentro del cerebro, la microglía corregida derivada de la médula ósea secreta IDS o IDS.ApoEII en niveles

similares, pero la captación de IDS.ApoEII es más eficiente y, junto con una estabilidad mejorada, conduce a una mejor corrección del almacenamiento primario y la neuroinflamación; y

La Figura 9 muestra gráficos e imágenes de tinción inmunofluorescente que muestran una mayor estabilidad del plasma y una captación mejorada por las células endoteliales del cerebro a través de múltiples mecanismos. (A) Eliminación plasmática de la proteína IDS medida en ratones MPS II inyectados con 12 ng de enzima IDS total 1, 10 y 30 minutos después de la inyección, n=2/grupo. (B) Correlación entre la actividad de la enzima IDS en plasma y la proteína IDS medida por ELISA. (C) Captación de FITC-dextrano en células bEND.3. (D, E) Tinción inmunofluorescente para LDLR (D) o LRP1 (E) en células bEND.3. (F) Captación de IDS o IDS.ApoEII producida por células CHME3 añadidas a medios de crecimiento de células bEND.3 cultivadas en cultivo monocapa durante 24 horas. n=2 experimentos independientes, con 3 pozos/condición. (G) Captación de IDS o IDS.ApoEII producida por células CHME3 añadidas a medios de crecimiento de células bEND.3 cultivadas en cultivo transwell durante 24 horas. n=3 experimentos independientes, con 2 pozos/condición. (H) Porcentaje de transcitos a la capa basal de células bEND.3 de G. (I) Captación mediada por destinatarios de IDS o IDS.ApoEII después de 24 horas, después del tratamiento con heparinasa de la capa celular o bloqueo con M6P de 7.5 mM o 50 µg/ml de ApoE recombinante humana durante 1 hora antes de la adición de la enzima. n=3 pozos/condición. Los datos son la media ± SEM, ANOVA unidireccional o prueba T según corresponda, \*=p<0.05, \*\*=p<0.01, \*\*\*=p<0.001, \*\*\*\*=p<0.0001 vs.MPS II.

#### Ejemplo 1

Se llevaron a cabo experimentos para transducir un vector que contenía un IDS optimizado por codón con células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) que posteriormente se probaron en un modelo de ratón para la expresión de IDS y, en particular, para evaluar la cantidad de IDS que pasa a través de la barrera hematoencefálica.

#### Vectores de expression

Se adaptó ADNc de IDS humano (SEQ ID No. 2) para formar ADNc de IDS optimizado con codones (colDS) (SEQ ID No. 1) y se sintetizó usando tecnología GeneArt (ThermoFisher, Paisley, Reino Unido) y se clonó en el LV pCCL.sin.cPPT.hCD11b.ccdB.wpre de tercera generación usando la clonación de Gateway para crear pCCL.sin.cPPT.hCD11b.IDS.wpre. Se insertó un vector adicional que contenía la secuencia de ADNc (SEQ ID No. 3) de la secuencia de péptidos dirigidos al cerebro ApoEII como una repetición en tándem (LRKLRKRLRLRKLRLRL) (SEQ ID No. 7) cadena abajo del ADNc de IDS humano optimizado por codón usando la secuencia larga de ADNc del conector invariante (SEQ ID No. 4) para proporcionar un conector LGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID No. 8) (32). Los plásmidos se optimizaron por codones y se sintetizaron usando tecnología GeneArt y se clonaron como se describió previamente en una estructura lentiviral de 3ª generación. La secuencia de aminoácidos para el ADNc de IDS humano (SEQ ID No. 2) se referencia como SEQ ID No. 6, en donde la secuencia de aminoácidos para el ADNc de colDS (SEQ ID No. 1) se referencia como SEQ ID No. 5. Las secuencias de aminoácidos resultantes, tanto para el ADNc de IDS humano como para el ADNc de colDS, son las mismas.

#### Transfección y corrección cruzada

Se transfectaron células microgliales humanas (CHME3) con 2 µg de ADN del plásmido CD11b.IDS o CD11b.IDS.ApoEII usando polietilenimina lineal de alta potencia de 7.5 mM (pH 7.4, PM 40,000, Polysciences Inc., Warrington, PA, EE. UU.) y NaCl de 150 mM. Las células se recolectaron 48 horas después de la transfección en regulador RIPA (NaCl 150 mM, Triton-X100 al 1%, desoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 0.1%, Tris de 50 mM, pH 8) y se incubaron en un agitador a 4°C durante 30 minutos, seguido de centrifugación a 14,000 rpm, 4°C durante 20 minutos. Los lisados celulares se recogieron y almacenaron a -80°C. Los sobrenadantes del medio se recogieron 48 horas después de la transfección y se centrifugaron a 1000 rpm, 4°C durante 10 minutos para eliminar los residuos celulares y se almacenaron a -80°C.

#### Producción y titulación de LV

Se produjo LV (25) mediante transfección transitoria de células HEK 293T con pMD2G, pΔ8.91gag/pol, plásmido LV (24, 25, 34, 35) y polietilenimina de 7.5 mM (40kDa, Polysciences, Warrington, PA, EE.UU.) (36). Las partículas de vector lentivírico se concentraron por centrifugación a 21,191 g durante 150 minutos a 4°C, se resuspendieron en regulador de formulación (PBS, 1 mg/ml de albúmina de suero humano, 5µg/ml de sulfato de protamina, 40 mg/ml de lactosa, pH 7.2). Se transdujeron células de linfoma de ratón EL4 (ATCC TIB-39; ATCC, Manassas, VA, EE.UU.) con tres diluciones de LV concentrado y se recogieron 72 horas después. El ADN genómico se extrajo usando el kit GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido). El número de genomas virales integrados por célula se determinó mediante PCR cuantitativa utilizando una curva estándar generada por diluciones de ADN genómico de un clon de línea celular EL4 que contiene 2 copias 2 copias integradas/célula de pHRsin.SFFV.eGFP.att.wpre (ALS EL4 eGFP 2.2) (24). Se usaron un cebador y una sonda contra wpre (TAMRA) como se describió previamente (24, 25) y se estandarizaron contra gapdh de roedor (VIC) (Applied Biosystems, Paisley, Reino Unido).

#### Procedimientos de trasplante y ratones



Se obtuvieron hembras heterocigotas para el alelo ligado a X del Prof. Joseph Muenzer (Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill, NC, EE. UU.) y se cruzaron con machos C57BL/6J de tipo silvestre (Envigo, Alconbury, Reino Unido) para obtener machos y hembras de tipo silvestre, y machos hemicigotos afectados y hembras portadoras. Las MPSII se retrocruzaron sobre el fondo congénico PEP3 CD45.1 (B6.SJL-*Ptprca<sup>u</sup>Pepc<sup>b</sup>*/BoyJ) para distinguir las células de donante y destinatario como se describió previamente (24). Se utilizaron compañeros de camada WT como controles en todo momento.

Se aislaron células mononucleares de médula ósea totales de ratones MPSII de fémures y tibias, y se agotó el linaje usando el kit de agotamiento de células de linaje murino (Miltenyi Biotec, Bisley, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante. Las células se resuspendieron a  $1 \times 10^6$  células/ml en medio X-Vivo-10 (BioWhittaker) que contenía albúmina de suero bovino al 2% y se estimularon usando 100 ng/ml de factor de células madre murinas, 100 ng/ml de tirosina quinasa-3 similar a fms murina y 10 ng/ml de interleucina-3 murina recombinante (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EE.UU.) durante 3 horas antes de la transducción con un vector lentiviral durante 20-24 horas con una multiplicidad de infección de 100.

Se sometieron a mieloablación ratones de seis a ocho semanas de edad alojados en jaulas ventiladas individualmente utilizando 125 mg/kg de Busulfano (Busilvex; Pierre Fabre, Castres, Francia) en cinco dosis diarias (25 mg/kg/día) mediante inyección intraperitoneal. Antes de la mieloablación, los ratones recibieron agua acidificada (pH 2.8), alimentos irradiados y puré. Dentro de las 24 horas posteriores a la recepción de la última inyección de busulfán, se inyectaron a los ratones  $3-4 \times 10^5$  células madre hematopoyéticas transducidas de linaje agotado a través de la vena lateral de la cola. Para los trasplantes de tipo silvestre (WT-HSCT), los ratones recibieron  $1-2 \times 10^7$  células totales de médula ósea no transducidas.

#### Análisis de quimerismo mediante citometría de flujo

Se evaluó el injerto de células madre hematopoyéticas del donante 4 semanas después del trasplante en sangre periférica. Las células se tiñeron con CD45.1-PE anti-ratón (HSC de donante), CD45.2-FITC (HSC de destinatario), CD3-Per-Cy5 (células T), CD19-APC-Cy7 (células B) y CD11b-Per-Cy7 (macrófagos/microglia) (BD Pharmingen, Oxford, Reino Unido) en una solución al 5% de yoduro ToPro3 (ThermoFisher Scientific, Paisley, Reino Unido) y se analizaron en un citómetro de flujo (BD) BD FACS Canto II.

#### Tratamiento de muestras

A los 8 meses de edad, los ratones fueron anestesiados y perfundidos transcárdialmente con solución salina de pH regulado con fosfato a 37°C para eliminar la sangre de los órganos. Un hemisferio cerebral se fijó en paraformaldehído al 4% durante 24 horas, se transfirió a sacarosa al 30%, 2 mmol/l de MgCl<sub>2</sub>/solución salina de pH regulado con fosfato durante 48 horas antes de congelar a -80°C. Se congelaron rápidamente trozos de cerebro, bazo, corazón, riñón, músculo e hígado en hielo seco y se almacenaron a -80°C. Para los ensayos de actividad enzimática de IDS, las muestras se homogeneizaron y se sometieron a ultrasonido en regulador de homogeneización (0.5 mol/l de NaCl, 0.02 mol/l de Tris, 0.1% de Triton-X100, pH 7-7.5) antes de centrifugar a 14000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Se recolectaron muestras de médula ósea lavando una tibia y fémur con 1 ml de FBS/PBS al 2%, se filtraron usando un filtro de 70 µm y se lisaron usando regulador de lisis de glóbulos rojos (NH<sub>4</sub>Cl de 150 mM, KHCO<sub>3</sub> de 10 mM, EDTA de 0.1 mM, pH 7.2-7.4). El sobrenadante se recogió y se almacenó a -80°C. El ADN genómico utilizado para el análisis de VCN de órganos se extrajo utilizando el kit GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep.

#### Actividad de la enzima IDS

La actividad de la enzima IDS se midió en un protocolo de dos pasos usando el sustrato fluorescente MU-aldoA-2S (Carbosynth, Compton, Reino Unido) y laronidasa (Aldurazyme, Genzyme) como sustrato del segundo paso como se describió previamente (37). La cantidad de material de partida se estandarizó a 20 µg de proteína total para plasma, 40 µg para hígado, bazo y médula ósea y 60 µg para cerebro usando un ensayo BCA (ThermoFisher).

#### Preparación de glicosaminoglicanos purificados

Las fracciones de cerebro solubles se recogieron y se trataron como se describió previamente (38). Brevemente, el tejido cerebral se homogeneizó mecánicamente y se trató con pronasa (1 mg/tejido) en 3 ml de PBS durante 4 horas a 37°C. Se añadieron 30 µl de TritonX100 a cada muestra para una concentración final del 1% y se incubó durante una hora a temperatura ambiente antes de una segunda adición de 1 mg de Pronasa durante 4 horas a 37°C. Las muestras se cargaron en una columna DEAE-Sephacel preequilibrada y se eliminó el hialuronano lavando la columna con 50 ml de NaCl de 0.25M/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O de 20mM (pH 7). Los GAG se eluyeron con 5 ml de NaCl de 1.5M/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O de 20mM (pH 7), se desalaron usando una columna PD10 (Amersham, GE Healthcare) y se liofilizaron.

#### Digestiones con heparinasa de HS y DS seguidas de análisis etiquetado con AMAC

Las cadenas de HS se digirieron usando 5 mIU de cada una de heparinasa I, II y III (Seikagaku, Tokio, Japón) en 100 µl de acetato de sodio de 0.1 M y acetato de calcio de 0.1 M (pH 7). Los disacáridos resultantes se liofilizaron, se redisolviaron en 20 µl de 2-aminoacridona (AMAC) de 0.1 M en Me<sub>2</sub>SO al 85%/ácido acético al 15% (v/v) y se incubaron

a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron 20 µl de NaBH<sub>3</sub>CN a cada muestra y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Los disacáridos etiquetados con AMAC se separaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa usando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1 x 500 mm, 3.5 µm) (Agilent Technologies, Stockport, Reino Unido).

## 5 Matriz de microesferas citométricas (CBA)

- Se midieron los niveles de IL-1α, MCP-1, MIP-1α y RANTES en extractos de cerebro entero a los 8 meses de edad (n=6/grupo) usando kits de matriz de microesferas citométricas (Cytometric Bead Array o CBA) de BD (BD Biosciences, Oxford, Reino Unido) (40). El análisis se realizó en un citómetro de flujo FACS Canto II(BD). La identificación de la población de microesferas singlete se realizó utilizando el gráfico FSC frente a SSC, y cada microesfera de citocina individual se separó usando APC y APC-Cy7, con los niveles de citocinas medidos usando PE. Los resultados se exportaron y analizaron utilizando el software FCAP Array (BD). Las concentraciones de proteínas de cerebro se obtuvieron utilizando el ensayo BCA y los niveles de citocinas se estandarizaron al nivel de proteína para cada muestra.

## Análisis de comportamiento

### Varilla giratoria

- 15 La prueba de la varilla giratoria se utilizó para evaluar la coordinación motora y el equilibrio a las 32 semanas de edad como se describió previamente con modificaciones menores (41). Se entrenaron ratones machos (WT, n=16, MUT, n=12, grupos de tratamiento n=12-16) en la varilla giratoria (Ugo Basile, Varese, Italia) en tres ensayos de entrenamiento (4 rpm durante 120 segundos; 4 rpm durante 300 segundos; 4-40 rpm durante 300 segundos) con un intervalo de 30 minutos entre cada sesión. Se llevaron a cabo tres ensayos de prueba 24 horas después del
- 20 entrenamiento. Para las pruebas de prueba, la varilla giratoria giraba a una velocidad de aceleración de 4 a 40 rpm durante 300 segundos, con un descanso de 5 minutos entre cada prueba. La latencia de caída se registró para todos los ensayos de entrenamiento y prueba, y la latencia de caída se calculó como porcentaje del tiempo total de prueba.

### Alternancia espontánea

- 25 Se evaluó la memoria de trabajo espacial en todos los ratones a las 32 semanas de edad usando la prueba de alternancia espontánea (41, 42). La alternancia espontánea se evaluó en una única prueba de 10 minutos en un laberinto en Y que consta de tres brazos idénticos. El ratón de prueba se colocó en el medio de los tres brazos y se le permitió explorar libremente. La alternancia espontánea se describió como entradas sucesivas en tres brazos, en conjuntos de tripletes superpuestos. El efecto se calculó como porcentaje de alternancia = [no. de alternancias / (número total de entradas de brazo - 2)] x 100.

## 30 Imágenes de rayos X de ratones vivos

Los ratones de control y tratados se anestesiaron usando isoflurano y se radiografiaron (45keV) usando el sistema Bruker InVivo Xtreme equipado con una cámara CCD digital de alta sensibilidad, retroiluminada de 4 MP y 16 bits. Las imágenes de rayos X se analizaron utilizando el software ImageJ para el ancho de los huesos individuales.

## Estadísticas

- 35 El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA, EE.UU.). Se aplicaron pruebas t paramétricas no apareadas de dos colas para las comparaciones de grupos individuales con una significación establecida en p<0.05. Se realizaron ANOVA unidireccionales para el análisis multigrupo seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

## Desarrollo y validación in vitro de la enzima IDS dirigida a la barrera hematoencefálica

- 40 Durante los experimentos, los inventores buscaron desarrollar una nueva enzima sulfatasa específica de MPS II que fuera capaz de cruzar eficazmente la BHE mediante el uso de LDLR por medio de transcitos mediada por destinatario. Se construyeron nuevos vectores lentivirales que codifican IDS humana sola, o IDS humana ligada a la región de unión al destinatario ApoE humano como una repetición en tándem, bajo el promotor CD11b específico de mieloides humano (como se ilustra en la Figura 1a).

- 45 Esta sulfatasa se modificó añadiendo un conector flexible invariante al C-terminal del gen de IDS, seguido de la secuencia optimizada por codón de la porción de unión al destinatario de la ApoE humana como una repetición en tándem (como se ilustra en la Figura 1b). Normalmente, la adición de un conector y un péptido puede alterar el plegamiento de proteínas y afectar negativamente a la actividad enzimática.

- 50 Para verificar que la construcción inventiva todavía permitía la sobreexpresión y secreción de IDS, se transfectó una línea celular microglial humana (CHME3) con ADN plasmídico que expresaba LV.IDS o LV.IDS.ApoEII. Se observaron aumentos de 26 y 24 veces en la actividad celular con LV.IDS y LV.IDS.ApoEII, respectivamente (como se muestra en la Figura 1c). Más importante aún, se detectaron aumentos de 84 y 81 veces en la actividad de IDS secretada 72 horas después de la transfección (Figura 1d). En particular, esto demuestra que las modificaciones C-terminales no impactan negativamente en la secreción o expresión de la enzima IDS modificada in vitro. Se detectó una captación

significativamente mayor de IDS.ApoEII sobre IDS en células bEND.3 endoteliales de ratón después de 24 horas (Figura 1E, 1F), predominantemente, pero no exclusivamente, a través de los destinatarios de M6P (Figura 1F)

La terapia génica con células madre mediada por LV.IDS y LV.IDS.ApoEII mejora la actividad de la enzima IDS en el cerebro y expresa niveles suprafisiológicos de IDS activa en órganos periféricos

- 5 Se trasplantaron  $4 \times 10^5$  células madre hematopoyéticas de linaje agotado (HSC) de donantes de MPS II transducidas con LV.IDS o LV.IDS.ApoEII, que expresan IDS o IDS.ApoEII, en 16 destinatarios ratón MPS II de 6-8 semanas de edad, acondicionados con busulfano (como se ilustra en la Figura 2a). También se inyectaron células de médula ósea totales no modificadas en destinatarios MPS II sometidos a mielo-ablación completa, equivalente a un trasplante de células madre alogénicas, y en adelante se denominan WT-HSCT.
- 10 Se midieron la actividad de IDS y el número de copias del vector (VCN) en HSC de linaje agotado (lin-HSC) aisladas de ensayos de unidades formadoras de colonias (CFU) antes del trasplante. Los experimentos demostraron un número medio de copias de vector de 3,1 y 3,8 en las HSC transducidas con LV.IDS y LV.IDS.ApoEII (como se muestra en la Figura 2b) y la sobreexpresión de la enzima IDS en 124 y 152 veces más que WT, respectivamente (como se muestra en la Figura 2c). Estos datos demuestran una correlación positiva entre el número de integraciones del genoma del vector y la sobreexpresión enzimática en las células hematopoyéticas. El análisis de citometría de flujo de los glóbulos blancos periféricos a las 4 semanas posteriores al trasplante demostró el injerto completo de células transducidas en los destinatarios de MPS II, logrando entre el 80 y el 100% de las células CD45.1+ del donante (como se muestra en la Figura 2d).

- 20 Para evaluar la eficacia terapéutica de esta nueva terapia génica en MPS II, se sacrificaron 6 animales de cada grupo a los 8 meses de edad para el análisis bioquímico de órganos centrales y periféricos. Se detectaron integraciones de vector en BM total, glóbulos blancos, bazo y cerebro, con una media significativamente menor en ratones tratados con LV.IDS.ApoEII en glóbulos blancos solamente (como se muestra en la Figura 2e). Un pequeño número de animales mostró consistentemente VCN más bajos en todos los órganos evaluados, pero recibieron HSC modificadas en procedimientos de trasplante separados. Se observaron niveles suprafisiológicos de IDS en la BM, el plasma y el bazo para los grupos tratados con LV.IDS y LV.IDS.ApoEII. Los niveles de actividad de la enzima IDS en el cerebro también se elevaron en comparación con los animales MPS II no tratados, y son equivalentes a entre el 1.5% y el 8% de la actividad IDS normal en los cerebros WT. Los trasplantes de WT-HSCT restauraron niveles de IDS equivalentes a WT en BM, plasma y bazo solamente, mientras que no se detectó un aumento notable en la actividad de IDS en el cerebro con respecto a los animales MPS II no tratados.

- 30 Ventajosamente, la actividad de IDS en el plasma de animales tratados con LV.IDS.ApoEII fue 3 veces mayor que en el grupo tratado con LV.IDS, lo que sugiere posibles alteraciones en la estabilidad enzimática y el tiempo de circulación, secreción o captación en las células (como se muestra en la Figura 2f). Además, las correlaciones positivas entre los niveles de actividad enzimática de VCN e IDS sugieren además que la sobreexpresión de la enzima está impulsada por aumentos en la integración del genoma del gen IDS (Figura 2g). Sin embargo, las correlaciones entre glóbulos blancos VCN y la actividad de IDS en plasma muestran diferencias significativas entre los grupos LV.IDS y LV.IDS.ApoEII, donde un VCN bajo en glóbulos blancos LV.IDS.ApoEII da como resultado niveles de IDS que son más altos que en cualquiera de los ratones tratados con LV.IDS, lo que sugiere diferencias mecánicas en la producción, captación o secreción de enzimas. Además, los niveles más altos de IDS en plasma de animales tratados con LV.IDS.ApoEII no producen niveles más altos de enzima IDS en el cerebro, ya que los niveles de enzima en el cerebro son equivalentes en ambos grupos tratados con LV (como se muestra en la Figura 2f). La tasa de eliminación de la enzima inyectada en plasma fue similar entre los grupos IDS e IDS.ApoEII (Figura 2J). Se observaron correlaciones positivas entre los niveles de actividad enzimática de VCN e IDS en BM, bazo, cerebro, pulmón, hígado y corazón, con una actividad/VCN casi equivalente, tanto para IDS como para IDS.ApoEII, lo que sugiere que la sobreexpresión es activada por aumentos en la integración de genoma del gen IDS (Figura 2K).

- 45 Se detectó un valor de 15.41 unidades/VCN de actividad enzimática en LV.IDS.ApoEII en comparación con 2.56 unidades/VCN en LV.IDS en plasma, lo que sugiere que la actividad de la enzima IDS en plasma aumenta significativamente por la fusión del residuo de ApoEII. Este aumento de la actividad enzimática en IDS.ApoEII se demuestra además comparando la actividad de la enzima IDS con la proteína IDS en plasma, donde IDS.ApoEII parece ser más activo por unidad de proteína IDS (Figura 2M).

## 50 Homeostasis lisosomal

- Es probable que la disfunción y la acumulación incontrolada de material de almacenamiento primario en lisosomas en MPS II tenga un impacto profundo en la regulación lisosómica y la homeostasis posterior. De modo importante, la neurodegeneración se asocia con disfunción lisosomal y autofagia alterada. En estados patológicos como MPS II, las enzimas lisosomales endógenas pueden compensar la deficiencia de otra enzima lisosomal. Se detectaron niveles elevados de hidrolasa lisosomal  $\beta$ -hexosaminidasa en el plasma (2 veces más que WT), bazo (1.53 veces más que WT) y cerebro (2 veces más que WT) de animales con MPS II no tratada (Figura 2N-P). Los niveles de  $\beta$ -hexosaminidasa en plasma, bazo y cerebro se normalizaron completamente de nuevo a los niveles de WT en los grupos tratados con LV.IDS y LV.IDS.ApoEII (Figura 2N-P). WT-HSCT normalizó los niveles de  $\beta$ -hexosaminidasa en

plasma y bazo (Figura 2N, 2O), y mejoró los niveles en el cerebro sin lograr la normalización completa a los niveles de WT (Figura 2P).

La acumulación de sulfato de heparán está completamente normalizada con LV.IDS.ApoEII, pero no con LV.IDS

Se purificaron glicosaminoglicanos HS y CS/DS a partir de muestras de cerebro, y se analizaron y cuantificaron mediante HPLC de fase inversa. Se detectó un aumento de 6 veces en la HS total en cerebros de ratones MPS II y ratones tratados con WT-HSCT (Figura 6A). Los ratones tratados con LV.IDS mostraron una disminución en la acumulación total de HS en el cerebro a aproximadamente 3 veces los niveles de WT. Lo más importante es que los ratones tratados con LV.IDS.ApoEII mostraron una normalización completa de los niveles de HS en el cerebro nuevamente a los niveles de WT y niveles significativamente más bajos de HS en comparación con LV.IDS (Figura 6A).

El análisis de la composición de HS en ratones MPS II mostró que el 31.1% de HS del cerebro consistía en UA (2S)-GlcNS (6S) completamente sulfatado, en comparación con el 12.3% en ratones WT de control (Figura 6B). En ratones WT, estos generalmente forman agregados con otros disacáridos sulfatados a lo largo de la cadena, con aumentos significativos en la sulfatación a lo largo de la totalidad de la cadena HS en ratones MPS II. Esta tendencia se revirtió con WT-HSCT, LV.IDS y de la manera más efectiva con LV.IDS.ApoEII. De manera similar, se observaron aumentos en UA (2S)-GlcNS del 16.8% en ratones WT al 31.1% en ratones MPSII, y se corrigieron completamente hasta el 18.4% en el grupo LV.IDS.ApoEII solamente.

También se observó una reducción significativa en los niveles de CS/DS cerebrales totales en ratones LV.IDS.ApoEII en comparación con MPS II (Figura complementaria 2A); aunque no se detectaron diferencias significativas entre los ratones WT y MPS II, se detectaron aumentos en UA (2S)-GalNAc (4S) desde 1.03% en ratones WT hasta 6.5% en ratones MPS II, con corrección completa obtenida en el grupo LV.IDS.ApoEII.

LV.IDS.ApoEII corrige la acumulación lisosomal en las neuronas de todo el cerebro

A continuación, se determinaron los efectos del aumento de los niveles de enzima IDS en los cerebros de ratones MPS II trasplantados a los 8 meses de edad (6 meses después del trasplante) sobre el agrandamiento lisosómico y la acumulación de sustrato en neuronas (NeuN) usando el marcador lisosómico LAMP2. Los animales WT mostraron una tinción LAMP2 débil, puntiforme y perinuclear que solo se co-localizó parcialmente con NeuN en la corteza motora (capa V/VI). Los animales con MPS II no tratados y WT-HSCT tratados mostraron una fuerte tinción colocalizada de NeuN y LAMP2 en la corteza motora, el putamen caudado, el hipocampo y la amígdala, lo que sugiere una pesada carga lisosomal en las neuronas o células gliales satélite (Figura 6C). Las mejorías mediadas con LV.IDS en la corteza cerebral, el putamen caudado y la amígdala, con compartimentos lisosomales abultados en el hipocampo aún visibles, lo que sugiere solo una corrección parcial de la acumulación de sustrato primario, que se correlaciona fuertemente con los niveles de HS detectados en el cerebro (Figura 6A, 6B). LV.IDS.ApoEII normalizó completamente el aumento de la tinción LAMP2 en la corteza, el putamen caudado y el hipocampo, y redujo considerablemente la cantidad de carga lisosomal en la amígdala (Figura 6C).

LV.IDS.ApoEII normaliza completamente la neuroinflamación, mientras que LV.IDS media una mejora en ratones MPS II

Se ha descubierto que los astrocitos median una fuerte respuesta neuroinflamatoria en los trastornos de MPS, lo que se traduce en gliosis reactiva, astrogliosis y niveles aumentados de citocinas inflamatorias. Se tiñeron secciones coronales de cerebro de ratones de control y tratados para MPS II con el marcador astrocítico GFAP (proteína asociada a fibrilación glial; verde) y LAMP2 (rojo). Se observó significativamente más tinción de GFAP en ratones con MPS II sin tratar que en ratones con WT en la corteza, el putamen caudado y la amígdala, indicativo de astrogliosis extensa (Figura 7A). Además, se observó una fuerte co-localización de GFAP y LAMP2 en el putamen caudado, hipocampo y amígdala en ratones no tratados y con WT-HSCT (Figura 7A), lo que sugiere una acumulación significativa de sustrato lisosómico en astrocitos además de neuronas (Figura 6C). LV.IDS.ApoEII fue capaz de abrogar completamente la astrogliosis y disminuir la tinción de LAMP2 de nuevo a los niveles de WT en la corteza, el putamen caudado, el hipocampo y la amígdala, lo que se correlaciona con disminuciones en el almacenamiento de sustrato y citocinas inflamatorias (Figura 6A, 6B, 6A-D). De manera similar, LV.IDS disminuyó el número de astrocitos reactivos presentes en la corteza, el putamen caudado y la amígdala.

LV.IDS.ApoEII corrige completamente las anomalías cognitivas y la coordinación y el equilibrio en ratones MPS II

Para comprender si el SNC y el fenotipo esquelético en el modelo de ratón con MPS II podrían mejorarse con las HSC modificadas con LV.IDS o LV.IDS.ApoEII, se realizaron estudios funcionales de cognición y rendimiento sensoriomotor a los 8 meses de edad, equivalente a 6 meses después del trasplante, en todos los animales tratados en cada grupo. La evaluación cognitiva de la memoria de trabajo espacial se evaluó mediante la prueba del laberinto en Y, que explota su preferencia innata para explorar nuevos brazos sobre brazos explorados recientemente durante 10 minutos (como se ilustra en la Figura 3a).

La evaluación neurocognitiva mostró una normalización completa de la alternancia espontánea en ratones tratados con LV.IDS.ApoEII, pero no en los grupos tratados con LV.IDS o WT-HSCT (Figura 3b). Esto sugiere no solo la

corrección completa de la disfunción cognitiva vista en el modelo de ratón MPS II usando LV.IDS.ApoEII, sino que también muestra la prevención de un mayor deterioro cognitivo asociado con la enfermedad progresiva MPS II. Curiosamente, WT-HSCT no tiene un impacto positivo en los síntomas cognitivos asociados con MPS II; destacando además que WT-HSCT puede no ser adecuado para tratar el cerebro en MPS II. El número total de entradas en los diferentes brazos del laberinto en Y también se puede utilizar como una medida indirecta de la actividad general. No se detectaron diferencias en el número de entradas totales entre todos los grupos probados, lo que sugiere un rescate fenotípico real de los síntomas cognitivos en animales tratados con LV.IDS.ApoEII (como se muestra en la Figura 3c).

Los ratones de control y tratados también se sometieron a pruebas en la varilla giratoria, una prueba bien establecida para la coordinación sensoriomotora y el equilibrio en los trastornos del movimiento en roedores (como se muestra en la Figura 3d). Los ratones MPSII de 8 meses de edad mostraron una reducción en el rendimiento en la barra de aceleración como se describió anteriormente. Esto fue rescatado por completo por todos los tratamientos de trasplante, incluido WT-HSCT (como se muestra en la Figura 3e).

Las citocinas neuroinflamatorias se normalizan con LV.IDS.ApoEII, pero no con LV.IDS

Se usaron matrices de perlas citométricas (CBA) para cuantificar una cantidad de citocinas inflamatorias asociadas con neuroinflamación crónica de extractos de cerebro entero de ratones de control y tratados a los 8 meses de edad. Por primera vez, identificamos aumentos significativos en la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1a/CCL3), proteína interleucina 1a (IL-1a), RANTES (CCL5) y proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1/CCL2) en animales con MPS II no tratados (como se muestra en las Figuras 4a, 4b, 4c, 4d). Los niveles de proteína MIP-1a, IL-1a y RANTES se normalizaron con LV.IDS.ApoEII, y solo parcialmente con LV.IDS, y los niveles de MCP-1 permanecieron elevados para todos los grupos (como se muestra en la Figura 4b).

Además, observamos un aumento de 30 y 25 veces en las células positivas a isolectina B4 (ILB4) en la corteza y el cuerpo estriado de ratones MPS II no tratados, respectivamente (Figura 4E, 4F, 4G), lo que sugiere una activación extensa de microglia y neuroinflamación posterior. Curiosamente, tanto WT-HSCT como LV.IDS redujeron la tinción de ILB4 a 14 y 12 veces los niveles de WT en la corteza (Figura 4F), y a 15 y 13 veces la tinción de WT en el cuerpo estriado (Figura 4G), respectivamente. Lo más importante es que LV.IDS.ApoEII fue capaz de normalizar por completo el número de microglías activadas tanto en la corteza como en el cuerpo estriado (Figura 4F, 4G), lo que se correlaciona fuertemente con la reducción de las citocinas de neuroinflamación observadas previamente y la abrogación completa de la astrocitosis en LV.IDS.ApoEII.

En general, esto sugiere que la liberación de citocinas y quimiocinas neuroinflamatorias, astrogliosis reactiva y activación microglial en MPS II pueden ser completamente anuladas por LV.IDS.ApoEII, y solo parcialmente con LV.IDS.

La acumulación de sulfato de heparán está completamente normalizada con LV.IDS.ApoEII, pero no con LV.IDS

Se purificaron HS GAG a partir de cerebros de control y tratados de ratones MPS II y se despolimerizaron en disacáridos HS individuales usando enzimas heparinasas bacterianas seguido de etiquetado fluorescente de los extremos reductores de disacáridos individuales usando AMAC. Se utilizó la separación por HPLC de fase inversa para cuantificar y determinar las contribuciones individuales y los patrones de sulfatación de cada disacárido HS.

El análisis de HPLC permite calcular los niveles relativos de HS total entre WT, MPS II sin tratar y todos los grupos de tratamiento (como se muestra en la Figura 4e). Se detectó un aumento de 6 veces en la HS total en cerebros de ratones MPS II y ratones tratados con WT-HSCT ( $p < 0.0001$ ). Curiosamente, los ratones tratados con LV.IDS mostraron una disminución en la acumulación total de HS en el cerebro a aproximadamente 3 veces los niveles de WT. Lo más importante es que los ratones tratados con LV.IDS.ApoEII mostraron una normalización completa de los niveles de HS en el cerebro de nuevo a los niveles de WT (como se muestra en la Figura 4e).

El análisis de composición de HS mostró aumentos significativos del disacárido tri-sulfatado UA (2S)-GlcNS (6S) y aumentos en UA (2S)-GlcNS en cerebros con MPS II no tratados (como se muestra en la Figura 4f). Esta tendencia se revirtió parcialmente con WT-HSCT y LV.IDS, aunque solo se obtuvo una corrección completa de vuelta a los niveles de WT en el grupo LV.IDS.ApoEII.

Los disacáridos HS monosulfatados mostraron una tendencia significativamente diferente; cuando los niveles de UA-GlcNS con MPS II sin tratar y tratados con WT-HSCT fueron más bajos que en los cerebros WT (como se muestra en la Figura 4f). Esto mejoró parcialmente con el tratamiento de LV.IDS, pero solo se corrigió por completo en el grupo con LV.IDS.ApoEII.

La patología esquelética mejora con todas las estrategias de trasplante en ratones con MPS II

Se realizaron radiografías de todo el cuerpo bajo anestesia completa en ratones de control y tratados para obtener datos sólidos sobre la extensión de los síntomas esqueléticos en el modelo de ratón MPS II. Se midieron los anchos de los arcos cigomáticos y los huesos largos apendiculares (húmero y fémur) utilizando el software de imágenes ImageJ.

La anchura de los arcos cigomáticos, que aumentan significativamente en los animales con MPS II sin tratar, se redujeron a dimensiones de WT en todos los grupos trasplantados, incluido WT-HSCT (como se muestra en las Figuras 5a, 5b). Los anchos del húmero se redujeron significativamente en los grupos WT-HSCT y LV.IDS, aunque sólo se obtuvo una corrección completa en los animales tratados con LV.IDS.ApoEII (como se muestra en la Figura 5c).  
 5 Además, el ancho del fémur en todos los animales tratados no mostró diferencias significativas en comparación con los animales con WT, lo que sugiere un rescate esquelético significativo.

La inflamación periférica se anula tras el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) modificadas con WT, LV.IDS o LV.IDS.

Se detectaron niveles elevados de MCP-1, MIP-1 $\alpha$  y RANTES en los hígados de ratones MPS II a los 8 meses de edad, que fueron completamente anulados por los tratamientos con WT-HSCT, LV.IDS- o LV.IDS.ApoEII (Figura 5E-5G). Estos datos sugieren que WT-HSCT, LV.IDS y LV.IDS.ApoEII producen cantidades suficientes de enzima periférica para corregir completamente la inflamación periférica crónica en ratones MPS II.

La expresión génica de los marcadores de insuficiencia cardíaca Nppb y Myh7 está normalizada en los grupos WT-HSCT, LV.IDS y LV.IDS.ApoEII

15 Se investigó la expresión de Nppb y Myh7, dos marcadores asociados con miocardiopatías y patología cardíaca, que podrían ser indicadores de mayores riesgos de insuficiencia cardíaca en el modelo de ratón MPS II. Se encontró que la expresión de Nppb, que codifica el péptido natriurético cerebral (BNP) que es secretado por los ventrículos y regula el estiramiento de los miocitos y la presión arterial, es aproximadamente 16 veces mayor en MPS II que en ratones macho WT (Figura 5H). La expresión de Nppb se estabilizó completamente de nuevo a los niveles de WT en los grupos  
 20 WT-HSCT, LV.IDS y LV.IDS.ApoEII (Figura 5H). La expresión de Myh7, que se encuentra principalmente en el corazón embrionario y codifica la cadena beta pesada de miosina como un componente clave del músculo cardíaco y las fibras musculares de tipo I, se elevó en animales con MPS II sin tratar. La expresión de Myh7 en los grupos WT-HSCT, LV.IDS y LV.IDS.ApoEII fue similar a la expresión de WT (Figura 5I).

25 Sobreexpresión de IDS después del trasplante de LV.IDS y LV.IDS. Las HSC transducidas con ApoEII no producen una respuesta inmune a las IDS humanas.

Para estudiar si las células modificadas genéticamente eran capaces de mediar la tolerancia a la IDS humana después del trasplante, analizamos el plasma de ratones que recibieron un acondicionamiento mieloablativo completo seguido de un trasplante de LV.IDS o LV.IDS.ApoEII, ambos sobreexpresando IDS humanas, para anticuerpos IgG contra IDS humanas. Los títulos generales de IgG específicos de IDS en los grupos LV.IDS y LV.IDS.ApoEII permanecieron en  
 30 el intervalo normal y no contribuyeron a una respuesta inmune a las enzimas (Figura 5J).

El tratamiento LV.IDS.ApoEII actúa a través de múltiples mecanismos

Tras el aumento observado de la actividad enzimática en plasma y el aumento de la actividad enzimática por VCN en ratones tratados con LV.IDS.ApoEII (Fig. 2f, 2j), se planteó la hipótesis de que el tiempo de circulación de la enzima podría aumentar. Se inyectaron niveles equivalentes de enzima IDS e IDS.ApoEII en ratones MPS II y se controlaron  
 35 los niveles de proteína mediante ELISA (Fig. 9A). Curiosamente, la tasa de eliminación de enzimas, ya sea por degradación o absorción en los órganos, fue similar entre los grupos IDS e IDS.ApoEII y se eliminó de manera efectiva en ambos grupos a los 30 minutos.

Los siguientes niveles de enzima activa en el plasma en comparación con la proteína IDS total se compararon y midieron mediante ELISA, planteando la hipótesis de que la conformación de la enzima puede alterarse con la adición del residuo de ApoEII, lo que confiere protección adicional contra la degradación. IDS.ApoEII pareció ser más activo  
 40 por unidad de proteína IDS en plasma (Fig. 9B). Esto puede sugerir que el sitio activo de la enzima IDS nativa se degrada rápidamente en el plasma, mientras que la adición de ApoEII es protectora y prolonga eficazmente la actividad enzimática in vivo.

Se usó la línea de células endoteliales BHE bEND.3 para determinar si había alguna diferencia en la captación de enzimas por las células endoteliales. Estas células producen una capa BHE eficaz en transpodos (Fig. 9C) y expresan tanto los destinatarios de LDLR como los de la proteína 1 relacionada con LDLR (LRP1) (Fig. 9D, 9E). Con el fin de asegurar que cada enzima tenga un estado M6P similar al de la enzima producida por HSCGT, usamos la enzima IDS e IDS.ApoEII secretada en el medio después de la transfección de células microgliales humanas CHME3 y estandarizada por ELISA. En cultivo de monocapa, comparamos la captación de IDS frente a IDS.ApoEII en células  
 45 bEND.3, identificando un aumento de 4.7 veces en la captación celular con la adición del péptido ApoEII (Fig. 9F). A continuación, se compararon la captación y transcitosis de IDS o IDS.ApoEII a través de capas de células polarizadas de células endoteliales bEND.3 en transpodos para imitar la BHE. Fueron evidentes aumentos de 2.6 veces en la captación, similar a cuando las células se cultivaron en monocapa, junto con un aumento de 1.5 veces en la transcitosis hacia el lado basolateral del transpocillo (Fig. 9G, 9H).

55 Además, el bloqueo de los destinatarios dependientes de ApoE usando ApoE o el bloqueo de los destinatarios de M6P usando M6P (Fig. 9I), reveló que IDS.ApoEII fue captado preferencial e inesperadamente a través de los destinatarios de M6P, aunque el bloqueo con el péptido ApoE también inhibió significativamente la captación de IDS.ApoEII en

aproximadamente un 30%. La secuencia del péptido ApoEII también codifica un sitio HS, necesario como codestinatario para la unión de destinatario/ligando de ApoE a sus destinatarios, incluidos LDLR y LRP1 (Ji et al, 1993). El pretratamiento de células con heparinasa también resultó en una reducción en la captación de IDS.ApoEII en aproximadamente un 30%, similar a los resultados con el péptido ApoE, lo que sugiere que ApoE/HS también puede ser importante en la captación y transcitosis a través de las células bEND3.

#### Discusión

La adición del conector y del péptido ApoEII no cambió la expresión, producción o secreción de la enzima IDS in vitro, pero produjo niveles suprafisiológicos de la enzima IDS en las HSC transducidas usando vectores tanto de LV.IDS como también de LV.IDS.ApoEII para un número de copia de vector similar. El injerto completo de las células del donante CD45.1+ (>80%) se obtuvo usando acondicionamiento mieloalativo completo usando busulfano en todos los animales trasplantados, sin diferencias significativas en los ensayos de diferenciación in vitro cadena abajo posteriores en el momento del trasplante (datos no mostrados).

Sorprendentemente, los niveles de actividad de la enzima IDS en plasma en el grupo LV.IDS.ApoEII fueron aproximadamente tres veces más altos que en LV.IDS, incluso con VCN más bajo en glóbulos blancos. Esto se traduce en una mayor actividad enzimática por copia en el grupo LV.IDS.ApoEII, lo que sugiere que el residuo ApoEII estabiliza o mejora la actividad al cambiar su conformación, y parece proporcionar un efecto protector contra la inactivación enzimática, pero no la eliminación en plasma (Figura 8). Se detectó una mayor captación de IDS.ApoEII en células bEND.3 en comparación con IDS sin modificar y se creía que estaba mediada predominantemente por M6PR. La porción de unión al destinatario de apoE utilizada en la enzima de fusión IDS.ApoEII (residuos 142-147) es capaz de formar un complejo de unión de alta afinidad con un fragmento HS de octasacárido compuesto por cuatro repeticiones de UA(2S)-GlcNS (6S), que son abundantes en las superficies de las células endoteliales e incluso más abundantes en MPS II. La HS actúa típicamente como un codestinatario en muchas interacciones de ligando destinatario y el aumento de la unión a proteoglicanos de HS (HSPG) a través de ApoEII podría mediar en un aumento en la captación celular a través del LDLR, la proteína 1 relacionada con el LDLR (LRP1), M6P o mediante la captación directa de un complejo apoE-HSPG.

Se detectaron cantidades similares de actividad enzimática dentro del cerebro entre los grupos LV.IDS y LV.IDS.ApoEII, pero la corrección se completó sólo en LV.IDS.ApoEII con una eliminación mejorada de LAMP2 de neuronas y astrocitos. Una explicación para esto es que la captación de enzimas del espacio intersticial puede ser más eficiente usando IDS.ApoEII, corrigiendo así las células cerebrales residentes de manera mucho más efectiva que la IDS no modificada mientras se mantienen los mismos niveles generales (Figura 8).

Se observó una corrección completa de las elevaciones de almacenamiento primario y una normalización global del patrón de sulfatación, que juega un papel principal en la neuroinflamación, en animales tratados con LV.IDS.ApoEII. La corrección parcial del almacenamiento primario de HS en el cerebro es insuficiente para corregir el comportamiento cognitivo. La acumulación de HS en MPS II probablemente podría proporcionar una de las primeras señales que desencadenan la neuroinflamación y exacerban la neurodegeneración. El patrón de sulfatación también desempeña un papel crucial en la función celular y la homeostasis de unión a HS, ya que las HS 6-O- y 2-O-sulfatadas son esenciales para la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos y el factor 1 derivado de células estromales (CXCL12). De hecho, se demostró que el exceso anormal de HS en MPS I reduce la migración de las HSC en condiciones limitantes mediante el secuestro de CXCL12 (42). En el contexto de este estudio, los aumentos en los disacáridos sulfatados en el tejido cerebral de los animales enfermos podrían promover una mejor captación celular de la enzima IDS.ApoEII, mejorando así la dirección de la enzima a las células enfermas.

Se observó una captación significativamente aumentada de IDS.ApoEII en células bEND.3 en comparación con IDS mediante un mecanismo basado en ApoE/HS y por medio de los destinatarios de M6P. El uso de múltiples mecanismos de determinar dianas podría mediar una determinación de dianas más eficiente en células con deficiencia de enzimas en todo el cuerpo, así como a través de la BHE. La porción de unión al destinatario de ApoE utilizada aquí es capaz de formar un complejo de unión de alta afinidad con un fragmento HS de octasacárido compuesto por cuatro repeticiones de UA(2S)-GlcNS(6S), que son abundantes en superficies de las células endoteliales e incluso más abundantes en MPS II. En el contexto de este estudio, los aumentos en los disacáridos sulfatados en el tejido cerebral de animales enfermos podrían promover una mejor captación celular de la enzima IDS.ApoEII, a través del motivo de unión a HS en el péptido ApoEII, mejorando así la determinación de diana de la enzima hacia las células enfermas. HS actúa típicamente como un codestinatario en muchas interacciones de ligando destinatario y el aumento de la unión a los proteoglicanos de HS a través de ApoEII podría mediar un aumento en la captación celular a través de LDLR, LRP1, M6P o mediante la captación directa de un complejo ApoE-HSPG. La estabilidad plasmática mejorada junto con el aumento de la captación de BHE y la transcitosis podrían explicar en conjunto la normalización del almacenamiento de HS y DS, así como varias otras neuropatologías en el cerebro observadas con LV.IDS.ApoEII, en ausencia de diferencias significativas en la cantidad de enzimas cerebrales. Se ha visto un efecto similar de aumento de captación, eliminación y asociación celular para actividades enzimáticas similares en MPS IIIB y enfermedad de Pompe usando enzimas acopladas a etiquetas GILT que apuntan a un epítipo alternativo de M6P a través de un péptido dirigido al destinatario IGFII. En este estudio, se mostraron pequeños aumentos en la actividad de las enzimas cerebrales con SGSH.ApoB sin cambios significativos sobre los IDS nativos

La neuroinflamación se informa comúnmente en los LSD, probablemente causada por la acumulación de diversas moléculas no degradadas, que activan cooperativamente y perpetúan un medio neuroinflamatorio que puede exacerbar la enfermedad misma. Los ratones MPS II provocan una fuerte respuesta inflamatoria en el cerebro, con niveles elevados de MIP-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , RANTES y MCP-1. Los niveles de MIP-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  y RANTES se normalizaron completamente en el grupo LV.IDS.ApoEII, con solo disminuciones parciales en los ratones tratados con LV.IDS. Curiosamente, los niveles de MCP-1 permanecieron elevados en MPS II y en todos los ratones acondicionados con busulfán. Como hemos demostrado anteriormente, el acondicionamiento con busulfano conduce a aumentos a largo plazo en los niveles de MCP-1 en el cerebro, un mediador clave de la trans migración celular al SNC, y ejerce un efecto transmigratorio a largo plazo. Aproximadamente el 20% del busulfán inyectado por vía intravenosa puede atravesar la BHE, impulsando una respuesta de MCP-1 pro-migratoria aún más fuerte, que en última instancia puede facilitar la trans migración de leucocitos derivados de donantes a través de la BHE al SNC en ratones MPS II y proporcionar medios adicionales de tráfico de enzima en el parénquima cerebral.

La activación microglial y la astrocitosis se informan comúnmente en los trastornos de MPS, incluido este estudio. Observamos una abrogación completa de la tinción de GFAP y LAMP2 en la corteza, el putamen caudado, el hipocampo y la amígdala de ratones LV.IDS.ApoEII, con sólo una corrección parcial de las mismas áreas en el grupo LV.IDS. Además, se observó una normalización completa de la microglía activada en la corteza y el cuerpo estriado de ratones tratados con LV.IDS.ApoEII, con solo una reducción del 50% en LV.IDS. El tratamiento con LV.IDS.ApoEII es comparable a la corrección de la astrogliosis y la activación microglial reportada usando inyección directa de AAV9-IDS en el LCR (15). Se detectó inflamación periférica en hígados de ratones MPS II, con marcadas elevaciones en los niveles de MCP-1, MIP-1 $\alpha$  y RANTES, y fue abrogada por todos los trasplantes, lo que indica que los niveles de enzima IDS periférica obtenidos con un alotrasplante pueden mediar una reducción en inflamación en la periferia.

Como paradigma sensible y ampliamente aceptado de comportamiento exploratorio y memoria de trabajo espacial, el laberinto en Y explica las posibles deficiencias físicas en ratones MPS II, a diferencia del laberinto de Barnes, que puede invalidarse por un rendimiento físico diferencial. Se observó una corrección conductual completa de los déficits cognitivos en el grupo LV.IDS.ApoEII junto con la normalización de la coordinación y el equilibrio. Nuestra hipótesis es que las mejoras cognitivas probablemente se deben a una combinación de factores; una reducción en el almacenamiento primario de HS junto con la abrogación completa de la neuroinflamación crónica, astrogliosis y activación microglial, todas las cuales solo se observaron en animales tratados con LV.IDS.ApoEII. El rescate de la coordinación y el equilibrio se puede atribuir al rescate central o periférico, o una combinación de los mismos. Más importante aún, esto destaca aún más que la adición del péptido en tándem de ApoE es absolutamente necesaria para dirigir la enzima IDS al cerebro para proporcionar una corrección completa del aspecto neurocognitivo en ratones MPS II.

Los presentes inventores y otros han informado de anomalías esqueléticas progresivas en el modelo de ratón MPS II, tales como agrandamiento de estructuras óseas craneofaciales y fémures, que se correlacionan con la disostosis múltiple observada en pacientes con MPS II. Dado que hay poca enzima dirigida al cartílago o las lesiones óseas, ERT que usa idursulfasa mostró beneficios limitados en el dolor articular, la rigidez o la amplitud de movimiento, aunque los tratamientos anteriores podrían proporcionar beneficios. En nuestro estudio, los anchos de los arcos cigomáticos, el húmero y los fémures se redujeron significativamente en todos los animales trasplantados, incluido el WT-HSCT, lo que sugiere que algún nivel de enzima puede penetrar el tejido óseo si se trata en un momento temprano cuando el fenotipo esquelético permanece leve. Esto es en parte comparable a la terapia génica AAV2/8TBG-IDS dirigida al hígado, donde también se corrigieron las anomalías craneofaciales. Es importante destacar que es probable que se requiera una disponibilidad sostenida de enzima para el esqueleto y las articulaciones desde un momento temprano para las mejoras clínicas.

La afectación cardíaca en MPS II varía desde patología valvular progresiva, hipertrofia ventricular izquierda, aumento del grosor de la pared hasta hipertensión sistémica, lo que produce un fenotipo cardíaco complejo que sigue siendo difícil de tratar (49). Una gran cantidad de factores pueden desencadenar la activación de factores de transcripción, correguladores y microARN que alterarán la expresión de genes cardíacos. HS GAG también regulan parcialmente Sonic Hedgehog (Shh), involucrado en la ontogénesis y la regeneración cardíaca, la cual disminuye junto con *Ptch1*, *FoxM1* y *Bmp4* en ratones MPS II. La expresión de Nppb y Myh7, dos genes previamente implicados con insuficiencia cardíaca en ratones MPS IIIB, se elevó hasta 18 veces y 9 veces por encima de los niveles de WT, respectivamente, lo que sugiere una desregulación significativa de genes cardíacos y vías cardíacas en ratones MPS II lo cual se rescata con todos los trasplantes. Por lo tanto, la entrega sostenida de la enzima IDS en la periferia puede beneficiar al tejido cardíaco y restaurar la expresión génica cardíaca normal, aunque solo sea parcialmente. En general, se ha demostrado por primera vez que la expresión de genes cardíacos implicados en la insuficiencia cardíaca se puede modular a niveles de WT trasplantando HSC que expresan niveles endógenos o suprafisiológicos de enzima IDS, y que esto puede ser un paso significativo en tratamiento del fenotipo cardiorrespiratorio en pacientes con MPS II.

Las proteínas y enzimas inmunológicamente extrañas tales como ERT pueden desencadenar la liberación de anticuerpos inhibidores que pueden disminuir la eficacia terapéutica, aunque el quimerismo molecular y celular después del HSCT puede inducir tolerancia a antígenos específicos del donante. No se detectaron anticuerpos IgG contra IDS recombinantes humanos en plasma de ratones tratados con LV.IDS y LV.IDS.ApoEII, y no se identificaron síntomas adversos que pudieran atribuirse a anticuerpos neutralizantes. En general, esta es una fuerte indicación de que la terapia génica con células madre hematopoyéticas (HSCGT) puede inducir tolerancia y que ambas enzimas



producidas son bien toleradas por el sistema inmunológico. Por último, la adición del residuo del péptido ApoEII no genera un aumento de la sensibilidad inmunitaria en comparación con los IDS no modificados.

- 5 Significativamente, la adición de la repetición en tándem de apoE a la IDS humana permite la corrección completa de la neuroinflamación, la neurodegeneración y el comportamiento cognitivo en el modelo de ratón MPS II, probablemente mediante una combinación de mayor captación y mecanismos de estabilización enzimática. Los enfoques de terapia génica anteriores han destacado el potencial terapéutico de las enzimas de fusión BBB con el dominio de unión al destinatario de otros complejos Apo como ApoB y ApoE para corregir la patología cerebral en modelos de enfermedad de LSD y su prometedor uso clínico para los trastornos MPS. Este es el primer estudio que destaca el uso combinado de HSCGT y la enzima de fusión ApoEII para corregir completamente los fenotipos neurológicos, esqueléticos, inflamatorios y conductuales en ratones MPS II. Los experimentos muestran la idoneidad de HSCGT usando enzima modificada con ApoEII para el tratamiento de pacientes con MPS II.

Las formas de realización anteriores no pretenden limitar el alcance de la protección proporcionada por las reivindicaciones, sino más bien describir ejemplos de cómo se puede poner en práctica la invención.

#### Listados de secuencias

- 15 SEQ ID No. 1 (secuencia de ADN de colDS)

atgcctccac	ctagaactgg	aagaggcctg	ctgtggctgg	gcctgggtgct	gtctagtgtg	60
tgtgtggccc	tgggcagcga	gacacaggcc	aacagcacaa	ccgacgccct	gaacgtgctg	120
ctgatcatcg	tggacgacct	gaggcctagc	ctgggctgct	acggcgataa	gctcgtgcgg	180
agccccaaca	tcgatcagct	ggcctctcac	agcctgctgt	tccagaacgc	attcgcacag	240
caggcagtgt	gcgccccag	cagagtgtct	ttcctgacgg	gcagaaggcc	cgacaccacc	300
cggctgtacg	acttcaacag	ctactggcgg	gtgcacgccg	gcaacttcag	caccatcccc	360
cagtacttca	aagaaaacgg	ctacgtgacc	atgagcgtgg	gcaaggtggt	ccaccccggc	420
atcagctcca	accacaccga	cgacagcccc	tacagctggt	ccttcccacc	ctaccacccc	480
agcagcgaga	agtacgagaa	caccaagacc	tgcagaggcc	ccgacggcga	gctgcatgcc	540
aatctgctgt	gccccgtgga	cgtgctggat	gtgcctgagg	gaacctgcc	cgacaagcag	600
tctaccgagc	aggccattca	gctgctggaa	aagatgaaga	ccagcgccag	ccccttcttc	660
ctggcctggt	gctatcacia	gccccacatc	cctttcagat	accccaaaga	gttccagaag	720
ctgtaccccc	tggaaaacat	cacctgggcc	cccgatcctg	agggtgccaga	tggactgcct	780
cccgtggcct	acaacccctg	gatggacatc	cggcagcgcg	aggatgtgca	ggccctgaat	840
atcagcgtgc	cctacggccc	catccccgtg	gatttccagc	ggaagatccg	gcagagctac	900
ttcgccagcg	tgtcctacct	ggacacccaa	gtgggcagac	tgtgagcgc	cctggacgat	960
ctgcagctgg	ccaactccac	catcattgcc	ttcaccagcg	accaaggctg	ggccctggga	1020
gaacatggcg	agtgggcca	gtacagcaac	ttcgacgtgg	ccacccacgt	gcccctgac	1080
ttctacgtgc	caggcagaac	cgccagcctg	cctgaggctg	gcgagaagct	gttcccttac	1140
ctggacccct	tcgacagcgc	ctcccagctg	atggaacctg	gcagacagag	catggacctg	1200
gtggaactgg	tgtccctggt	ccccacactg	gcccgaactg	ctggactgca	ggtgccccct	1260
agatgtcccg	tgccctagctt	tcacgtggaa	ctgtgcagag	agggcaagaa	cctgctgaag	1320
cacttccggt	tccgggacct	ggaagaagat	cctacacctg	ccggcaaccc	cagagagctg	1380
atcgccata	gccagtaccc	cagacccagc	gacatccctc	agtggaacag	cgacaagccc	1440
agcctgaagg	acatcaagat	catgggctac	agcatccgga	ccatcgacta	ccggtacacc	1500
gtgtgggtgg	gattcaaccc	cgacgagttc	ctggccaatt	tctccgacat	ccacgcccgg	1560
gagctgtact	tcgtggacag	cgatccctg	caggaccaca	acatgtacaa	cgacagccag	1620
ggcggcgacc	tgttccagct	gctgatgccc				1650

SEQ ID No. 2 (Secuencia de ADN de IDS de tipo silvestre)

atgccgccac	cccgagccgg	ccgagggcctt	ctctgggctgg	gtctgggttct	gagctccgtc	60
tgcgtcgccc	tccgatccga	aacgcaggcc	aactcgacca	cagatgctct	gaacgttctt	120
ctcatcatcg	tggatgacct	ggccccctcc	ctgggctggt	atggggataa	gctggtgagg	180
cccccaata	ttgaccaact	ggcatccac	agcctcctct	tccagaatgc	ctttgcgcag	240
caagcagtg	ggccccgag	cccggtttct	ttcctcactg	gcaggagacc	tgacaccacc	300
cgctgtacg	acttcaactc	ctactggagg	gtgcacgctg	gaaacttctc	caccatcccc	360
cagtacttca	aggagaatgg	ctatgtgacc	atgtcgggtg	gaaaagtctt	tcacctggg	420
atatcttcta	accataccga	tgattctccg	tatagctgg	cttttccacc	ttatcatcct	480
tcctctgaga	agtatgaaaa	cactaagaca	tgtcgagggc	cagatggaga	actccatgcc	540
aacctgcttt	gccctgtgga	tgtgctggat	gttcccgagg	gcaccttgcc	tgacaaacag	600
agcactgagc	aagccataca	gttggttgaa	aagatgaaaa	cgtcagccag	tcctttcttc	660
ctggccgttg	ggtatcataa	gccacacatc	cccttcagat	acccaagga	atttcagaag	720
ttgtatccct	tggagaacat	caccttgccc	cccgatcccg	aggtccctga	tggcctaccc	780
cctgtggcct	acaaccctcg	gatggacatc	aggcaacggg	aagacgtcca	agccttaaac	840
atcagtggtc	cgatgggtcc	aattcctgtg	gactttcagc	ggaaaatccg	ccagagctac	900
tttgccctcg	tgtcatattt	ggatacacag	gtcggccgccc	tcttgagtgc	tttggacgat	960
cttcagctgg	ccaacagcac	catcattgca	tttacctcgg	atcatgggtg	ggctctaggt	1020
gaacatggag	aatgggcaa	atacagcaat	tttgatgttg	ctacccatgt	tcacctgata	1080
ttctatgttc	ctggaaggac	ggcttcactt	ccggaggcag	gcgagaagct	tttcccttac	1140
ctcgaccctt	ttgattccgc	ctcacagttg	atggagccag	gcaggcaatc	catggacctt	1200
gtggaacttg	tgtctctttt	tcccacgctg	gctggacttg	caggactgca	ggttccacct	1260
cgctgccccg	ttccttcatt	tcacgttgag	ctgtgcagag	aaggcaagaa	ccttctgaag	1320
cattttcgat	tcogtgactt	ggaagaggat	ccgtacctcc	ctggtaatcc	ccgtgaactg	1380
attgcctata	gccagtatcc	ccggccttca	gacatccctc	agtgggaattc	tgacaagccg	1440
agttttaaag	atataaagat	catgggctat	tcatacgcga	ccatagacta	taggtatact	1500
gtgtgggttg	gcttcaatcc	tgatgaattt	ctagctaact	tttctgacat	ccatgcaggg	1560
gaactgtatt	ttgtggatc	tgacccattg	caggatcaca	atatgtataa	tgattcccaa	1620
ggtggagatc	ttttccagtt	gttgatgcct				1650

SEQ ID No. 3 (secuencia de ADN de repetición en tándem de ApoE (ApoEII))

ctgagaaagc tgccgaagcg gctgctgctg aggaagctga gaaaaagact gctg 54

SEQ ID No. 4 (secuencia de ADN de conector)

5 ctgggagggg gaggatctgg ccgaggcgga agtggcgcg gaggatcagg gggcgagggc 60 tct 63

SEQ ID No. 5 (secuencia de aminoácidos de coIDS)

MPPPRTRGRL	LWLGLVLSSV	CVALGSETQA	NSTTDALNVL	LIIVDDLRLPS	LGCYGDKLVR	60
SPNIDQLASH	SLLFQNAFAQ	QAVCAPSRVS	FLTGRRPDTT	RLYDFNSYWR	VHAGNFSTIP	120
QYFKENGVT	MSVGKVFHFG	ISSNHTDDSP	YSWSFPPYHP	SSEKYENTKT	CRGPDGELHA	180
NLLCPVDVLD	VPEGLTPDKQ	STEQAIIQLE	KMKTSASFFF	LAVGYHKPHI	PFRYPKEFQK	240
LYPLENITLA	PDPEVPDGLP	PVAYNPWMDI	RQREDVQALN	ISVPYGPPIV	DFQRKIRQSY	300
FASVSYLDTQ	VGRLLSALDD	LQLANSTIIA	FTSDHGWALG	EHGEWAKYSN	FDVATHVPLI	360
FYVPGRTASL	PEAGEKLFY	LDPFDSASQL	MEPGRQSMDL	VELVSLFPTL	AGLAGLQVPP	420
RCPVPSFHVE	LCREGKNLLK	HFRFRDLEED	PYLPGNPREL	IAYSQYPRPS	DIPQWNSDKP	480
SLKDIKIMGY	SIRTIDYRYT	VWVGFPNDEF	LANFSDIHAG	ELYFVDSDDL	QDHNMYNDSQ	540
GGDLFQLLMP						550

SEQ ID No. 6 (secuencia de aminoácidos de IDS de tipo silvestre)

MPPPRTRGRL	LWLGLVLSSV	CVALGSETQA	NSTTDALNVL	LIIVDDLRLPS	LGCYGDKLVR	60
SPNIDQLASH	SLLFQNAFAQ	QAVCAPSRVS	FLTGRRPDTT	RLYDFNSYWR	VHAGNFSTIP	120
QYFKENGVT	MSVGKVFHFG	ISSNHTDDSP	YSWSFPPYHP	SSEKYENTKT	CRGPDGELHA	180
NLLCPVDVLD	VPEGLTPDKQ	STEQAIIQLE	KMKTSASFFF	LAVGYHKPHI	PFRYPKEFQK	240
LYPLENITLA	PDPEVPDGLP	PVAYNPWMDI	RQREDVQALN	ISVPYGPPIV	DFQRKIRQSY	300
FASVSYLDTQ	VGRLLSALDD	LQLANSTIIA	FTSDHGWALG	EHGEWAKYSN	FDVATHVPLI	360
FYVPGRTASL	PEAGEKLFY	LDPFDSASQL	MEPGRQSMDL	VELVSLFPTL	AGLAGLQVPP	420
RCPVPSFHVE	LCREGKNLLK	HFRFRDLEED	PYLPGNPREL	IAYSQYPRPS	DIPQWNSDKP	480
SLKDIKIMGY	SIRTIDYRYT	VWVGFPNDEF	LANFSDIHAG	ELYFVDSDDL	QDHNMYNDSQ	540
GGDLFQLLMP						550

10 SEQ ID No. 7 (secuencia de aminoácidos de repeticiones en tándem de ApoE (ApoEII))

LRKLRLRL RLKLRLRL 18

SEQ ID No. 8 (secuencia de aminoácidos de conector)

LGGGSGGGG SGGGSGGGG S 21

## Referencias

- 5 1. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: McGraw-Hill, editor. *Lysosomal Disorders* 2001. p. 3421-52.
2. Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, et al. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *Journal of inherited metabolic disease*. 2005;28(6):1011-7.
3. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Human genetics*. 1999;105(1-2):151-6. Epub 1999/09/10.
- 10 4. Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer OA, De Meirleir L, Guffon N, et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *European journal of pediatrics*. 2008;167(3):267-77. Epub 2007/11/27.
5. Cardone M, Polito VA, Pepe S, Mann L, D'Azzo A, Auricchio A, et al. Correction of Hunter syndrome in the MPSII mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery. *Human molecular genetics*. 2006;15(7):1225-36. Epub 2006/03/01.
- 15 6. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama*. 1999;281(3):249-54. Epub 1999/01/26.
7. Holt JB, Poe MD, Escolar ML. Natural Progression of Neurological Disease in Mucopolysaccharidosis Type II. *Pediatrics*. 2011;127(5):E1258-E65.
8. Eng C, Muenzer J, Wraith E, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, et al. Clinical benefit of enzyme replacement therapy (ERT) in mucopolysaccharidosis II (MPS II, Hunter syndrome). *Molecular genetics and metabolism*. 2007;92(4):S18-S.
- 20 9. Muenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, et al. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genetics in Medicine*. 2006;8(8):465-73.
- 25 10. Muenzer J, Beck M, Eng CM, Giugliani R, Harmatz P, Martin R, et al. Long-term, open-labeled extension study of idursulfase in the treatment of Hunter syndrome. *Genetics in Medicine*. 2011;13(2):95-101.
11. Scarpa M, Almasy Z, Beck M, Bodamer O, Bruce IA, De Meirleir L, et al. Mucopolysaccharidosis type II: European recommendations for the diagnosis and multidisciplinary management of a rare disease. *Orphanet journal of rare diseases*. 2011;6:72. Epub 2011/11/09.
- 30 12. Brooks DA, Kakavanos R, Hopwood JJ. Significance of immune response to enzyme-replacement therapy for patients with a lysosomal storage disorder. *Trends in molecular medicine*. 2003;9(10):450-3. Epub 2003/10/15.
13. Wakabayashi T, Shimada Y, Akiyama K, Higuchi T, Fukuda T, Kobayashi H, et al. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Corrects Neuropathic Phenotype in Murine Model of Mucopolysaccharidosis Type II. *Hum Gene Ther*. 2015. Epub 2015/03/13.
- 35 14. Hinderer C, Katz N, Louboutin JP, Bell P, Yu H, Nayal M, et al. Delivery of an adeno-associated virus vector into CSF attenuates central nervous system disease in mucopolysaccharidosis type II mice. *Hum Gene Ther*. 2016. Epub 2016/08/12.
15. Motas S, Haurigot V, Garcia M, Marcó S, Ribera A, Roca C, et al. CNS-directed gene therapy for the treatment of neurologic and somatic mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *JCI Insight*. 2016;1(9).
- 40 16. Aldenhoven M, Jones SA, Bonney D, Borrill RE, Coussons M, Mercer J, et al. Hematopoietic cell transplantation for mucopolysaccharidosis patients is safe and effective: results after implementation of international guidelines. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(6):1106-9. Epub 2015/02/25.
- 45 17. Aldenhoven M, Wynn RF, Orchard PJ, O'Meara A, Veys P, Fischer A, et al. Long-term outcome of Hurler syndrome patients after hematopoietic cell transplantation: an international multicenter study. *Blood*. 2015;125(13):2164-72. Epub 2015/01/28.
18. Boelens JJ, Aldenhoven M, Purtill D, Ruggeri A, Defor T, Wynn R, et al. Outcomes of transplantation using various hematopoietic cell sources in children with Hurler syndrome after myeloablative conditioning. *Blood*. 2013;121(19):3981-7. Epub 2013/03/16.

19. Guffon N, Bertrand Y, Forest I, Fouilhoux A, Froissart R. Bone marrow transplantation in children with Hunter syndrome: outcome after 7 to 17 years. *The Journal of pediatrics*. 2009;154(5):733-7. Epub 2009/01/27.
20. Vellodi A, Young E, Cooper A, Lidchi V, Winchester B, Wraith JE. Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease. *Journal of inherited metabolic disease*. 1999;22:638-48.
- 5 21. Visigalli I, Delai S, Politi LS, Di Domenico C, Cerri F, Mrak E, et al. Gene therapy augments the efficacy of hematopoietic cell transplantation and fully corrects mucopolysaccharidosis type I phenotype in the mouse model. *Blood*. 2010;116(24):5130-9. Epub 2010/09/18.
22. Biffi A, Visigalli I. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for Lysosomal Storage Disorders: Expected Benefits and Limitations. *Stem Cells Biol Reg*. 2013:127-38.
- 10 23. Biffi A, De Palma M, Quattrini A, Del Carro U, Amadio S, Visigalli I, et al. Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *The Journal of clinical investigation*. 2004; 113(8):1118-29. Epub 2004/04/16.
24. Langford-Smith A, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, Holley RJ, Sergijenko A, Howe SJ, et al. Hematopoietic stem cell and gene therapy corrects primary neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2012;20(8):1610-21. Epub 2012/05/02.
- 15 25. Sergijenko A, Langford-Smith A, Liao AY, Pickford CE, McDermott J, Nowinski G, et al. Myeloid/Microglial driven autologous hematopoietic stem cell gene therapy corrects a neuronopathic lysosomal disease. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(10):1938-49. Epub 2013/06/12.
26. Pardridge WM. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Molecular biotechnology*. 2005;30(1):57-70. Epub 2005/04/05.
- 20 27. Pardridge WM. Targeting neurotherapeutic agents through the blood-brain barrier. *Archives of neurology*. 2002;59(1):35-40. Epub 2002/01/16.
28. Boren J, Lee I, Zhu W, Arnold K, Taylor S, Innerarity TL. Identification of the low density lipoprotein destination-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(5): 1084-93. Epub 1998/04/16.
- 25 29. Sorrentino NC, D'Orsi L, Sambri I, Nusco E, Monaco C, Spanpanato C, et al. A highly secreted sulphamidase engineered to cross the blood-brain barrier corrects brain lesions of mice with mucopolysaccharidoses type IIIA. *Embo Mol Med*. 2013;5(5):675-90. Epub 2013/04/10.
- 30 30. Spencer B, Verma I, Desplats P, Morvinski D, Rockenstein E, Adame A, et al. A neuroprotective brain-penetrating endopeptidase fusion protein ameliorates Alzheimer disease pathology and fracciónres neurogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(25):17917-31. Epub 2014/05/16.
31. Spencer BJ, Verma IM. Targeted delivery of proteins across the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(18):7594-9. Epub 2007/04/28.
- 35 32. Bockenhoff A, Cramer S, Wolte P, Knieling S, Wohlenberg C, Gieselmann V, et al. Comparison of five peptide vectors for improved brain delivery of the lysosomal enzyme arylsulfatase A. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014;34(9):3122-9. Epub 2014/02/28.
33. Wang D, El-Amouri SS, Dai M, Kuan CY, Hui DY, Brady RO, et al. Engineering a lysosomal enzyme with a derivative of destination-binding domain of apoE enables delivery across the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(8):2999-3004. Epub 2013/02/06.
- 40 34. Bigger BW, Siapati EK, Mistry A, Waddington SN, Nivsarkar MS, Jacobs L, et al. Permanent partial phenotypic correction and tolerance in a mouse model of hemophilia B by stem cell gene delivery of human factor IX. *Gene therapy*. 2006;13(2):117-26.
- 35 35. Siapati EK, Bigger BW, Miskin J, Chipchase D, Parsley KL, Mitrophanous K, et al. Comparison of HIV- and EIAV-based vectors on their efficiency in transducing murine and human hematopoietic repopulating cells. *Molecular Therapy*. 2005;12(3):537-46.
- 45 36. Kuroda H, Kutner RH, Bazan NG, Reiser J. Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection. *J Virol Methods*. 2009;157(2):113-21.
37. Lu JZ, Hui EK, Boado RJ, Pardridge WM. Genetic engineering of a bifunctional IgG fusion protein with iduronate-2-sulfatase. *Bioconjugate chemistry*. 2010;21(1):151-6. Epub 2009/12/17.

38. Holley RJ, Deligny A, Wei W, Watson HA, Ninonuevo MR, Dagalv A, et al. Mucopolysaccharidosis Type I, Unique Structure of Accumulated Heparan Sulfate and Increased N-Sulfotransferase Activity in Mice Lacking alpha-L-iduronidase. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(43):37515-24.
- 5 39. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*. 2006;1(3):1559-82.
40. Wilkinson FL, Holley RJ, Langford-Smith KJ, Badrinath S, Liao A, Langford-Smith A, et al. Neuropathology in mouse models of mucopolysaccharidosis type I, IIIA and IIIB. *PloS one*. 2012;7(4):e35787. Epub 2012/05/05.
- 10 41. Jiang L, O'Leary C, Kim HA, Parish CL, Massalas J, Waddington JL, et al. Motor and behavioral phenotype in conditional mutants with targeted ablation of cortical D1 dopamine destinatario-expressing cells. *Neurobiology of disease*. 2015;76:137-58. Epub 2015/02/17.
42. O'Tuathaigh CMP, Babovic D, O'Sullivan GJ, Clifford JJ, Tighe O, Croke DT, et al. Phenotypic characterization of spatial cognition and social behavior in mice with 'knockout' of the schizophrenia risk gene neuregulin 1. *Neuroscience*. 2007;147(1):18-27.

# LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> La Universidad de Manchester
- <120> TERAPIA GÉNICA
- <130> P33752WO/SNB
- <150> GB1701968.8
- <151> 2017-02-07
- 20 <160> 8
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 1650
- <212> ADN
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de ADN de colDS
- <400> 1

```

atgcctccac ctagaactgg aagaggcctg ctgtggctgg gcctggtgct gtctagtgtg      60
tgtgtggccc tgggcagcga gacacaggcc aacagcaciaa ccgacgccct gaacgtgctg      120
ctgatcatcg tggacgacct gaggcctagc ctgggctgct acggcgataa gctcgtgcgg      180
agccccaaca tcgatcagct ggcctctcac agcctgctgt tccagaacgc attcgcacag      240
caggcagtgt gcgccccag cagagtgtct ttcctgaccg gcagaaggcc cgacaccacc      300
cggctgtacg acttcaacag ctactggcgg gtgcacgccg gcaacttcag caccatcccc      360
cagtacttca aagaaaacgg ctacgtgacc atgagcgtgg gcaagggtgtt ccaccccggc      420
atcagctcca accacaccga cgacagcccc tacagctggt ccttcccacc ctaccacccc      480
agcagcgaga agtacgagaa caccaagacc tgcagaggcc ccgacggcga gctgcatgcc      540
aatctgctgt gcccgtgga cgtgctggat gtgcctgagg gaaccctgcc cgacaagcag      600
tctaccgagc aggccattca gctgctggaa aagatgaaga ccagcgccag ccccttcttc      660
ctggccgtgg gctatcacia gcccacatc cctttcagat accccaaaga gttccagaag      720
ctgtaccccc tggaaaacat caccctggcc cccgatcctg aggtgccaga tggactgcct      780
cccgtggcct acaaccctg gatggacatc cggcagcgcg aggatgtgca ggccctgaat      840
atcagcgtgc cctacggccc catccccgtg gatttccagc ggaagatccg gcagagctac      900
ttcgccagcg tgtcctacct ggacacccaa gtgggcagac tgctgagcgc cctggacgat      960
ctgcagctgg ccaactccac catcattgcc ttcaccagcg accacggctg ggccctggga     1020
gaacatggcg agtgggcaa gtacagcaac ttcgacgtgg ccacccacgt gccctgatc     1080
ttctacgtgc caggcagaac cgccagcctg cctgaggctg gcgagaagct gttcccttac     1140
ctggaccctc tcgacagcgc ctcccagctg atggaacctg gcagacagag catggacctg     1200
gtggaactgg tgtccctgtt cccacactg gccggactgg ctggactgca ggtgccccct     1260
agatgtcccg tgccctagctt tcacgtggaa ctgtgcagag agggcaagaa cctgctgaag     1320
cacttccggt tccgggacct ggaagaagat ccctacctgc ccggcaaccc cagagagctg     1380
atgcctaca gccagtacc cagaccagc gacatccctc agtggaacag cgacaagccc     1440
agcctgaagg acatcaagat catgggctac agcatccgga ccatcgacta ccggtacacc     1500
gtgtgggtgg gattcaaccc cgacgagttc ctggccaatt tctccgacat ccacgccggg     1560
gagctgtact tcgtggacag cgatcccctg caggaccaca acatgtacaa cgacagccag     1620
ggcggcgacc tggtccagct gctgatgccc                                     1650

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1650

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

atgccgccac	cccggaccgg	ccgaggcctt	ctctggctgg	gtctggttct	gagctccgtc	60
tgcgtcgccc	tccgatccga	aacgcaggcc	aactcgacca	cagatgctct	gaacgttctt	120
ctcatcatcg	tggatgacct	gcgcccctcc	ctgggctggt	atggggataa	gctggtgagg	180
tccccaaata	ttgaccaact	ggcatcccac	agcctcctct	tccagaatgc	ctttgcgcag	240
caagcagtgt	gcgccccgag	ccgcgtttct	ttcctcactg	gcaggagacc	tgacaccacc	300
cgcctgtacg	acttcaactc	ctactggagg	gtgcacgctg	gaaacttctc	caccatcccc	360
cagtacttca	aggagaatgg	ctatgtgacc	atgtcggctg	gaaaagtctt	tcaccctggg	420
atatcttcta	accataccga	tgattctccg	tatagctggt	cttttccacc	ttatcatcct	480
tcctctgaga	agtatgaaaa	cactaagaca	tgtcgagggc	cagatggaga	actccatgcc	540
aacctgcttt	gccctgtgga	tgtgctggat	gttcccagag	gcaccttgcc	tgacaaacag	600
agcactgagc	aagccataca	gttggttgaa	aagatgaaaa	cgtcagccag	tcctttcttc	660
ctggccggtg	ggtatcataa	gccacacatc	cccttcagat	accccaagga	atttcagaag	720
ttgtatccct	tggagaacat	caccctggcc	ccgatcccg	aggtccctga	tggcctaccc	780
cctgtggcct	acaaccctg	gatggacatc	aggcaacggg	aagacgtcca	agccttaaac	840
atcagtgtgc	cgtatggtcc	aattcctgtg	gactttcagc	ggaaaatccg	ccagagctac	900
tttgccctctg	tgtcatattt	ggatacacag	gtcggccgcc	tcttgagtgc	tttggacgat	960
cttcagctgg	ccaacagcac	catcattgca	tttacctcgg	atcatgggtg	ggctctaggt	1020
gaacatggag	aatgggcaa	atacagcaat	tttgatgttg	ctacccatgt	tcccctgata	1080
ttctatgttc	ctggaaggac	ggcttcactt	ccggaggcag	gcgagaagct	tttcccttac	1140
ctcgaccctt	ttgattccgc	ctcacagttg	atggagccag	gcaggcaatc	catggacctt	1200
gtggaacttg	tgtctctttt	tcccacgtg	gctggacttg	caggactgca	ggttccacct	1260
cgtcgccccg	ttccttcatt	tcacgttgag	ctgtgcagag	aaggcaagaa	ccttctgaag	1320
cattttcgat	tccgtgactt	ggaagaggat	ccgtacctcc	ctggtaatcc	ccgtgaactg	1380
attgcctata	gccagtatcc	ccggccttca	gacatccctc	agtggaatcc	tgacaagccg	1440
agtttaaaag	atataaagat	catgggctat	tccatacgca	ccatagacta	taggtatact	1500
gtgtggggtg	gcttcaatcc	tgatgaattt	ctagctaact	tttctgacat	ccatgcaggg	1560
gaactgtatt	ttgtggattc	tgaccatttg	caggatcaca	atatgtataa	tgattcccaa	1620
ggtggagatc	ttttccagtt	gttgatgcct				1650

&lt;210&gt; 3

<211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> repetición en tándem de ApoE (ApoEII)  
 <400> 3  
 ctgagaaagc tgcggaagcg gctgctgctg aggaagctga gaaaaagact gctg 54  
 <210> 4  
 <211> 63  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Conector  
 <400> 4  
 ctgggagggg gaggatctgg cggaggcgga agtggcggcg gaggatcagg gggcggaggc 60  
 15 tct 63  
 <210> 5  
 <211> 550  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> colDS  
 <400> 5  
 Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser  
 20 25 30  
 Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg



# ES 2 895 263 T3

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

# ES 2 895 263 T3

Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val  
 290 295 300  
 Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp  
 305 310 315 320  
 Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly  
 325 330 335  
 Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp  
 340 345 350  
 Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala  
 355 360 365  
 Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe  
 370 375 380  
 Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu  
 385 390 395 400  
 Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu  
 405 410 415  
 Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro Ser Phe His Val Glu Leu Cys  
 420 425 430  
 Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu  
 435 440 445  
 Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser  
 450 455 460  
 Gln Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro  
 465 470 475 480  
 Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ile Met Gly Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp  
 485 490 495  
 Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala  
 500 505 510  
 Asn Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu Leu Tyr Phe Val Asp Ser Asp  
 515 520 525  
 Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr Asn Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu  
 530 535 540

# ES 2 895 263 T3

Phe Gln Leu Leu Met Pro  
545 550

<210> 6

<211> 550

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

# ES 2 895 263 T3

Met	Pro	Pro	Pro	Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu	Trp	Leu	Gly	Leu	Val	1	5	10	15
Leu	Ser	Ser	Val	Cys	Val	Ala	Leu	Gly	Ser	Glu	Thr	Gln	Ala	Asn	Ser	20	25	30	
Thr	Thr	Asp	Ala	Leu	Asn	Val	Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Asp	Asp	Leu	Arg	35	40	45	
Pro	Ser	Leu	Gly	Cys	Tyr	Gly	Asp	Lys	Leu	Val	Arg	Ser	Pro	Asn	Ile	50	55	60	
Asp	Gln	Leu	Ala	Ser	His	Ser	Leu	Leu	Phe	Gln	Asn	Ala	Phe	Ala	Gln	65	70	75	80
Gln	Ala	Val	Cys	Ala	Pro	Ser	Arg	Val	Ser	Phe	Leu	Thr	Gly	Arg	Arg	85	90	95	
Pro	Asp	Thr	Thr	Arg	Leu	Tyr	Asp	Phe	Asn	Ser	Tyr	Trp	Arg	Val	His	100	105	110	
Ala	Gly	Asn	Phe	Ser	Thr	Ile	Pro	Gln	Tyr	Phe	Lys	Glu	Asn	Gly	Tyr	115	120	125	
Val	Thr	Met	Ser	Val	Gly	Lys	Val	Phe	His	Pro	Gly	Ile	Ser	Ser	Asn	130	135	140	
His	Thr	Asp	Asp	Ser	Pro	Tyr	Ser	Trp	Ser	Phe	Pro	Pro	Tyr	His	Pro	145	150	155	160
Ser	Ser	Glu	Lys	Tyr	Glu	Asn	Thr	Lys	Thr	Cys	Arg	Gly	Pro	Asp	Gly	165	170	175	
Glu	Leu	His	Ala	Asn	Leu	Leu	Cys	Pro	Val	Asp	Val	Leu	Asp	Val	Pro	180	185	190	
Glu	Gly	Thr	Leu	Pro	Asp	Lys	Gln	Ser	Thr	Glu	Gln	Ala	Ile	Gln	Leu	195	200	205	

# ES 2 895 263 T3

Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly  
 210 215 220  
 Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro  
 245 250 255  
 Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln  
 260 265 270  
 Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile  
 275 280 285  
 Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val  
 290 295 300  
 Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp  
 305 310 315 320  
 Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly  
 325 330 335  
 Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp  
 340 345 350  
 Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala  
 355 360 365  
 Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe  
 370 375 380  
 Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu  
 385 390 395 400  
 Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu  
 405 410 415  
 Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro Ser Phe His Val Glu Leu Cys  
 420 425 430  
 Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu  
 435 440 445  
 Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser  
 450 455 460

Gln Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro  
465 470 475 480

Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ile Met Gly Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp  
485 490 495

Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala  
500 505 510

Asn Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu Leu Tyr Phe Val Asp Ser Asp  
515 520 525

Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr Asn Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu  
530 535 540

Phe Gln Leu Leu Met Pro  
545 550

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ApoE tandem repeat (ApoEII)

<400> 7

Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Leu Arg Lys Leu Arg Lys Arg  
1 5 10 15

Leu Leu

10 <210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Conector

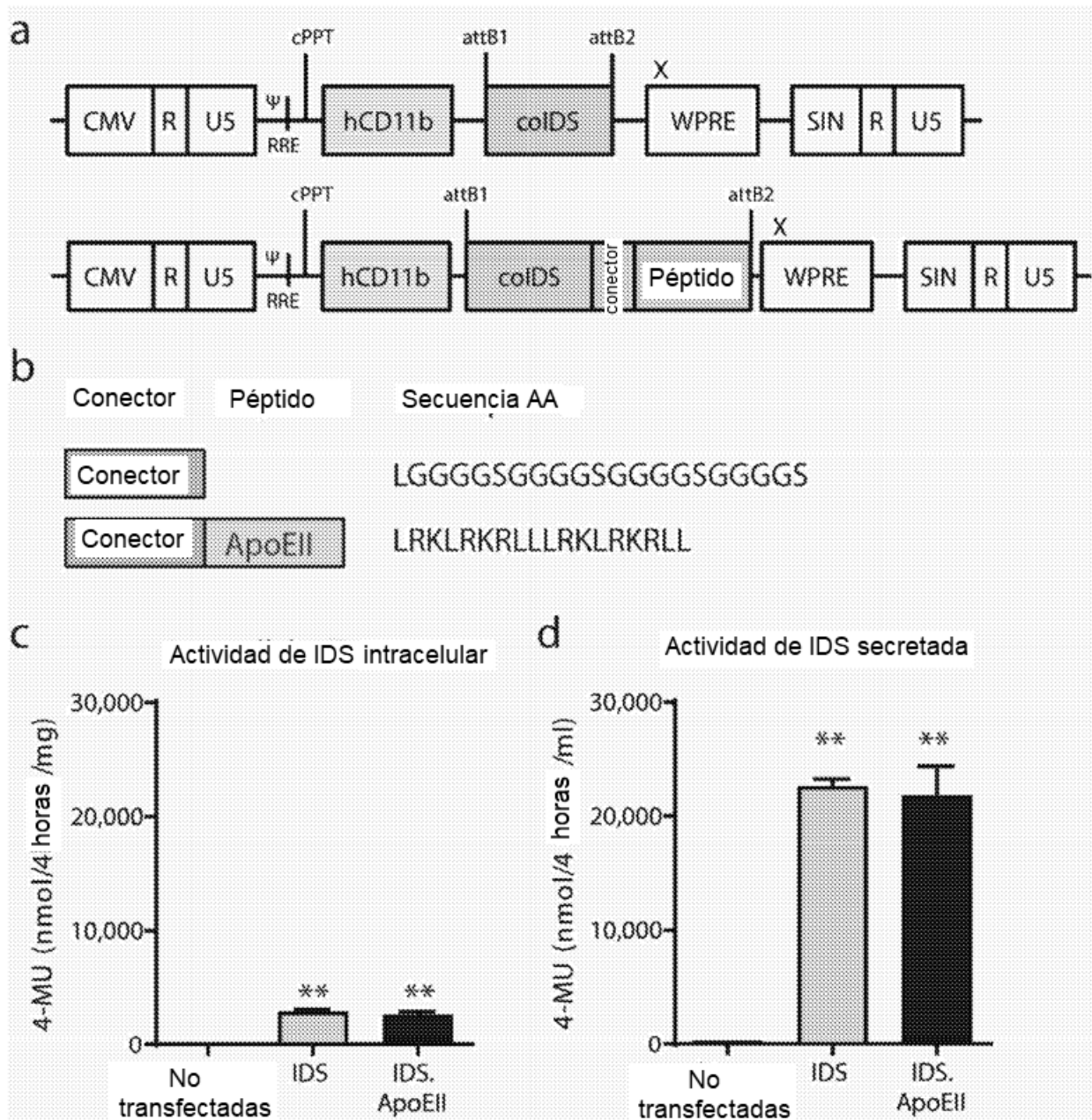
<400> 8

Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser  
20

# REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que comprende una secuencia del gen iduronato-2-sulfatasa (IDS) y una repetición en tándem de la secuencia del gen de la apolipoproteína E (ApoEII).
- 5 2. El ácido nucleico según la reivindicación 1, que comprende además una secuencia conectora intermedia ubicada entre la secuencia de IDS y la secuencia de ApoEII.
3. El ácido nucleico según la reivindicación 1 o 2, en el que la secuencia de IDS comprende una secuencia optimizada por codón de la secuencia de IDS de tipo silvestre.
4. El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
  - 10 a) la secuencia de IDS comprende la secuencia según SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2 o una secuencia derivada que tiene al menos un 90% de homología de la misma; y/o
  - b) la secuencia de ApoEII comprende una o más secuencias según SEQ ID No. 3 o una secuencia derivada que tiene al menos un 95% de homología de la misma; y/o
  - c) la secuencia conectora intermedia comprende la secuencia según SEQ ID No. 4 o una secuencia derivada que tiene al menos un 95% de homología de la misma.
- 15 5. El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico se incorpora en un vector de terapia génica y opcionalmente, el vector es un vector lentivírico.
6. El ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico se transduce en una o más células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC).
- 20 7. El ácido nucleico de cualquier reivindicación anterior, para uso en el tratamiento, manejo, retraso de la progresión o normalización de la mucopolisacaridosis tipo II (MPS II) o síndrome de Hunters.
8. Una composición que comprende:
  - a) una primera fracción que comprende iduronato-2-sulfatasa (IDS); y
  - b) una segunda fracción que comprende una repetición en tándem de la apolipoproteína E (ApoEII).
- 25 9. La composición de la reivindicación 8, en la que la primera y la segunda fracción tienen una fracción conectora intermedia ubicada entre ellas.
10. La composición de la reivindicación 9, en la que:
  - a) la secuencia de aminoácidos de la primera fracción comprende la secuencia según SEQ ID No. 5 o una secuencia derivada que tiene al menos un 90% de homología de la misma; y/o
  - 30 b) la secuencia de aminoácidos de la segunda fracción comprende una o más secuencias según SEQ ID No. 7 o una secuencia derivada que tiene al menos un 95% de homología de la misma; y/o
  - c) la secuencia de aminoácidos de la fracción conectora intermedia comprende la secuencia según SEQ ID No. 8 o una secuencia derivada que tiene al menos un 95% de homología de la misma.
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para uso en el tratamiento, manejo, retraso de la progresión o normalización de la mucopolisacaridosis tipo II (MPS II) o síndrome de Hunters.
- 35 12. Células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) para uso en el tratamiento, manejo, retraso de la progresión o normalización del desarrollo de mucopolisacaridosis tipo II (MPS II) en un individuo, en donde las HSPC se han extraído del paciente, transducido ex vivo con el ácido nucleico reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y las HSPC transducidas se han administrado al individuo.
- 40 13. Una combinación de un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y una o más células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC), en donde el ácido nucleico es capaz de transducir las HSPC.

**Figura 1**



**Figura 1 cont.**

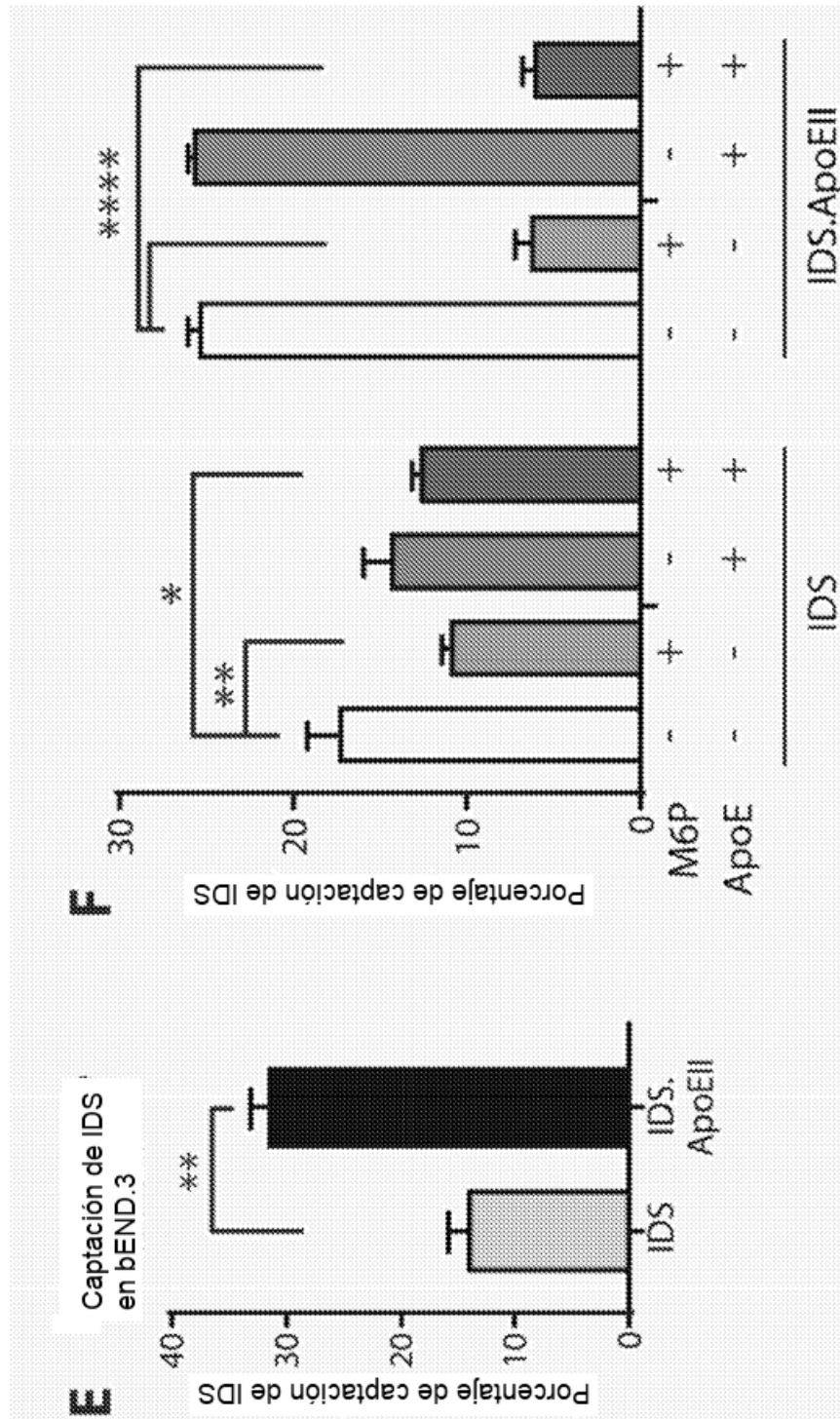
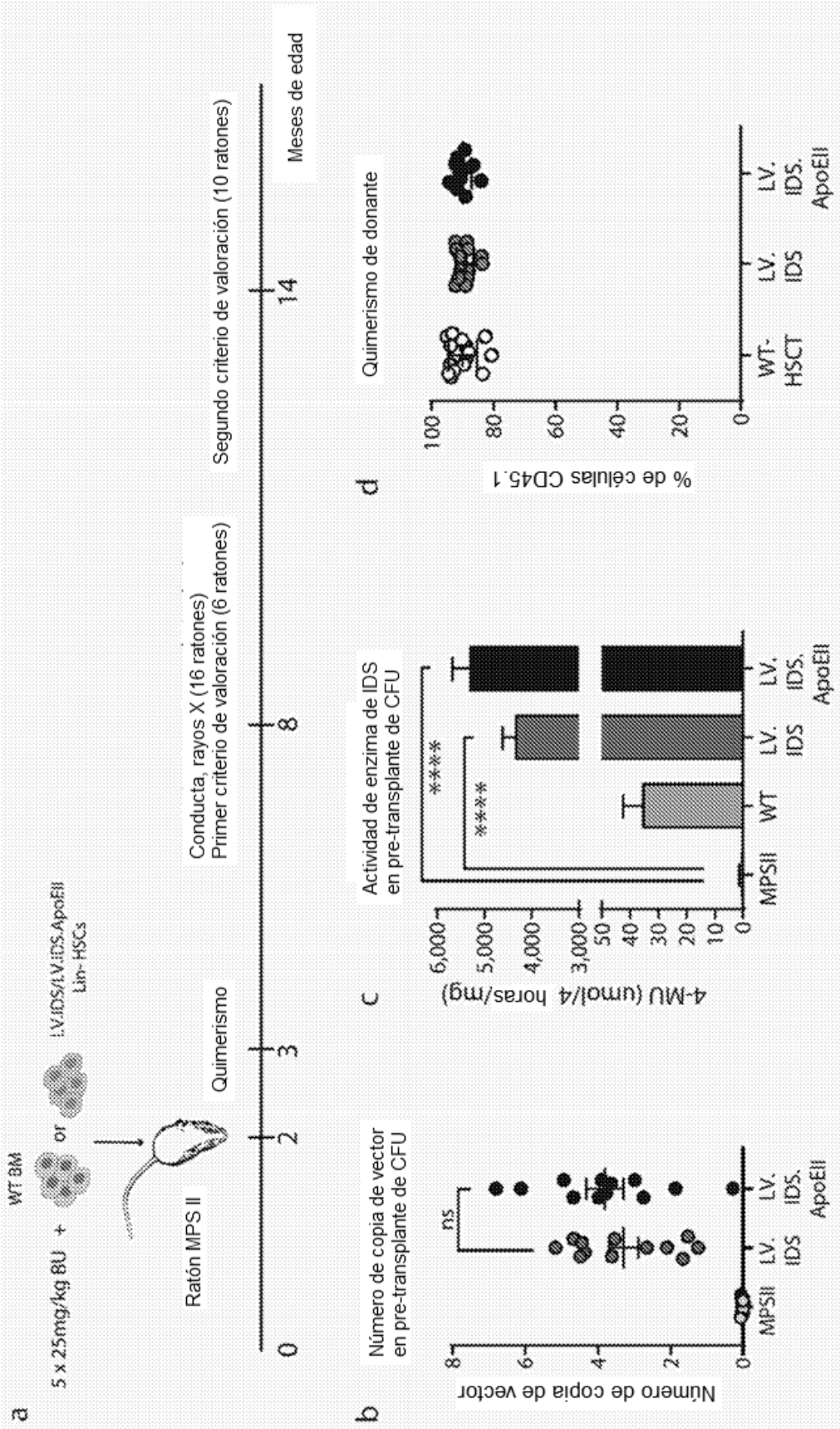
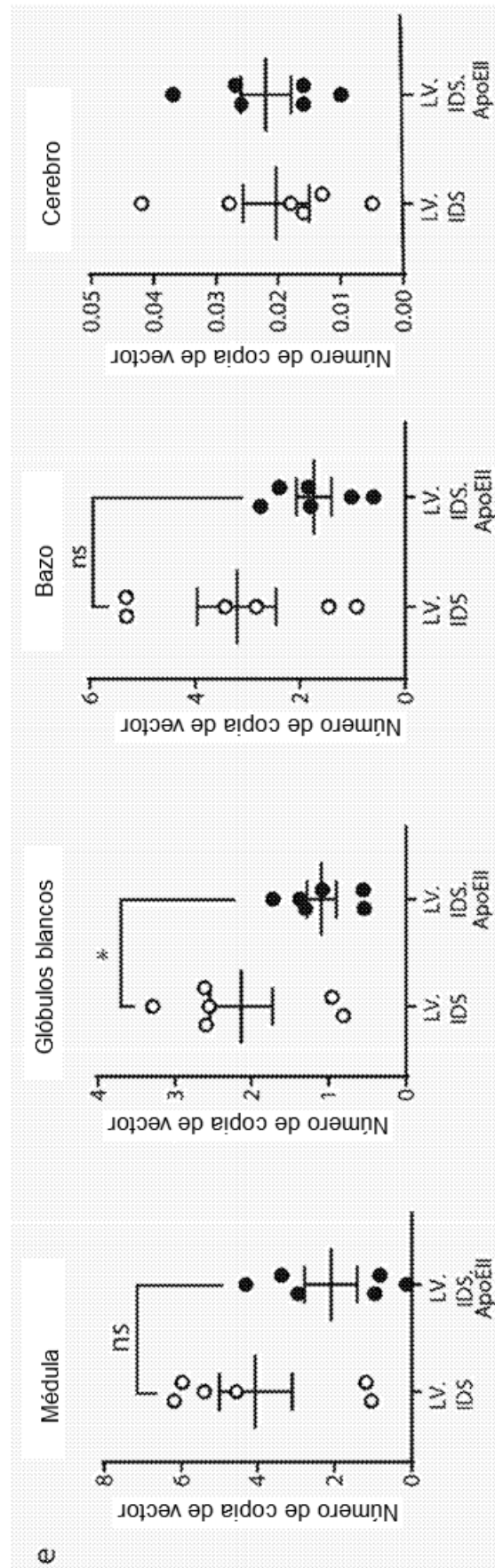


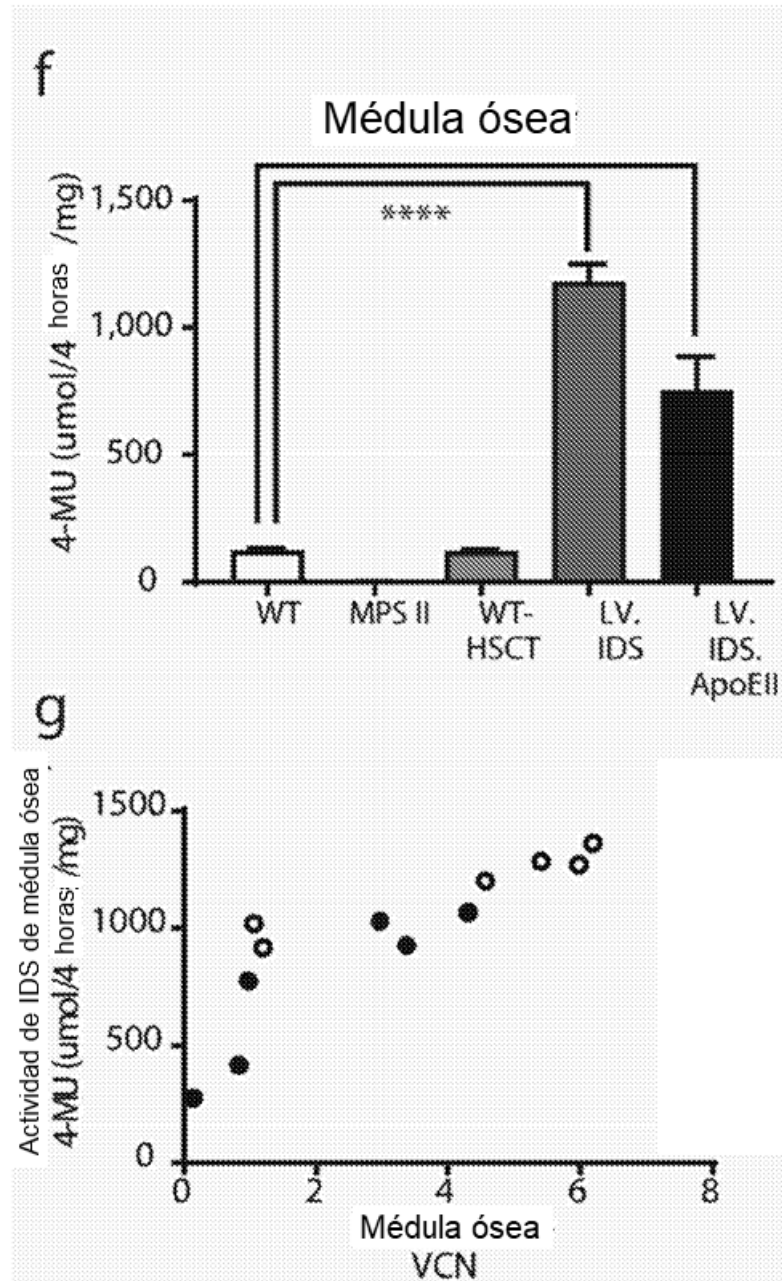
Figura 2



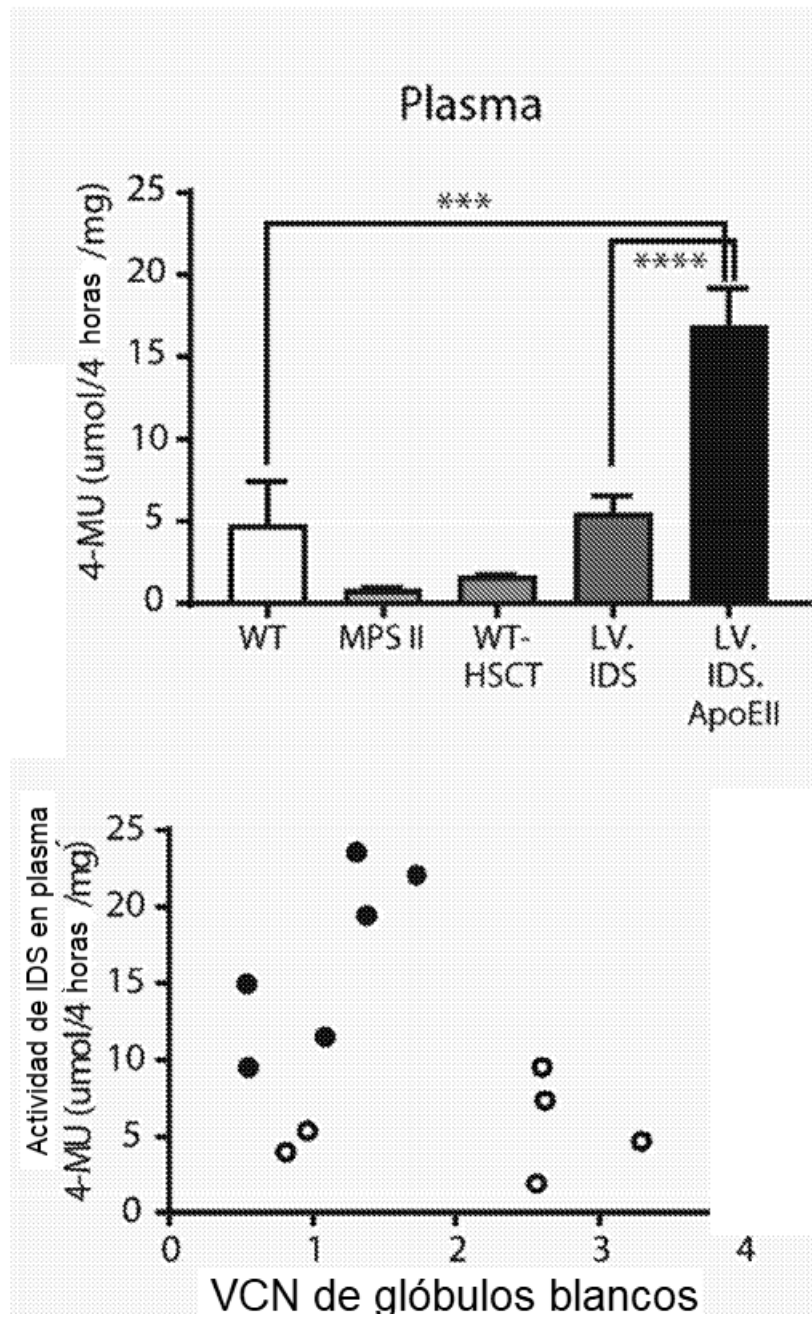
**.Figura 2 cont.**



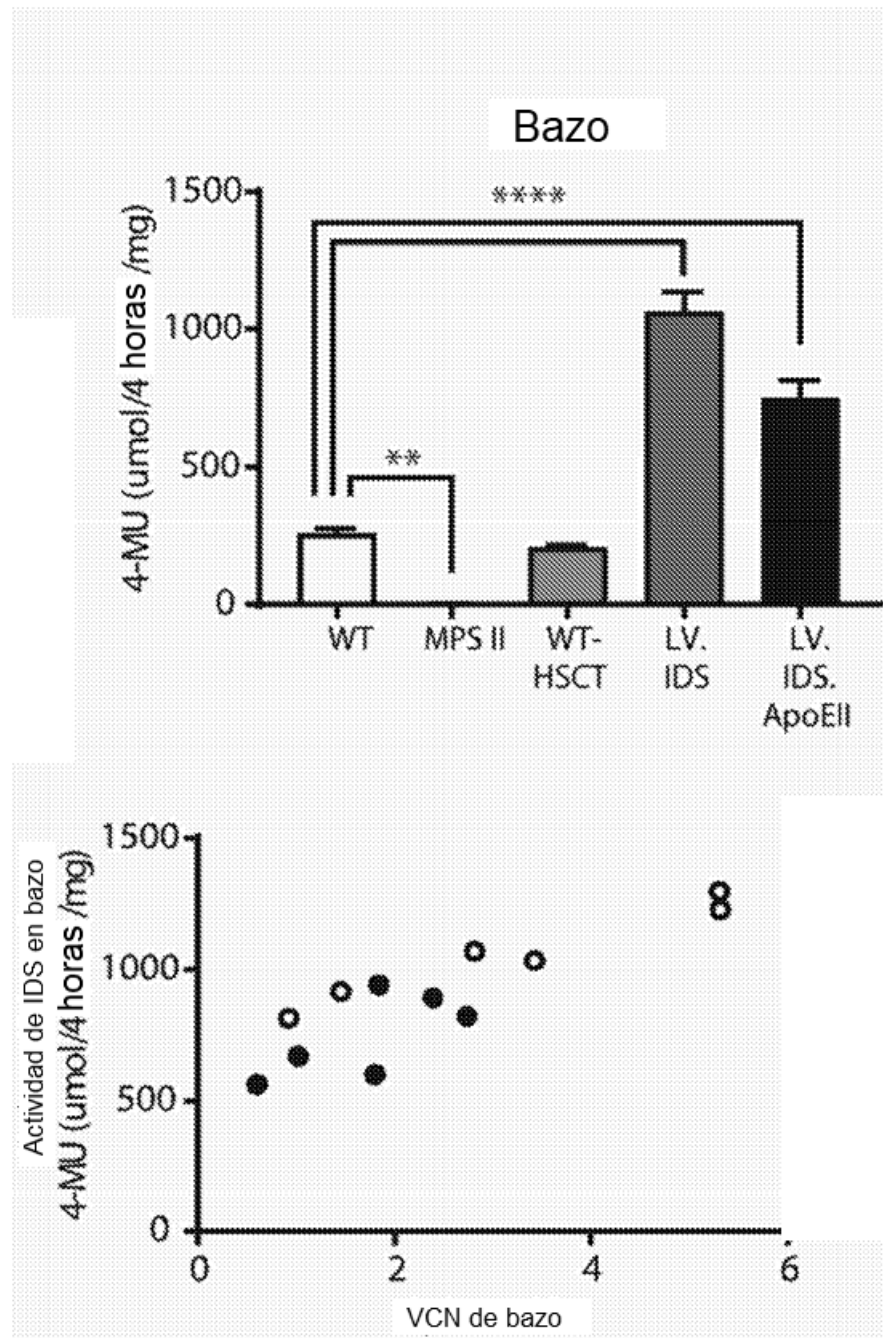
**Figura 2 cont.**



**Figura 2 cont.**

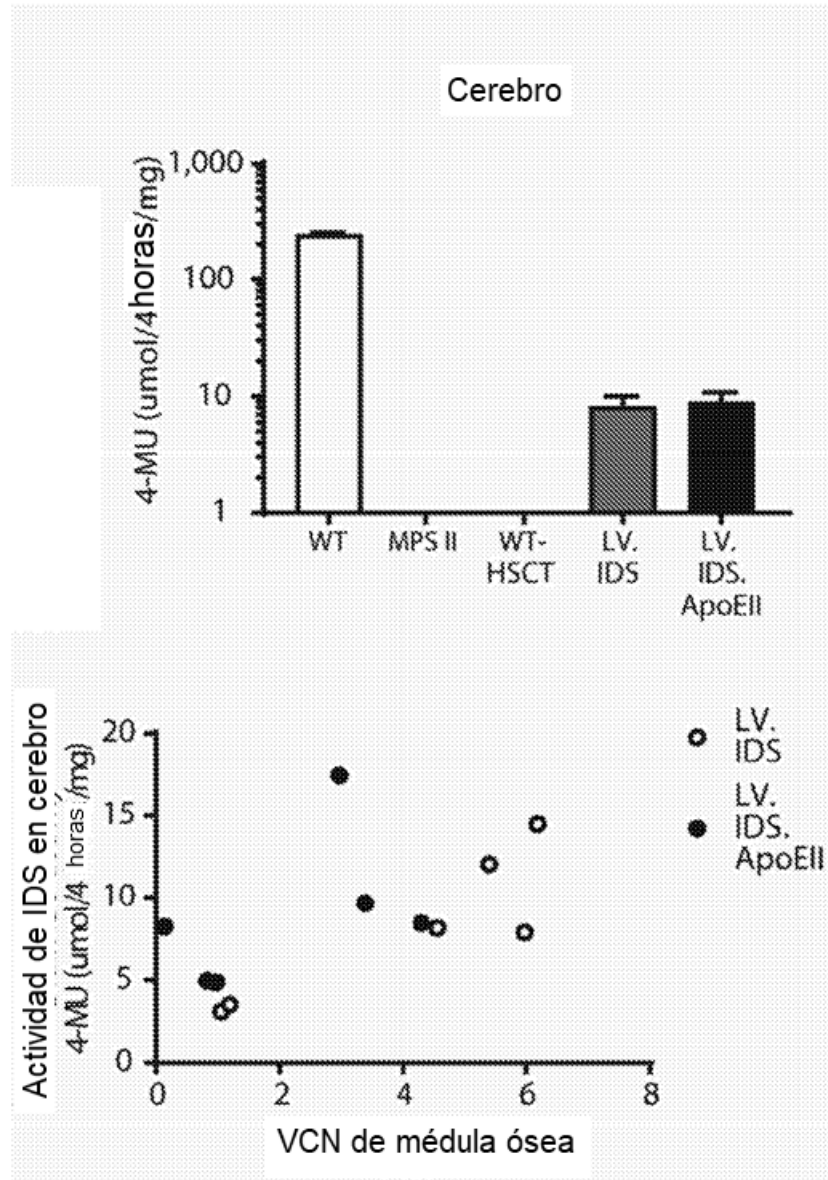


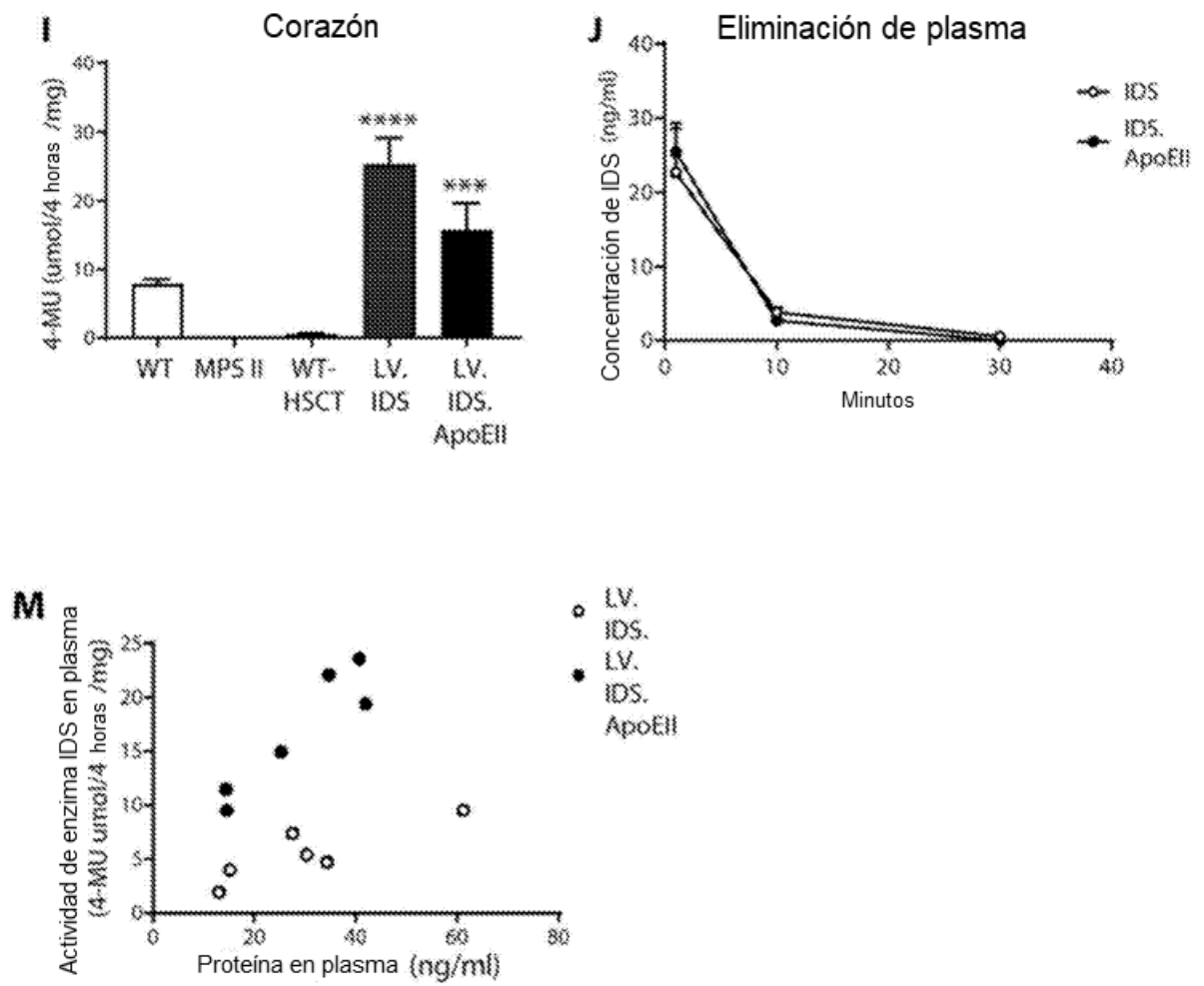
**Figura 2 cont.**





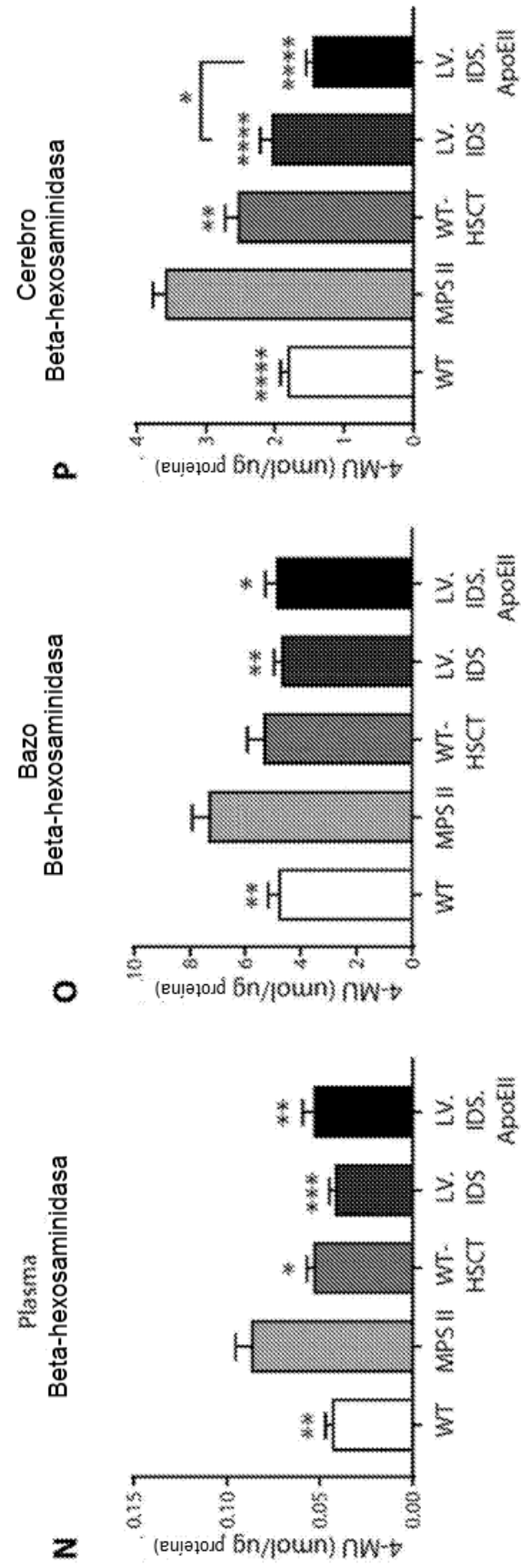
**Figura 2 cont.**



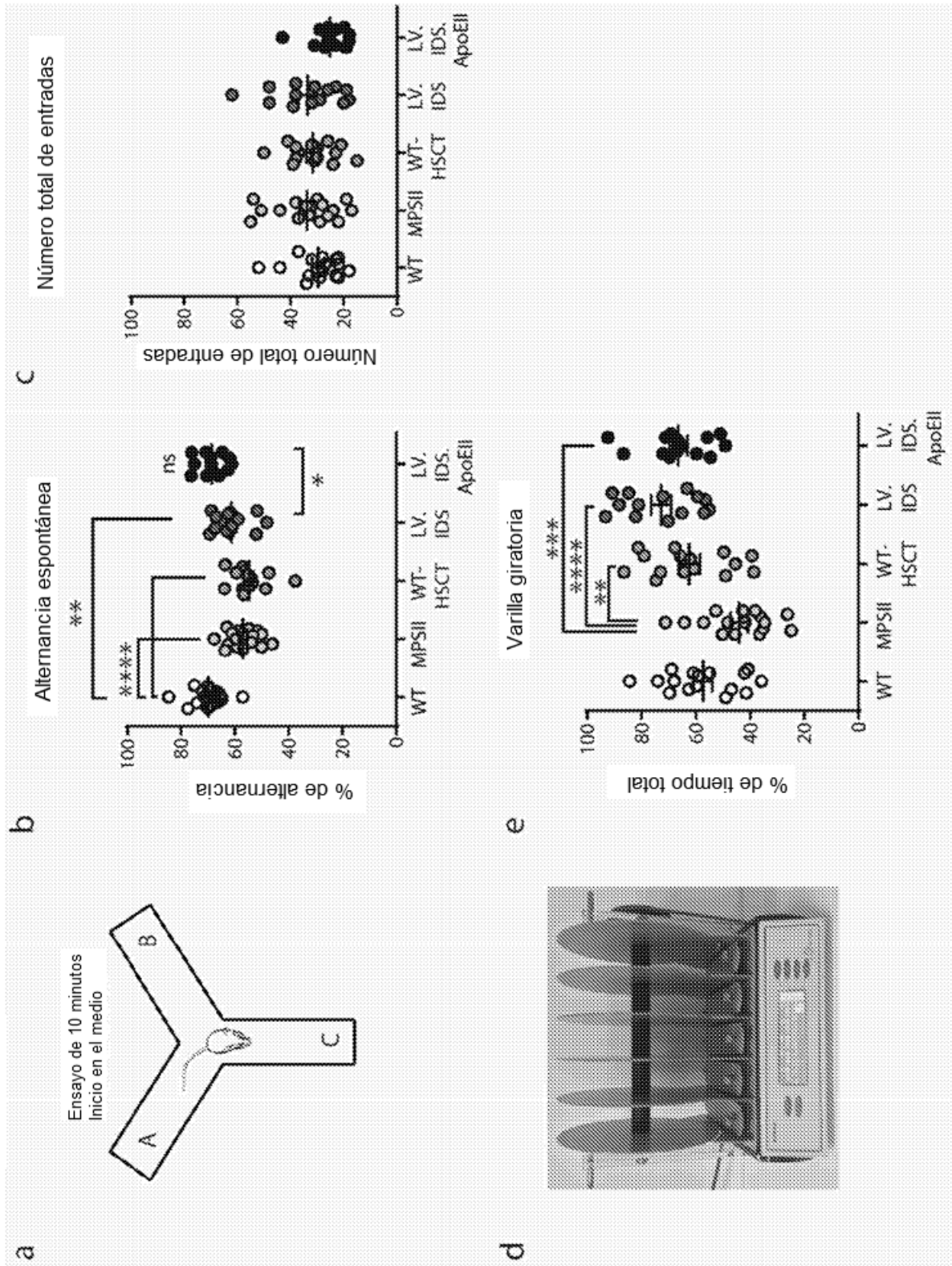
**Figura 2 cont.**



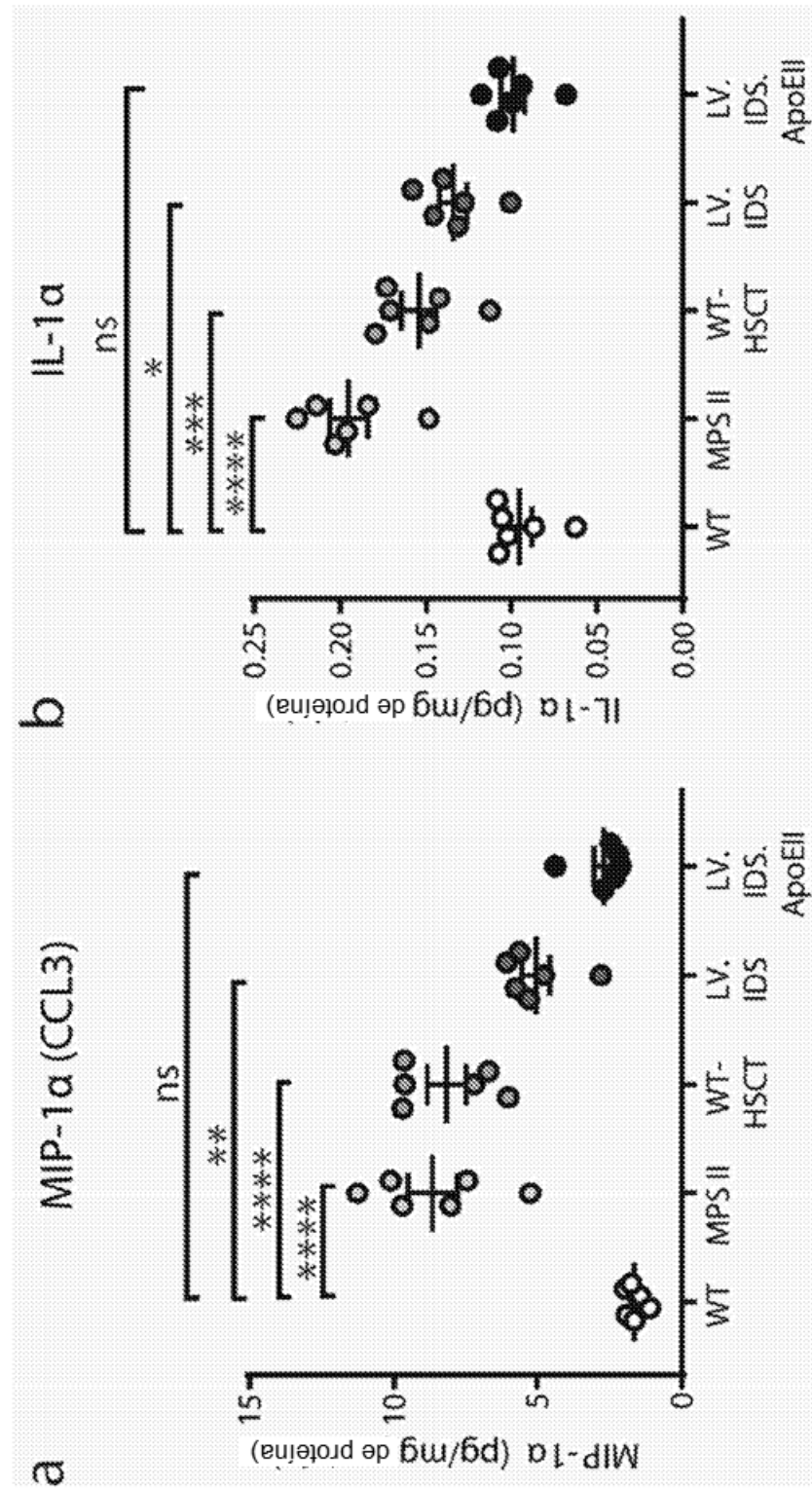
**Figura 2 cont.**



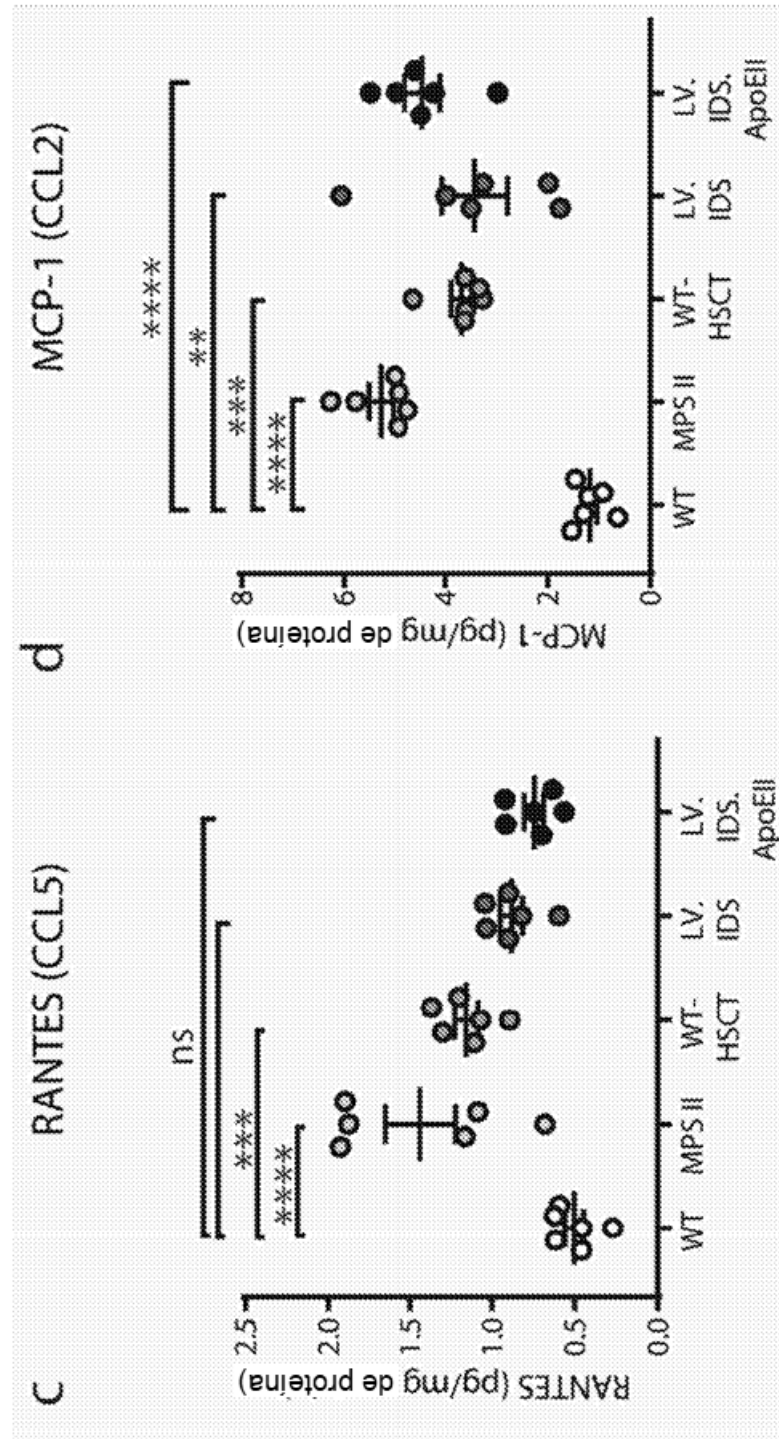
**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 4 cont.**



**Figura 4 cont.**

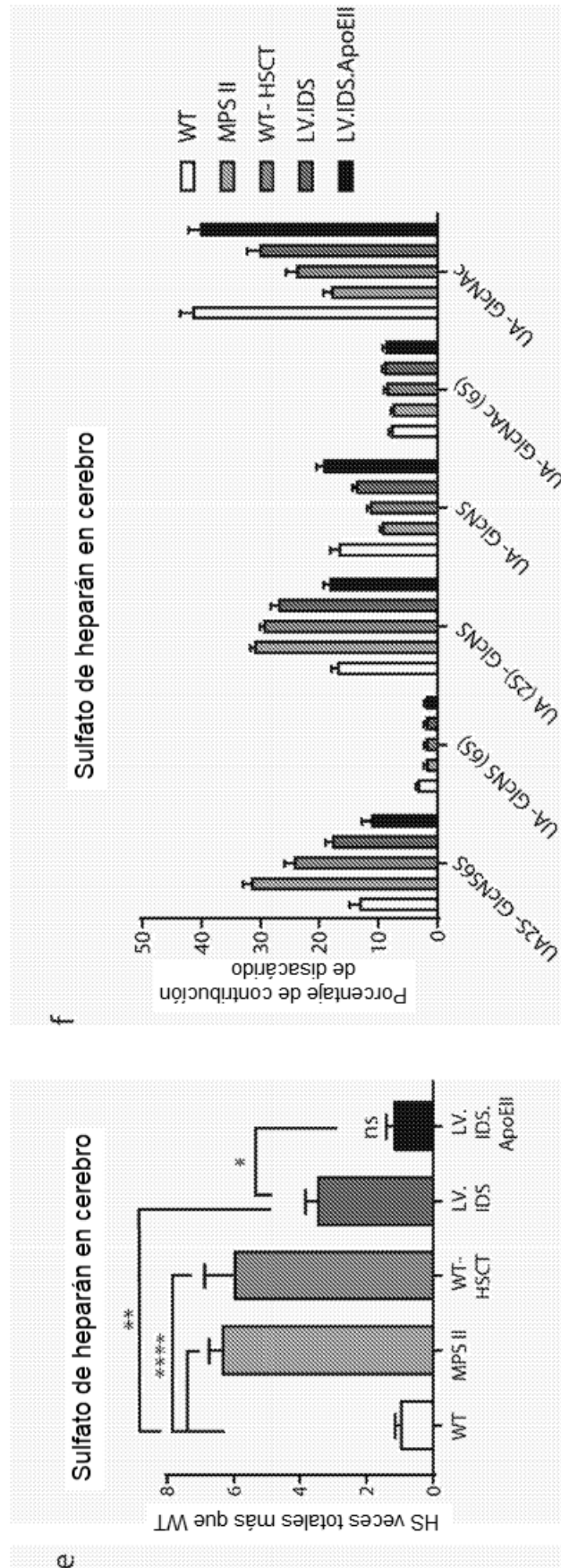




Figura 4 cont.

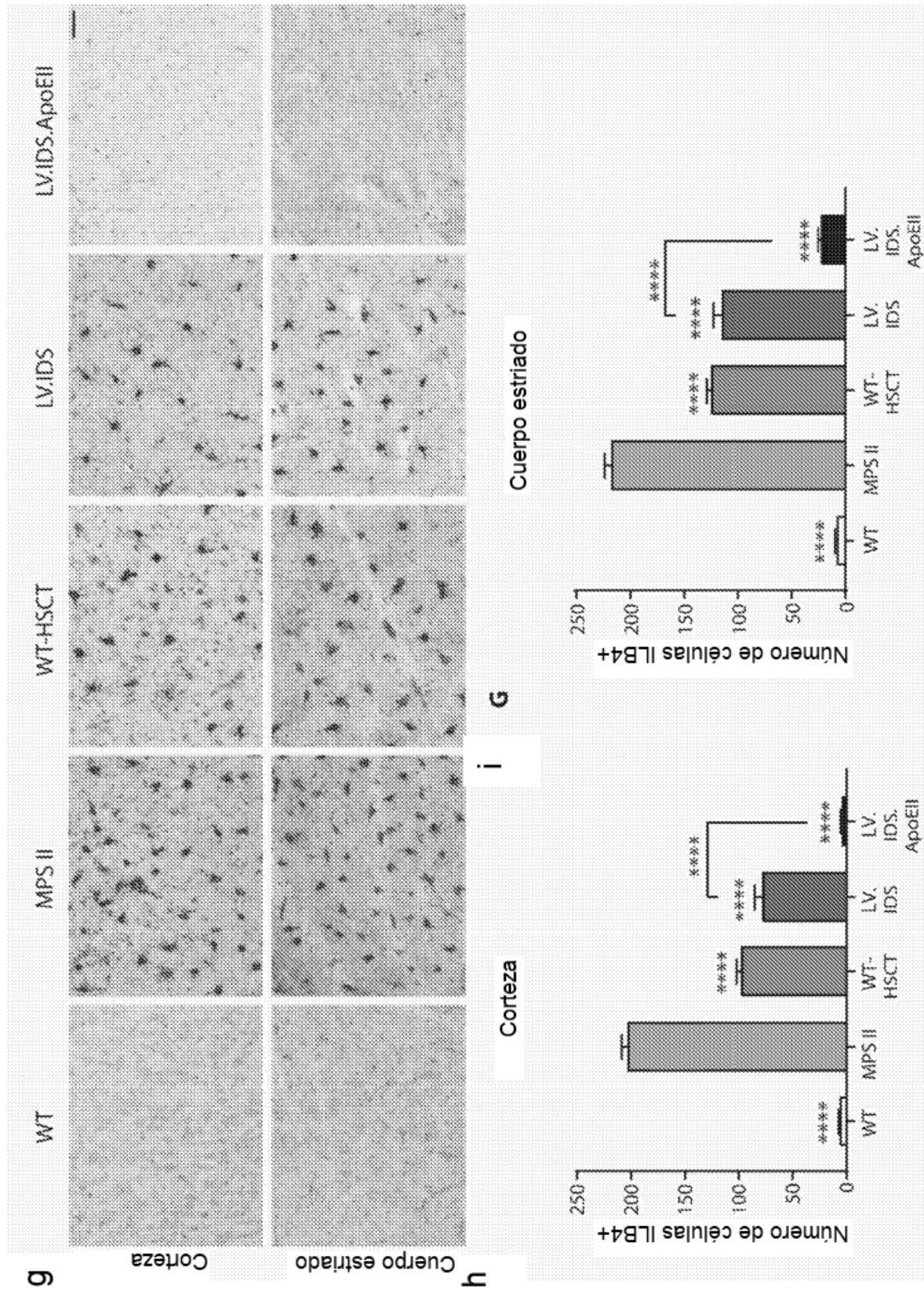
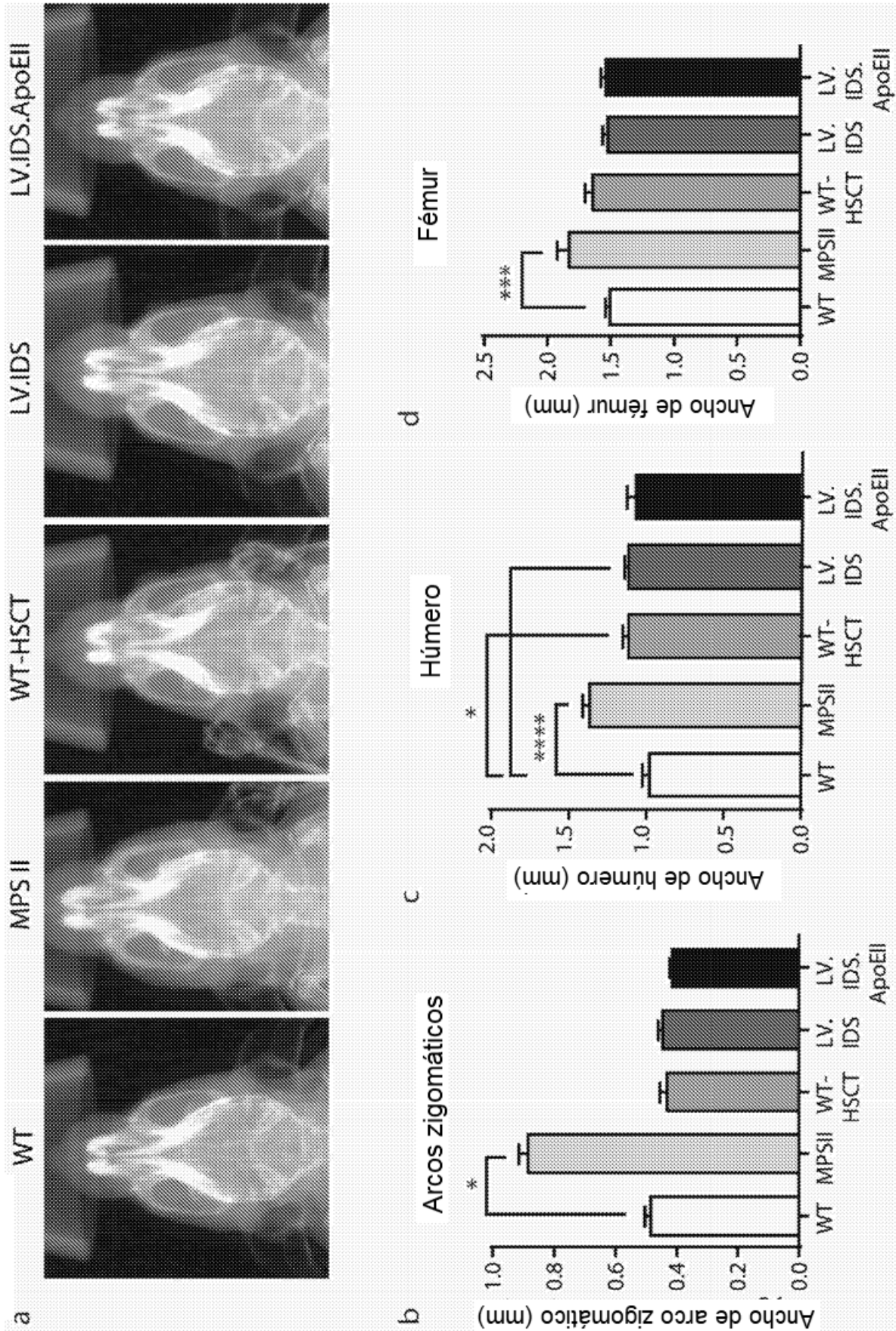
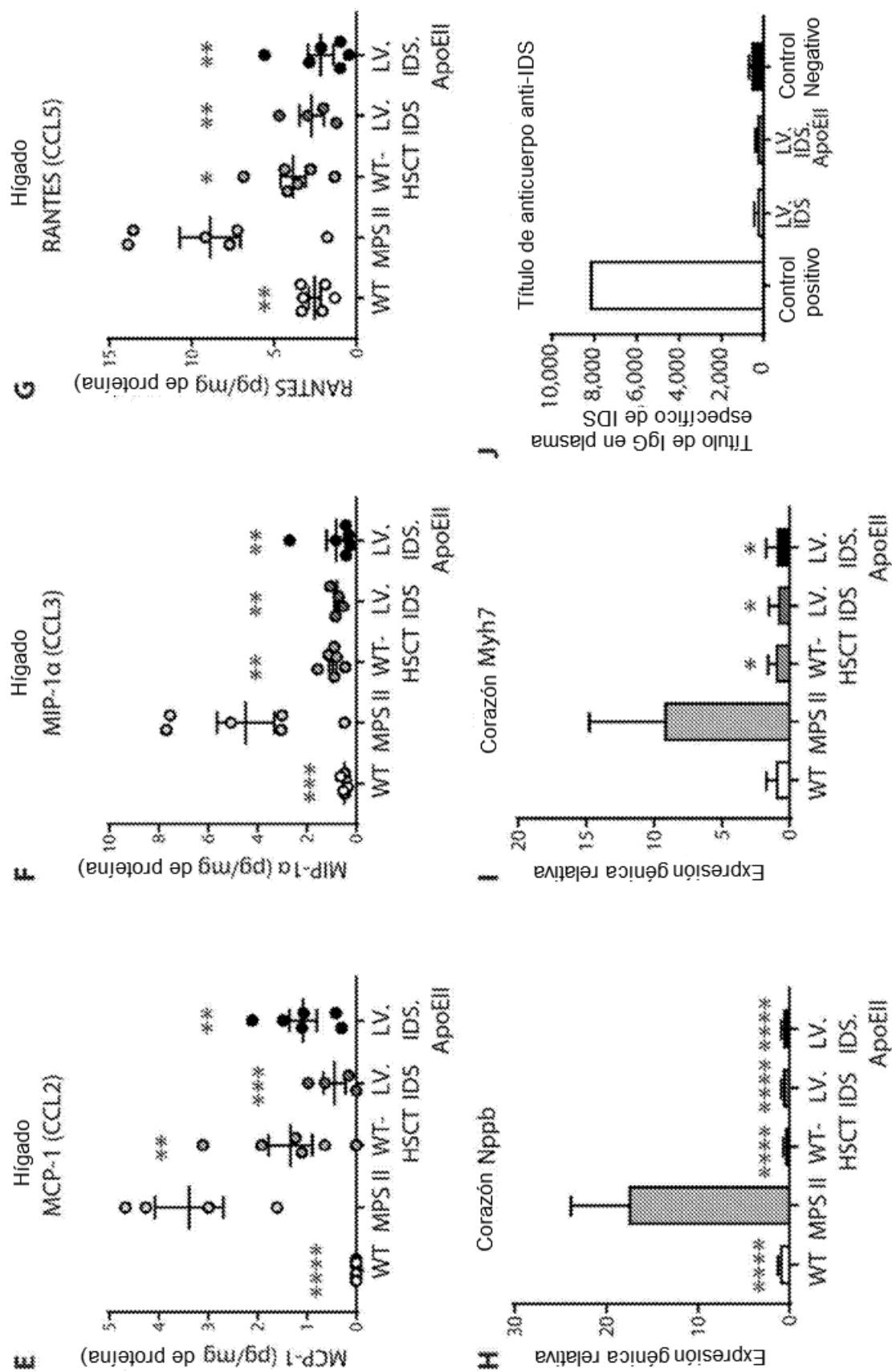


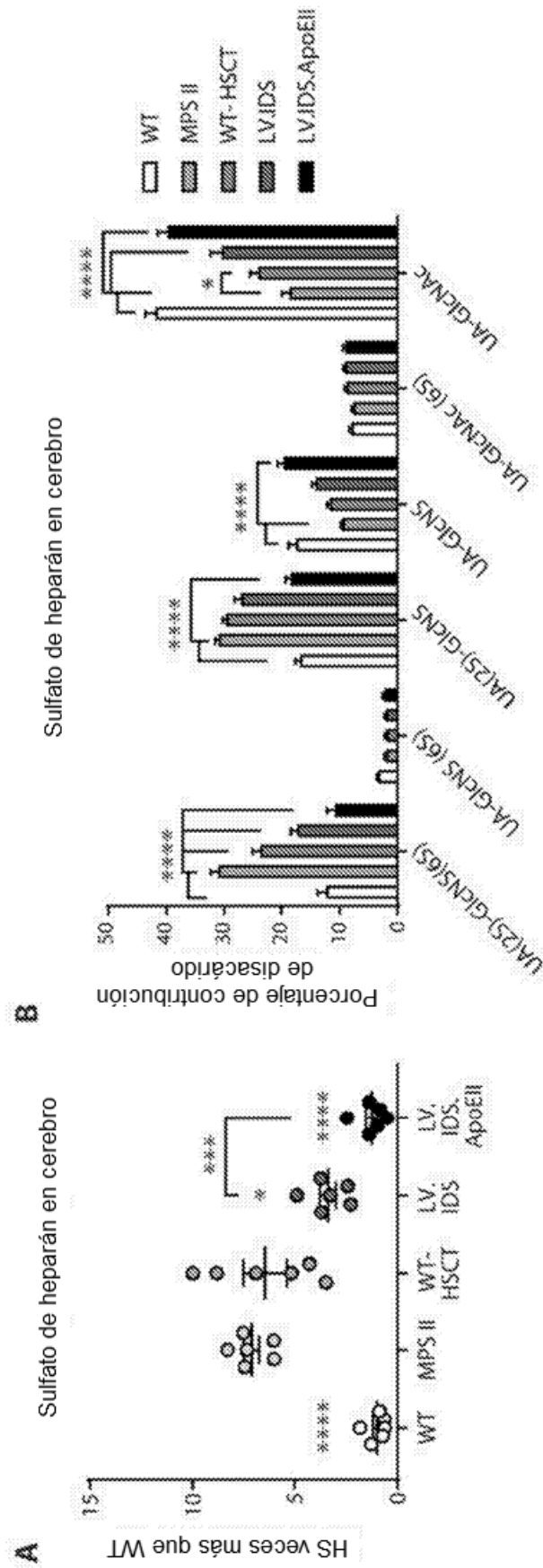
Figura 5



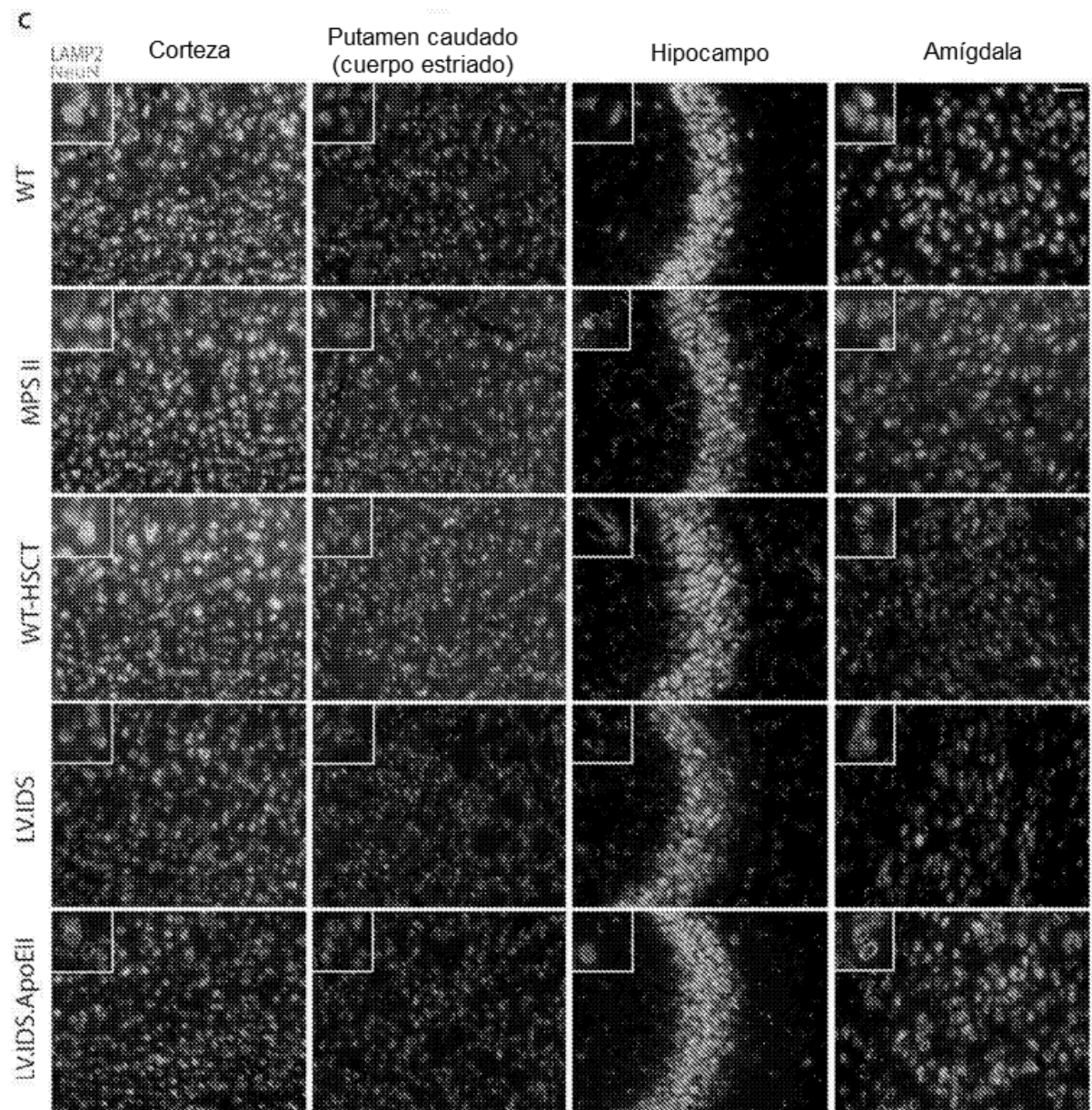
**Figura 5 cont.**



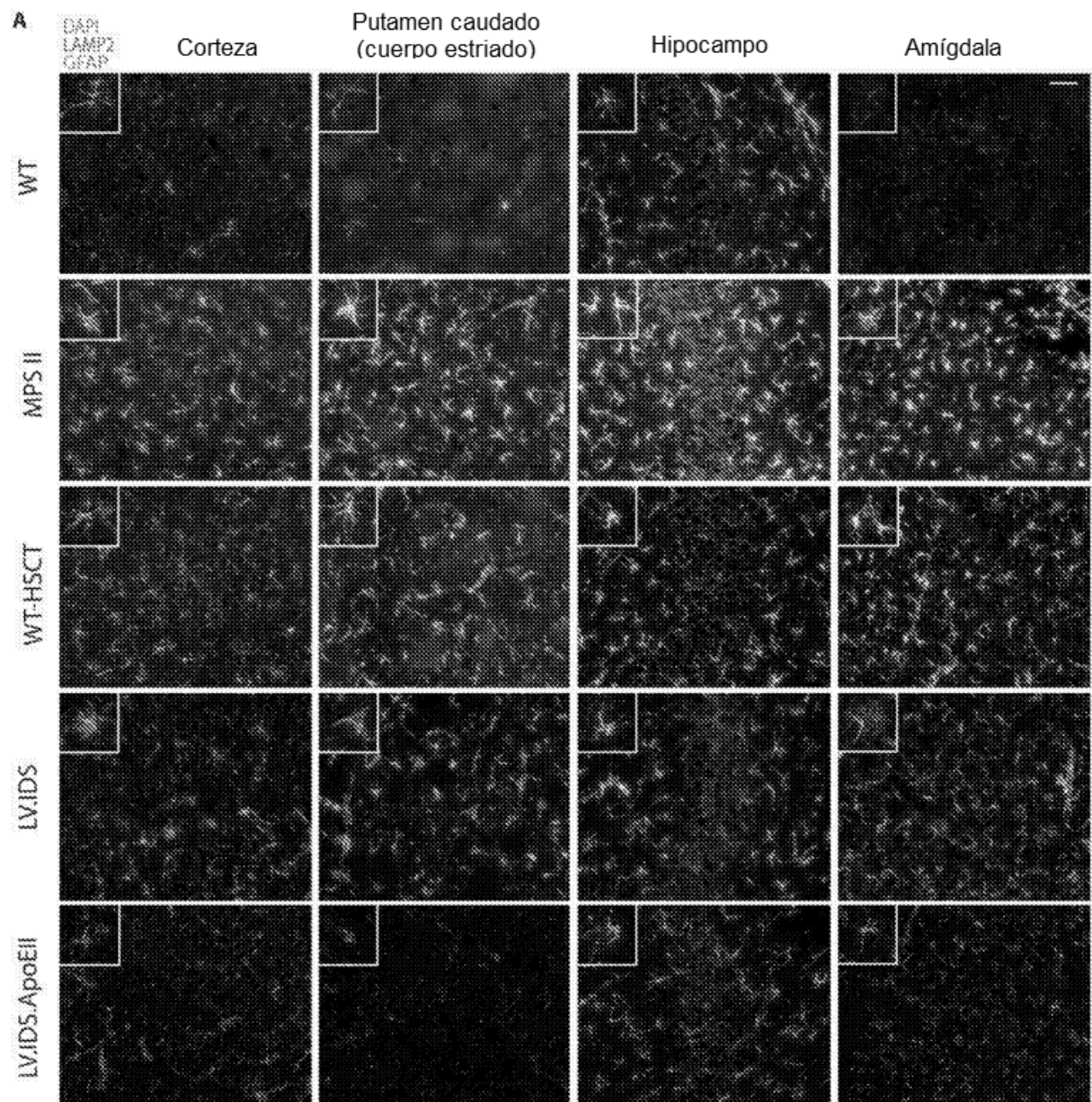
**Figura 6**



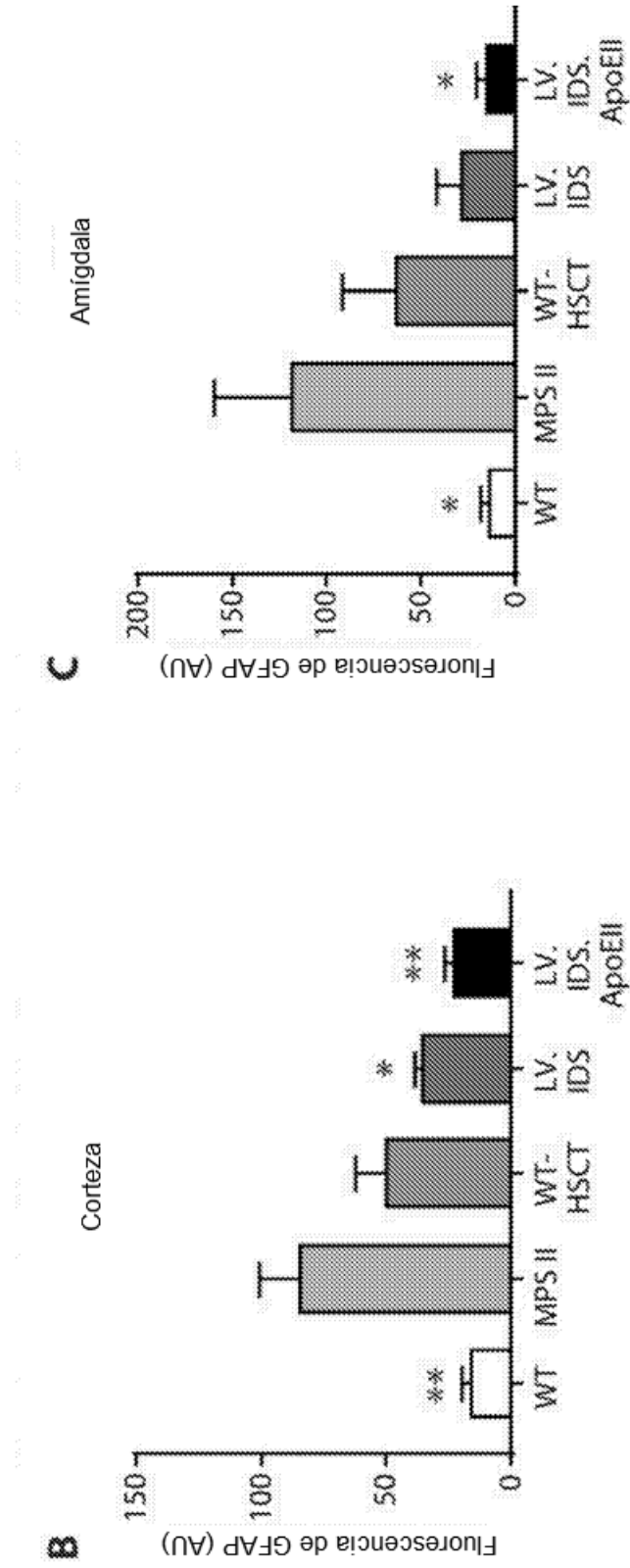
**Figura6 cont.**



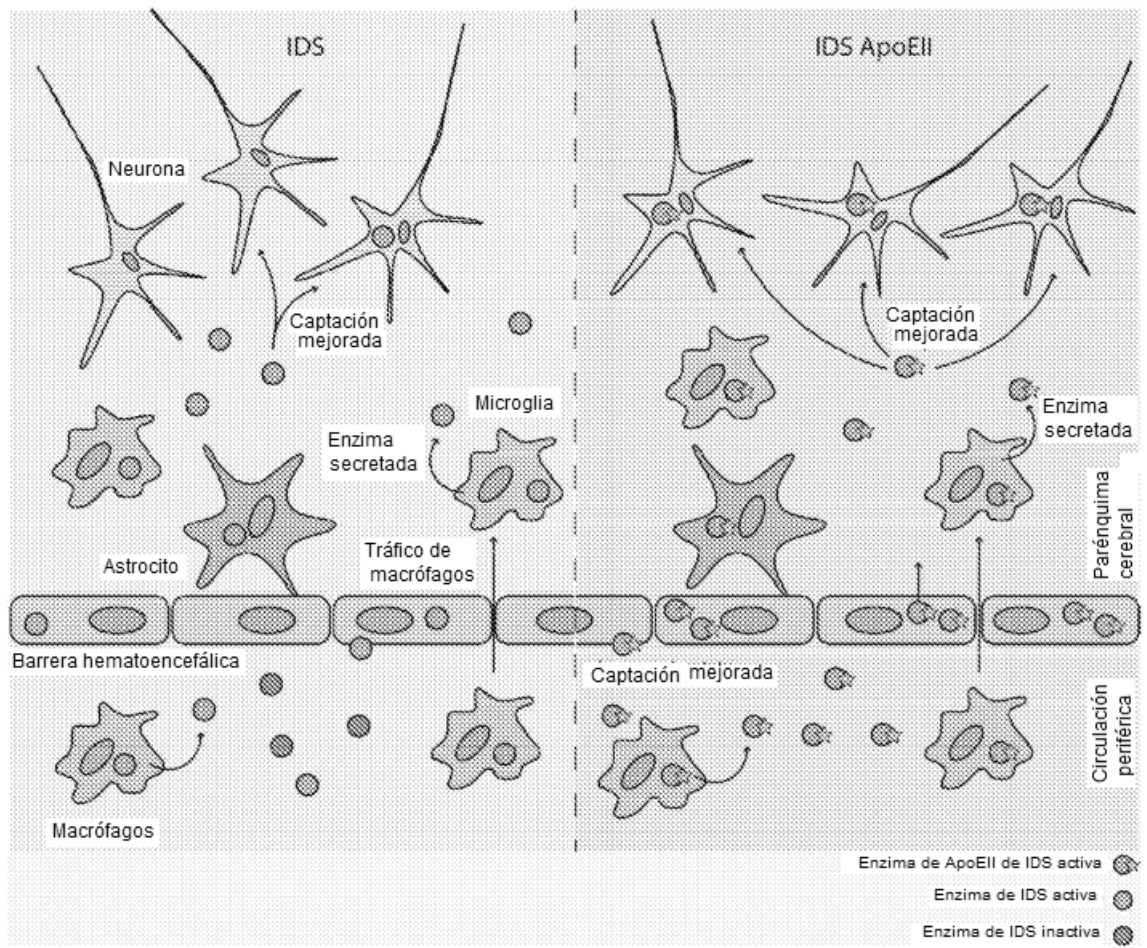
**Figura 7**



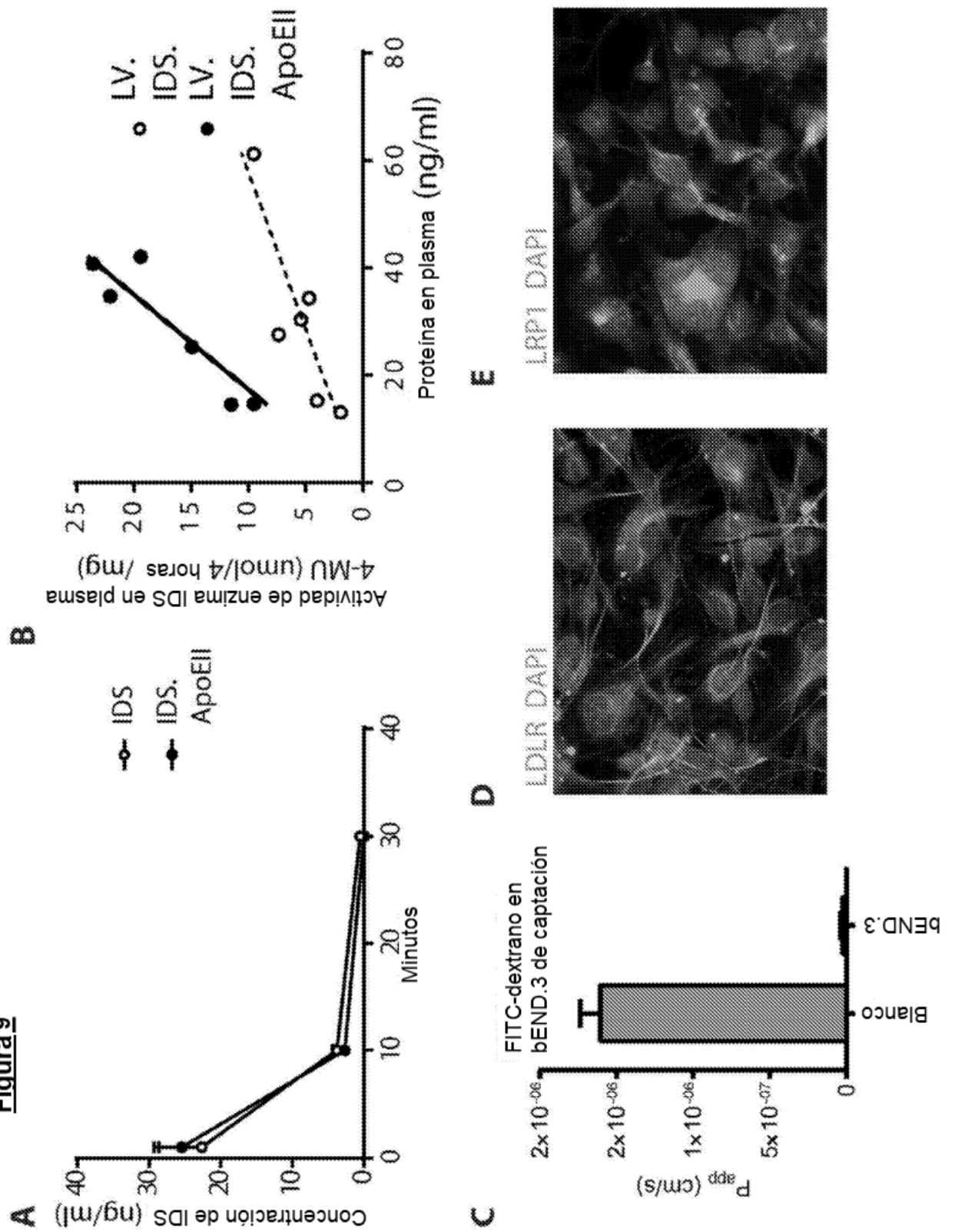
**Figura 7 cont.**



**Figura 8**



**Figura 9**



**Figura 9 cont.**

