



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

(21) BR 112019021569-7 A2



(22) Data do Depósito: 13/04/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 12/05/2020

(54) Título: PRECURSOR DE IDURONATO-2-SULFATASE HUMANA RECOMBINANTE GLICOSILADA (IDS), MÉTODO PARA TRATAR UM SUJEITO HUMANO DIAGNOSTICADO COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II (MPS II)

(51) Int. Cl.: A61K 38/43; A61K 47/26; A61K 48/00; A61P 25/00; C12N 15/86.

(30) Prioridade Unionista: 14/04/2017 US 62/485,659; 18/10/2017 US 62/573,921; 19/10/2017 US 62/574,355; 31/10/2017 US 62/579,686.

(71) Depositante(es): REGENXBIO INC..

(72) Inventor(es): STEPHEN YOO; RICKEY ROBERT REINHARDT; CURRAN MATTHEW SIMPSON; ZHUCHUN WU.

(86) Pedido PCT: PCT US2018027568 de 13/04/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/191666 de 18/10/2018

(85) Data da Fase Nacional: 14/10/2019

(57) Resumo: São descritas composições e métodos para a entrega de iduronato-2-sulfatase recombinante humano (IDS) produzida por células neuronais ou gliais humanas no líquido cefalorraquidiano do sistema nervoso central (SNC) de um indivíduo humano diagnosticado com mucopolissacaridose II (MPS II).

**PRECURSOR DE IDURONATO-2-SULFATASE HUMANA RECOMBINANTE
GLICOSILADA (IDS), MÉTODO PARA TRATAR UM SUJEITO HUMANO
DIAGNOSTICADO COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II (MPS II)**

REFERÊNCIA CRUZADA PARA PEDIDOS DE PATENTES RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório nos EUA 62/485.659, apresentado em 14 de abril de 2017, 62/573.921, apresentado em 18 de outubro de 2017, 62/574.355, apresentado em 19 de outubro de 2017 e 62/579.686, arquivado em 31 de outubro de 2017, que são incorporados por referência aqui na sua totalidade.

REFERÊNCIA À LISTA DE SEQUÊNCIAS APRESENTADA ELETRONICAMENTE

[0002] Este pedido incorpora por referência uma Listagem de Sequências enviada com este pedido como um arquivo de texto intitulado "Sequence_Listing_12656-104-228.TXT" criado em 3 de abril de 2018 e com um tamanho de 166.497 bytes.

1. INTRODUÇÃO

[0003] São descritas composições e métodos para a entrega de iduronato-2-sulfatase recombinante humana (IDS) produzida por células neuronais ou gliais humanas no líquido cefalorraquidiano (LCR OU CFS - "cerebrospinal fluid") do sistema nervoso central (SNC ou CNS - "central nervous system") de um indivíduo humano diagnosticado com mucopolissacaridose II (MPS II).

2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0004] A síndrome de Hunter/MPS II é uma doença genética rara recessiva ligada ao X que ocorre em 0,5 a 1,3 por 100.000 nascidos vivos do sexo masculino. Esta doença progressiva e devastadora é causada por mutação genética no gene IDS, levando

à deficiência da enzima de armazenamento lisossômico iduronato-2-sulfatase, uma enzima necessária para o catabolismo lisossômico do sulfato de heparan e sulfato de dermatan. Esses polissacarídeos ubíquos, chamados GAGs (glicosaminoglicanos), acumulam-se nos tecidos e órgãos dos pacientes com MPS II, resultando em lesões características de armazenamento e diversas sequelas de doenças. A morbimortalidade é alta nessa população de pacientes; Foi relatado que a morte ocorre com uma idade média de 11,7 anos em pacientes com fenótipo grave (caracterizado por deterioração neurocognitiva) e 21,7 anos em pacientes com fenótipo leve ou atenuado. (Young *et al.*, 1982, Um estudo clínico e genético da síndrome de Hunter. 2 Diferenças entre as formas leve e grave. J. Medical Genetics 19: 408-411). É relatado que a maioria (dois terços) dos pacientes apresenta a forma grave desta doença. (Wraith JE, *et al.*, 2007, Terapia de reposição enzimática em pacientes com mucopolissacaridose I e menores de 5 anos: resultados de um estudo multinacional de alfa-L-iduronidase humana recombinante (Laronidase). Pediatrics 120 (1): E37-E46). Enquanto a doença afeta principalmente os meninos, as mulheres afetadas foram relatadas como resultado da inativação x aleatória e/ou mutação não aleatória nos dois alelos do gene. (Martin *et al.*, 2008, Reconhecimento e diagnóstico de mucopolissacaridose II (síndrome de Hunter). Pediatrics 121:e377). No entanto, a MPS II em mulheres é extremamente rara, ocorrendo menos de 2% das vezes.

[0005] Pacientes com MPS II parecem normais ao nascimento, mas sinais e sintomas da doença geralmente se apresentam entre as idades de 18 meses e 4 anos na forma grave e entre as idades de 4 e 8 anos na forma atenuada. Sinais e sintomas comuns a todos

os pacientes afetados incluem baixa estatura, características faciais grosseiras, macrocefalia, macroglossia, perda auditiva, hepato e esplenomegalia, distose múltipla, contraturas articulares, estenose espinhal e síndrome do túnel do carpo. As infecções respiratórias e auriculares superiores freqüentes ocorrem na maioria dos pacientes e a obstrução progressiva das vias aéreas é comumente encontrada, levando à apneia do sono e freqüentemente à morte. A doença cardíaca é uma das principais causas de morte nessa população e é caracterizada por disfunção valvar que leva à hipertrofia ventricular direita e esquerda e insuficiência cardíaca. A morte é geralmente atribuída à doença obstrutiva das vias aéreas ou insuficiência cardíaca.

[0006] Em formas graves da doença, podem ser alcançados marcos iniciais do desenvolvimento, mas o atraso no desenvolvimento é facilmente aparente em 18 a 24 meses. Alguns pacientes falham nos testes de triagem auditiva no primeiro ano e outros marcos são adiados, incluindo a capacidade de sentar-se sem suporte, a capacidade de andar e a fala. A progressão do desenvolvimento começa a se estabilizar entre 3 e 5 anos de idade, com a regressão relatada para começar em torno de 6,5 anos. Dos 50% das crianças com MPS II que conseguem ir ao banheiro sozinhas, a maioria, se não todas perderão essa capacidade à medida que a doença progride. (Wraith *et al.*, 2007, *supra*; Martin *et al.*, 2008, *supra*).

[0007] Pacientes com envolvimento neurológico significativo exibem distúrbios comportamentais graves, incluindo hiperatividade, obstinação e agressão, começando no segundo ano de vida e continuando até os 8-9 anos de idade, quando a neurodegeneração atenua esse comportamento. (Muenzer *et al.*,

2009, Mucopolissacaridose I: Diretrizes de Gerenciamento e Tratamento, *Pediátrica* 123 (1): 19-29).

[0008] Convulsões são relatadas em mais da metade dos pacientes gravemente afetados que atingem a idade de 10 anos e, na hora da morte, a maioria dos pacientes com envolvimento do SNC tem deficiências mentais graves e requer cuidados constantes. (Wraith *et al.*, 2007, *supra*; Martin *et al.*, 2008, *supra*). Embora os pacientes com doença atenuada exibam funcionamento intelectual normal, a ressonância magnética revela anormalidades cerebrais graves em todos os pacientes com MPS II, incluindo lesões na substância branca, ventrículos aumentados e atrofia cerebral. (Muenzer *et al.*, 2009, *supra*).

[0009] A terapia de reposição enzimática (TER OU ERT - "Enzyme replacement therapy") com idursulfase recombinante produzida pelas células HT1080 (fibrossarcoma) (Elaprase®, Shire Human Genetic Therapies) é o único produto aprovado para o tratamento da síndrome de Hunter e é administrada como uma infusão semanal. (Injeção de ELAPRASE (idursulfase) [folheto informativo] Lexington, MA: Shire Human Genetic Therapies, Inc; 2013, disponível em http://pi.shirecontent.com/PI/PDFs/Elaprase_USA_ENG.pdf).

[0010] No entanto, a TRE, atualmente administrada, não atravessa a barreira hematoencefálica e, portanto, é incapaz de atender à necessidade não atendida em pacientes com doença grave, isto é, MPS II com CNS/envolvimento neurocognitivo e comportamental. Em um recente ensaio clínico desenvolvido para solucionar esse problema, a idursulfase (Elaprase) formulada para administração intratecal foi administrada uma vez por mês a pacientes pediátricos, usando um dispositivo de administração

de drogas intratecal implantado na coluna vertebral (inserção do cateter no nível de L4/L5 com implante da porta de acesso através de uma incisão nas nervuras inferiores). Os pacientes também receberam idursulfase iv concomitante uma vez por semana. Muenzer et al., 2016, Genetics in Med 18: 73-81, esp.p.74; resumo disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25834948?dopt=Abstract>). O mau funcionamento do dispositivo levou à revisão parcial, revisão cirúrgica total ou remoção em 6 dos 12 (50%) dos pacientes tratados. Notavelmente, 12 dos 14 SAEs (eventos adversos graves) estavam relacionados ao dispositivo (complicação de inserção do dispositivo, problema de deslocamento/conexão do dispositivo, quebra/mau funcionamento/falha do dispositivo, infecção no local do implante, infecção no local do implante, dor no procedimento e deiscência da ferida). (Muenzer et al., 2016, p. 75, col. 2 e fig. 1). A quebra do dispositivo e a migração do cateter do canal espinhal foram exacerbadas pelo alto nível de atividade dessa população pediátrica. (Muenzer et al., 2016 na p.78 Discussão).

3. SUMARIO DA INVENÇÃO

[0011] A invenção envolve a entrega de iduronato-2-sulfatase recombinante humana (rhIDS) produzida por células neuronais ou gliais humanas ao líquido cefalorraquidiano (LCR) do sistema nervoso central (SNC) de um sujeito humano diagnosticado com mucopolissacaridose II (MPS II), incluindo, entre outros, pacientes diagnosticados com síndrome de Hunter.

[0012] Em uma forma de realização preferencial, o tratamento é realizado via terapia genética -*por exemplo*, administrando um vetor viral ou outra construção de expressão de DNA que codifica

IDS humano (hIDS), ou um derivado de hIDS, no LCR de um paciente (sujeito humano) diagnosticada com MPS II, para que seja gerado um depósito permanente de células neuronais e/ou gliais transduzidas que forneçam continuamente o produto transgene ao CNS. Os rhIDS secretados do depósito de células neuronais/gliais no LCR serão endocitados pelas células do SNC, resultando em "correção cruzada" do defeito enzimático nas células receptoras. Além disso, foi descoberto, inesperadamente, que o depósito de células neurais e gliais transduzidas no SNC pode entregar a enzima recombinante ao SNC e sistemicamente, o que pode reduzir ou eliminar a necessidade de tratamento sistêmico, *por exemplo*, injeções semanais da enzima.

[0013] Em uma forma de realização alternativa, os hIDS podem ser produzidos por células neuronais ou gliais humanas em cultura de células (*por exemplo*, biorreatores) e administrados como uma terapia de reposição enzimática ("ERT"), *por exemplo*, injetando a enzima - no LCR, diretamente no CNS e/ou sistemicamente. No entanto, a abordagem da terapia genética oferece várias vantagens sobre a ERT, pois a entrega sistêmica da enzima não resultará no tratamento do SNC, porque a enzima não pode atravessar a barreira hematoencefálica; e, diferentemente da abordagem de terapia gênica da invenção, a entrega direta da enzima ao LCR e/ou CNS exigiria repetidas injeções que não são apenas onerosas, mas representam um risco de infecção.

[0014] O hIDS codificado pelo transgene pode incluir, mas é não se limitando a humanos IDS (HIDs) possuindo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO.1 (como mostrado na FIG.1) e derivados de hIDS com substituições, deleções ou adições de aminoácidos, *por exemplo*, incluindo, mas não se limitando a substituições de

aminoácidos selecionadas a partir de resíduos não conservados correspondentes em ortólogos de IDS mostrados na FIG.2, com a *condição* de que tais mutações não incluam a substituição do resíduo de cisteína na posição 84 (C84), necessária para a atividade enzimática (Millat *et al.*, 1997, Biochem J 326: 243-247); ou uma mutação que foi identificada em fenótipos graves, intermediários graves, intermediários ou atenuados de MPS II, *por exemplo*, como mostrado na FIG.3, ou conforme relatado por Sukegawa-Hayasaka *et al.*, 2006, J Inher Metab Dis 29: 755-761 (relatando os mutantes "atenuados" R48P, A85T, W337R e o mutante truncado Q531X; e os mutantes "graves" P86L, S333L, S349I, R468Q, R468L); Millat *et al.*, 1998, BBA 1406: 214-218 (relatando mutantes "atenuados" P480L e P480Q; e mutante "grave" P86L); e Bonucelli *et al.*, 2001, BBA 1537: 233-238, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade.

[0015] Por exemplo, as substituições de aminoácidos em uma posição específica de hIDS podem ser selecionadas dentre os resíduos de aminoácidos não conservados correspondentes encontrados nessa posição nos ortólogos do IDS alinhados na FIG.2, com a *condição* de que tais substituições não incluam nenhuma das mutações deletérias mostradas na FIG.3 ou como relatado por Sukegawa-Hayasaka *et al.*, 2006, *supra*; Millat *et al.*, 1998, *supra*; ou Bonucelli *et al.*, 2001, *supra*, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade. O produto transgene resultante pode ser testado usando ensaios convencionais *in vitro*, em cultura de células ou animais de teste para garantir que a mutação não perturbe a função IDS. As substituições, deleções ou adições de aminoácidos preferidas selecionadas devem ser aquelas que mantêm ou aumentam a atividade

enzimática, a estabilidade ou a meia-vida do IDS, como testado por ensaios convencionais *in vitro*, em cultura de células ou modelos animais para MPS II. Por exemplo, a atividade enzimática do produto transgene pode ser avaliada usando um ensaio enzimático convencional com, por exemplo, 2-sulfato de ácido 4-metilumbeliferil α -L-idopiranosidurônico como sulfato de 2-sulfato ou 4-metilumbeliferil sulfato como substrato (por exemplo, Lee et al. al., 2015, Clin. Biochem. 48 (18): 1350-1353, Dean et al., 2006, Clin. Chem. 52 (4): 643-649 para ensaios enzimáticos de IDS exemplares que podem ser usados, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade). A capacidade do produto transgene para corrigir o fenótipo MPS II pode ser avaliada em cultura de células; por exemplo, pela transdução de células MPS II em cultura com um vetor viral ou outra construção de expressão de DNA que codifica hIDS ou um derivado; adicionando o produto transgene ou um derivado às células MPS II em cultura; ou co-cultivando células MPS II com células hospedeiras neuronais/gliais humanas projetadas para expressar e secretar rhIDS ou um derivado e determinando a correção do defeito nas células cultivadas com MPS II, por exemplo, detectando a atividade da enzima IDS e/ou redução no armazenamento de GAG nas células MPS II em cultura (por exemplo, Stroncek et al., 1999, Transfusion 39 (4): 343-350, que é incorporado por referência aqui na sua totalidade).

[0016] Foram descritos modelos animais para MPS II que podem ser utilizados para avaliar os agentes terapêuticos aqui descritos. Por exemplo, um modelo de camundongo knockout (IDS-knockout) do MPS II foi projetado substituindo os exons 4 e 5 do gene *IDS* pelo gene de resistência à neomicina. (Garcia et al.,

2007, J. Inherit Metab Dis 30: 924-34). Este camundongo IDS knockout exibe muitas das características do MPS II, incluindo anormalidades esqueléticas, hepatoesplenomegalia, GAG urinário e tecidual elevado e lesões de armazenamento cerebral (Muenzer *et al.*, 2001, Acta Paediatr Suppl 91: 98-99) e foi usado avaliar o efeito da terapia de reposição enzimática no MPS II no suporte de ensaios clínicos para a ERT. Este modelo de camundongo, portanto, é um modelo relevante para estudar os efeitos da terapia gênica que fornece rIDS produzidos por células neuronais ou gliais como um tratamento para MPS II (ver, por exemplo, Polito e Cosma, 2009, Am.J.Hum. Genet. 85 (2): 296-301, que é incorporado por referência aqui na sua totalidade).

[0017] De preferência, o transgene hIDS produzido pelas células neuronais/gliais humanas deve ser controlado por elementos de controle de expressão que funcionam em neurônios e/ou células gliais, por exemplo, o promotor CB7 (um promotor de β -actina de frango e potenciador de CMV), e pode incluir outros elementos de controle de expressão que aprimoram a expressão do transgene acionado pelo vetor (por exemplo, íntron de act-actina de galinha e sinal poli A de β -globina de coelho). A construção de cDNA para o transgene hIDS deve incluir uma sequência de codificação para um peptídeo sinal que garanta o processamento co e pós-traducional adequado (glicosilação e sulfatação de proteínas) pelas células CNS transduzidas. Tais peptídeos de sinal usados pelas células do SNC podem incluir, mas não estão limitados a:

- Peptídeo sinal de glicoproteína mielina-oligodendrócito (hOMG):

MEYQILKMSLCLFILLFLTPGILC (SEQ ID NO: 2)

- Repressor celular dos peptídeos sinalizadores dos genes 2 estimulados por E1A (hCREG2):

MSVRRGRPARPGTRLWLLCCSALLSPAAG (SEQ ID NO: 3)

- Conjunto V e domínio transmembranar contendo peptídeo sinal 2B (hVSTM2B): MEQRNRLGALGYLPPLLLHALLLFVADA (SEQ ID NO: 4)

- Peptídeo sinal de protocaderina alfa-1 (hPCADHA1):

MVFSRRGGLGARDLLLWLLLLAAWEVGS (SEQ ID NO: 5)

- Peptídeo de sinal FAM19A1 (TAFA1):

MAMVSAMSWVLYLWISACA (SEQ ID NO: 6)

- Peptídeo sinal de interleucina-2:

MYRMQLLSCIALILALVTNS (SEQ ID NO: 14)

Os peptídeos de sinal também podem ser aqui referidos como sequências líderes ou peptídeos líderes.

[0018] O vetor recombinante usado para administrar o transgene deve ter um tropismo para células no SNC, incluindo mas limitado a neurônios e/ou células da glia. Tais vetores podem incluir vetores de vírus adeno-associados recombinantes não replicantes ("rAAV"), particularmente aqueles portadores de um capsídeo AAV9 ou AAVrh10. Os capsídeos variantes de AAV podem ser utilizados, incluindo, mas não se limitando, aos descritos por Wilson na patente US 7.906.111, que é incorporada por referência aqui na sua totalidade, sendo particularmente preferido o AAV/hu.31 e AAV/hu.32; bem como os capsídeos variantes do AAV descritos por Chatterjee na Patente US No. 8.628.966, Patente US No. 8.927.514 e Smith et al., 2014, Mol Ther 22: 1625-1634, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade. No entanto, outros vetores

virais podem ser utilizados, incluindo, entre outros, vetores lentivirais, vetores virais de vaccinia ou vetores de expressão não viral referidos como construções de "DNA nu".

[0019] Em uma forma de realização, a construção 1 pode ser usado para a entrega do transgene. A construção 1 é uma cápside recombinante do sorotipo 9 do vírus adeno-associado que contém a cassette de expressão de iduronato-2-sulfatase humana em que a expressão é dirigida por um híbrido do intensificador de citomegalovírus (CMV) e o promotor de beta actina de frango (CB7), em que a cassette de expressão IDS é flanqueado por repetições terminais invertidas (ITRs) e o transgene inclui o íntron beta-actina de frango e um sinal de poliadenilação de beta-globina de coelho (poliA).

[0020] As composições farmacêuticas adequadas para administração no LCR compreendem uma suspensão do vetor rhIDS em um tampão de formulação compreendendo um tampão aquoso fisiologicamente compatível, um surfactante e excipientes opcionais. Em certas formas de realização, as composições farmacêuticas são adequadas para administração intratecal. Em certas formas de realizações, as composições farmacêuticas são adequadas para administração intracisternal (injeção na cisterna magna). Em certas formas de realização, as composições farmacêuticas são adequadas para injeção no espaço subaracnóide por meio de uma punção C1-2. Em certas formas de realização, as composições farmacêuticas são adequadas para administração intracerebroventricular. Como também, as composições farmacêuticas são adequadas para administração via punção lombar.

[0021] Doses terapeuticamente eficazes do vetor recombinante devem ser administradas ao LCR via administração intratecal (isto é, injeção no espaço subaracnóideo, de modo que os vetores recombinantes se distribuam através do LCR e transduzam células no SNC). Isso pode ser realizado de várias maneiras - por exemplo, por injeção intracraniana (cisternal ou ventricular) ou injeção na cisterna lombar. Por exemplo, a injeção intracisternal (CI) (na cisterna magna) pode ser realizada por punção suboccipital guiada por TC; ou a injeção no espaço subaracnóideo pode ser realizada através de uma punção C1-2 quando possível para o paciente; ou punção lombar (normalmente procedimentos de diagnóstico realizados para coletar uma amostra de LCR) pode ser usada para acessar o LCR. Alternativamente, a administração intracerebroventricular (ICV) (uma técnica mais invasiva usada para a introdução de drogas anti-infecciosas ou anticâncer que não penetram na barreira hematoencefálica) pode ser usada para instilar os vetores recombinantes diretamente nos ventrículos do cérebro. Alternativamente, a administração intranasal pode ser usada para distribuir o vetor recombinante no SNC.

[0022] As concentrações de LCR podem ser monitoradas medindo diretamente a concentração de rhIDS no fluido do LCR obtido a partir de punções occipitais ou lombares, ou estimadas por extrapolação a partir das concentrações de rhIDS detectadas no soro do paciente.

[0023] Como pano de fundo, o IDS humano é traduzido como um polipeptídeo de 550 aminoácidos que contém oito locais potenciais de N-glicosilação (N³¹, N¹¹⁵, N¹⁴⁴, N²⁴⁶, N²⁸⁰, N³²⁵, N⁵¹³ e N⁵³⁷) representado na FIG.1 e inclui uma sequência de sinal de

25 aminoácidos que é clivada durante o processamento. Um precursor intracelular inicial de 76 kDa é convertido em um precursor fosforilado de 90 kDa após modificação de suas cadeias de oligossacarídeos no aparelho de Golgi. Este precursor é processado por modificações de glicosilação e clivagem proteolítica através de vários intermediários intracelulares até uma forma principal de 55 kDa. Para resumir, após a remoção da sequência de sinal 25 aa, o processamento proteolítico envolve a clivagem proteolítica N-terminal a jusante de N³¹ removendo um propeptídeo de oito aminoácidos (resíduos 26-33) e a clivagem proteolítica C-terminal a montante de N⁵¹³, que libera um polipeptídeo de 18 kDa e produz um intermediário de 62 kDa que é convertido em uma forma madura de 55 kDa. A clivagem proteolítica adicional produz uma forma madura de 45 kDa localizada no compartimento lisossômico. (Veja a FIG. 4 para o diagrama reproduzido de Millat *et al.*, 1997, *Exp Cell Res* 230: 362-367 ("Millat 1997"); Millat *et al.* 1997, *Biochem J.* 326: 243-247 ("Millat 1997a") e Froissart *et al.*, 1995, *Biochem J.* 309: 425-430, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade).

[0024] Uma modificação de formilglicina de C⁸⁴ (mostrada em negrito na FIG.1) necessária para a atividade enzimática provavelmente ocorre como um evento pós-tradução ou co-tradução precoce, provavelmente no retículo endoplasmático. (Millat 1997a, citando Schmidt *et al.*, 1995, *Cell* 82: 271-278). O processamento pós-tradução continua no Golgi para incluir a adição de glicanos complexos contendo ácido siálico e a aquisição de resíduos de manose-6-fosfato que marcam a enzima para entrega ao compartimento lisossômico. (Clarke, 2008, *Expert Opin*

Pharmacother 9: 311-317 para uma revisão concisa que é incorporada por referência aqui na sua totalidade). Embora nenhum local de glicosilação seja essencial para a estabilidade do IDS, a glicosilação na posição N²⁸⁰ é importante para a internalização celular e o direcionamento lisossômico através do receptor de manose-6-fosfato (M6P). (Chung *et al.*, 2014, Glycoconj J 31: 309-315 na p. 310, primeira coluna). No estado fisiológico normal, o IDS é produzido em níveis muito baixos e muito pouca ou nenhuma enzima é secretada na célula. (Clarke, 2008, *supra*).

[0025] A invenção é baseada, em parte, nos seguintes princípios:

(i) As células neuronais e gliais no SNC são células secretoras que possuem o mecanismo celular para o processamento pós-traducional de proteínas secretadas - incluindo processos robustos de glicosilação, manose-6-fosforilação e tirosina-O-sulfatação - no SNC. Ver, por exemplo, Sleat *et al.*, 2005, Proteomics 5: 1520-1532, e Sleat 1996, J Biol Chem 271: 19191-98, que descreve o glicoproteoma do manose-6-fosfato do cérebro humano e observa que o cérebro contém mais proteínas com um número muito maior de isoformas individuais e proteínas manose-6-fosforiladas do que as encontradas em outros tecidos; e Kanan *et al.*, 2009, Exp. Eye Res. 89: 559-567 e Kanan e Al-Ubaidi, 2015, Exp. Eye Res. 133: 126-131 relatando a produção de glicoproteínas sulfatadas em tirosina secretadas por células neuronais, cada uma das quais é incorporada por referência na sua totalidade para modificações pós-tradução feitas por células CNS humanas.

(ii) O cérebro humano produz várias isoformas de IDS natural/nativo. Em particular, a sequenciação N-terminal de glicoproteínas de manose-6-fosforiladas do cérebro humano revelou que a sequência N-terminal da cadeia madura de 42 kDa de hIDS varia no cérebro, começando nas posições 34 ou 36, como a seguir: T³⁴ DALNVLLI; e A³⁶ LNVLLIIV. (Sleat, 2005, *Proteomics* 5: 1520-1532, Tabela S2). Verificou-se que dois dos oito locais de glicosilação ligados a N, N²⁸⁰ e N¹¹⁶, eram manose-6-fosforilados no IDS obtido a partir do cérebro humano. (Sleat *et al.*, 2006, *Mol & Cell Proteomics* 5.4: 686-701, relatado na Tabela V).

(iii) Durante o processamento de hIDS, dois polipeptídeos, 76 kDa e 90 kDa, são secretados por células neurais e gliais, mas apenas o polipeptídeo de 90 kDa é manose-6-fosforilado, o que é necessário para que as formas secretadas da enzima atinjam a concentração cruzada. (Ver Millat, 1997, resultados da Fig. 1 para células linfoblastoides transduzidas e Froissart 1995, Fig. 4 mostrando resultados semelhantes para fibroblastos transduzidos - em meio de cultura, apenas a forma de 90 kDa é fosforilada). Curiosamente, foi demonstrado que o IDS recombinante produzido pelas células neuronais e gliais pode ser endocitado pelas células CNS receptoras mais avidamente do que o IDS recombinante produzido por outras células, como o rim. Daniele 2002 (*Biochimica et Biophysica Acta* 1588 (3): 203-9) demonstrou endocitose mediada pelo receptor M6P de IDS recombinante a partir de meios condicionados de culturas de células neuronais e gliais transduzidas por uma população receptora de células neuronais e gliais não transduzidas que processaram adequadamente o precursor da forma ativa madura de 45 kDa. A captação do IDS recombinante produzido pelas linhas

celulares neuronais e gliais (74% de endocitose) excedeu em muito a captação da enzima produzida por uma linha de células renais (5,6% de endocitose). Em cada caso, a captação foi inibida por M6P, indicando que a captação de IDS recombinante era mediada pelo receptor de M6P. (Daniele 2002, Tabelas 2 e 4 e descrição anexa em Resultados nas páginas 205-206 resumidas na Tabela 1 abaixo).

Tabela 1. Resumo dos resultados relatados em Daniele 2002

Fonte da Linhagem Celular de rIDS	Meios Unidades enzimáticas	Células Receptoras: Unidades Recuperadas		% Endocitose (valor médio)
		Neuronal	Glial	
Rim (transfectado)	35 U	1,7 U	2,2 U	5,6%
Neuronal (Ad- transduzido)	12 U	8,8 U	8,8 U	74%
Glial (Ad- transduzido)	14 U	10,5 U	10,5 U	74%

(iv) A abordagem de terapia genética aqui descrita deve resultar na secreção contínua de um precursor da glicoproteína hIDS de cerca de 90 kDa, conforme medido por eletroforese em gel de poliacrilamida (dependendo do ensaio utilizado) que é enzimaticamente ativo. Primeiro, a enzima responsável pela modificação da formilglicina C⁸⁴ necessária para a atividade do IDS - a enzima geradora de FGly (FGE, também conhecida como

SUMF1) - é expressa no córtex cerebral do cérebro humano (os dados de expressão gênica para SUMF1 podem por exemplo, em GeneCards, acessível em <http://www.genecards.org>). Segundo, os rIDS glicosilados/fosforilados secretados, produzidos por neurônios transduzidos e células gliais *in situ*, devem ser absorvidos e processados corretamente por células neuronais e gliais não traduzidas no SNC. Sem estar vinculado a nenhuma teoria, parece que o precursor de rhIDS secretado produzido *in situ* por terapia genética pode ser mais avocemente endocitado pelas células receptoras no SNC do que as enzimas recombinantes tradicionais usadas para a TRE se administradas ao SNC. Por exemplo, Elaprase® (fabricada em HT1080, uma linha celular de fibrossarcoma) é uma proteína purificada que tem um peso molecular de cerca de 76 kDa - não as espécies de 90 kDa secretadas pelas células neuronais e gliais que parecem ser mais fortemente fosforiladas. Embora os oito locais de glicosilação ligados a N estejam totalmente ocupados em Elaprase® e contenham dois glicanos terminados com bis-manose-6-fosfato, bem como glicanos altamente sialilados complexos, a modificação pós-tradução de C⁸⁴ para FGly, que é um requisito absoluto para a atividade enzimática, é de apenas cerca de 50%. (Clarke, 2008, Expert Opin Pharmacother 9: 311-317; Elaprase® Full Prescribing Information e arquivamento EMA). Outro produto recombinante, Hunterase®, é produzido em células CHO. Embora relatado ter maior atividade de FGly e atividade que Elaprase®, manose-6-fosforilação e captação não diferiram. (Chung, 2014, Glycoconj J 31: 309-315).

(v) A eficácia extracelular do IDS *in vivo* depende da captação (internalização de células e lisossomos) através do M6P e de seu

sítio ativo formilglicina (FGly), que é convertido de C⁸⁴ por meio de modificação pós-traducional pela enzima geradora de formilglicina. Como mostrado acima na Tabela 1, as células cerebrais (células neuronais e gliais) mostram atividades enzimáticas mais altas quando incubadas com mídia precursora IDS secretada por células neuronais e gliais transduzidas do que com mídia precursora IDS secretada por células renais geneticamente modificadas. O aumento de atividade resultante em cinco vezes provavelmente pode ser atribuído à absorção eficiente de IDS (ver Daniele 2002, tabelas 2 e 4). Formas comerciais de IDS, que são geradas por células CHO ou HT-1080, têm um conteúdo de FGly de cerca de 50% a 70%, o que determina a atividade da enzima. No entanto, as células neuronais e gliais podem melhorar essa atividade, devido à melhora da captação de IDS.

(vi) O tráfico/captação celular e subcelular de proteínas lisossômicas, incluindo IDS, é através do M6P. O IDS das células cerebrais pode conter um conteúdo mais alto de M6P, como relatado em Daniele 2002, e em Sleat, Proteomics, 2005 (indicando que o cérebro humano contém mais glicoproteínas de Man6-P (tanto no sentido quantitativo quanto qualitativo) do que outros tecidos. É possível medir o conteúdo M6P de um precursor do IDS, como feito em Daniele 2002. Na presença de M6P inibitório (por exemplo, 5 mM), prevê-se que a captação do precursor do IDS gerado por células não neuronais ou não gliais, como as células renais geneticamente modificadas de Daniele 2002, diminua para níveis próximos aos de células de controle, como foi mostrado em Daniele 2002. Enquanto na presença de M6P inibitório, prevê-se que a captação do precursor do IDS gerado pelas células cerebrais, como as células neuronais e gliais, permaneça em um

nível alto, como foi mostrado em Daniele 2002, onde a captação foi quatro vezes maior que as células de controle e comparável ao nível de atividade (ou captação) de IDS precursor de IDS gerado por células renais geneticamente modificadas sem a presença de M6P inibitório. Este ensaio permite uma maneira de prever o conteúdo de M6P no precursor de IDS gerado pelas células cerebrais e, em particular, comparar o conteúdo de M6P nos precursores de IDS gerados por diferentes tipos de células. A abordagem de terapia genética descrita neste documento deve resultar na secreção contínua de um precursor de HIDS que pode ser absorvido pelas células neuronais e gliais em um nível alto na presença de M6P inibidor em um desses ensaios.

(vii) O conteúdo de M6P e a captação do precursor de IDS também podem ser demonstrados por bandas de gel de 90 kDa e 76 kDa (*por exemplo*, bandas de gel SDS-PAGE). É relatado que os 90 kDa são altamente glicosilados/fosforilados e contêm M6P, enquanto os 76 kDa não são. Uma banda de gel muito ampla, com faixa de 76 kDa a 95 kDa e com um MW médio de 80-85 kDa, semelhante à banda precursora de gel IDS gerada a partir de células renais geneticamente modificadas (Daniele 2002, Figura 1), pode ser contrastada com uma banda de gel do precursor IDS gerado a partir de células cerebrais. Em Daniele 2002, a banda de gel não pode ser obtida devido à imunoprecipitação malsucedida do precursor do IDS. A abordagem de terapia genética aqui descrita deve resultar na secreção contínua de um precursor de hIDS que difere da banda de precursor de IDS em gel gerada a partir de células renais geneticamente modificadas.

(viii) O conteúdo de M6P do precursor comercial de IDS é de 2 a 2,5 mol/mol, a maioria dos quais está presente na forma de

glicanos di-fosforilados. Embora, em média, todo precursor de IDS seja fosforilado, uma distribuição normal de glicanos terá algum precursor de IDS com 2, 1 e 0 de glicanos M6P di-fosforilados, assumindo múltiplos locais de fosforilação. A taxa de captação deve ser significativamente maior com a fosforilação múltipla.

(ix) A glicosilação de hIDS pelas células humanas do SNC resultará na adição de glicanos que podem melhorar a estabilidade, a meia-vida e reduzir a agregação indesejada do produto transgênico. Significativamente, os glicanos que são adicionados para hIDS da invenção incluem 2,6 ácido-siálico, incorporando Neu5Ac ("NANA"), mas não o seu derivado hidroxilado, NeuGc (ácido N-glicolilneuramínico, ou seja, "NGNA" ou "Neu5Gc"). Tais glicanos não estão presentes nos produtos de IDS recombinantes, tais como Hunterase®, feita em células CHO porque as células CHO não têm o 2,6-sialiltransferase necessário para efectuar esta modificação pós-translacional; nem as células CHO produzem GlcNAc em bissecção, embora adicionem Neu5Gc (NGNA) como ácido siálico não típico (e potencialmente imunogênico) aos seres humanos em vez de Neu5Ac (NANA). Por exemplo, Dumont *et al.*, 2016, *Critical Rev in Biotech* 36 (6): 1110-1122 (Early Online pp. 1-13 na p. 5); e Hague *et al.*, 1998 *Electrophor* 19: 2612-2630 ("[a] linha celular CHO é considerada 'fenotipicamente restrita', em termos de glicosilação, devido à falta de uma α 2,6-sialil-transferase"). Além disso, as células CHO também podem produzir um glicano imunogênico, o antígeno α -Gal, que reage com os anticorpos anti- α -Gal presentes na maioria dos indivíduos, e em altas concentrações pode desencadear anafilaxia. Ver, por exemplo, Bosques, 2010, *Nat Biotech* 28:

1153-1156. O padrão de glicosilação humana dos rhIDS da invenção deve reduzir a imunogenicidade do produto transgene e melhorar a eficácia.

(x) A imunogenicidade de um produto transgênico pode ser induzida por vários fatores, incluindo a condição imunológica do paciente, a estrutura e as características da droga protéica infundida, a via de administração e a duração do tratamento. Impurezas relacionadas ao processo, como proteína da célula hospedeira (HCP), DNA da célula hospedeira e resíduos químicos, e impurezas relacionadas ao produto, como degradantes de proteínas e características estruturais, como glicosilação, oxidação e agregação (partículas subvisíveis), também pode aumentar a imunogenicidade, servindo como um adjuvante que melhora a resposta imune. As quantidades de impurezas relacionadas ao processo e ao produto podem ser afetadas pelo processo de fabricação: cultura celular, purificação, formulação, armazenamento e manuseio, que podem afetar os produtos IDS fabricados comercialmente. Na terapia gênica, as proteínas são produzidas *in vivo*, de modo que as impurezas relacionadas ao processo não estão presentes e os produtos protéicos provavelmente não contêm impurezas/degradantes relacionados ao produto associados às proteínas produzidas por tecnologias recombinantes, como agregação e oxidação de proteínas. A agregação, por exemplo, está associada à produção e armazenamento de proteínas devido à alta concentração de proteínas, à interação da superfície com equipamentos e recipientes de fabricação e ao processo de purificação com certos sistemas tampão. Mas essas condições que promovem agregação não estão presentes quando um transgene é expresso *in vivo*. A

oxidação, como a oxidação da metionina, triptofano e histidina, também está associada à produção e armazenamento de proteínas, causada, por exemplo, por condições estressadas de cultura de células, contato com metais e ar e impurezas em tampões e excipientes. As proteínas expressas *in vivo* também podem oxidar em uma condição estressada, mas os seres humanos, como muitos organismos, são equipados com um sistema de defesa antioxidante, que não apenas reduz o estresse oxidativo, mas também pode reparar e/ou reverter a oxidação. Assim, é provável que as proteínas produzidas *in vivo* não estejam na forma oxidada. Tanto a agregação quanto à oxidação podem afetar a potência, PK (depuração) e podem aumentar as preocupações de imunogenicidade. A abordagem de terapia genética aqui descrita deve resultar na secreção contínua de um precursor de hIDS com uma imunogenicidade reduzida em comparação com produtos fabricados comercialmente.

(xi) Além dos locais de glicosilação ligados ao N, o hIDS contém um local de sulfatação da tirosina ("Y") (PSSEKY¹⁶⁵ ENTKTCTGPD). (Ver, por exemplo, Yang et al, 2015, As moléculas 20:2138-2164, especialmente a p 2154, que é aqui incorporada por referência na sua totalidade para a análise de aminoácidos circundantes resíduos de tirosina submetidos a sulfatação da tirosina proteína. As "regras" podem ser resumidas da seguinte forma: Y resíduo com E ou D na posição de +5 a -5 de Y e onde a posição -1 de Y é um aminoácido com carga neutra ou ácida - mas não um aminoácido básico, por exemplo, R, K ou H que abole a sulfatação). Embora não pretenda estar vinculado a nenhuma teoria, a sulfatação deste local no hIDS pode melhorar a estabilidade da enzima e a afinidade de ligação ao substrato. A sulfatação de tirosina de hIDS - um processo pós-tradução robusto

nas células humanas do SNC - deve resultar em melhor processamento e atividade dos produtos transgênicos. O significado da tirosina-sulfatação das proteínas lisossômicas não foi elucidado; mas em outras proteínas demonstrou-se aumentar a avidéz das interações proteína-proteína (anticorpos e receptores) e promover o processamento proteolítico (hormônio peptídico). (Moore, 2003, J. Biol. Chem. 278: 24243-46; e Bundegaard *et al.*, 1995, The EMBO J 14: 3073-79). A tirosilproteína sulfotransferase (TPST1) responsável pela sulfatação da tirosina (que pode ocorrer como uma etapa final no processamento do IDS) é aparentemente expressa em níveis mais altos (com base no mRNA) no cérebro (dados de expressão gênica para TPST1 podem ser encontrados, por exemplo, no Atlas de Expressões EMBL-EBI, acessível em <http://www.ebi.ac.uk/gxa/home>). Essa modificação pós-traducional, na melhor das hipóteses, está sub-representada nos produtos de células CHO. Ao contrário das células humanas do SNC, as células CHO não são células secretoras e têm capacidade limitada para sulfatação de tirosina pós-tradução. (*por exemplo*, Mikkelsen & Ezban, 1991, Biochemistry 30: 1533-1537, especialmente a discussão na p. 1537).

[0026] Pelas razões expostas acima, a produção de rhIDS por neuronal humano e/ou células gliais deve resultar numa molécula "biobetter" para o tratamento da MPS II conseguida via terapia genética - *por exemplo*, por administração de um vetor viral ou outra construção de expressão de DNA codificação de rhIDS no LCR de um paciente (sujeito humano) diagnosticado com uma doença por MPS II (incluindo, entre outros, Hunter) para criar um depósito permanente no CNS que fornece continuamente um glicosilado

totalmente humano, manose-6-fosforilada, transgene sulfatado secretado pelas células CNS transduzidas. O produto transgene hIDS secretado do depósito no LCR será endocitado pelas células no SNC, resultando em "correção cruzada" do defeito enzimático nas células receptoras de MPS II.

[0027] Não é essencial que todas as moléculas de rhIDS produzidas na terapia genética ou na abordagem proteica sejam totalmente glicosiladas, fosforiladas e sulfatadas. Em vez disso, a população de glicoproteínas produzidas deve ter glicosilação suficiente (incluindo 2,6-flutuação e manose-6-forofilção) e sulfatação para demonstrar eficácia. O objetivo do tratamento de terapia gênica da invenção é retardar ou interromper a progressão da doença. A eficácia pode ser monitorada medindo a função cognitiva (*por exemplo*, prevenção ou diminuição do declínio neurocognitivo); reduções nos biomarcadores da doença (como GAG) no LCR e/ou soro; e/ou aumento da atividade da enzima IDS no LCR e/ou soro. Sinais de inflamação e outros eventos de segurança também podem ser monitorados.

[0028] Como alternativa, ou um tratamento adicional à terapia gênica, a glicoproteína rhIDS pode ser produzida em linhas de células neuronais ou gliais humanas por tecnologia de DNA recombinante e a glicoproteína pode ser administrada a pacientes diagnosticados com MPS II sistemicamente e/ou na CSF para ERT). As linhas celulares humanas que podem ser usadas para essa produção de glicoproteína recombinante incluem, entre outras, HT-22, SK-N-MC, HCN-1A, HCN-2, NT2, SH-SY5y, hNSC11 ou ReNcell VM (*consulte por exemplo*, Dumont et al., 2016, Critical Rev in Biotech 36 (6): 1110-1122 "Linhas de células humanas para fabricação biofarmacêutica: história, status e perspectivas

futuras”, que é incorporado por referência em sua totalidade para uma revisão das linhas celulares humanas que poderiam ser usadas para a produção recombinante da glicoproteína rHuGlyIDS). Para garantir glicosilação completa, especialmente sialilação e sulfatação de tirosina, a linha celular utilizada para produção pode ser aprimorada através da engenharia das células hospedeiras para co-expressar α -2,6-sialiltransferase (ou ambas α -2,3- e α -2,6-sialiltransferases) e/ou enzimas TPST-1 e TPST-2 responsáveis pela tirosina-O-sulfatação.

[0029] Embora a administração de rhIDS deva minimizar as reações imunes, a fonte potencial mais clara de toxicidade relacionada à terapia genética direcionada ao CNS está gerando imunidade contra a proteína rhIDS expressa em indivíduos humanos que são geneticamente deficientes para IDS e, portanto, potencialmente não tolerantes da proteína e/ou do vetor usado para administrar o transgene.

[0030] Assim, em uma modalidade preferida, é aconselhável co-tratar o paciente com terapia de supressão imunológica - especialmente ao tratar pacientes com doença grave que têm níveis próximos a zero de IDS. Podem ser empregadas terapias de supressão imune envolvendo um regime de tacrolimus ou rapamicina (sirolimus) em combinação com ácido micofenólico, ou outros esquemas de supressão imune usados em procedimentos de transplante de tecidos. Esse tratamento de supressão imune pode ser administrado durante o curso da terapia gênica e, em certas modalidades, o pré-tratamento com terapia de supressão imune pode ser preferido. A terapia de supressão imunológica pode ser continuada após o tratamento de terapia gênica, com base no julgamento do médico assistente, e pode posteriormente ser

retirada quando a tolerância imunológica for induzida; *por exemplo*, após 180 dias.

[0031] As combinações de entrega dos rhIDS ao LCR acompanhadas pela entrega de outros tratamentos disponíveis são abrangidas pelos métodos da invenção. Os tratamentos adicionais podem ser administrados antes, simultaneamente ou após o tratamento de terapia gênica. Os tratamentos disponíveis para o MPS II que poderiam ser combinados com a terapia gênica da invenção incluem, mas não estão limitados, à terapia de reposição enzimática usando Elaprase® administrada sistemicamente ou no LCR; e/ou terapia de TCTH.

3.1 FORMAS DE REALIZAÇÃO ILUSTRATIVAS

3.1.1 Conjunto 1

1. Precursor da iduronato-2-sulfatase (IDS) humana recombinante glicosilada produzida por células neuronais ou gliais humanas.
2. O precursor do IDS humano recombinante glicosilado do parágrafo 1, que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa) medido por eletroforese em gel de poliacrilamida.
3. O precursor do IDS humano recombinante glicosilado do parágrafo 1, que é de cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa, ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose 6-fosforilada.

4. O precursor de IDS humano recombinante glicosilado de qualquer um dos parágrafos 1 a 3, que é secretado a partir de um depósito de células no sistema nervoso central geneticamente modificado por engenharia genética para secretar o referido precursor de glicoproteína IDS humana.

5. O precursor do IDS humano recombinante glicosilado do parágrafo 4, no qual o depósito é formado no cérebro de um sujeito humano.

6. O precursor do IDS humano recombinante glicosilado de qualquer um dos parágrafos 1 a 5, no qual as células neuronais ou gliais humanas são deficientes na atividade do IDS.

7. O precursor de IDS humano recombinante glicosilado de qualquer um dos parágrafos 1 a 6, em que o precursor de IDS humano recombinante glicosilado compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 1

8. Um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano, em que o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante quando usado para transduzir uma célula neuronal humana primária em cultura direciona a expressão de um precursor de IDS humano glicosilado segregado que é de cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medidos por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém detectável NeuGc, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose-6-fosforilada.

9. Um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano, cujo vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é adequado para administração ao líquido

cefalorraquidiano (CSF) do cérebro humano, de modo que um depósito é formado no sistema nervoso central humano que secreta um precursor de IDS humano glicosilado que é cerca de 90 kDa (por exemplo, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medidos por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose-6-fosforilado.

10. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante do parágrafo 9, em que a secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado é confirmada pela transdução de uma linha celular neuronal humana com o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante em cultura de células.

11. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante dos parágrafos 9 ou 10, no qual a secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado é confirmada na presença e ausência de manose-6-fosfato.

12. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante de qualquer um dos parágrafos 8 a 11, no qual o IDS humano compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 1

13. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante de qualquer um dos parágrafos 8 a 12, que compreende um promotor específico de neurônio que controla a expressão do precursor de IDS humano glicosilado em células neuronais humanas ou um promotor específico de célula glial que controla a expressão do humano glicosilado Precursor do IDS em células gliais humanas.

14. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante de qualquer um dos parágrafos 8 a 13, que codifica um peptídeo líder

que garante o processamento co- e pós-tradução adequado do precursor do IDS humano glicosilado em células neuronais humanas ou células gliais humanas.

15. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante de qualquer um dos parágrafos 8 a 14, que é um vetor AAV.

16. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante do parágrafo 15, que é um vetor de AAV com defeito de replicação.

17. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante do parágrafo 15 ou 16, que é um vetor AAV9 ou AAVrh10.

18. Uma formulação compreendendo um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano, em que a formulação é adequada para administração no LCR do cérebro humano, de modo que um depósito seja formado no sistema nervoso central humano que secreta um precursor de IDS humano glicosilado que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose-6-fosforilada.

19. Um kit compreendendo um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano e um transportador farmacologicamente aceitável, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é adequado para administração ao líquido cefalorraquidiano (CSF) do cérebro humano, para que um depósito seja formado no sistema nervoso central humano secreta um precursor de IDS humano glicosilado que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91

kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa) medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é fosforilado com manose-6.

20. Um kit compreendendo uma formulação com um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano, em que a formulação é adequada para administração no LCR do cérebro humano, de modo que um depósito seja formado no sistema nervoso central humano que secreta um precursor de IDS humano glicosilado que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medidos por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose-6-fosforilado.

3.1.2 Conjunto 2

1. Precursor de iduronato-2-sulfatase humano recombinante glicosilado (IDS) para uso no tratamento de um indivíduo humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), em que o precursor de IDS humano recombinante glicosilado é produzido por células gliais humanas ou neuronais humanas e em que o tratamento compreende a entrega ao fluido cerebrospinal (CSF) do referido sujeito humano uma quantidade terapeuticamente eficaz do precursor do IDS humano recombinante glicosilado.

2. O precursor de IDS humano recombinante glicosilado para uso do parágrafo 1, em que o precursor de IDS humano recombinante glicosilado é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87

kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida.

3. O precursor de IDS humano recombinante glicosilado para uso do parágrafo 1, em que o precursor de IDS humano recombinante glicosilado é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose-6 fosforilado.

4. O precursor de IDS humano recombinante glicosilado para uso de qualquer um dos parágrafos 1 a 3, em que o precursor de IDS humano recombinante glicosilado é secretado a partir de um depósito de células no sistema nervoso central modificado geneticamente para secretar o referido precursor de IDS humano recombinante glicosilado.

5. O precursor de IDS humano recombinante glicosilado para uso do parágrafo 4, no qual o depósito é formado no cérebro de um sujeito humano.

6. O precursor do IDS humano recombinante glicosilado para uso de qualquer um dos parágrafos 1 a 5, no qual o sujeito humano é deficiente na atividade do IDS.

7. O precursor de IDS humano recombinante glicosilado para uso de qualquer um dos parágrafos 1 a 6, no qual o precursor de IDS humano recombinante glicosilado compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO. 1

8. Um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano para uso no tratamento de um sujeito humano

diagnosticado com MPS II, em que o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante quando usado para transduzir uma célula neuronal humana primária em cultura direciona a expressão de um precursor de IDS humano glicosilado segregado que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém um a formilglicina, é α 2,6-sialilada, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose-6-fosforilada e em que o tratamento compreende administrar ao CSF do referido sujeito humano o nucleotídeo recombinante vetor de expressão.

9. Um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano para uso no tratamento de um sujeito humano diagnosticado com MPS II, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é adequado para administração ao líquido cefalorraquidiano do cérebro humano, de modo que um depósito seja formado no centro humano sistema nervoso que secreta um precursor de IDS humano glicosilado que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é fosforilado com manose-6 e em que o tratamento compreende a administração ao CSF do referido sujeito humano o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante.

10. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante para uso do parágrafo 9, em que a secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado é confirmada pela transdução de uma linha

celular neuronal humana com o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante em cultura de células.

11. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante para uso dos parágrafos 9 ou 10, em que a secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado é confirmada na presença e ausência de manose-6-fosfato.

12. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante para uso de qualquer um dos parágrafos 8 a 11, no qual o IDS humano compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 1

13. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante para uso de qualquer um dos parágrafos 8 a 12, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante compreende um promotor específico de neurônio que controla a expressão do precursor de IDS humano glicosilado em células neuronais humanas ou um promotor específico de célula glial que controla a expressão do precursor de IDS humano glicosilado em células gliais humanas.

14. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante para uso de qualquer um dos parágrafos 8 a 13, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante codifica um peptídeo líder que garante o processamento co- e pós-tradução adequado do precursor do IDS humano glicosilado em células neuronais humanas ou células gliais humanas.

15. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante para uso de qualquer um dos parágrafos 8 a 14, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é um vetor de AAV.

16. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante para uso do parágrafo 15, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é um vetor de AAV com defeito de replicação.

17. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante para uso dos parágrafos 15 ou 16, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é um vetor AAV9 ou AAVrh10.

18. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante para uso de qualquer um dos parágrafos 8 a 17, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é entregue ao LCR do sujeito humano por punção intratecal, intracerebroventricular, lombar ou administração intranasal.

19. O vetor de expressão de nucleotídeo recombinante para uso de qualquer um dos parágrafos 8 a 18, em que o sujeito humano é deficiente na atividade do IDS.

20. Uma formulação para uso no tratamento de um sujeito humano diagnosticado com MPS II, que compreende um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano, em que a formulação é adequada para administração no LCR do cérebro humano, de modo que um depósito seja formado no humano sistema nervoso central que secreta um precursor de IDS humano glicosilado que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa) conforme medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é fosforilado com manose-6.

3.1.3 Conjunto 3

1. Uso de um precursor de iduronato-2-sulfatase recombinante humano glicosilado (IDS) para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um indivíduo humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), em que o precursor de IDS

humano recombinante glicosilado é produzido por neurônios humanos ou células gliais humanas, e em que o tratamento compreende a entrega ao líquido cefalorraquidiano (LCR) do referido sujeito humano uma quantidade terapêuticamente eficaz do precursor de IDS humano recombinante glicosilado.

2. O uso do parágrafo 1, em que o precursor do IDS humano recombinante glicosilado é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa, ou 95 kDa) medido por eletroforese em gel de poliacrilamida.

3. O uso do parágrafo 1, em que o precursor do IDS humano recombinante glicosilado é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa, ou 95 kDa), medido por electroforese em gel de poliacrilamida, contém um formilglicina, é α 2,6-sialylated, não contém detectável NeuGc, não contém antígeno α -Gal detectável, e/ou é o manose-6-fosforilado.

4. O uso de qualquer um dos parágrafos 1 a 3, em que o precursor de IDS humano recombinante glicosilado é secretado a partir de um depósito de células no sistema nervoso central geneticamente modificado por engenharia genética para secretar o referido precursor de IDS humano recombinante glicosilado.

5. O uso do parágrafo 4, no qual o depósito é formado no cérebro de um sujeito humano.

6. O uso de qualquer um dos parágrafos 1 a 5, no qual o sujeito humano é deficiente na atividade do IDS.

7. A utilização de qualquer um dos parágrafos 1 a 6, em que o precursor do IDS humano recombinante glicosilado compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 1

8. A utilização de um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um sujeito humano diagnosticado com MPS II, em que o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante quando usado para transduzir uma célula neuronal humana primária em cultura direciona a expressão de um precursor de IDS humano glicosilado secretado que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilada, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose 6-fosforilada e em que o tratamento compreende a administração ao LCR de dito sujeito humano o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante.

9. Uso de um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um sujeito humano diagnosticado com MPS II, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é adequado para administração ao fluido cerebrospinal do cérebro humano, de modo que um depósito é formado no sistema nervoso central humano que secreta um precursor de IDS humano glicosilado que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose 6-fosforilada, e em que

o tratamento compreende administrar ao CSF do referido sujeito humano o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante.

10. A utilização do parágrafo 9, em que a secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado é confirmada pela transdução de uma linha de células neuronais humanas com o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante em cultura de células.

11. A utilização dos parágrafos 9 ou 10, em que a secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado é confirmada na presença e ausência de manose-6-fosfato.

12. A utilização de qualquer um dos parágrafos 8 a 11, em que o IDS humano compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 1

13. O uso de qualquer um dos parágrafos 8 a 12, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante compreende um promotor específico de neurônio que controla a expressão do precursor de IDS humano glicosilado em células neuronais humanas ou um promotor específico de célula glial que controla a expressão do precursor de IDS humano glicosilado em células gliais humanas.

14. O uso de qualquer um dos parágrafos 8 a 13, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante codifica um peptídeo líder que garante o processamento co- e pós-tradução adequado do precursor do IDS humano glicosilado em células neuronais humanas ou células gliais humanas.

15. O uso de qualquer um dos parágrafos 8 a 14, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é um vetor de AAV.

16. A utilização do parágrafo 15, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é um vetor de AAV com defeito de replicação.

17. A utilização do parágrafo 15 ou 16, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é um vetor AAV9 ou AAVrh10.

18. O uso de qualquer um dos parágrafos 8 a 17, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é entregue ao LCR do sujeito humano por punção intratecal, intracerebroventricular, lombar ou administração intranasal.

19. O uso de qualquer um dos parágrafos 8 a 18, em que o sujeito humano é deficiente na atividade do IDS.

20. Uso de uma formulação para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um sujeito humano diagnosticado com MPS II, em que a formulação compreende um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica o IDS humano e em que a formulação é adequada para administração no LCR do cérebro humano, de modo que um depósito seja formado no sistema nervoso central humano que segrega um precursor de IDS humano glicosilado que é de cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose 6-fosforilado.

3.1.4 Conjunto 4

1. Método para o tratamento de um sujeito humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), compreendendo a entrega ao líquido cefalorraquidiano (LCR) do referido sujeito

humano uma quantidade terapêuticamente eficaz de um precursor iduronato-2-sulfatase recombinante glicosilado humano (IDS) produzido por células neuronais ou gliais humanas.

2. Método do parágrafo 1, em que o precursor do IDS humano recombinante glicosilado é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa, ou 95 kDa) medido por eletroforese em gel de poliacrilamida.

3. Método do parágrafo 1, em que o precursor do IDS humano recombinante glicosilado é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa, ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém um formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável, e/ou é manose-6-fosforilado.

4. Método de qualquer um dos parágrafos 1 a 3, em que o precursor de IDS humano recombinante glicosilado é secretado a partir de um depósito de células no sistema nervoso central geneticamente modificado por engenharia genética para secretar o referido precursor de IDS humano recombinante glicosilado.

5. Método do parágrafo 4, no qual o depósito é formado no cérebro de um sujeito humano.

6. Método de qualquer um dos parágrafos 1 a 5, no qual o sujeito humano é deficiente na atividade do IDS.

7. Método de qualquer um dos parágrafos 1 a 6, no qual o precursor do IDS humano recombinante glicosilado compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 1

8. Método para tratar um sujeito humano diagnosticado com MPS II, compreendendo a administração ao CSF do referido sujeito humano de um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano, em que o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante quando usado para transduzir uma célula neuronal humana primária em cultura direciona a expressão de um precursor de IDS humano glicosilado secretado que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa) medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é fosforilado com manose-6.

9. Método para tratar um humano diagnosticado com MPS II, compreendendo a administração ao CSF do referido humano de um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano, de modo que um depósito seja formado no sistema nervoso central humano que secreta um precursor de IDS humano glicosilado que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose-6-fosforilada.

10. O método do parágrafo 9, em que a secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado é confirmada através da transdução de uma linha celular neuronal humana com o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante em cultura de células.

11. Os métodos dos parágrafos 9 ou 10, em que a secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado é confirmada na presença e ausência de manose-6-fosfato.

12. Método de qualquer um dos parágrafos 8 a 11, no qual o IDS humano compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 1

13. Método de qualquer um dos parágrafos 8 a 12, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante compreende um promotor específico de neurônio que controla a expressão do precursor de IDS humano glicosilado em células neuronais humanas ou um promotor específico de célula glial que controla a expressão do precursor de IDS humano glicosilado em células gliais humanas.

14. Método de qualquer um dos parágrafos 8 a 13, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante codifica um peptídeo líder que garante o processamento co- e pós-tradução adequado do precursor do IDS humano glicosilado em células neuronais humanas ou células gliais humanas.

15. Método de qualquer um dos parágrafos 8 a 14, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é um vetor de AAV.

16. Método do parágrafo 15, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é um vetor de AAV com defeito de replicação.

17. Método dos parágrafos 15 ou 16, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é um vetor AAV9 ou AAVrh10.

18. Método de qualquer um dos parágrafos 8 a 17, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é entregue ao LCR do sujeito humano por punção intratecal, intracerebroventricular, lombar ou administração intranasal.

19. Método de qualquer um dos parágrafos 8 a 18, em que o sujeito humano é deficiente na atividade do IDS.

20. Método para tratar um sujeito humano diagnosticado com MPS II, compreendendo a administração ao CSF do referido sujeito humano uma formulação compreendendo um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica o IDS humano, em que a formulação é adequada para administração ao CSF do cérebro humano, de modo que um depósito é formado no sistema nervoso central humano que secreta um precursor de IDS humano glicosilado que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa , 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou possui manose 6-fosforilada.

3.1.5 Conjunto 5

1. Método para o tratamento de um sujeito humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), compreendendo a entrega ao líquido cefalorraquidiano (LCR) do referido sujeito humano uma quantidade terapêuticamente eficaz de um precursor iduronato-2-sulfatase recombinante glicosilado humano (IDS) produzido por células neuronais ou gliais humanas.

2. Método para tratar um sujeito humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), caracterizado pelo fato de que compreende:

adicionar ao fluido cerebrospinal (CSF) do referido sujeito humano, uma quantidade terapêuticamente eficaz de um precursor iduronato-2-sulfatase (IDS) humano recombinante glicosilado que

é cerca de 90 kDa (por exemplo, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medidos por eletroforese em gel de poliacrilamida, tem um resíduo de formilglicina em C⁸⁴ (Fig. 1), é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável e é manose-6-fosforilada.

3. Método para tratar um sujeito humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), caracterizado pelo fato de que compreende:

adicionar ao fluido cerebrospinal (CSF) do referido sujeito humano, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um precursor iduronato-2-sulfatase (IDS) humano recombinante glicosilado que é cerca de 90 kDa (por exemplo, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medidos por eletroforese em gel de poliacrilamida, tem um resíduo de formilglicina em C⁸⁴ (Fig. 1), é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc e/ou antígeno α -Gal detectável e é manose-6-fosforilada.

4. Método de qualquer um dos parágrafos 1 a 3, no qual o precursor de IDS humano recombinante glicosilado é entregue ao CSF a partir de um depósito de células no sistema nervoso central modificado geneticamente para secretar o referido precursor de IDS humano recombinante glicosilado no CSF.

5. Método do parágrafo 4, no qual o depósito é formado no cérebro do sujeito humano.

6. Método de qualquer um dos parágrafos 1 a 5, no qual o sujeito humano é deficiente na atividade do IDS.

7. Método de qualquer um dos parágrafos 1 a 6, no qual o precursor do IDS humano recombinante glicosilado compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 1

8. Método para tratar um humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), compreendendo a administração ao fluido cerebrospinal (CSF) do referido sujeito humano um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica a iduronato-2-sulfatase humana (IDS), em que o referido nucleotídeo recombinante o vetor de expressão quando usado para transduzir uma célula neuronal humana primária em cultura direciona a expressão de um precursor de IDS humano glicosilado segregado que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, possui um resíduo de formilglicina em C⁸⁴ (Fig. 1), é α 2,6-sialilado e manose-6-fosforilada.

9. Método para tratar um humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), caracterizado pelo fato de que compreende:

administrar ao fluido cerebrospinal do cérebro do referido sujeito humano, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica o IDS humano, de modo que um depósito seja formado no sistema nervoso central do sujeito que secreta um precursor de IDS humano glicosilado que é α 2,6-sialilado e manose-6-fosforilado.

10. Método do parágrafo 9, em que a secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado que é α 2,6-sialilado é confirmada pela transdução de uma linha celular neuronal humana com o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante em cultura de células.

11. Método do parágrafo 9, em que a secreção do referido precursor IDS humano glicosilado que é manose-6-fosforilada é confirmada pela transdução de uma linha celular neuronal humana com o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante em cultura de células.

12. Método dos parágrafos 10 ou 11, no qual a secreção é confirmada na presença e na ausência de manose-6-fosfato.

13. Método para tratar um sujeito humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), caracterizado pelo fato de que compreende:

administrar ao fluido cerebrospinal do cérebro do referido sujeito humano, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica o IDS humano, de modo que seja formado um depósito que segrega um precursor de IDS humano glicosilado contendo um glicano α 2,6-sialilado;

em que o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante, quando usado para transduzir células neuronais humanas em cultura resulta na secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado contendo um glicano α 2,6-sialilado na referida cultura de células.

14. Método para tratar um sujeito humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), caracterizado pelo fato de que compreende :

administrar ao fluido cerebrospinal do cérebro do referido sujeito humano, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica o IDS humano, de modo que seja formado um depósito que secrete um

precursor de IDS humano glicosilado que contém um manose-6-fosfato;

em que o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante, quando usado para transduzir células neuronais humanas em cultura resulta na secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado que é manose-6-fosforilada na referida cultura de células.

15. Método para tratar um sujeito humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), caracterizado pelo fato de que compreende :

administrar ao fluido cerebrospinal do cérebro do referido sujeito humano, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica o IDS humano, de modo que seja formado um depósito que secrete um precursor do IDS humano glicosilado que contém uma formilglicina;

em que o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante, quando usado para transduzir células neuronais humanas em cultura resulta na secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado que contém uma formilglicina na referida cultura de células.

16. Método de qualquer um dos parágrafos 8 a 15, no qual o IDS humano compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 1

17. Método de qualquer um dos parágrafos 8 a 15, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante codifica um peptídeo líder.

18. Método de qualquer um dos parágrafos 8 a 15, no qual o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é um vetor de AAV com defeito de replicação.

19. Método de qualquer um dos parágrafos 8 a 15, no qual o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é entregue ao LCR do sujeito humano por punção intratecal, intracerebroventricular, lombar ou administração intranasal.

20. Método de qualquer um dos parágrafos 8 a 15, no qual o sujeito é humano e é deficiente na atividade do IDS.

4. BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0032] FIG.1. A sequência de aminoácidos do IDS humano.

É necessária uma modificação pós-tradução da formilglicina de C⁸⁴ (mostrada em negrito na FIG.1) para a atividade enzimática. Oito locais de glicosilação ligados a N (N³¹, N¹¹⁵, N¹⁴⁴, N²⁴⁶, N²⁸⁰, N³²⁵, N⁵¹³ e N⁵³⁷) estão em negrito e em caixas. Um local de tirosina-O-sulfatação (Y) está em negrito e a sequência completa do local de sulfatação (PSSEKY¹⁶⁵ ENTKTCRGPD) é encaixotada. O terminal N dos polipeptídeos maduros de 42 kDa e 14 kDa é indicado por setas horizontais. No cérebro, o terminal N da forma madura de 42 kDa começa nas posições 34 ou 36 da seguinte maneira: T³⁴ DALNVLLI; e A³⁶ LNVLLIIV como indicado na FIG.1. (Ver Sleat, 2005, Proteomics 5: 1520-1532, Tabela S2). Dois dos oito locais de glicosilação ligados a N, nomeadamente N²⁸⁰ e N¹¹⁶, são manose-6-fosforilados no IDS obtido a partir do cérebro humano. (Sleat et al., 2006, Mol & Cell Proteomics 5.4: 686-701, relatado na Tabela V).

[0033] FIG.2. Alinhamento de sequência múltipla de HIDS com ortólogos conhecidos. Os nomes das espécies e IDs de proteínas

são os seguintes: SP|P22304|IDS_HUMAN [Homo sapiens];
 TR|K6ZGI9_PANTR [trogloditas de pan (chimpanzé)];
 TR|K7BKV4_PANTR [trogloditas de pan (chimpanzé)];
 TR|H9FTX2_MACMU [*Macaca mulatta* (macaco Rhesus)]; TRF7EJG2_CALJA
 [*Callithrix jacchus* (sagui-de-tufo-branco)]; TR|U3DTL8_CALJA
 [*Callithrix jacchus* (sagui-de-tufo-branco)]; TR|G7NRX7_MACMU
 [*Macaca mulatta* (macaco Rhesus)]; TR|G7Q1V9_MACFA [*Macaca
 fascicularis* (macaco que come caranguejo; macaco cinomólogo)];
 TR|H2PX10_PONAB [*Pongo abelii* (orangotango de Sumatra)];
 TR|A0A0D9R4D1_CHLSB [*Chlorocebus sabaues* (macaco verde)];
 TR|G1RST8|G1RST8_NOMLE [*Nomascus leucogenys* (gibão do norte de
 bochechas brancas)];
 UPI0000D9F625 [*Macaca mulatta* (macaco Rhesus)]; UPI000274358B
 [*Pan paniscus* (chimpanzé-pigmeu; Bonobo)]; UPI00027F6FC5 [*Papio
 Anubis* (babuíno verde-oliva)]; UPI00027FAE03 [*Saimiri
 boliviensis* (macaco-esquilo boliviano)]; UPI0003ABBF28 [*Macaca
 fascicularis* (macaco que come caranguejo; macaco cinomólogo)];
 UPI000533297F [*Rhinopithecus roxellana* (macaco-de-nariz-
 dourado; *Pygathrix roxellana*)]; UPI0005F40BD2 [*Colobus
 angolensis palliates* (Peters 'Angolan colobus)] (SEQ ID NOs: 27-
 44).

[0034] FIG.3. Mutações no MPS II em HIDS e fenótipos de doenças correspondentes, leves, intermediários ou graves. (da Uniprot).

[0035] FIG.4. Processamento humano de IDS como relatado em Millat et al., 1997, Exp. célula. Res. 230: 362-367, na Fig.7.

[0036] FIG.5. Representação esquemática da construção 1.

[0037] **FIG.6.** Alinhamento de Sequência Múltipla Clustal dos capsídeos 1 - 9 do AAV (SEQ ID NOs: 16-26). As substituições de aminoácidos (mostradas em negrito nas linhas inferiores) podem ser feitas nos capsídeos AAV9 e AAV8 "recrutando" resíduos de aminoácidos da posição correspondente de outros capsídeos AAV alinhados. Regiões de sequência designadas por "HVR" = regiões hipervariáveis.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0038] A invenção envolve a entrega de iduronato-2-sulfatase recombinante humana (rhIDS) produzida por células neuronais ou gliais humanas ao líquido cefalorraquidiano (LCR) do sistema nervoso central (CNS) de um sujeito humano diagnosticado com mucopolissacaridose II (MPS II), incluindo, entre outros, pacientes diagnosticados com síndrome de Hunter. Veja também o Pedido de Patente Internacional No. PCT / US2017 / 027770, arquivado em 14 de abril de 2017 (publicado como WO / 2017/181113 em 19 de outubro de 2017), que é incorporado por referência aqui na sua totalidade, para composições e métodos que pode ser usado de acordo com a invenção aqui descrita.

[0039] Numa forma de realização preferida, o tratamento é realizado por meio de terapia de genes - por exemplo, por administração de um vetor viral ou outra construção de expressão de ADN que codifica o IDS humanos (HIDs), ou um derivado de HIDs, para o CSF de um paciente (sujeito humano) diagnosticada com MPS II, para que seja gerado um depósito permanente de células neuronais e/ou gliais transduzidas que forneçam continuamente o produto transgene ao CNS. Os rhIDS secretados do depósito de células neuronais/gliais no LCR serão endocitados pelas células do SNC, resultando em "correção cruzada" do defeito enzimático

nas células receptoras. Além disso, verificou-se, inesperadamente, que o depósito de células neurais e gliais transduzidas no SNC pode entregar a enzima recombinante ao SNC e sistemicamente, o que pode reduzir ou eliminar a necessidade de tratamento sistêmico, por exemplo, semanal i.v. injeções da enzima.

[0040] Numa forma de realização alternativa, os HIDs pode ser produzido por neuronal humano ou células gliais em culturas de células (por exemplo, bio-reatores) e administrados como uma terapia de substituição de enzimas ("TRE"), por exemplo, por injeção da enzima - no LCR , diretamente no CNS e/ou sistemicamente. No entanto, a abordagem da terapia genética oferece várias vantagens sobre a ERT, pois a entrega sistêmica da enzima não resultará no tratamento do SNC, porque a enzima não pode atravessar a barreira hematoencefálica; e, diferentemente da abordagem de terapia gênica da invenção, a entrega direta da enzima ao LCR e/ou CNS exigiria repetidas injeções que não são apenas onerosas, mas representam um risco de infecção.

[0041] Os HIDs codificado pelo transgene pode incluir, mas é não se limitando a humanos IDS (HIDs) possuindo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO.1 (como mostrado na FIG.1) e derivados de HIDS com substituições, deleções ou adições de aminoácidos, *por exemplo*, incluindo, mas não se limitando a substituições de aminoácidos selecionadas a partir de resíduos não conservados correspondentes em ortólogos de IDS mostrados na FIG.2, com a *condição* de que tais mutações não incluam a substituição do resíduo de cisteína na posição 84 (C84), necessária para a atividade enzimática (Millat et al., 1997, Biochem J 326: 243-

247); ou uma mutação que foi identificada em fenótipos graves, intermediários graves, intermediários ou atenuados de MPS II , *por exemplo*, como mostrado na FIG. 3, ou conforme relatado por Sukegawa-Hayasaka *et al.*, 2006, J Inher Metab Dis 29: 755-761 (relatando os mutantes "atenuados" R48P, A85T, W337R e o mutante truncado Q531X; e os mutantes "graves" P86L, S333L , S349I, R468Q, R468L); Millat *et al.*, 1998, BBA 1406: 214-218 (relatando mutantes "atenuados" P480L e P480Q; e mutante "grave" P86L); e Bonucelli *et al.*, 2001, BBA 1537: 233-238, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade.

[0042] Por exemplo, as substituições de aminoácidos em uma posição específica de HIDS podem ser selecionadas dentre os resíduos de aminoácidos correspondentes não conservados encontrados nessa posição nos ortólogos do IDS alinhados na FIG.2, com a *condição de* que tais substituições não incluam nenhuma das mutações deletérias mostradas na FIG.3 ou como relatado por Sukegawa-Hayasaka *et al.*, 2006, *supra*; Millat *et al.*, 1998, *supra*; ou Bonucelli *et al.*, 2001, *supra*, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade. O produto transgene resultante pode ser testado usando ensaios convencionais *in vitro*, em cultura de células ou animais de teste para garantir que a mutação não perturbe a função IDS. As substituições, deleções ou adições de aminoácidos preferidas selecionadas devem ser aquelas que mantêm ou aumentam a atividade enzimática, a estabilidade ou a meia-vida do IDS, como testado por ensaios convencionais *in vitro*, em cultura de células ou modelos animais para MPS II. Por exemplo, a atividade enzimática do produto transgene pode ser avaliada usando um ensaio enzimático convencional com, por exemplo, 2-sulfato de ácido 4-

metilumbeliferil α -L-idopiranosidurônico como sulfato de 2-sulfato ou 4-metilumbeliferil sulfato como substrato (*ver, por exemplo, Lee et al. al., 2015, Clin. Biochem. 48 (18): 1350-1353, Dean et al., 2006, Clin. Chem. 52 (4): 643-649 para ensaios enzimáticos de IDS exemplares que podem ser usados, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade*). A capacidade do produto transgene para corrigir o fenótipo MPS II pode ser avaliada em cultura de células; *por exemplo, pela transdução de células MPS II em cultura com um vetor viral ou outra construção de expressão de DNA que codifica HIDS ou um derivado; adicionando o produto transgene ou um derivado às células MPS II em cultura; ou co-cultivando células MPS II com células hospedeiras neuronais/gliais humanas projetadas para expressar e secretar rhIDS ou um derivado e determinando a correção do defeito nas células cultivadas com MPS II, por exemplo, detectando a atividade da enzima IDS e/ou redução na Armazenamento de GAGnas células MPS II em cultura (ver, por exemplo, Stroncek et al., 1999, Transfusion 39 (4): 343-350, que é incorporado por referência aqui na sua totalidade)*.

[0043] Foram descritos modelos animais para MPS II que podem ser utilizados para avaliar a terapêutica aqui descrita. Por exemplo, um modelo de camundongo knockout (IDS-knockout) do MPS II foi projetado substituindo os exons 4 e 5 do gene *IDS* pelo gene de resistência à neomicina. (Garcia et al., 2007, J. Inherit Metab Dis 30: 924-34). Este camundongo IDS knockout exibe muitas das características do MPS II, incluindo anormalidades esqueléticas, hepatoesplenomegalia, GAG urinário e tecidual elevado e lesões de armazenamento cerebral (Muenzer et al., 2001, Acta Paediatr Suppl 91: 98-99) e foi usado avaliar o efeito da

terapia de reposição enzimática no MPS II no suporte de ensaios clínicos para a ERT. Este modelo de camundongo, portanto, é um modelo relevante para estudar os efeitos da terapia gênica que fornece RIDS produzidos por células neuronais ou gliais como um tratamento para MPS II (*ver, por exemplo, Polito e Cosma, 2009, Am. J. Hum. Genet. 85 (2): 296-301, que é incorporado por referência aqui na sua totalidade*).

[0044] De preferência, o transgene HIDS produzido pelas células neuronais/gliais humanas deve ser controlado por elementos de controle de expressão que funcionam em neurônios e/ou células gliais, *por exemplo*, o promotor CB7 (um promotor de β -actina de frango e potenciador de CMV), e podem incluir outros elementos de controle da expressão que aumentam a expressão do transgene impulsionado pelo vetor (*por ex.*, frango β de intron e de coelho β -globina sinal poli A). A construção de cDNA para o transgene hIDS deve incluir uma sequência de codificação para um peptídeo sinal que garanta o processamento co e pós-traducional adequado (glicosilação e sulfatação de proteínas) pelas células CNS transduzidas. Tais peptídeos de sinal usados pelas células do SNC podem incluir, mas não estão limitados a:

- Peptídeo sinal de glicoproteína mielina-oligodendrócito (hOMG):

MEYQILKMSLCLFILLFLTPGILC (SEQ ID NO: 2)

- Repressor celular dos peptídeos sinalizadores dos genes 2 estimulados por E1A (hCREG2):

MSVRRGRRPARPGTRLISWLLCCSALLSPAAG (SEQ ID NO: 3)

- Conjunto V e domínio transmembranar contendo peptídeo sinal 2B (hVSTM2B): MEQRNRLGALGYLPPLLLHALLLFVADA (SEQ ID NO:4)
- Peptídeo sinal de protocaderina alfa-1 (hPCADHA1):
MVFSRRGGLGARDLLLWLLLLAAWEVGSG (SEQ ID NO: 5)
- Peptídeo de sinal FAM19A1 (TAFA1):
MAMVSAMSWVLYLWISACA (SEQ ID NO: 6)
- Peptídeo sinal de interleucina-2:
MYRMQLLSCIALILALVTNS (SEQ ID NO: 14)

Os peptídeos de sinal também podem ser aqui referidos como sequências líderes ou peptídeos líderes.

[0045] O vetor recombinante usado para administrar o transgene deve ter um tropismo para células no SNC, incluindo mas limitado a neurônios e/ou células da glia. Tais vetores podem incluir vetores de vírus adeno-associados recombinantes não replicantes ("rAAV"), particularmente aqueles portadores de um capsídeo AAV9 ou AAVrh10. Os capsídeos variantes de AAV podem ser utilizados, incluindo, mas não se limitando, aos descritos por Wilson na patente US 7.906.111, que é incorporada por referência aqui na sua totalidade, sendo particularmente preferido o AAV/hu.31 e AAV/hu.32; bem como os capsídeos variantes do AAV descritos por Chatterjee na Patente US No. 8.628.966, Patente US No. 8.927.514 e Smith *et al.*, 2014, Mol Ther 22: 1625-1634, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade. No entanto, outros vetores virais podem ser utilizados, incluindo, entre outros, vetores lentivirais, vetores virais de vaccinia ou vetores de expressão não viral referidos como construções de "DNA nu".

[0046] As composições farmacêuticas adequadas para administração ao LCR compreendem uma suspensão do vetor rhIDS em um tampão de formulação compreendendo um tampão aquoso fisiologicamente compatível, um surfactante e excipientes opcionais. Em certas formas de realização, as composições farmacêuticas são adequadas para administração intratecal. Em certas formas de realizações, as composições farmacêuticas são adequadas para administração intracisternal (injeção na cisterna magna). Em certas formas de realizações, as composições farmacêuticas são adequadas para injeção no espaço subaracnóide por meio de uma punção C1-2. Em certas formas de realizações, as composições farmacêuticas são adequadas para administração intracerebroventricular. Em certas formas de realizações, as composições farmacêuticas são adequadas para administração via punção lombar.

[0047] Doses terapeuticamente eficazes do vetor recombinante devem ser administradas ao LCR via administração intratecal (isto é, injeção no espaço subaracnóideo de modo que os vetores recombinantes se distribuam através do LCR e transduzam células no SNC). Isso pode ser realizado de várias maneiras - por exemplo, por injeção intracraniana (cisternal ou ventricular) ou injeção na cisterna lombar. Por exemplo, a injeção intracisternal (CI) (na cisterna magna) pode ser realizada por punção suboccipital guiada por TC; ou a injeção no espaço subaracnóideo pode ser realizada através de uma punção C1-2 quando possível para o paciente; ou punção lombar (normalmente procedimentos de diagnóstico realizados para coletar uma amostra de LCR) pode ser usada para acessar o LCR. Alternativamente, a administração intracerebroventricular (ICV) (uma técnica mais

invasiva usada para a introdução de drogas anti-infecciosas ou anticâncer que não penetram na barreira hematoencefálica) pode ser usada para instilar os vetores recombinantes diretamente nos ventrículos do cérebro. Alternativamente, a administração intranasal pode ser usada para distribuir o vetor recombinante no SNC.

[0048] Devido ao crescimento relativamente rápida do cérebro que ocorre no início de um feto em desenvolvimento, a dose total de AAV9.hIDS administrado IC depende da massa cerebral assumido entre diferentes idades. Para massa cerebral por idade para os sujeitos do estudo, ver, por exemplo, (AS Dekaban, Ann Neurol, outubro de 1978; 4 (4): 345-56.

[0049] Tabela: Dose total administrada por idade

Idade	Massa cerebral presumida (g)	Dose 1 (GC total)	Dose 2 (GC total)
≥ 4 a <9 meses	600	7,8 × 10 ¹²	3,9 × 10 ¹³
≥ 9 a <18 meses	1000	1,3 × 10 ¹³	6,5 × 10 ¹³
≥ 18 meses a <3 anos	1100	1,4 × 10 ¹³	7,2 × 10 ¹³
≥ 3 anos	1300	1,7 × 10 ¹³	8,5 × 10 ¹³

[0050] As concentrações de LCR podem ser monitoradas medindo diretamente a concentração de rhIDS no fluido do LCR obtido a partir de punções occipitais ou lombares, ou estimadas por extrapolação a partir das concentrações de rhIDS detectadas no soro do paciente.

[0051] Como pano de fundo, o IDS humano é traduzido como um polipeptídeo de 550 aminoácidos que contém oito locais potenciais de N-glicosilação (N³¹, N¹¹⁵, N¹⁴⁴, N²⁴⁶, N²⁸⁰, N³²⁵, N⁵¹³ e N⁵³⁷) representado na FIG.1 e inclui uma sequência de sinal de 25 aminoácidos que é clivada durante o processamento. Um precursor intracelular inicial de 76 kDa é convertido em um precursor fosforilado de 90 kDa após modificação de suas cadeias de oligossacarídeos no aparelho de Golgi. Este precursor é processado por modificações de glicosilação e clivagem proteolítica através de vários intermediários intracelulares até uma forma principal de 55 kDa. Para resumir, após a remoção da sequência de sinal 25 aa, o processamento proteolítico envolve a clivagem proteolítica N-terminal a jusante de N³¹ removendo um propeptídeo de oito aminoácidos (resíduos 26-33) e a clivagem proteolítica C-terminal a montante de N⁵¹³, que libera um polipeptídeo de 18 kDa e produz um intermediário de 62 kDa que é convertido em uma forma madura de 55 kDa. A clivagem proteolítica adicional produz uma forma madura de 45 kDa localizada no compartimento lisossômico. (Veja a FIG. 4 para o diagrama reproduzido de Millat *et al.*, 1997, Exp Cell Res 230: 362-367 ("Millat 1997"); Millat *et al.* 1997, Biochem J. 326: 243-247 ("Millat 1997a") e Froissart *et al.*, 1995, Biochem J. 309: 425-430, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade).

[0052] Uma modificação de formilglicina de C⁸⁴ (mostrada em **negrito** na FIG.1) necessária para a atividade enzimática provavelmente ocorre como um evento pós-tradução ou co-tradução precoce, provavelmente no retículo endoplasmático. (Ver Millat 1997a, citando Schmidt *et al.*, 1995, Cell 82: 271-278). O processamento pós-tradução continua no Golgi para incluir a adição de glicanos complexos contendo ácido siálico e a aquisição de resíduos de manose-6-fosfato que marcam a enzima para entrega ao compartimento lisossômico. (Ver Clarke, 2008, Expert Opin Pharmacother 9: 311-317 para uma revisão concisa que é incorporada por referência aqui na sua totalidade). Embora nenhum local de glicosilação seja essencial para a estabilidade do IDS, a glicosilação na posição N²⁸⁰ é importante para a internalização celular e o direcionamento lisossômico através do receptor de manose-6-fosfato (M6P). (Chung *et al.*, 2014, Glycoconj J 31: 309-315 na p.310, primeira coluna). No estado fisiológico normal, o IDS é produzido em níveis muito baixos e muito pouca ou nenhuma enzima é secretada na célula. (Clarke, 2008, *supra*).

[0053] A invenção é baseada, em parte, nos seguintes princípios:

(i) As células neuronais e gliais no SNC são células secretoras que possuem o mecanismo celular para o processamento pós-traducional de proteínas secretadas - incluindo processos robustos de glicosilação, manose-6-fosforilação e tirosina-O-sulfatação - no SNC. Ver, por exemplo, Sleat *et al.*, 2005, Proteomics 5: 1520-1532, e Sleat 1996, J Biol Chem 271: 19191-98, que descreve o glicoproteoma do manose-6-fosfato do cérebro humano e observa que o cérebro contém mais proteínas com um

número muito maior de isoformas individuais e proteínas manose-6-fosforiladas do que as encontradas em outros tecidos; e Kanan *et al.*, 2009, *Exp. Eye Res.* 89: 559-567 e Kanan e Al-Ubaidi, 2015, *Exp. Eye Res.* 133: 126-131 relataram a produção de glicoproteínas sulfatadas em tirosina secretadas por células neuronais, cada uma das quais é incorporada por referência na sua totalidade para modificações pós-tradução feitas por células CNS humanas.

(ii) O cérebro humano produz várias isoformas de IDS natural/nativo. Em particular, a sequenciação N-terminal de glicoproteínas de manose-6-fosforiladas do cérebro humano revelou que a sequência N-terminal da cadeia madura de 42 kDa de hIDS varia no cérebro, começando nas posições 34 ou 36, como a seguir: T³⁴ DALNVLLI; e A³⁶ LNVLLIIV. (Sleat, 2005, *Proteomics* 5: 1520-1532, Tabela S2). Verificou-se que dois dos oito locais de glicosilação ligados a N, N²⁸⁰ e N¹¹⁶, eram manose-6-fosforilados no IDS obtido a partir do cérebro humano. (Sleat *et al.*, 2006, *Mol & Cell Proteomics* 5.4: 686-701, relatado na Tabela V).

(iii) Durante o processamento de HIDS, dois polipeptídeos, 76 kDa e 90 kDa, são secretados por células neurais e gliais, mas apenas o polipeptídeo de 90 kDa é manose-6-fosforilado, o que é necessário para que as formas secretadas da enzima atinjam a correção cruzada. (Ver Millat, 1997, resultados da Fig. 1 para células linfoblastoides transduzidas e Froissart 1995, Fig.4 mostrando resultados semelhantes para fibroblastos transduzidos - em meio de cultura, apenas a forma de 90 kDa é fosforilada). Curiosamente, foi demonstrado que o IDS recombinante produzido pelas células neuronais e gliais pode ser endocitado pelas células CNS receptoras mais avidamente do que o IDS recombinante

produzido por outras células, como o rim. Daniele 2002, demonstrou endocitose mediada pelo receptor M6P de IDS recombinante a partir de meios condicionados de culturas de células neuronais e gliais transduzidas por uma população receptora de células neuronais e gliais não transduzidas que processaram adequadamente o precursor para a forma ativa madura de 45 kDa. A captação do IDS recombinante produzido pelas linhas celulares neuronais e gliais (74% de endocitose) excedeu em muito a captação da enzima produzida por uma linha de células renais (5,6% de endocitose). Em cada caso, a captação foi inibida por M6P, indicando que a captação de IDS recombinante era mediada pelo receptor de M6P. (Ver Daniele 2002, Tabelas 2 e 4 e descrição anexa em Resultados nas páginas 205-206 resumidas na Tabela 1 abaixo).

Tabela 1. Resumo dos resultados relatados em Daniele 2002

Fonte da Linhagem Celular de rIDS	Meios Unidades enzimáticas	Células Receptoras: Unidades Recuperadas		Endocitose (valor médio)
		Neuronal	Glial	
Rim (transfectado)	35 U	1,7 U	2,2 U	5,6%
Neuronal (Ad transduzido)	12 U	8,8 U	8,8 U	74%
Glial (Ad transduzido)	14 U	10,5 U	10,5 U	74%

(iv) A abordagem de terapia genética aqui descrita deve resultar na secreção contínua de um precursor da glicoproteína HIDS de cerca de 90 kDa, conforme medido por eletroforese em gel de poliacrilamida (dependendo do ensaio utilizado) que é enzimaticamente ativo. Primeiro, a enzima responsável pela modificação da formilglicina C⁸⁴ necessária para a atividade do IDS - a enzima geradora de FGly (FGE, também conhecida como SUMF1) - é expressa no córtex cerebral do cérebro humano (os dados de expressão gênica para SUMF1 podem por exemplo, em GeneCards, acessível em <http://www.genecards.org>). Segundo, os RIDS glicosilados/fosforilados secretados, produzidos por neurônios transduzidos e células gliais *in situ*, devem ser absorvidos e processados corretamente por células neurais e gliais não traduzidas no SNC. Sem estar vinculado a nenhuma teoria, parece que o precursor de rhIDS secretado produzido *in situ* por terapia genética pode ser mais avocemente endocitado pelas células receptoras no SNC do que as enzimas recombinantes tradicionais usadas para a TRE se administradas ao SNC. Por exemplo, Elaprase® (fabricada em HT1080, uma linha celular de fibrossarcoma) é uma proteína purificada que tem um peso molecular de cerca de 76 kDa - não as espécies de 90 kDa secretadas pelas células neuronais e gliais que parecem ser mais fortemente fosforiladas. Embora os oito locais de glicosilação ligados a N estejam totalmente ocupados em Elaprase® e contenham dois glicanos terminados com bis-manose-6-fosfato, bem como glicanos altamente sialilados complexos, a modificação pós-tradução de C⁸⁴ para FGly, que é um requisito absoluto para a atividade enzimática, é de apenas cerca de 50%. (Clarke, 2008, Expert Opin Pharmacother 9: 311-317; Elaprase® Full Prescribing

Information e arquivamento EMA). Outro produto recombinante, Hunterase®, é produzido em células CHO. Embora relatado ter maior atividade de FGly e atividade que Elapraxe®, manose-6-fosforilação e captação não diferiram. (Chung, 2014, Glycoconj J 31: 309-315).

(v) A eficácia extracelular do IDS *in vivo* depende da captação (internalização de células e lisossomos) através da manose-6-fosfato (M6P) e de seu sítio ativo formilglicina (FGly), que é convertido de C⁸⁴ através de modificação pós-traducional por formilglicina-enzima geradora. Como mostrado acima na Tabela 1, as células cerebrais (células neuronais e gliais) mostram atividades enzimáticas mais altas quando incubadas com mídia precursora IDS secretada por células neuronais e gliais transduzidas do que com mídia precursora IDS secretada por células renais geneticamente modificadas. O aumento de atividade resultante em cinco vezes provavelmente pode ser atribuído à absorção eficiente de IDS (ver Daniele 2002, tabelas 2 e 4). Formas comerciais de IDS, que são geradas por células CHO ou HT-1080, têm um conteúdo de FGly de cerca de 50% a 70%, o que determina a atividade da enzima. No entanto, as células neuronais e gliais podem melhorar essa atividade, devido à melhora da captação de IDS.

(vi) O tráfico/captação celular e subcelular de proteínas lisossômicas, incluindo IDS, é através do M6P. O IDS das células cerebrais pode conter um conteúdo mais alto de M6P, como relatado em Daniele 2002, e em Sleat, Proteomics, 2005 (indicando que o cérebro humano contém mais glicoproteínas de Man6-P (tanto no sentido quantitativo quanto qualitativo) do que outros tecidos. É possível medir o conteúdo de M6P de um precursor de IDS, como

feito em Daniele 2002. Na presença de M6P inibitório (*por exemplo*, 5 mM), a captação do precursor de IDS gerado por células não neuronais ou não gliais, como prevê-se que as células renais geneticamente modificadas de Daniele 2002 diminuam para níveis próximos aos das células de controle, como foi mostrado em Daniele 2002. Enquanto estiver na presença de M6P inibitório, a captação do precursor de IDS gerado por células cerebrais, como prevê-se que as células neuronais e gliais permaneçam em um nível alto, como foi mostrado em Daniele 2002, onde a captação foi quatro vezes maior que as células de controle e comparável ao nível de atividade (ou captação) de IDS do precursor de IDS gerado por engenharia genética. células renais sem a presença de M6P inibitório. Este ensaio permite uma maneira de prever o conteúdo de M6P no precursor de IDS gerado pelas células cerebrais e, em particular, comparar o conteúdo de M6P nos precursores de IDS gerados por diferentes tipos de células. A abordagem de terapia genética descrita neste documento deve resultar na secreção contínua de um precursor de HIDS que pode ser absorvido pelas células neuronais e gliais em um nível alto na presença de M6P inibidor em um desses ensaios.

(vii) O conteúdo de M6P e a captação do precursor de IDS também podem ser demonstrados por bandas de gel de 90 kDa e 76 kDa (*por exemplo*, bandas de gel SDS-PAGE). É relatado que os 90 kDa são altamente glicosilados/fosforilados e contêm M6P, enquanto os 76 kDa não são. Uma banda de gel muito ampla, com faixa de 76 kDa a 95 kDa e com um MW médio de 80-85 kDa, semelhante à banda precursora de gel IDS gerada a partir de células renais geneticamente modificadas (Daniele 2002, Figura 1), pode ser contrastada com uma banda de gel do precursor IDS

gerado a partir de células cerebrais. Em Daniele 2002, a banda de gel não pode ser obtida devido à imunoprecipitação malsucedida do precursor do IDS. A abordagem de terapia genética aqui descrita deve resultar na secreção contínua de um precursor de HIDS que difere da banda de precursor de IDS em gel gerada a partir de células renais geneticamente modificadas.

(viii) O conteúdo de M6P do precursor comercial de IDS é de 2 a 2,5 mol/mol, a maioria dos quais está presente na forma de glicanos di-fosforilados. Embora, em média, todo precursor de IDS seja fosforilado, uma distribuição normal de glicanos terá algum precursor de IDS com 2, 1 e 0 de glicanos M6P di-fosforilados, assumindo múltiplos locais de fosforilação. A taxa de captação deve ser significativamente maior com a fosforilação múltipla.

(ix) A glicosilação de HIDS pelas células humanas do SNC resultará na adição de glicanos que podem melhorar a estabilidade, a meia-vida e reduzir a agregação indesejada do produto transgênico. Significativamente, os glicanos que são adicionados para HIDS da invenção incluem 2,6 ácido-siálico, incorporando Neu5Ac ("NANA"), mas não o seu derivado hidroxilado, NeuGc (ácido N-glicolilneuramínico, ou seja, "NGNA" ou "Neu5Gc"). Tais glicanos não estão presentes nos produtos de IDS recombinantes, tais como Hunterase®, feita em células CHO porque as células CHO não têm o 2,6-sialiltransferase necessário para efetuar esta modificação pós-translacional; nem as células CHO produzem GlcNAc em bissecção, embora adicionem Neu5Gc (NGNA) como ácido siálico não típico (e potencialmente imunogênico) aos seres humanos em vez de Neu5Ac (NANA). Ver, por exemplo, Dumont et al., 2016, Critical Rev in Biotech 36 (6): 1110-1122 (Early

Online pp. 1-13 na p. 5); e Hague *et al.*, 1998 Electrophor 19: 2612-2630 ("[a] linha celular CHO é considerada 'fenotipicamente restrita', em termos de glicosilação, devido à falta de uma α 2,6-sialil-transferase"). Além disso, as células CHO também podem produzir um glicano imunogênico, o antígeno α -Gal, que reage com os anticorpos anti- α -Gal presentes na maioria dos indivíduos, e em altas concentrações pode desencadear anafilaxia. Ver, por exemplo, Bosques, 2010, Nat Biotech 28: 1153-1156. O padrão de glicosilação humana dos rhIDS da invenção deve reduzir a imunogenicidade do produto transgene e melhorar a eficácia.

(x) A imunogenicidade de um produto transgênico pode ser induzida por vários fatores, incluindo a condição imunológica do paciente, a estrutura e as características da droga protéica infundida, a via de administração e a duração do tratamento. Impurezas relacionadas ao processo, como proteína da célula hospedeira (HCP), DNA da célula hospedeira e resíduos químicos, e impurezas relacionadas ao produto, como degradantes de proteínas e características estruturais, como glicosilação, oxidação e agregação (partículas subvisíveis), também pode aumentar a imunogenicidade, servindo como um adjuvante que melhora a resposta imune. As quantidades de impurezas relacionadas ao processo e ao produto podem ser afetadas pelo processo de fabricação: cultura celular, purificação, formulação, armazenamento e manuseio, que podem afetar os produtos IDS fabricados comercialmente. Na terapia gênica, as proteínas são produzidas *in vivo*, de modo que as impurezas relacionadas ao processo não estão presentes e os produtos protéicos provavelmente não contêm impurezas/degradantes relacionados ao produto associados às proteínas produzidas por

tecnologias recombinantes, como agregação e oxidação de proteínas. A agregação, por exemplo, está associada à produção e armazenamento de proteínas devido à alta concentração de proteínas, à interação da superfície com equipamentos e recipientes de fabricação e ao processo de purificação com certos sistemas tampão. Mas essas condições que promovem agregação não estão presentes quando um transgene é expresso *in vivo*. A oxidação, como a oxidação da metionina, triptofano e histidina, também está associada à produção e armazenamento de proteínas, causada, por exemplo, por condições estressadas de cultura de células, contato com metais e ar e impurezas em tampões e excipientes. As proteínas expressas *in vivo* também podem oxidar em uma condição estressada, mas os seres humanos, como muitos organismos, são equipados com um sistema de defesa antioxidante, que não apenas reduz o estresse oxidativo, mas também pode reparar e/ou reverter a oxidação. Assim, é provável que as proteínas produzidas *in vivo* não estejam na forma oxidada. Tanto a agregação quanto à oxidação podem afetar a potência, a farmacocinética (depuração) e podem aumentar as preocupações de imunogenicidade. A abordagem de terapia genética aqui descrita deve resultar na secreção contínua de um precursor de HIDS com uma imunogenicidade reduzida em comparação com produtos fabricados comercialmente.

(xi) Além dos locais de glicosilação ligados ao N, o hIDS contém um local de sulfatação da tirosina ("Y") (PSSEKY¹⁶⁵ ENTKTCRGPD). (Ver, por exemplo, Yang et al, 2015, As moléculas 20:2138-2164, especialmente a p 2154, que é aqui incorporada por referência na sua totalidade para a análise de aminoácidos circundantes resíduos de tirosina submetidos a sulfatação da

tirosina proteína. As "Regras" podem ser resumidas da seguinte forma: Y resíduo com E ou D na posição de +5 a -5 de Y e onde a posição -1 de Y é um aminoácido com carga neutra ou ácida - mas não um aminoácido básico, *por exemplo*, R, K ou H que abole a sulfatação). Embora não pretenda estar vinculada a nenhuma teoria, a sulfatação deste local no HIDS pode melhorar a estabilidade da enzima e a afinidade de ligação ao substrato. A sulfatação de tirosina de HIDS - um processo pós-tradução robusto nas células humanas do SNC - deve resultar em melhor processamento e atividade dos produtos transgênicos. O significado da tirosina-sulfatação das proteínas lisossômicas não foi elucidado; mas em outras proteínas demonstrou-se aumentar a avidéz das interações proteína-proteína (anticorpos e receptores) e promover o processamento proteolítico (hormônio peptídico). (Ver Moore, 2003, J. Biol. Chem. 278: 24243-46; e Bundegaard *et al.*, 1995, The EMBO J 14: 3073-79). A tirosilproteína sulfotransferase (TPST1) responsável pela sulfatação da tirosina (que pode ocorrer como uma etapa final no processamento do IDS) é aparentemente expressa em níveis mais altos (com base no mRNA) no cérebro (dados de expressão gênica para TPST1 podem ser encontrados, *por exemplo*, no Atlas de Expressões EMBL-EBI, acessível em <http://www.ebi.ac.uk/gxa/home>). Essa modificação pós-traducional, na melhor das hipóteses, está sub-representada nos produtos de células CHO. Ao contrário das células humanas do SNC, as células CHO não são células secretoras e têm capacidade limitada para sulfatação de tirosina pós-tradução. (Ver, *por exemplo*, Mikkelsen & Ezban, 1991, Biochemistry 30: 1533-1537 especialmente, discussão na p. 1537).

[0054] Pelas razões anteriores, a produção de rhIDS por células neuronais e/ou gliais humanas deve resultar em uma molécula "biobetter" para o tratamento de MPS II realizado por terapia genética - *por exemplo*, administrando um vetor viral ou outra expressão de construção de DNA codificação de rhIDS no LCR de um paciente (sujeito humano) diagnosticado com uma doença por MPS II (incluindo, entre outros, Hunter) para criar um depósito permanente no CNS que fornece continuamente um glicosilado totalmente humano, manose-6-fosforilada, transgene sulfatado secretado pelas células CNS transduzidas. O produto transgene hIDS secretado do depósito no LCR será endocitado pelas células no SNC, resultando em "correção cruzada" do defeito enzimático nas células receptoras de MPS II.

[0055] Não é essencial que todas as moléculas de rhIDS produzidas na terapia genética ou na abordagem proteica sejam totalmente glicosiladas, fosforiladas e sulfatadas. Em vez disso, a população de glicoproteínas produzidas deve ter glicosilação suficiente (incluindo 2,6-flutuação e manose-6-fosforilação) e sulfatação para demonstrar eficácia. O objetivo do tratamento de terapia gênica da invenção é retardar ou interromper a progressão da doença. A eficácia pode ser monitorada medindo a função cognitiva (*por exemplo*, prevenção ou diminuição do declínio neurocognitivo); reduções nos biomarcadores da doença (como GAG) no LCR e/ou soro; e/ou aumento da atividade da enzima IDS no LCR e/ou soro. Sinais de inflamação e outros eventos de segurança também podem ser monitorados.

[0056] Como alternativa, ou um tratamento adicional à terapia gênica, a glicoproteína rhIDS pode ser produzida em linhas celulares neurais ou gliais humanas por tecnologia de DNA

recombinante e a glicoproteína pode ser administrada a pacientes diagnosticados com MPS II sistemicamente e/ou na CSF para ERT). As linhas celulares humanas que podem ser usadas para essa produção de glicoproteína recombinante incluem, entre outras, HT-22, SK-N-MC, HCN-1A, HCN-2, NT2, SH-SY5y, hNSC11 ou ReNcell VM (*consulte por exemplo, Dumont et al., 2016, Critical Rev in Biotech* 36 (6): 1110-1122 "Linhas de células humanas para fabricação biofarmacêutica: história, status e perspectivas futuras", que é incorporado por referência em sua totalidade para uma revisão da linhas celulares humanas que poderiam ser usadas para a produção recombinante da glicoproteína rHuGlyIDS). Para garantir glicosilação completa, especialmente sialilação e sulfatação de tirosina, a linha celular utilizada para produção pode ser aprimorada através da engenharia das células hospedeiras para co-expressar α -2,6-sialiltransferase (ou ambas α -2,3- e α - 2,6-sialiltransferases) e/ou enzimas TPST-1 e TPST-2 responsáveis pela tirosina-O-sulfatação.

[0057] Embora a administração de rhIDS deva minimizar as reações imunes, a fonte potencial mais clara de toxicidade relacionada à terapia genética direcionada ao SNC está gerando imunidade contra a proteína rhIDS expressa em indivíduos humanos que são geneticamente deficientes para IDS e, portanto, potencialmente não tolerantes da proteína e/ou do vetor usado para administrar o transgene.

[0058] Assim, em uma forma de realização, é aconselhável co-tratar o paciente com terapia de supressão imunológica - especialmente ao tratar pacientes com doença grave que têm níveis próximos de zero de IDS. Podem ser empregadas terapias de supressão imune envolvendo um regime de tacrolimus ou rapamicina

(sirolimus) em combinação com ácido micofenólico, ou outros esquemas de supressão imune usados em procedimentos de transplante de tecidos. Esse tratamento de supressão imune pode ser administrado durante o curso da terapia gênica e, em certas modalidades, o pré-tratamento com terapia de supressão imune pode ser preferido. A terapia de supressão imunológica pode ser continuada após o tratamento de terapia gênica, com base no julgamento do médico assistente, e pode posteriormente ser retirada quando a tolerância imunológica for induzida; *por exemplo*, após 180 dias.

[0059] As combinações de entrega dos rhIDS ao LCR acompanhadas pela entrega de outros tratamentos disponíveis são abrangidas pelos métodos da invenção. Os tratamentos adicionais podem ser administrados antes, simultaneamente ou após o tratamento de terapia gênica. Os tratamentos disponíveis para o MPS II que poderiam ser combinados com a terapia gênica da invenção incluem, mas não estão limitados, à terapia de reposição enzimática usando Elaprase® administrada sistemicamente ou no LCR; e/ou terapia de TCTH.

[0060] Em certas formas de realização, da presente invenção, aqui descrito é um método para o tratamento de um humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), que compreende administrar ao líquido cefalorraquidiano (CSF) do referido indivíduo humano uma quantidade terapeuticamente eficaz de um iduronato humano recombinante. Precursor da 2-sulfatase (IDS) produzido por células neuronais ou gliais humanas.

[0061] Em certas formas de realização, da presente invenção, aqui descrito é um método de tratamento de um indivíduo humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), que

compreende administrar ao fluido cerebrospinal (CSF) do referido humano, uma quantidade terapêuticamente eficaz de um iduronato humano recombinante precursor da glicoproteína α -2-sulfatase (IDS) que é cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, possui um resíduo de formilglicina em C⁸⁴ (Fig. 1), é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável e é manose 6-fosforilado.

[0062] Em certas formas de realização, da presente invenção, aqui descrito é um método de tratamento de um humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), que compreende administrar ao fluido cerebrospinal (CSF) do referido sujeito humano, uma quantidade terapêuticamente eficaz de um iduronato humano recombinante precursor da glicoproteína α -2-sulfatase (IDS) que é de cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, tem um resíduo de formilglicina em C⁸⁴ (Fig. 1), é α 2,6-sialilado, não contém antígeno NeuGc e/ou α -Gal detectável e é manose-6-fosforilado.

[0063] Em certas formas de realização, da presente invenção, aqui descrito, o precursor de IDS humano é entregue ao LCR a partir de um depósito de células no sistema nervoso central geneticamente modificado por engenharia genética para secretar o referido precursor de IDS no LCR. Em certas formas de realização, o depósito é formado no cérebro do sujeito. Em certas formas de realização, o indivíduo humano é deficiente na atividade do IDS. Em certas modalidades, o IDS humano compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO.1.

[0064] Em certas formas de realização, da presente invenção, aqui descrito é um método de tratamento de um indivíduo humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), compreendendo a administração ao líquido cefalorraquidiano (CSF) do referido sujeito humano um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica o iduronato humano-2 -sulfatase (IDS), em que o referido vetor de expressão quando usado para transduzir uma célula neuronal humana primária em cultura direciona a expressão de um precursor de glicoproteína IDS humana secretada que é de cerca de 90 kDa (*por exemplo* , 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa , 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medidos por eletroforese em gel de poliacrilamida, tem um resíduo de formilglicina em C⁸⁴ (Fig. 1), é α 2,6-sialilado e manose-6-fosforilada.

[0065] Em certas formas de realização, da presente invenção, aqui descrito é um método de tratamento de um indivíduo humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), compreendendo a administração ao fluido cerebrospinal do cérebro do referido sujeito humano, uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma expressão de nucleotídeo recombinante vector que codifica IDS humano, de modo a formar um depósito no sistema nervoso central do sujeito que segrega um precursor da glicoproteína IDS humana recombinante que é α 2,6-sialilado e manose-6-fosforilado.

[0066] Em certas formas de realização, da presente invenção, aqui descrito, a secreção do referido precursor da glicoproteína IDS humana recombinante que é α 2,6-sililada é confirmada pela transdução de uma linha celular neuronal humana com o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante em cultura de

células. Em certas formas de realização, a secreção do referido precursor da glicoproteína IDS humana recombinante que é manose-6-fosforilada é confirmada pela transdução de uma linha celular neuronal humana com o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante em cultura celular. Em certas formas de realização, a secreção é confirmada na presença e ausência de manose-6-fosfato.

[0067] Em certas formas de realização, da presente invenção, aqui descrito é um método de tratamento de um indivíduo humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), compreendendo a administração ao fluido cerebrospinal do cérebro do referido sujeito humano, uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma expressão de nucleotídeo recombinante vector que codifica IDS humano, de modo que seja formado um depósito que segrega um precursor de IDS glicosilado contendo um glicano α 2,6-sialilado; em que o referido vetor recombinante, quando usado para transduzir células neuronais humanas em cultura resulta na secreção do referido precursor de IDS glicosilado contendo um glicano α 2,6-sialilado na referida cultura de células.

[0068] Em certas formas de realização, da presente invenção, aqui descrito é um método de tratamento de um indivíduo humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), compreendendo a administração ao fluido cerebrospinal do cérebro do referido sujeito humano, uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma expressão de nucleotídeo recombinante vector que codifica IDS humano, de modo que seja formado um depósito que segrega um precursor de IDS glicosilado que contém um manose-6-fosfato; em que o referido vetor recombinante, quando usado para transduzir células neuronais humanas em cultura resulta na

secreção do referido precursor de IDS glicosilado que é manose-6-fosforilada na referida cultura de células.

[0069] Em certas formas de realização, da presente invenção, aqui descrito, é um método de tratamento de um humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), compreendendo a administração ao fluido cerebrospinal do cérebro do referido humano, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma expressão de nucleotídeo recombinante vetor que codifica IDS humano, de modo que seja formado um depósito que segrega um precursor de IDS glicosilado que contém uma formilglicina; em que o referido vetor recombinante, quando usado para transduzir células neuronais humanas em cultura resulta na secreção do referido precursor de IDS glicosilado que contém uma formilglicina na referida cultura de células.

[0070] Em certas formas de realização, da presente invenção, o IDS humano compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO.1. Em certas formas de realização, o transgene IDS codifica um peptídeo líder. Como também, o vetor de expressão é um vetor AAV com defeito de replicação. Em certas formas de realização, o vetor de expressão é entregue ao LCR do sujeito por administração intratecal (por exemplo, intracisternal, C1-2, se possível para o paciente ou punção lombar), administração intracerebroventricular ou intranasal. E, o indivíduo humano é deficiente na atividade do IDS.

[0071] Em certas formas de realização, da presente invenção, o IDS glicosilado não contém NeuGc detectável e/ou α -Gal. A frase "NeuGc detectável e/ou α -Gal" usada aqui significa porções NeuGc e/ou α -Gal detectáveis por métodos de ensaio padrão conhecidos na técnica. Por exemplo, NeuGc pode ser detectado por HPLC de

acordo com Hara *et al.*, 1989, "Determinação altamente sensível de ácidos N-acetil e N-glicolilneuramínicos no soro humano e soro de urina e rato por cromatografia líquida de fase reversa com detecção de fluorescência". *J. Chromatogr., B: Biomed.* 377: 111-119, que é aqui incorporado por referência para o método de detecção de NeuGc. Alternativamente, NeuGc pode ser detectado por espectrometria de massa. O α -Gal pode ser detectado usando teste ELISA, ver, por exemplo, Galili *et al.*, 1998, "Um ensaio sensível para medir a expressão do epítipo alfa-Gal nas células por um anticorpo monoclonal anti-Gal". *Transplante.* 65 (8): 1129-32, ou por espectrometria de massa, ver, por exemplo, Ayoub *et al.*, 2013, "Avaliação correta da estrutura primária e extenso perfil glicológico do cetuximab por uma combinação de técnicas de espectrometria de massa ESI e MALDI intacta, intermediária, intermediária e descendente e descendente". *Landes Bioscience.* 5 (5): 699-710. Veja também as referências citadas em Platts-Mills *et al.*, 2015, "Anafilaxia para a alfa-gal da cadeia lateral de carboidratos" *Immunol Allergy Clin North Am.* 35 (2): 247-260.

5.1 PROCESSAMENTO, N-GLICOSILAÇÃO E SULFAÇÃO DE TIROSINA

5.1.1 Em processamento

[0072] IDS humano inclui uma seqüência de sinal de 25 aminoácidos que é clivado durante o processamento. Um precursor intracelular IDS inicial de 76 kDa é convertido em um precursor IDS fosforilado de 90 kDa após modificação de suas cadeias de oligossacarídeos no aparelho de Golgi. Este precursor é processado por modificações de glicosilação e clivagem proteolítica através de vários intermediários intracelulares até uma forma principal de 55 kDa. Para resumir, após a remoção da

sequência de sinal 25 aa, o processamento proteolítico envolve a clivagem proteolítica N-terminal a jusante de N³¹ removendo um propeptídeo de oito aminoácidos (resíduos 26-33) e a clivagem proteolítica C-terminal a montante de N⁵¹³, que libera um polipeptídeo de 18 kDa e produz um intermediário de 62 kDa que é convertido em uma forma madura de 55 kDa. A clivagem proteolítica adicional produz uma forma madura de 45 kDa localizada no compartimento lisossômico. (Veja a FIG.4 para o diagrama reproduzido de Millat *et al.*, 1997, Exp Cell Res 230: 362-367 ("Millat 1997"); Millat *et al.* 1997, Biochem J. 326: 243-247 ("Millat 1997a") e Froissart *et al.*, 1995, Biochem J. 309: 425-430, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade).

[0073] Uma modificação de formilglicina de C⁸⁴ (mostrada em negrito na FIG.1) necessária para a atividade enzimática provavelmente ocorre como um evento pós-tradução ou co-tradução precoce, provavelmente no retículo endoplasmático. (Ver Millat 1997a, citando Schmidt *et al.*, 1995, Cell 82: 271-278). O processamento pós-tradução continua no Golgi para incluir a adição de glicanos complexos contendo ácido siálico e a aquisição de resíduos de manose-6-fosfato que marcam a enzima para entrega ao compartimento lisossômico. (Ver Clarke, 2008, Expert Opin Pharmacother 9: 311-317 para uma revisão concisa que é incorporada por referência aqui na sua totalidade).

[0074] Em certas formas de realização, da presente invenção, os HuGlyIDS usados de acordo com os métodos aqui descritos, quando expressos em uma célula neuronal ou glial, *in vivo* ou *in vitro*, podem ser os 90 kDa (*por exemplo* , 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou

95 kDa) forma manose-6-fosforilada da enzima. O IDS produzido a partir de células neuronais e gliais pode conter maior conteúdo de M6P, conforme relatado em Daniele 2002 e em Sleat, Proteomics, 2005 (indicando que o cérebro humano contém mais glicoproteínas M6P (tanto no sentido quantitativo quanto qualitativo) do que outros tecidos). É possível medir o conteúdo M6P de um precursor do IDS, como feito em Daniele 2002.

[0075] Por conseguinte, em certas formas de realização, da presente invenção, o HuGlyIDS usado de acordo com os métodos aqui descritos, quando expresso em uma célula neuronal ou glial, *in vivo* ou *in vitro*, é manose 6-fosforilada em um nível mais alto do que o IDS expresso célula neuronal ou glial. Em particular, o HuGlyIDS usado de acordo com os métodos descritos neste documento, quando expresso em uma célula neuronal ou glial, *in vivo* ou *in vitro*, é manose-6-fosforilada em um nível mais alto do que o IDS expresso em uma célula HT1080 ou CHO. Em certas formas de realização, da presente invenção, o nível de manose-6-fosforilação do IDS expresso é medido pela captação do IDS por uma célula neuronal humana na presença de M6P (*por exemplo* , 5 mM M6P). Em certas modalidades, quando expresso em uma célula neuronal ou glial, *in vivo* ou *in vitro* , 10% - 20%, 20% - 30%, 30% - 40%, 40% - 50%, 50% - 60%, 60 % - 70%, 70% - 80%, 80% - 90% ou 90% - 100% das moléculas de HuGlyIDS utilizadas de acordo com os métodos aqui descritos são manose 6-fosforiladas .

5.1.2 N-Glicosilação

As células neuronais e gliais no SNC são células secretoras que possuem o mecanismo celular para o processamento pós-tradução de proteínas secretadas - incluindo glicosilação e tirosina-O-sulfatação. O hIDS possui oito locais de glicosilação

asparaginal ("N") identificados na FIG.1 (N³¹ ST; N¹¹⁵ FS; N¹⁴⁴ HT; N²⁴⁶ IT; N²⁸⁰ IS; N³²⁵ ST; N⁵¹³ FS; N⁵³⁷ DS). Dois dos oito locais de glicosilação ligados a N, nomeadamente N²⁸⁰ e N¹¹⁶, são manose-6-fosforilados no IDS obtido a partir do cérebro humano. (Sleat et al., 2006, Mol & Cell Proteomics 5.4: 686-701, relatado na Tabela V).

Embora nenhum local de glicosilação seja essencial para a estabilidade do IDS, a glicosilação na posição N²⁸⁰ é importante para a internalização celular e o direcionamento lisossômico através do receptor de manose-6-fosfato (M6P). (Chung et al., 2014, Glycoconj J 31: 309-315 na p.310, primeira coluna). No estado fisiológico normal, o IDS é produzido em níveis muito baixos e muito pouca ou nenhuma enzima é secretada na célula. (Clarke, 2008, *supra*).

[0077] Não é essencial que todas as moléculas produzidas na terapia de genes ou na abordagem de terapia de proteínas sejam totalmente glicosiladas e sulfatadas. Pelo contrário, a população de glicoproteínas produzidas deve ter glicosilação e sulfatação suficientes para demonstrar eficácia.

[0078] Em uma forma de realização específica, da presente invenção,, os HuGlyIDS utilizados de acordo com os métodos aqui descritos, quando expressos em uma célula neuronal ou glial, *in vivo* ou *in vitro*, podem ser glicosilados em 100% dos seus locais de N-glicosilação. No entanto, um especialista na técnica compreenderá que nem todos os locais de N-glicosilação do HuGlyIDS precisam ser N-glicosilados para que os benefícios da glicosilação sejam alcançados. Em vez disso, os benefícios da glicosilação podem ser alcançados quando apenas uma porcentagem dos locais de N-glicosilação é glicosilada e/ou quando apenas

uma porcentagem das moléculas de IDS expressas é glicosilada. Por conseguinte, em certas formas de realização, da presente invenção, os HuGlyIDS usados de acordo com os métodos aqui descritos, quando expresso em uma célula neuronal ou glial, *in vivo* ou *in vitro*, é glicosilado em 10% - 20%, 20% - 30%, 30% - 40 %, 40% - 50%, 50% - 60%, 60% - 70%, 70% - 80%, 80% - 90% ou 90% - 100% de seus locais de N-glicosilação disponíveis. Em certas formas de realização, da presente invenção,, quando expresso em uma célula neuronal ou glial, *in vivo* ou *in vitro*, 10% - 20%, 20% - 30%, 30% - 40%, 40% - 50%, 50% - 60%, 60 % - 70%, 70% - 80%, 80% - 90% ou 90% - 100% das moléculas de HuGlyIDS usadas de acordo com os métodos aqui descritos são glicosiladas pelo menos um de seus locais de N-glicosilação disponíveis.

[0079] Em uma forma de realização específica, da presente invenção, pelo menos 10%, 20% 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% das Os locais de N-glicosilação presentes no HuGlyIDS usados de acordo com os métodos aqui descritos são glicosilados em um resíduo Asn (ou outro resíduo relevante) presente em um local de N-glicosilação, quando o HuGlyIDS é expresso em uma célula neuronal ou glial, *in vivo* ou *in vitro*. Ou seja, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% dos locais de N-glicosilação dos HuGlyIDS resultantes são glicosilados.

[0080] Em uma forma de realização específica, da presente invenção, pelo menos 10%, 20% 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% dos locais de N-glicosilação presentes em um HuGlyIDS a molécula usada de acordo com os métodos aqui descritos é glicosilada com um glicano anexado idêntico, vinculado ao resíduo Asn (ou outro resíduo relevante) presente

em um local de N-glicosilação, quando o HuGlyIDS é expresso em uma célula neuronal ou glial, *in vivo* ou *in vitro*. Ou seja, pelo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% dos locais de N-glicosilação dos HuGlyIDS resultantes têm um glicano anexado idêntico.

[0081] É importante ressaltar que, quando as proteínas IDS usadas de acordo com os métodos aqui descritos são expressas em células neuronais ou gliais, a necessidade de produção *in vitro* em células hospedeiras procarióticas (por exemplo, *E. coli*) ou células hospedeiras eucarióticas (por exemplo, CHO células) é contornada. Em vez disso, como resultado dos métodos aqui descritos (por exemplo, uso de células neuronais ou gliais para expressar IDS), os locais de N-glicosilação das proteínas IDS são vantajosamente decorados com glicanas relevantes e benéficas para o tratamento de seres humanos e, em particular, no local de destino do tratamento. Essa vantagem é inatingível quando células CHO ou *E. coli* são utilizadas na produção de proteínas, porque, por exemplo, as células CHO (1) não expressam 2,6 sialiltransferase e, portanto, não podem adicionar ácido 2,6 siálico durante a N-glicosilação e (2) pode adicionar Neu5Gc como ácido siálico em vez de Neu5Ac; e porque *E. coli* não contém naturalmente componentes necessários para a N-glicosilação. Além disso, essa vantagem pode ser inatingível quando células humanas que não são neuronais ou gliais são utilizadas na produção de proteínas. Por conseguinte, em uma modalidade, uma proteína IDS expressa em uma célula neuronal ou glial para originar um HuGlyIDS usado nos métodos de tratamento aqui descritos é glicosilada da maneira pela qual uma proteína é N-glicosilada em células neuronais ou gliais humanas, mas não é glicosilado da

maneira em que as proteínas são glicosiladas nas células CHO. Em outra modalidade, uma proteína IDS expressa em uma célula neuronal ou glial para dar origem a um HuGlyIDS usado nos métodos de tratamento aqui descritos é glicosilada da maneira pela qual uma proteína é N-glicosilada em células neuronais ou gliais, em que tal a glicosilação não é naturalmente possível usando uma célula hospedeira procariótica, por exemplo, usando *E. coli*. Em uma modalidade, uma proteína IDS expressa em uma célula neuronal ou glial humana para originar um HuGlyIDS usado nos métodos de tratamento aqui descritos é glicosilada da maneira pela qual uma proteína é N-glicosilada em células neuronais ou gliais humanas, mas não é glicosilado da maneira em que as proteínas são glicosiladas em células humanas que não são células neuronais ou gliais.

[0082] Os ensaios para determinar o padrão de glicosilação de proteínas são conhecidos na técnica. Por exemplo, a hidrazinólise pode ser usada para analisar glicanos. Primeiro, os polissacarídeos são liberados de sua proteína associada por incubação com hidrazina (pode ser usado o Ludger Liberate Hydrazinolysis Glycan Release Kit, Oxfordshire, Reino Unido). A hidrazina nucleófila ataca a ligação glicosídica entre o polissacarídeo e a proteína transportadora e permite a liberação dos glicanos ligados. Os grupos N-acetil são perdidos durante este tratamento e precisam ser reconstituídos por re-N-acetilação. Os glicanos livres podem ser purificados em colunas de carbono e subsequentemente rotulados na extremidade redutora com a fluorófor 2-amino benzamida. Os polissacarídeos marcados podem ser separados em uma coluna GlycoSep-N (GL Sciences) de acordo com o protocolo de HPLC de Royle *et al.*, Anal Biochem

2002, 304 (1): 70-90. O cromatograma de fluorescência resultante indica o comprimento do polissacarídeo e o número de unidades repetidas. Informações estruturais podem ser coletadas através da coleta de picos individuais e subsequentemente executando análises de MS/MS. Desse modo, a composição de monossacarídeos e a sequência da unidade de repetição podem ser confirmadas e, adicionalmente, é possível identificar a homogeneidade da composição de polissacarídeos. Picos específicos de baixo peso molecular podem ser analisados por MALDI-MS/MS e o resultado usado para confirmar a sequência de glicano. Cada pico corresponde a um polímero constituído por certo número de unidades de repetição e seus fragmentos. O cromatograma permite, assim, medir a distribuição do comprimento do polímero. O tempo de eluição é uma indicação do comprimento do polímero, enquanto a intensidade da fluorescência se correlaciona com a abundância molar do respectivo polímero.

[0083] A homogeneidade dos padrões de glicano associados às proteínas, no que se refere ao comprimento e ao número de glicanos presentes nos locais de glicosilação, pode ser avaliada usando métodos conhecidos na técnica, por exemplo, métodos que medem o comprimento do glicano e o raio hidrodinâmico. A exclusão por tamanho - HPLC permite a medição do raio hidrodinâmico. Números mais altos de locais de glicosilação em uma proteína levam a uma maior variação no raio hidrodinâmico em comparação com um transportador com menos locais de glicosilação. No entanto, quando cadeias simples de glicano são analisadas, elas podem ser mais homogêneas devido ao comprimento mais controlado. O comprimento do glicano pode ser medido por hidrazinólise, SDS PAGE e eletroforese em gel capilar. Além disso, homogeneidade

também pode significar que certos padrões de uso de locais de glicosilação mudam para uma faixa mais ampla/mais estreito. Esses fatores podem ser medidos pelo glicopeptídeo LC-MS/MS.

[0084] A N-glicosilação confere numerosos benefícios aos HuGlyIDS utilizados nos métodos aqui descritos. Tais benefícios são inatingíveis pela produção de proteínas em *E. coli*, porque a *E. coli* não possui naturalmente componentes necessários para a N-glicosilação. Além disso, alguns benefícios são inatingíveis através da produção de proteínas em, por exemplo, células CHO, porque as células CHO não possuem componentes necessários para a adição de certos glicanos (por exemplo, ácido 2,6 siálico) e porque as células CHO podem adicionar glicanos, por exemplo, Neu5Gc não é típico para humanos, e o antígeno α -Gal, que é imunogênico na maioria dos indivíduos e em altas concentrações, pode desencadear anafilaxia. Além disso, alguns benefícios são inatingíveis através da produção de proteínas em células humanas que não são células neuronais ou gliais. Assim, a expressão de IDS em células neuronais ou gliais humanas resulta na produção de HuGlyIDS compreendendo glicanos benéficos que de outra forma não estariam associados à proteína se produzidos em células CHO, em *E. coli* ou em células humanas que não são neuronais ou células da glia.

5.1.3 Sulfação de tirosina

[0085] Além dos locais de glicosilação ligados ao N, o hIDS contém um local de sulfatação da tirosina ("Y") (PSSEKY¹⁶⁵ ENTKTCRGPD. Veja por exemplo, Yang et al, 2015, Molecules 20:2138-2164, especialmente a p2154, que é aqui incorporada por referência na sua totalidade para a análise de aminoácidos circundantes resíduos de tirosina submetidos a sulfatação da

tirosina proteína. As "Regras" podem ser resumidas da seguinte forma: Y resíduo com E ou D na posição de +5 a -5 de Y e onde a posição -1 de Y é um aminoácido com carga neutra ou ácida - mas não um aminoácido básico, *por exemplo* , R, K ou H que abole a sulfatação.

[0086] É importante ressaltar que proteínas de sulfato de tirosina não podem ser produzidas em *E. coli*, que naturalmente não possui as enzimas necessárias para a sulfatação de tirosina. Além disso, as células CHO são deficientes para a sulfatação da tirosina - elas não são células secretoras e têm uma capacidade limitada para a sulfatação da tirosina pós-traducional. Por exemplo, Mikkelsen & Ezban, 1991, *Biochemistry* 30: 1533-1537. Vantajosamente, os métodos aqui fornecidos requerem a expressão de IDS, por exemplo, HuGlyIDS, em neurônios ou células gliais, que são secretórias e têm capacidade para sulfatação de tirosina. Os ensaios para detecção da sulfatação de tirosina são conhecidos na técnica. Por exemplo, Yang *et al.*, 2015, *Molecules* 20: 2138-2164.

[0087] A sulfatação de tirosina de HIDS - um processo pós-tradução robusto em células humanas do SNC - deve resultar em melhor processamento e atividade de produtos transgênicos. O significado da tirosina-sulfatação das proteínas lisossômicas não foi elucidado; mas em outras proteínas demonstrou-se aumentar a avidéz das interações proteína-proteína (anticorpos e receptores) e promover o processamento proteolítico (hormônio peptídico). (Moore, 2003, *J. Biol. Chem.* 278: 24243-46; e Bundegaard *et al.*, 1995, *The EMBO J* 14: 3073-79). A tirosilproteína sulfotransferase (TPST1) responsável pela sulfatação da tirosina (que pode ocorrer como uma etapa final no

processamento do IDS) é aparentemente expressa em níveis mais altos (com base no mRNA) no cérebro (dados de expressão gênica para TPST1 podem ser encontrados, por exemplo, no Atlas de Expressões EMBL-EBI, acessível em <http://www.ebi.ac.uk/gxa/home>).

5.2 CONSTRUÇÕES E FORMULAÇÕES

[0088] Para uso nos métodos aqui fornecidos, são vetores virais ou outras construções de expressão de DNA que codificam iduronato-2-sulfatase (IDS), *por exemplo*, IDS humano (hIDS). Os vetores virais e outras construções de expressão de DNA aqui fornecidas incluem qualquer método adequado para a entrega de um transgene ao fluido cerebrospinal (CSF). Os meios de entrega de um transgene incluem vetores virais, lipossomas, outros complexos contendo lipídios, outros complexos macromoleculares, mRNA modificado sintético, mRNA não modificado, moléculas pequenas, moléculas não biologicamente ativas (*por exemplo*, partículas de ouro), moléculas polimerizadas (*por exemplo*, dendrímeros), DNA nu, plasmídeos, fagos, transposons, cosmídeos ou episomas. Em algumas formas de realização, o vetor é um vetor direcionado, *por exemplo*, um vetor direcionado para células neuronais.

[0089] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um ácido nucleico para uso, em que o ácido nucleico codifica um IDS, *por exemplo*, HIDS, operacionalmente ligado a um promotor selecionado do grupo que consiste em: promotor de citomegalovírus (CMV), vírus de sarcoma de Rous (RSV), MMT, EF-1 alfa, UB6, promotor frango beta-actina, CAG, RPE65 e opsin.

[0090] Em uma forma de realização, da presente invenção, são aqui fornecidos vetores recombinantes que compreendem um ou mais ácidos nucleicos (*por exemplo*, polinucleotídeos). Os ácidos nucleicos podem compreender DNA, RNA ou uma combinação de DNA e RNA. Em certas formas de realização, o DNA compreende uma ou mais das sequências selecionadas do grupo que consiste em sequências promotoras, a sequência do gene de interesse (o transgene, *por exemplo*, IDS), regiões não traduzidas e sequências de terminação. Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos compreendem um promotor operacionalmente ligado ao gene de interesse.

[0091] Em certas formas de realização, as sequências de ácidos nucleicos (*por exemplo*, polinucleotídeos) e de ácidos nucleicos aqui divulgadas podem ser otimizadas por códon, *por exemplo*, através de qualquer técnica de otimização de códon conhecida por um especialista na técnica (*por exemplo*, revisão por Quax et al., 2015, Mol Cell 59: 149-161).

[0092] Em outro aspecto, a divulgação fornece uma formulação compreendendo um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano, em que a formulação é adequada para administração ao fluido cerebrospinal do cérebro humano, de modo que um depósito seja formado no sistema nervoso central humano que secreta um precursor da glicoproteína IDS humana recombinante que é de cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa) conforme medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal e/ou é manose-6-fosforilada. *Por exemplo*, a formulação pode conter tampão

(como um tampão com um pH específico ou um tampão contendo um ingrediente específico) que o torna adequado para administração ao líquido cefalorraquidiano do cérebro humano, de modo que um depósito seja formado no ser humano sistema nervoso central que secreta um precursor da glicoproteína IDS humana recombinante que é de cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal e/ou é manose-6-fosforilado. Numa forma de realização específica, o tampão compreende um tampão aquoso fisiologicamente compatível, um surfactante e excipientes opcionais.

[0093] Em outro aspecto, a divulgação fornece um kit compreendendo um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano e um transportador farmacologicamente aceitável, em que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é adequado para administração ao líquido cefalorraquidiano (CSF) do cérebro humano, de modo que um depósito é formado no sistema nervoso central humano que secreta um precursor da glicoproteína IDS humana recombinante que é de cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa), medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose 6-fosforilado. Em outro aspecto, a divulgação fornece um kit compreendendo uma formulação compreendendo um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano, em que a formulação é

adequada para administração ao LCR do cérebro humano, de modo que um depósito é formado no sistema nervoso central humano que secreta um precursor da glicoproteína IDS humana recombinante que é de cerca de 90 kDa (*por exemplo*, 85 kDa, 86 kDa, 87 kDa, 88 kDa, 89 kDa, 90 kDa, 91 kDa, 92 kDa, 93 kDa, 94 kDa ou 95 kDa) como medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é fosforilado com manose-6. Um kit aqui descrito compreende o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante ou a formulação em um ou mais recipientes. Opcionalmente associado a um ou mais recipientes, pode haver um aviso na forma prescrita por uma agência governamental que regula a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, aviso que reflete a aprovação da agência de fabricação, uso ou venda para administração humana.

[0094] As formulações e kits aqui abrangidos podem ser utilizados de acordo com os métodos para o tratamento de um paciente humano, conforme fornecido nesta divulgação.

5.2.1 mRNA

[0095] Em certas formas de realização da presente invenção, os vetores aqui fornecidos são mRNA modificados que codificam para o gene de interesse (*por exemplo*, o transgene, *por exemplo*, IDS). A síntese de mRNA modificado e não modificado para entrega de um transgene ao LCR é ensinada, *por exemplo*, em Hocquemiller *et al.*, 2016, Human Gene Therapy 27 (7): 478-496, que é incorporado por referência aqui na sua totalidade. Em certas modalidades, é aqui fornecido um mRNA modificado que codifica para IDS, *por exemplo*, hIDS.

5.2.2 Vetores virais

[0096] Os vetores virais incluem adenovírus, vírus adeno-associado (AAV, *por exemplo*, AAV9, AAVrh10), lentivírus, adenovírus dependente de ajudante, vírus do herpes simples, poxvírus, vírus de hemaglutinina do Japão (HVJ), alfavírus, vírus da vacinação e retrovírus. Os vetores retrovirais incluem vetores baseados no vírus da leucemia murina (MLV) - e no vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os vetores de alfavírus incluem o vírus da floresta semliki (SFV) e o vírus sindbis (SIN). Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos são vetores virais recombinantes. Os vetores virais aqui fornecidos são alterados de modo que sejam deficientes em replicação em humanos. Os vetores virais são vetores híbridos, *por exemplo*, um vetor AAV colocado em um vetor adenoviral "indefeso". Em certas formas de realização, são aqui fornecidos vetores virais compreendendo um capsídeo viral de um primeiro vírus e proteínas do envelope viral de um segundo vírus. Em formas de realização específicas, o segundo vírus é o vírus da estomatite vesicular (VSV). E a proteína do envelope é a proteína VSV-G.

[0097] Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos são vetores virais baseados em HIV. Os vetores baseados em HIV aqui fornecidos compreendem pelo menos dois polinucleotídeos, em que os genes gag e pol são de um genoma do HIV e o gene env é de outro vírus.

[0098] Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos são vetores virais baseados em vírus do herpes simples. Os vetores baseados no vírus herpes simples aqui fornecidos são modificados de modo que não compreendam um ou

mais genes imediatamente precoces (IE), tornando-os não citotóxicos.

[0099] Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos são vetores virais baseados em MLV. Os vetores baseados em MLV aqui fornecidos compreendem até 8 kb de DNA heterólogo no lugar dos genes virais.

[00100] Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos são vetores virais baseados em lentivírus. Os vetores lentivirais aqui fornecidos são derivados de lentivírus humanos. Os vetores lentivirais aqui fornecidos são derivados de lentivírus não humanos. Os vetores lentivirais aqui fornecidos são empacotados em um capsídeo lentiviral. Em certas formas de realização, os vetores lentivirais aqui fornecidos compreendem um ou mais dos seguintes elementos: repetições terminais longas, um local de ligação ao iniciador, um trato polipurino, locais att e um local de encapsidação.

[00101] Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos são vetores virais baseados em alfavírus. Os vetores de alfavírus aqui fornecidos são alfavírus recombinantes com defeito de replicação. Em certas formas de realização, os replicons de alfavírus nos vetores de alfavírus aqui fornecidos são direcionados a tipos celulares específicos, exibindo um ligante heterólogo funcional em sua superfície de virion.

[00102] Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos são vetores virais baseados em AAV. Em modalidades preferidas, os vetores virais aqui fornecidos são vetores virais baseados em AAV9 ou AAVrh10. Em certas formas de realização, os vetores virais baseados em AAV9 ou AAVrh10 fornecidos aqui retêm

tropismo para células CNS. Vários sorotipos de AAV foram identificados. Os vetores baseados em AAV aqui fornecidos compreendem componentes de um ou mais sorotipos de AAV. Os vetores baseados em AAV aqui fornecidos compreendem componentes de um ou mais de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV10 ou AAV11. Os vetores baseados em AAV aqui fornecidos compreendem componentes de um ou mais dos sorotipos AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV10 ou AAV11. Os vetores virais baseados em AAV9 são utilizados nos métodos aqui descritos. Sequências de ácido nucleico de vetores virais baseados em AAV e métodos de produção de capsídeos AAV e AAV recombinantes são ensinadas, por exemplo, na Patente dos Estados Unidos No. 7.282.199 B2, Patente dos Estados Unidos No. 7.790.449 B2, Patente dos Estados Unidos No. 8.318.480 B2, Estados Unidos Patente No. 8.962.332 B2 e Pedido Internacional de Patente No. PCT/EP2014/076466, cada um dos quais é incorporado aqui por referência na sua totalidade. Em um aspecto, são aqui fornecidos os vetores virais baseados em AAV (por exemplo, AAV9 ou AAVrh10) que codificam um transgene (por exemplo, IDS). Em uma forma de realização específica, são aqui fornecidos vetores virais baseados em AAV9 que codificam IDS. São aqui fornecidos vetores virais baseados em AAV9 que codificam HIDS.

[00103] São fornecidos em formas de realização particulares vetores AAV9 compreendendo um genoma artificial compreendendo (i) uma cassete de expressão contendo o transgene sob o controle de elementos reguladores e flanqueado por ITRs; e (ii) um capsídeo viral que possui a sequência de aminoácidos da proteína do capsídeo AAV9 ou é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 99,9% idêntico à sequência de aminoácidos da proteína do capsídeo AAV9

(SEQ ID NO: 26), mantendo a função biológica do capsídeo AAV9. O capsídeo AAV9 codificado tem a sequência da SEQ ID NO: 26 com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 substituições de aminoácidos e mantendo a função biológica do capsídeo AAV9. FIG.6 fornece um alinhamento comparativo das sequências de aminoácidos das proteínas do capsídeo de diferentes sorotipos de AAV com potenciais aminoácidos que podem ser substituídos em certas posições nas sequências alinhadas com base na comparação na linha rotulada como SUBS. Por conseguinte, em modalidades específicas, o vetor AAV9 compreende uma variante do capsídeo AAV9 que possui 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 substituições de aminoácidos identificadas na linha SUBS da FIG. 6 que não estão presentes nessa posição na sequência nativa do AAV9.

[00104] Em certas formas de realização, o AAV usado nos métodos aqui descritos é Anc80 ou Anc80L65, conforme descrito em Zinn *et al.*, 2015, Cell Rep. 12 (6): 1056-1068, que é incorporado por referência em sua totalidade. Em certas formas de realização, o AAV que é usado nos métodos aqui descritos compreende uma das seguintes inserções de aminoácidos: LGETTRP ou LALGETTRP, como descrito nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 9.193.956; 9.458.517; e 9.587.282 e publicação do pedido de patente nºs. 2016/0376323, cada um dos quais é incorporado aqui por referência na sua totalidade. O AAV que é usado nos métodos aqui descritos é AAV.7m8, como descrito nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 9.193.956; 9.458.517; e 9.587.282 e publicação do pedido de patente nos. 2016/0376323, cada um dos quais é incorporado aqui

por referência na sua totalidade. Em certas formas de realização, o AAV que é usado nos métodos aqui descritos é qualquer AAV divulgado na Patente dos Estados Unidos No. 9.585.971, como AAV-PHP.B. O AAV que é usado nos métodos aqui descritos é um AAV divulgado em qualquer uma das seguintes patentes e pedidos de patente, cada um dos quais é incorporado aqui por referência na sua totalidade: Patentes dos Estados Unidos Nos. 7.906.111; 8.524.446; 8.999.678; 8.628.966; 8.927.514; 8.734.809; US 9.284.357; 9.409.953; 9.169.299; 9.193.956; 9458517; e 9.587.282 publicação de pedido de patente nos. 2015/0374803; 2015/0126588; 2017/0067908; 2013/0224836; 2016/0215024; 2017/0051257; e pedidos de patentes internacionais nos. PCT/US2015/034799; PCT/EP2015/053335.

[00105] Em certas formas de realização, um AAV de cadeia simples (ssAAV) pode ser usado *supra*. Um vetor auto-complementar, por exemplo, scAAV, pode ser usado (por exemplo, Wu, 2007, Human Gene Therapy, 18 (2): 171-82, McCarty et al, 2001, Gene Therapy, Vol. 8, Número 16, páginas 1248-1254; e patentes US 6.596.535; 7.125.717; e 7.456.683, cada uma das quais é aqui incorporada por referência na sua totalidade).

[00106] Em certas formas de realização, os vetores virais utilizados nos métodos aqui descritos são vetores virais baseados em adenovírus. Um vetor de adenovírus recombinante pode ser usado para transferir no IDS. O adenovírus recombinante pode ser um vetor de primeira geração, com uma deleção E1, com ou sem uma deleção E3, e com o cassete de expressão inserido em qualquer região excluída. O adenovírus recombinante pode ser um vetor de segunda geração, que contém deleções completas ou parciais das regiões E2 e E4. Um adenovírus dependente de auxiliar retém

apenas as repetições terminais invertidas do adenovírus e o sinal de empacotamento (ϕ). O transgene é inserido entre o sinal de empacotamento e o 3'ITR, com ou sem seqüências stuffer para manter o genoma artificial próximo ao tamanho do tipo selvagem de aprox. 36 kb. Um protocolo exemplar para produção de vetores adenovirais pode ser encontrado em Alba *et al.*, 2005, "Adenovírus intestinais: adenovírus de última geração para terapia genética", Gene Therapy 12: S18-S27, que é incorporado por referência aqui na sua totalidade.

[00107] Em certas formas de realização, os vetores virais utilizados nos métodos aqui descritos são vetores virais baseados em lentivírus. Um vetor de lentivírus recombinante pode ser usado para transferir no IDS. Quatro plasmídeos são usados para fazer a construção: seqüência Gag/pol contendo plasmídeo, seqüência Rev contendo plasmídeos, proteína Envelope contendo plasmídeo (isto é, VSV-G) e plasmídeo Cis com os elementos de envelope e o gene IDS.

[00108] Para a produção do vetor lentiviral, os quatro plasmídeos são co-transfectados em células (isto é, células baseadas em HEK293), em que a polietilenimina ou fosfato de cálcio pode ser usada como agentes de transfecção, entre outros. O lentivírus é então colhido no sobrenadante (os lentivírus precisam brotar das células para serem ativos, de modo que nenhuma colheita de células precisa/deve ser feita). O sobrenadante é filtrado (0,45 μ m) e depois adicionado cloreto de magnésio e benzonase. Outros processos a jusante podem variar bastante, com o uso de TFF e cromatografia em coluna sendo os mais compatíveis com GMP. Outros usam ultracentrifugação com/sem cromatografia em coluna. Protocolos exemplares para produção de

vetores lentivirais podem ser encontrados em Lesch *et al.*, 2011, "Produção e purificação do vetor lentiviral gerado em células de suspensão 293T com vetores baculovirais", Gene Therapy 18: 531-538 e Ausubel *et al.*, 2012, "Produção de vetores lentivirais de grau CGMP", Bioprocess Int. 10 (2): 32-43, os quais são incorporados por referência aqui na sua totalidade.

[00109] Em uma forma de realização específica, um vetor para uso nos métodos aqui descritos é aquele que codifica um IDS (por exemplo, HIDS), de modo que, mediante transdução de células no CNS, ou uma célula relevante (por exemplo, uma célula neuronal *in vivo* ou *in vitro*), uma variante glicosilada de IDS é expressa pela célula transduzida. Em uma forma de realização específica, um vetor para uso nos métodos aqui descritos é aquele que codifica um IDS (por exemplo, HIDS), de modo que, após a transdução de uma célula no CNS, ou uma célula relevante (por exemplo, uma célula neuronal *in vivo* ou *in vitro*), uma variante sulfatada do IDS é expressa pela célula.

5.2.3 Promotores e modificadores da expressão gênica

[00110] Em certas formas de realização, os vetores aqui fornecidos compreendem componentes que modulam a entrega ou expressão gênica (por exemplo, "elementos de controle de expressão"). Os vetores aqui fornecidos compreendem componentes que modulam a expressão gênica. E compreendem componentes que influenciam a ligação ou o direcionamento para as células. Em certas formas de realização, os vetores aqui fornecidos compreendem componentes que influenciam a localização do polinucleotídeo (por exemplo, o transgene) dentro da célula após a captação. Os vetores aqui fornecidos compreendem componentes que podem ser usados como marcadores detectáveis ou

selecionáveis, *por exemplo*, para detectar ou selecionar células que absorveram o polinucleotídeo.

[00111] Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos compreendem um ou mais promotores. O promotor é um promotor constitutivo. Em formas de realização alternativas, o promotor é um promotor induzível. O gene IDS nativo, como a maioria dos genes de limpeza, usa principalmente um promotor rico em GC. São utilizados promotores constitutivos fortes que proporcionam expressão sustentada de HIDS. Esses promotores incluem promotores sintéticos "CAG" que contêm: "C" - o elemento potencializador precoce do citomegalovírus (CMV); "A" - o promotor, bem como o primeiro exão e intrão do gene da beta-actina de frango; e "G" - o aceitador de emenda do gene da beta-globina de coelho (ver Miyazaki *et al.*, 1989, Gene 79: 269-277; e Niwa *et al.*, Gene 108: 193-199).

[00112] Em certas formas de realização, o promotor é um promotor CB7 (Dinculescu *et al.*, 2005, Hum Gene Ther 16: 649-663, incorporado por referência aqui na sua totalidade). O promotor CB7 inclui outros elementos de controle de expressão que melhoram a expressão do transgene acionado pelo vetor. Em certas formas de realização, os outros elementos de controle da expressão incluem β intrón de frango actina e/ou de β - sinal de polA globina de coelho. O promotor compreende uma caixa TATA e um ou mais elementos. Em certas formas de realização, os um ou mais elementos promotores podem ser invertidos ou movidos em relação um ao outro. Os elementos do promotor estão posicionados para funcionar cooperativamente e independentemente. Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos compreendem um ou mais promotores selecionados do grupo que

consiste no promotor genético precoce imediato do CMV humano, no promotor inicial SV40, na repetição terminal longa do vírus Rous sarcoma (RS) e no promotor de insulina de rato. Os vetores aqui fornecidos compreendem um ou mais promotores de repetição terminal longa (LTR) selecionados do grupo que consiste em AAV, MLV, MMTV, SV40, RSV, HIV-1 e HIV-2 LTRs. Os vetores aqui fornecidos compreendem um ou mais promotores específicos de tecido (*por exemplo*, um promotor específico de célula neuronal).

[00113] Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos compreendem um ou mais elementos reguladores que não sejam um promotor. Os vetores virais aqui fornecidos compreendem um intensificador e um repressor. Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos compreendem um íntron ou um íntron quimérico e uma sequência de poliadenilação.

5.2.4 Peptídeos de Sinal

[00114] Em certas formas de realização, os vetores aqui fornecidos compreendem componentes que modulam a entrega de proteínas. Os vetores virais aqui fornecidos compreendem um ou mais peptídeos de sinal e tais peptídeos de sinal permitem que o produto transgene (*por exemplo*, IDS) alcance o empacotamento adequado (*por exemplo*, glicosilação) na célula. Em certas formas de realização, os peptídeos de sinal permitem que o produto transgene (*por exemplo*, IDS) atinja a localização adequada na célula. Em certas formas de realização, os peptídeos de sinal permitem que o produto transgene (*por exemplo*, IDS) atinja a secreção da célula. Exemplos de peptídeos de sinal a serem utilizados em conexão com os vetores e transgenes aqui fornecidos podem ser encontrados na Tabela 1. Os peptídeos de sinal também

podem ser aqui referidos como sequências líderes ou peptídeos líderes.

Tabela 2. Peptídeos de sinal para uso com os vetores aqui fornecidos.

SEQ ID NO.	Peptídeo de sinal	Sequência
2	Glicoproteína oligodendrocítica de mielina-peptídeo de sinal (hOMG)	MEYQILKMSLCLEFILLFLTPGILC
3	Repressor celular dos peptídeos sinalizadores dos genes 2 estimulados por E1A (hCREG2)	MSVRRGRPARPGTRL SWLLCCSALLSP AAG
4	Conjunto V e domínio transmembranar contendo peptídeo sinal 2B (hVSTM2B)	MEQRNRLGALGYLPPLLLHALLLFVADA
5	Peptídeo sinal de protocaderina alfa-1 (hPCADHA1)	MVFSRRGGLGARDLLLWLLLLAAWEVGSG
6	Peptídeo sinal FAM19A1 (TAFA1)	MAMVSAMSWVLYLWISACA

SEQ ID NO.	Peptídeo de sinal	Sequência
7	Peptídeo sinal VEGF-A	MNFLLSWVHW SLALLLYLHH AKWSQA
8	Peptídeo sinal de fibulina-1	MERAAPSRRV PLPLLLLGGL ALLAAGVDA
9	Peptídeo sinal de vitronectina	MAPLRPLLIL ALLAWVALA
10	Peptídeo de sinal do fator H do complemento	MRLLAKEICLMLWAICVA
11	Peptídeo sinal Opticin	MRLLAFLSLL ALVLQETGT
12	Peptídeo sinal de albumina	MKWV t FI S LLFLF SS AYS
13	Peptídeo sinal de quimotripsinogênio	MAFLWLL S CWALLG T TFG
14	Peptídeo sinal de interleucina-2	MYRMQLLSCIALILALVTNS
15	Peptídeo sinal de tripsinogênio-2	MNLLLIL T FVAAAVA

5.2.5 Regiões não traduzidas

[00115] Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos compreendem uma ou mais regiões não traduzidas (UTRs), *por exemplo*, UTRs 3' e/ou 5'. As UTRs são otimizadas para o nível desejado de expressão de proteína. Em certas formas

de realização, as UTRs são otimizadas para a meia-vida do mRNA do transgene. As UTRs são otimizadas para a estabilidade do mRNA do transgene e são otimizadas para a estrutura secundária do mRNA do transgene.

5.2.6 Repetições terminais invertidas

[00116] Em certas formas de realização, os vetores virais aqui fornecidos compreendem uma ou mais sequências de repetição terminal invertida (ITR). As sequências de ITR podem ser usadas para empacotar a cassete de expressão gênica recombinante no virion do vetor viral. Em certas formas de realização, o ITR é de um AAV, *por exemplo*, AAV9 (*por exemplo*, Yan et al., 2005, J. Virol., 79 (1): 364-379; Patente dos EUA No. 7.282.199 B2, Estados Unidos Patente N ° 7.790.449 B2, Patente dos Estados Unidos N ° 8.318.480 B2, Patente dos Estados Unidos N ° 8.962.332 B2 e Pedido de Patente Internacional N ° PCT / EP2014 / 076466, cada um dos quais é incorporado aqui por referência na sua totalidade).

5.2.7 Transgenes

[00117] Em certas formas de realização, os vetores aqui fornecidos codificam um transgene IDS. O IDS é controlado por elementos de controle de expressão apropriados para expressão em células neuronais: o transgene IDS (*por exemplo*, hIDS) compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1. Em certas formas de realizações, o IDS (*por exemplo*, hIDS) transgene compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntico à sequência apresentada na SEQ ID NO :1.

[00118] As HuGlyIDS codificado pelo transgene pode incluir, mas não é limitado a humanos IDS (HIDs) possuindo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO.1 (como mostrado na FIG.1) e derivados de HIDS com substituições, deleções ou adições de aminoácidos, *por exemplo*, incluindo , mas não se limitando a substituições de aminoácidos selecionadas a partir de resíduos não conservados correspondentes em ortólogos de IDS mostrados na FIG.2, com a *condição de* que tais mutações não incluem a substituição do resíduo cisteína na posição 84 (C84), o qual é necessário para a atividade da enzima (Millat et al, 1997, Biochem J 326:. 243-247); ou uma mutação que foi identificada em fenótipos graves, intermediários graves, intermediários ou atenuados de MPS II , *por exemplo*, como mostrado na FIG.3, ou conforme relatado por Sukegawa-Hayasaka et al., 2006, J Inher Metab Dis 29: 755-761 (relatando os mutantes "atenuados" R48P, A85T, W337R e o mutante truncado Q531X; e os mutantes "graves" P86L, S333L , S349I, R468Q, R468L); Millat et al., 1998, BBA 1406: 214-218 (relatando mutantes "atenuados" P480L e P480Q; e mutante "grave" P86L); e Bonucelli et al., 2001, BBA 1537: 233-238, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade.

[00119] Por exemplo, as substituições de aminoácidos em uma posição específica de HIDS podem ser selecionadas dentre os resíduos de aminoácidos não conservados correspondentes encontrados nessa posição nos ortólogos do IDS alinhados na FIG.2, com a *condição de* que tais substituições não incluam nenhuma das mutações deletérias mostradas na FIG.3 ou como relatado por Sukegawa-Hayasaka et al., 2006, *supra* ; Millat et al., 1998, *supra* ; ou Bonucelli et al., 2001, *supra* , cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade.

O produto transgene resultante pode ser testado usando ensaios convencionais *in vitro*, em cultura de células ou animais de teste para garantir que a mutação não perturbe a função IDS. As substituições, deleções ou adições de aminoácidos preferidas selecionadas devem ser aquelas que mantêm ou aumentam a atividade enzimática, a estabilidade ou a meia-vida do IDS, como testado por ensaios convencionais *in vitro*, em cultura de células ou modelos animais para MPS II. Por exemplo, a atividade enzimática do produto transgene pode ser avaliada usando um ensaio enzimático convencional com, por exemplo, 2-sulfato de ácido 4-metilumbeliferil α -L-idopiranosidurônico como sulfato de 2-sulfato ou 4-metilumbeliferil sulfato como substrato (por exemplo, Lee et al. al., 2015, Clin. Biochem. 48 (18): 1350-1353, Dean et al., 2006, Clin. Chem. 52 (4): 643-649 para ensaios enzimáticos de IDS exemplares que podem ser usados, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade). A capacidade do produto transgene para corrigir o fenótipo MPS II pode ser avaliada em cultura de células; por exemplo, pela transdução de células MPS II em cultura com um vetor viral ou outra construção de expressão de DNA que codifica HIDS ou um derivado; adicionando o produto transgene ou um derivado às células MPS II em cultura; ou co-cultivando células MPS II com células hospedeiras neuronais/gliais humanas projetadas para expressar e secretar rhIDS ou um derivado e determinando a correção do defeito nas células cultivadas com MPS II, por exemplo, detectando a atividade da enzima IDS e/ou redução no armazenamento de GAG nas células MPS II em cultura (por exemplo, Stroncek et al., 1999, Transfusion 39 (4): 343-350, que é incorporado por referência aqui na sua totalidade).

5.2.8 Construções

[00120] Em certas formas de realzação, os vetores virais aqui fornecidos compreendem os seguintes elementos na seguinte ordem:

a) uma primeira sequência ITR, b) uma primeira sequência ligante, c) uma sequência promotora, d) uma segunda sequência ligante, e) uma sequência de íntron, f) uma terceira sequência de ligação, g) uma sequência que codifica o transgene (*por exemplo*, IDS), h) uma quarta sequência de ligação, i) uma sequência de poli A, j) uma quinta sequência de ligação, e k) uma segunda sequência ITR.

[00121] Em certas formas de realzação, os vetores virais aqui fornecidos compreendem os seguintes elementos na seguinte ordem:

a) uma sequência promotora e b) uma sequência que codifica o transgene (*por exemplo*, IDS). Em certas modalidades, os vetores virais aqui fornecidos compreendem os seguintes elementos na seguinte ordem: a) uma sequência promotora e b) uma sequência que codifica o transgene (*por exemplo*, IDS), em que o transgene compreende um peptídeo sinal.

[00122] Em certas formas de realzação, os vetores virais aqui fornecidos compreendem os seguintes elementos na seguinte ordem:

a) uma primeira sequência ITR, b) uma primeira sequência ligante, c) uma sequência promotora, d) uma segunda sequência ligante, e) uma sequência de íntron, f) uma terceira sequência de ligação, g) uma primeira sequência de UTR, h) uma sequência que codifica o transgene (*por exemplo*, IDS), i) uma segunda sequência de UTR, j) uma quarta sequência de ligação, k) uma poli A sequência, l) uma quinta sequência ligante e m) uma segunda sequência ITR.

[00123] Em certas formas de realzação, os vetores virais aqui fornecidos compreendem os seguintes elementos na seguinte ordem:

a) uma primeira sequência ITR, b) uma primeira sequência ligante, c) uma sequência promotora, d) uma segunda sequência ligante, e) uma sequência de íntron, f) uma terceira sequência de ligação, g) uma primeira sequência de UTR, h) uma sequência que codifica o transgene (*por exemplo*, IDS), i) uma segunda sequência de UTR, j) uma quarta sequência de ligação, k) uma poli A sequência, l) uma quinta sequência de ligação, e m) uma segunda sequência ITR, em que o transgene compreende um peptídeo sinal e em que o transgene codifica HIDS.

5.2.9 Fabricação e teste de vetores

[00124] Os vetores virais aqui fornecidos podem ser fabricados usando células hospedeiras. Os vetores virais aqui fornecidos podem ser fabricados usando células hospedeiras de mamíferos, *por exemplo*, A549, WEHI, 10T1/2, BHK, MDCK, COS1, COS7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, W138, HeLa, 293, Saos, C2C12, L, HT1080, HepG2, fibroblastos primários, hepatócitos e células de mioblastos. Os vetores virais aqui fornecidos podem ser fabricados usando células hospedeiras de humanos, macacos, camundongos, ratos, coelhos ou hamsters.

[00125] As células hospedeiras são transformadas de maneira estável com as sequências que codificam o transgene e os elementos associados (ou seja, o genoma do vetor) e os meios de produção de vírus nas células hospedeiras, *por exemplo*, os genes de replicação e capsídeo (*por exemplo*, o rep e genes cap do AAV). Para um método de produção de vetores AAV recombinantes com capsídeos AAV8, consulte a Seção IV da Descrição Detalhada da Patente US No. 7.282.199 B2, que é incorporada aqui por referência na sua totalidade. Os títulos de cópias do genoma dos referidos vetores podem ser determinados, *por exemplo*, por

análise TAQMAN®. Os virions podem ser recuperados, por exemplo, por CsCl₂ sedimentação.

[00126] Ensaios *in vitro*, por exemplo, ensaios de cultura de células, podem ser usados para medir a expressão do transgene a partir de um vetor aqui descrito, indicando, *por exemplo*, a potência do vetor. Por exemplo, as linhas de células HT-22, SK-N-MC, HCN-1A, HCN-2, NT2, SH-SY5y, hNSC11 ou ReNcell VM ou outras linhas de células derivadas de células ou progenitores neuronais ou gliais células neuronais ou gliais podem ser usadas para avaliar a expressão do transgene. Uma vez expressas, as características do produto expresso (isto é, HuGlyIDS) podem ser determinadas, incluindo a determinação dos padrões de glicosilação e sulfatação da tirosina associados ao HuGlyIDS.

5.2.10 Composições

[00127] As composições são descritas compreendendo um vetor que codifica um transgene aqui descrito e um veículo adequado. Um veículo adequado (*por exemplo*, para administração no LCR e, *por exemplo*, em células neuronais) seria facilmente selecionado por um especialista na técnica.

5.3 TERAPIA GÊNICA

[00128] Os métodos são descritos para a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma construção de transgene a indivíduos humanos com MPS II. Mais particularmente, são descritos métodos para administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma construção de transgene a pacientes com MPS II, em particular, para administração no LCR. Em formas de realzação particulares, esses métodos para administração ao LCR de uma quantidade terapêuticamente eficaz

de uma construção de transgene podem ser usados para tratar pacientes com síndrome de Hunter.

5.3.1 Populações alvo de pacientes

[00129] Em certas formas de realização, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes diagnosticados com MPS II. Em formas de realizações específicas, os pacientes foram diagnosticados com MPS II leve ou os pacientes foram diagnosticados com MPS II grave. Em formas de realizações específicas, os pacientes foram diagnosticados com a síndrome de Hunter.

[00130] Em certas formas de realização, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes diagnosticados com MPS II que foram identificados como responsivos ao tratamento com IDS, *por exemplo*, HIDS.

[00131] Em certas formas de realização, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes pediátricos. Como também doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes com menos de três anos de idade. Em certas formas de realização, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes com idade entre 2 e 4 anos. Em certas formas de realização, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes com 4 meses de idade ou mais e menos de 5 anos de idade. Em certas formas de realização específicas, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes que possuem MPS II grave e têm 4 meses de idade ou mais e menos de 5 anos de idade. Em certas formas de realização, doses terapêuticamente eficazes

do vetor recombinante são administradas a pacientes com 18 meses de idade ou mais e 8 anos de idade ou menos. Em uma forma de realização específica, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes que são pacientes pediátricos do sexo masculino e têm 18 meses ou mais e 8 anos ou menos. Em certas formas de realização, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes com idade entre 3 e 8 anos. Em certas formas de realização, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes com idades entre 8 e 16 anos. Em certas formas de realização, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes com 10 anos ou menos. Em uma forma de realização específica, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes que possuem MPS II grave e têm 10 anos ou menos. Em certas formas de realização, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes com mais de 10 anos de idade, como também, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes adolescentes. E também, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes adultos.

[00132] Em certas formas de realização, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas a pacientes diagnosticados com MPS II que foram identificados como responsivos ao tratamento com IDS, *por exemplo*, HIDS, injetados no LCR antes do tratamento com terapia genética.

5.3.2 Dosagem e Modo de Administração

[00133] Em certas formas de realização, doses terapêuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas ao LCR via

administração intratecal (*isto é, injeção no espaço subaracnóideo de modo que os vetores recombinantes se distribuam através do LCR e transduzam células no CNS*). Isso pode ser realizado de várias maneiras - *por exemplo, por injeção intracraniana (cisternal ou ventricular) ou injeção na cisterna lombar*. Em certas formas de realização, a administração intratecal é realizada via injeção intracisternal (IC) (*por exemplo, na cisterna magna*). Em formas de realização específicas, a injeção intracisternal é realizada por punção suboccipital guiada por TC. Em formas de realização específicas, a injeção intratecal é realizada por punção lombar. Em formas de realização específicas, a injeção no espaço subaracnóideo é realizada por punção C1-2, se possível para o paciente. As doses terapeuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas ao SNC via administração intranasal. Em certas formas de realização, doses terapeuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas ao SNC por injeção intraparenquimatosa. Em certas formas de realização, a injeção intraparenquimatosa é direcionada para o estriado. A injeção intraparenquimatosa é direcionada para a substância branca. Doses terapeuticamente eficazes do vetor recombinante são administradas ao LCR por qualquer meio conhecido na técnica, *por exemplo, por qualquer meio divulgado em Hocquemiller et al., 2016, Human Gene Therapy 27 (7): 478-496, que é aqui incorporado por referência na sua totalidade*.

[00134] Para administração intratecal, doses terapeuticamente eficazes do vetor recombinante devem ser administradas ao LCR em um volume de injeção, preferencialmente até cerca de 20 mL. Um veículo adequado para injeção intratecal, como a solução

Elliotts B, deve ser usado como veículo para os vetores recombinantes. A solução Elliotts B (nome genérico: cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, dextrose anidra, sulfato de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio e fosfato de sódio) é uma solução isotônica estéril, não pirogênica, que não contém conservantes bacteriostáticos e é usada como diluente para administração intratecal de quimioterapêutica.

[00135] Em uma forma de realzação, um vetor AAV9 recombinante não replicante que expressa a iduronato-2-sulfatase humana (IDS) é usado para o tratamento. Em certas formas de realzação, a cassete de expressão IDS é flanqueada por repetições terminais invertidas (ITRs) e a expressão é dirigida por um híbrido do intensificador de citomegalovírus (CMV) e do promotor de beta-actina de frango (CB7). Em certas formas de realzação, o transgene inclui o íntron beta-actina de frango e um sinal de poliadenilação de beta-globina de coelho (poliA).

[00136] O rAAV9.hIDS é administrado por CI (por injeção suboccipital) como uma dose única variando de $1,4 \times 10^{13}$ GC ($1,1 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral) a $7,0 \times 10^{13}$ GC ($5,6 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral) num volume de cerca de 5 a 20 ml. No caso de o paciente possuir anticorpos neutralizantes do AAV, podem ser utilizadas doses na faixa alta.

5.4 TERAPIAS COMBINADAS

[00137] As combinações de administração dos HuGlyIDS ao LCR acompanhadas pela administração de outros tratamentos disponíveis são abrangidas pelos métodos da invenção. Os tratamentos adicionais podem ser administrados antes, simultaneamente ou após o tratamento de terapia gênica. Os

tratamentos disponíveis para MPS II que poderiam ser combinados com a terapia gênica da invenção, mas não estão limitados a terapia de reposição enzimática (ERT), utilizando a idursulfase administrada sistemicamente ou no LCR; e/ou terapia de TCTH. Noutra forma de realização, a ERT pode ser administrada usando a glicoproteína rHuGlyIDS produzida em linhas celulares neuronais e gliais humanas por tecnologia de DNA recombinante. As linhas celulares neuronais e gliais humanas que podem ser usadas para essa produção de glicoproteína recombinante incluem, entre outras, HT-22, SK-N-MC, HCN-1A, HCN-2, NT2, SH-SY5y, hNSC11 ou ReNcell VM para nomear alguns. Para garantir glicosilação completa, especialmente sialilação e sulfatação de tirosina, a linha celular utilizada para produção pode ser aprimorada através da engenharia das células hospedeiras para co-expressar a-2,6-sialiltransferase (ou ambas a-2,3- e α - 2,6-sialiltransferases) e/ou enzimas TPST-1 e TPST-2 responsáveis pela tirosina-O-sulfatação.

5.5 BIOMARCADORES/AMOSTRAGEM/EFICÁCIA DE MONITORAMENTO

[00138] A eficácia pode ser monitorada medindo a função cognitiva (*por exemplo*, prevenção ou diminuição do declínio neurocognitivo); reduções nos biomarcadores da doença (como GAG) no LCR e/ou soro; e/ou aumento da atividade da enzima IDS no LCR e/ou soro. Sinais de inflamação e outros eventos de segurança também podem ser monitorados.

5.5.1 Marcadores de Doenças

[00139] Em certas formas de realização, a eficácia do tratamento com o vetor recombinante é monitorada medindo o nível de um biomarcador de doença no paciente. O nível do biomarcador

da doença é medido no LCR do paciente e o nível do biomarcador da doença é medido no soro do paciente. Em certas formas de realização, o nível do biomarcador da doença é medido na urina do paciente. Em certas formas de realização, o biomarcador da doença é GAG. Em certas formas de realização, o biomarcador da doença é a atividade da enzima IDS. Em certas formas de realização, o biomarcador da doença é a inflamação e o biomarcador de doença é um evento de segurança.

5.5.2 Testes para a função neurocognitiva

[00140] Em certas formas de realização, a eficácia do tratamento com o vetor recombinante é monitorada medindo o nível da função cognitiva no paciente. A função cognitiva pode ser medida por qualquer método conhecido por um especialista na técnica. Em certas formas de realização, a função cognitiva é medida através de um instrumento validado para medir o quociente de inteligência (QI). Em formas de realização específicas, o QI é medido pela Escala de Inteligência Abreviada de Wechsler, Segunda Edição (WASI-II). Em certas formas de realização, a função cognitiva é medida através de um instrumento validado para medir a memória. A memória é medida pelo Hopkins Verbal Learning Test (HVLT). Em certas formas de realização, a função cognitiva é medida através de um instrumento validado para medir a atenção. A atenção é medida pelo Teste de Variáveis de Atenção (TOVA). Em certas formas de realização, a função cognitiva é medida por meio de um instrumento validado para medir um ou mais de QI, memória e atenção.

5.5.3 Mudanças físicas

[00141] Em certas formas de realização, a eficácia do tratamento com o vetor recombinante é monitorada medindo características físicas associadas à deficiência de armazenamento lisossômico no paciente. As características físicas são lesões de armazenamento e a característica física é baixa estatura. Em certas formas de realização, a característica física são características faciais grosseiras. Como também a apneia obstrutiva do sono. Em certas formas de realização, a característica física é a deficiência auditiva como também, a deficiência visual. Em formas de realização específicas, a deficiência visual é devida à turvação da córnea. Em certas formas de realização, a característica física é hidrocefalia. Em certas formas de realização, a característica física é a compressão da medula espinhal. Em certas formas de realização, a característica física é hepatoesplenomegalia. Em certas formas de realização, as características físicas são deformidades ósseas e articulares. Em certas formas de realização, a característica física é a doença da válvula cardíaca. Em certas formas de realização, as características físicas são infecções respiratórias superiores recorrentes. Em certas formas de realização, a característica física é a síndrome do túnel do carpo. E outra característica física é macroglossia (língua aumentada). Como também, cordas vocais aumentadas e/ou alteração na voz. Tais características físicas podem ser medidas por qualquer método conhecido por um especialista na técnica.

TABELA DE SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
1	Sequência de aminoácidos do IDS humano	MPPPRTGRGL LWLGLVLSSV CVALGSETQA NSTTDALNVL LIIVDDL RPS LGCYGDKLVR SPNIDQLASH SLLFQNAFAQ QAVCAPSRVS FLTGRRPD TT RLYDFNSYWR VHAGNFSTIP QYFKENGYVT MSVGKVFH PG ISSNHTDDSP YSWSFPPYHP SSEKYENTKT CRGPDGELHA NLLCPVDVLD VPEGTL PDKQ STEQA IQLLE KMKTSASPFF LAVGYHKPHI PFRYPKEFQK LYPLENITLA PDPEVPDGLP PVAYNPWMDI RQREDVQALN ISVPYGPIPV DFQRKIRQSY FASVSYLDTQ VGRLLSALDD LQLANSTIIA FTSDHGWALG EHGEWAKYSN FDVATHVPLI FYVPGRTASL PEAGEKLF PY LDPFDSASQL MEPGRQSMDL VELVSLFPTL AGLAGLQVPP RCPVPSFHVE LCREGKNLLK HFRFRDLEED PYLPGNPREL IAYSQYPRPS DIPQWNSDKP SLKDIKIMGY SIRTIDYRYT VWVGFN PDEF LANFSDIHAG ELYFVDS DPL QDHNMYNDSQ GGDLFQLLMP
2	Peptídeo sinal da glicoproteína da mielina-oligodendrócito (hOMG)	MEYQILKMSL CLFILLFLTP GILC
3	Repressor celular de peptídeo sinal de genes 2 estimulados por ElA	MSVRRGRRPA RPGTRLSWLL CCSALLSPAA G

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
	(hCREG2)	
4	Conjunto V e domínio transmembranar contendo peptídeo sinal 2B (hVSTM2B)	MEQRNRLGAL GYLPPLLLHA LLLFVADA
5	Peptídeo sinal de protocaderina alfa-1 (hPCADHA1)	MVFSRRGGLG ARDLLLWLLL LAWEVGSG
6	Peptídeo sinal FAM19A1 (TAFA1)	MAMVSAMSWV LYLWISACA
7	Peptídeo sinal VEGF-A	MNFLLSWVHW SLALLLYLHH AKWSQA
8	Peptídeo sinal de fibulina-1	MERAAPSRRV PLPLLLLGGL ALLAAGVDA
9	Peptídeo sinal de vitronectina	MAPLRPLLIL ALLAWVALA
10	Peptídeo de	MRLLAKEIICL MLWAICVA

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
	sinal do fator H do complemento	
11	Peptídeo sinal Opticin	MRLLAFLSLL ALVLQETGT
12	Peptídeo sinal de albumina	MKWVTFISLL FLFSSAYS
13	Peptídeo sinal de quimiotripsi nogênio	MAFLWLLSCW ALLGTTFG
14	Peptídeo sinal de interleucina -2	MYRMQLLS CI ALILALVTNS
15	Peptídeo sinal de tripsinogêni o-2	MNLLLILTFV AAVA
16	AAV1	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP GYKYLGPFGNLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHA DAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKR PVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDPQPLGEPP ATPAAVGPTTMASSGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVI

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
		TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRF HCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANN LTSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG SQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVPFHSSYAHSQSLD RLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQPKNWLP GPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHK DDEDKFFPMSGVMI FGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATER FGTAVVNFQSSSTD PATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPWIWAKIPH TDGHFHPSPLMGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFIT QYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGL YTEPRPIGTRYLTRPL
17	AAV2	MAADGYLPDWLEDTLSEGI RQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLD SGDNPYLKYNHA DAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVK TAPGKKR PVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPP AAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVI TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFH CHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL TSTVQVF TDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGS QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDR LMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSR LQFSQAGASDIRDQSRNWLPG PCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKD DEEKFFPQSGVLI FGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEI RTTNPVATEQY GSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLP GMVWQDRDVYLQGPWIWAKI PHT DGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTF SAAKFASFITQ

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
		YSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVY SEPRPIGTRYLTRNL
18	AAV3-3	MAADGYLPDWLEDNLSEGI REWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLP GYKYLPGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHA DAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKG AVDQSPQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPP AAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD RVI TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFH CHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFNIQVRGVTQNDGTTTIANNL TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGS QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDR LMNPLIDQYLYYLNRTQGTTSGTTNQSRLLFSQAGPQSMSLQARNWLP GPCYRQQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSL VNPGPAMASHK DDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEEI RTTNPVATEQ YGTVANNNLQSSNTAPTGTGNHQQALPGMVWQDRDVYLQGP I WAKIPH TDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFIT QYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGV YSEPRPIGTRYLTRNL
19	AAV4-4	MTDGYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLP YKYLPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHAD AEFQQRLQGDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRP LIESPQQPDSSSTGIGKKGKQPAKKKLVFEDETGAGDGPPEGSTSGAMS DDSEMRAAAGGAAVEGGQGADGVGNASGDWHCDSTWSEGHVTTTSTRT WVLPTYNNHLYKRLGESLQSN TYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ RLINNNWGM RPKAMRVKIFNIQVKEVTTSNGETT VANNNLTSTVQIFAD

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
		SSYELPYVMDAGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGLVTGNTSQQQTDRN AFYCLEYFPSQMLRTGNNFEITYSFEKVPFHSMYAHSQSLDRLMNPLI DQYLWGLQSTTTGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFSNFKKNWLPGPSIKQ QGFSKTANQNYKIPATGSDSLIKYETHSTLDGRWSALTPGPPMATAGP ADSKFSNSQLIFAGPKQNGNTATVPGTLIFTSEEELAATNATDMDMWG NLPGGDQSNSNLPTVDRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQGPIWAKIPHTD GHFHPSPILIGGFGLKHPPQIFIKNTPVPANPATTFSSTPVNSFITQY STGQVSVQIDWEIQKERSKRWNPEVQFTSNYGQQNSLLWAPDAAGKYT EPRAIGTRYLTHHL
20	AAV5	MSFVDHPPDWLEEVGEGLEFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLP YNYLGPGNGLDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNFYLYKNHAD AEFQEKLADDTSGGNLKGAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRI DDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQQLQIPAQPASSLGADT MSAGGGGGLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP SYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWSPRDWQ RLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLSTVQVFTD DDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERS FFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVD QYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSG VNRASVSATATNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALNTMI FNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSS TTAPATGTYNLQEIIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHPSAM GGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEME WELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTRPIGTRYL TRPL

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
21	AAV6	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP GYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHA DAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKR PVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEP ATPAAVGPTTMAAGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVI TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNR HCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANN LTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG SQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLD RLMNPLIDQYLYLNRQTQNSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQPKNWLP GPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHK DDKDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATER FGTVAVNLQSSSTD PATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGP IWAKI PH TDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFIT QYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNG YTEPRPIGTRYLTRPL
22	AAV7	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDN GRGLVLP GYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHA DAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPAKKR PVEPSPQRS PDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEP PAAPSSVSGTVAAGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRV ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSETAGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNR FHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLRFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIAN NLTSTIQVFSDEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNN GSQSVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYSFEDVPFHSSYAHSQSL DRLMNPLIDQYLYLARTQSNPGGTAGNRELQFYQGGPSTMAEQAKNW

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
		LPGPCFRQQRVSKTLDQNNNSNFAWTGATKYHLNGRNSLVNPGVAMAT HKDDEDRFFPSSGVLI FGKTGATNKTTLENVMTNEEEIRPTNPVATE EYGIVSSNLQAANTAAQTQVVNNQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIP HTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPPEVFTPAKFASFI TQYSTGQVSVEIEWELQENSKRWNPEIQYTSNFEKQTGVDFAVDSQG VYSEPRPIGTRYLTRNL
23	AAV8	MAADGYLPDWLEDNLSEGI REWWALKPGAPKPKANQQKDDGRGLVLP GYKYLGPFGNLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHA DAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKR PVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEP PAAPSGVGPNMTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYFDFN RFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIA NNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTNL NGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQS LDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNW LPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMAT HKDDEERFFPSNGILIFGKQNAARDNADYSDVMLTSEEEIKTTNPVAT EEYGIVADNLQQNTAPQIGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKI PHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPADPPTTFNQSKLNSF ITQYSTGQVSVEIEWELQENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTE GYSEPRPIGTRYLTRNL
24	hu31	MAADGYLPDWLEDTLSEGI RQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP GYKYLGPFGNLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHA DAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKR

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
		PVEQSPQEPDSSAGIGKSGSQPAKKKLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPP AAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVI TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNR FHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIAN NLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLND GGQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSL DRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHK EGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATES YGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPH TDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFIT QYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVSTEGV YSEPRPIGTRYLTRNL
25	hu32	MAADGYLPDWLEDTLSEGI RQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP GYKYLPGPNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHA DAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKR PVEQSPQEPDSSAGIGKSGSQPAKKKLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPP AAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVI TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNR FHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIAN NLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLND GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSL DRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHK EGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATES YGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPH

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
		TDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQILIKNTVPVADPPTAFNKDKLNSFIT QYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV YSEPRPIGTRYLTRNL
26	AAV9	MAADGYLPDWLEDNLSEGI REWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLP GYKYLPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHA DAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKR PVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPP AAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVI TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNR FHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIAN NLTSTVQVFTDSQYLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLND GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSSQL DRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHK EGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATES YGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPH TDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQILIKNTVPVADPPTAFNKDKLNSFIT QYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV YSEPRPIGTRYLTRNL
27	SP P22304 ID S_HUMANO [<i>Homo sapiens</i>]	MPPPRRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDL R PSLGCYGDKLVRS PNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRR PDTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSN HTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRPGD GELHANLLCPVDVLDVP EGTLDPDKQSTEQA IQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP I

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
		PVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPF DSASQLMEPGRQSM DLVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFLANFSDIHAGELYFVDS PLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP
28	TR K6ZGI9_PA NTR [Pan <i>troglodytes</i> (Chimpanzee)]	MPPPRTGRGLPWLGVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIIVDDL PSLG CYGDKLVRSNIDQLASHLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGR PDPTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSN HTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVP EGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP PVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPF DSASQLMEPGRQSM DLVSLFPTLAGLAGLQAPPRCPVPSFHVELC REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWIGFNPDEFLANFSDIHAGELYFVDS PLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP
29	TR K7BKV4_PA NTR [Pan <i>troglodytes</i> (Chimpanzee)]	MPPPRTGRGLPWLGVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIIVDDL PSLG CYGDKLVRSNIDQLASHLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGR PDPTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSN HTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVP EGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP PVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPF DSASQLMEPGRQSM DLVSLFPTLAGLAGLQAPPRCPVPSFHVELC

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
		REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWIGFNPDEFLANFSDIHAGELYFVDS PLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP
30	TR H9FTX2_MA CMU [<i>Macaca mulatta</i> (<i>Macaco Rhesus</i>)]	MPTPGSGRGFLWLGLVLSSVCVALGCETQANSTTDALNILLIIVDDL PSLGCYGDKLVRSNPIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGR PDTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGITSN HTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVVDV EGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDSEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP PVEFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIVAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPF DSASELMEPGRQSMDELVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADFPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFLANFSDIHAGELYFVDS PLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP
31	TRF7EJG2_CAL JA [<i>Callithrix jacchus</i> (<i>Sagui de topete branco</i>)]	MPPPRTSRCLLLLGLVLGSVCVTLGSQAQASSTTDALNVLLIIVDDL PSLGCYGDKLVRSNPIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGR PDTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKDNGYVTMSVGKVFHPGISSN HSDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVVDV EGTLPDKQSTEEAIRLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP PVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGHLLSALDDLQLANSTIVAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATRVPLMFYVPGRTASLPEADEKLFYVDPF HSASELMEPGRQSMDELVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKSLLKHFRFHGLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADFPQWNSDKP SLKYIKIMGYSIRTVDYRYTVWVGFPNDEFLANFSDIHAGELYFVDS PLQDHNMYNDSQGGELFQSLMP

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
32	TR U3DTL8_CA LJA [Callithrix jacchus (Sagui de topete branco)]	MPPPRPSRCLLLLGLVLGSVCVTLGSQAQASSTTDALNLLIIVDDLRL PSLGCGYDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRL PDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKDNGYVTMSVGKVFHFGISSN HSDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVVDVPL EGTLPDKQSTEEAIRLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPIL PVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGHLLSALDDLQLANSTIVAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATRVPLMFYVPGRTASLPEADEKLFYPYVDPFL HSASELMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKSLLKHFRFHGLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADFPQWNSDKP SLKYIKIMGYSIRTVDYRYTVWVGFPNDEFANFSDIHAGELYFVDSDL PLQDHNMYNDSQGGELFQSLMP
33	TR G7NRX7_MA CMU [Macaca mulatta (macaco Rhesus)]	MPTPGSGRGFLWLGLVLSSVCVALGCETQANSTTDALNILLIIVDDLRL PSLGCGYDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRL PDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHFGITSN HTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVVDVPL EGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDSEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPIL PVEFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIVAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPL DSASELMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADFPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFANFSDIHAGELYFVDSDL PLQDHNMYNDSQGGDLLQLLMP
34	TR G7Q1V9_MA CFA [Macaca fascicularis]	MPTPGSGRGFLWLGLVLSSVCVALGCETQANSTTDALNILLIIVDDLRL PSLGCGYDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRL PDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHFGITSN

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
	(macaco que come carangueijo; macaco cinomólogo)]	HTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVVDVP EGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDSEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP PVEFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGHLLSALDDLQLANSTIVAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPF DSASELMEPGRQSM DLVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADFPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFLANFSDIHAGELYFVDS PLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP
35	TR H2PX10_PO NAB [Pongo abelii (Orangotango de Sumatra)]	MPPPRTGRLWLGLVLSSVCVALGSETQADSTTDGLNVLLIIVDDL PSLGCYGD KLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGR PDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSN HTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLI AKKMCWMFP RAPCCDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP PVDFQQKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSTLDDLQLANSTIIAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPF DSASELMEPGRQSM DLVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADIPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFLANFSDIHAGELYFVDS PLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP
36	TR A0A0D9R4D 1_CHLSB [Chlorocebus sabaeus (macaco verde)]	MPTPGSGRGFLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNILLIIVDDL PSLGCYGD KLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGR PDTRLHNFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGITSN HTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVVDVP EGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDSEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
		PVEFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIVAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPF DSASELMEPGRQSM DLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADFPQWNSDKP NLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPDEF LANFSDIHAGELYFVDS PLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP
37	TR G1RST8 G1 RST8_NOMLE [Nomascus leucogenys (Gibão do norte de bochechas brancas)]	MSPPRTGQGLLWLGVLSSVCVAXVTSKPSPSFVDALNVLLIIVDDL PSLG CYGDKLVRS PNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGR PDTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSN HTDDSPYSWSFPPYHPSSXXXXXXKTCRGP DGELHANLLCPVDVLDVP EGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPI PVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPF DSASELMEPGRQSM DLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADIPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFSDEF LANFSDIHAGELYFVDS PLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP
38	UPI0000D9F62 5 [Macaca mulatta (Macaco Rhesus)]	MPTPGSGRGFLWLGLVLSSVCVALGCETQANSTTDALNILLIIVDDL PSLG CYGDKLVRS PNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGR PDTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGITSN HTDDSPYSWSFPPYHPSSSEKYENTKTCRGP DGELHANLLCPVDVVDVP EGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDSEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPI PVEFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGHLLSALDDLQLANSTIVAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPF DSASELMEPGRQSM DLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
		REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADFPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFLANFSDIHAGELYFVDS PLQDHNMYNDSQGGDLLQLLMP
39	UPI000274358 B [Pan paniscus (Pigmeu chimpanze; Bonobo)]	MPPPRRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDL PSLGCGYDKLVRSNPIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGR PDTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSN HTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVP EGTLPDKQSTEQAIRLLEKMKTSASPFLLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP PVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPF DSASQLMEPGRQSMDELVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFLANFSDIHAGELYFVDS PLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP
40	UPI00027F6FC 5 [Papio Anubis (Babuino verde oliva)]	MPTPGSGRGFLWLGLVLSSVCVALGCEMQANSTTDALNILLIIVDDL PSLGCGYDKLVRSNPIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGR PDTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGITSN HTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVVDVP EGTLPDKQSTEQAIIQLLEKMKTSASPFLLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDSEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP PVEFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIVAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPF DSASELMEPGRQSMDELVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADFPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFLANFSDIHAGELYFVDS PLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
41	UPI00027FAE0 3 [Saimiri boliviensis (Macaco esquilo boliviano)]	MPPPRGTGLCLLLLGLVLGSVCVTLGSQAQANSTTDALNVLIIIVDDLRL PSLGCGYDKLVRSFNIDQLASHSLLFQNAFVQQAVCAPSRVSFLTGRRL PDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKDNGYVTMSVGKVFHFGISSN HSDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDPGELHANLLCPVDVVDVPL EGTLPDKQSTEEAIRLLKKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPIL PVDFQKIRQSYFASVSYLDTQVGHLLSALDDLHLANSTIVAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATRVPLMFYVPGRTASLPETGEKLFYVDPFL HSASELMEPGRQSTDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHIELC REGKNLLKHFRFHGLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADFPQQNSDKP SLKYIKIMGYSIRTVDYRYTVWVGFPNDEFANFSDIHAGELYFVDSDL PLQDHNMYNDSQGGELFQSLMP
42	UPI0003ABBF2 8 [Macaca fascicularis (Macaco caranguejo e macaco cinomólogo)]	MPTPGSGRGFLWLGLVLSSVCVALGCETQANSTTDALNILLIIIVDDLRL PSLGCGYDKLVRSFNIDQLASHSLLFQNAFAQEAVCAPSRVSFLTGRRL PDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHFGITSLN HTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDPGELHANLLCPVDVVDVPL EGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDSEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPIL PVEFQKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIVAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPLF DSASELMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADFPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFANFSDIHAGELYFVDSDL PLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP
43	UPI000533297 F [Rhinopithec	MPTPASGRGFLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNILLIIIVDDLRL PSLGCGYDKLVRSFNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRL PDTRRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHFGITSLN

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência
	us roxellana (Macao de nariz dourado; Pygathrix roxellana)]	HTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVVDVP EGTLPDKQSTEQAVQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDSEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP PVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGHLLSALDDLQLANSTIVAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPF DSASELMEPGRQSM DLVLSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADFPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFLANFSDIHAGELYFVDS PFQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP
44	UPI0005F40BD 2 [Colobus angolensis palliates (Colobus Angolano de Peter)]	MPTPASGRGFLWLGLVLRVCVALGSETQANSTTDALNILLIIVDDL PSLGCGYDKLVRSPNIDQLASHLLFQNAFAQQAVCTPSHVSFLTGR PDTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGITSN HTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVVDVP EGTLPDKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK LYPLENITLAPDSEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP PVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGHLLSALDDLQLANSTIVAFTSDHG WALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLMFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPF DSASELMEPGRQSM DLVLSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELC REGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPADFPQWNSDKP SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPNDEFLANFSDIHAGELYFVDS PLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP

6. EXEMPLOS

6.1 EXEMPLO 1: hIDS cDNA

[00142] Um vetor à base de cDNA de hIDS é construído compreendendo um transgene com hIDS (SEQ ID NO:1). O transgene também compreende ácidos nucleicos compreendendo um peptídeo

sinal escolhido no grupo listado na Tabela 2. Opcionalmente, o vetor compreende adicionalmente um promotor.

6.2 EXEMPLO 2: cDNAs hIDS substituídos

[00143] Um vetor à base de cDNA hIDS é construído compreendendo um transgene que compreende hIDS com substituições, deleções ou adições de aminoácidos em comparação com a sequência de hIDS da SEQ ID NO:1, por exemplo, incluindo, sem limitação, as substituições de aminoácidos selecionadas dentre as correspondentes resíduos não conservados em ortólogos de IDS mostrados na FIG.2, com a condição de que tais mutações não incluam a substituição do resíduo de cisteína na posição 84 (C84), necessária para a atividade enzimática (Millat *et al.*, 1997, *Biochem J* 326: 243-247); ou uma mutação que foi identificada em fenótipos graves, intermediários graves, intermediários ou atenuados de MPS II, por exemplo, como mostrado na FIG. 3, ou conforme relatado por Sukegawa-Hayasaka *et al.*, 2006, *J Inher Metab Dis* 29: 755-761 (relatando os mutantes "atenuados" R48P, A85T, W337R e o mutante truncado Q531X; e os mutantes "graves" P86L, S333L, S349I, R468Q, R468L); Millat *et al.*, 1998, *BBA* 1406: 214-218 (relatando mutantes "atenuados" P480L e P480Q; e mutante "grave" P86L); e Bonucelli *et al.*, 2001, *BBA* 1537: 233-238, cada um dos quais é incorporado por referência aqui na sua totalidade. O transgene também compreende ácidos nucleicos compreendendo um peptídeo sinal escolhido a partir do grupo listado na Tabela 2. Opcionalmente, o vetor compreende adicionalmente um promotor.

6.3 EXEMPLO 3: Tratamento de MPS II em modelos animais com hIDS ou hIDS substituídos

[00144] Um vetor baseado em cDNA de hIDS é considerado útil para o tratamento de MPS II quando expresso como um transgene. Um modelo animal para MPS II, por exemplo, um modelo de camundongo descrito em Garcia *et al.*, 2007, J Inherit Metab Dis 30: 924-34 ou Muenzer *et al.*, 2001, Acta Paediatr Suppl 91: 98-99 é administrado como recombinante vetor que codifica HIDS intratecalmente a uma dose suficiente para administrar e manter uma concentração terapeuticamente eficaz do produto transgene no LCR do animal. Após o tratamento, o animal é avaliado quanto à melhoria dos sintomas consistentes com a doença no modelo animal específico.

6.1 EXEMPLO 4: Tratamento de MPS II com hIDS ou hIDS substituídos

[00145] Um vetor baseado em cDNA de hIDS é considerado útil para o tratamento de MPS II quando expresso como um transgene. Um sujeito que se apresenta com MPS II é administrado a um vetor baseado em cDNA que codifica HIDS (por exemplo, Construção 1 (veja abaixo) por via intratecal a uma dose suficiente para administrar e manter uma concentração terapêutica do produto transgene no LCR. o sujeito é avaliado quanto à melhora nos sintomas da MPS II.

6.2 EXEMPLO 5: Um estudo aberto, multicêntrico de fase I/II para avaliar a segurança, tolerabilidade e farmacodinâmica da construção 1 em indivíduos pediátricos com MPS II (síndrome de Hunter)

6.2.1 SINOPSE

[00146] PRODUTO INVESTIGACIONAL, DOSE E ROTA DE ADMINISTRAÇÃO

[00147] Construção 1: AAV9.CB7.hIDS (capsídeo recombinante do sorotipo 9 do vírus adeno associado ao vírus contendo cassete de expressão de iduronato humano-2-sulfatase humana). Veja o parágrafo [0019] e a Figura 5.

[00148] O produto será entregue como uma dose intracisternal (IC) única.

[00149] Dois níveis de dose serão avaliados: $1,3 \times 10^{10}$ cópias do genoma (GC)/g de massa cerebral (Dose 1) e $6,5 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral (Dose 2). A dose total administrada será responsável pelo tamanho estimado do cérebro dos sujeitos do estudo com base na idade. O volume total do produto administrado não excederá 5 mL.

[00150] OBJETIVOS

[00151] Objetivo principal:

- Avaliar a segurança e a tolerabilidade da Construção 1 a 24 semanas após uma dose única de CI administrada a pacientes pediátricos com MPS II grave

[00152] Objetivos secundários:

- Para avaliar a segurança e tolerabilidade a longo prazo da Construção 1
- Avaliar o efeito da Construção 1 sobre biomarcadores no líquido cefalorraquidiano (LCR), plasma e urina
- Avaliar o efeito da Construção 1 nos parâmetros do desenvolvimento neurológico da função cognitiva, comportamental e adaptativa
- Avaliar o derramamento de vetores no LCR, plasma e urina

[00153] Objetivos exploratórios:

- Para avaliar a imunogenicidade da Construção 1
- Para explorar o efeito da Construção 1 em alterações físicas no CNS
- Explorar o efeito da Construção 1 nas manifestações sistêmicas da doença
- Para explorar o efeito da Construção 1 na capacidade auditiva
- Explorar o efeito da Construção 1 em biomarcadores no plasma e na urina em indivíduos que descontinuem temporariamente o IV ERT (ELAPRASE®)
- Explorar o efeito da Construção 1 na qualidade de vida (QV) e medidas de sono.

[00154] METODOLOGIA DO ESTUDO

[00155] Este é um estudo de escalonamento de dose de braço único, fase I/II, primeiro em humano, multicêntrico, de rótulo aberto e com um braço, da Construção 1. Nenhum grupo de controle está incluído. Aproximadamente 6 indivíduos pediátricos com MPS II grave podem ser incluídos em dois estudos de corte de dose, $1,3 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral (Dose 1) ou $6,5 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral (Dose 2) e receberão uma dose única da Construção 1 administrado por injeção de IC. A segurança será o foco principal das primeiras 24 semanas após o tratamento (período do estudo primário). Após a conclusão do período primário do estudo, os sujeitos continuarão sendo avaliados (segurança e eficácia) por até um total de 104 semanas após o tratamento com a

Construção 1. No final do estudo, os sujeitos serão convidados a participar de um estudo de longa duração de acompanhamento.

[00156] Os três primeiros sujeitos elegíveis serão inscritos no estudo de corte Dose 1 ($1,3 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral). Após a administração da Construção 1 para o primeiro sujeito, haverá um período de observação de 8 semanas para segurança. O Comitê de Segurança Interna (ISC) analisará os dados de segurança obtidos durante as primeiras 8 semanas (incluindo os dados obtidos durante a visita da Semana 8) para esse assunto e, se não houver preocupações com a segurança, o segundo sujeito poderá ser inscrito. O mesmo processo será usado para inscrever o terceiro sujeito. Se nenhum evento do gatilho de revisão de segurança (SRT) for observado, todos os dados de segurança disponíveis para o estudo de corte Dose 1, obtidos até a visita da Semana 8 para o terceiro sujeito, serão avaliados pelo Comitê Independente de Monitoramento de Dados (IDMC). Se a decisão for avançar para a segunda dose ($6,5 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral), os 2 sujeitos subsequentes seguirão o mesmo esquema de dosagem do estudo de corte de dose inicial com a administração de cada sujeito subsequente após todos os dados de segurança obtidos durante o foram revisadas as primeiras 8 semanas (incluindo dados obtidos durante a visita da Semana 8) para o último sujeito administrado. O ISC revisará todos os dados de segurança do sujeito obtidos até a visita da 2ª semana da Semana 2 e inclusive poderá determinar que é seguro prosseguir com a administração do terceiro sujeito imediatamente após esta avaliação. Todos os dados de segurança disponíveis para o estudo de corte da Dose 2 serão avaliados pelo IDMC após a visita da Semana 8 para o terceiro sujeito no estudo de corte da Dose 2.

[00157] Os indivíduos em potencial serão rastreados até 35 dias antes da dosagem para determinar a elegibilidade para o estudo. Os indivíduos que atenderem aos critérios de elegibilidade serão admitidos no hospital entre o dia 2 e a manhã do dia 1 (de acordo com a prática institucional), e as avaliações da linha de base serão realizadas pré-dose. Os indivíduos receberão uma dose única de CI da Construção 1 no Dia 1 e permanecerão no hospital por aproximadamente 30-36 horas após a administração para observação. As avaliações subsequentes no período primário do estudo (ou seja, até a Semana 24) serão realizadas semanalmente até a Semana 4 e nas Semanas 8, 12, 16, 20 e 24. Após o período primário do estudo, as visitas serão realizadas nas Semanas 28, 32, 40, 48, 52, 56, 64, 78 e 104. As visitas da semana 12, 40 e 64 podem ser realizadas por uma enfermeira de saúde em casa. As avaliações da semana 20 e 28 serão limitadas à avaliação de EAs e terapias concomitantes por contato telefônico.

[00158] Todos os indivíduos receberão inicialmente supressão imune (IS) no estudo com base em descobertas de potencial imunogenicidade no estudo de segurança/toxicologia não clínico realizado em animais e incluirão corticosteróides (metilprednisolona 10 mg/kg por via intravenosa [IV] uma vez no dia 1 predose e prednisona oral a partir de 0,5 mg/kg/dia no dia 2, com redução gradual e interrupção até a semana 12), tacrolimus (1 mg duas vezes ao dia [BID] por via oral) [boca] dia 2 a semana 24 com nível sanguíneo alvo de 4 -8 ng/mL e redução gradual durante 8 semanas entre as semanas 24 e 32) e sirolimus (uma dose de carga de 1 mg/m² a cada 4 horas x 3 doses no dia 2 e depois no dia 1: sirolimus 0,5 mg/m²/dia dividido em dosagem BID

com nível sanguíneo alvo de 4-8 ng/ml até a Semana 48. As avaliações neurológicas e o monitoramento do nível sanguíneo de tacrolimus/sirolimus serão realizados conforme Tabela 3. As doses de sirolimus e tacrolimus serão ajustadas para manter os níveis sanguíneos no intervalo alvo.

[00159] Nenhuma terapia de EI é planejada após a Semana 48. Se o EI for necessário após a Semana 48 para controlar uma resposta imune clinicamente relevante, o regime imunossupressor apropriado será determinado pelo investigador principal (PI), em discussão com o Monitor Médico e Patrocinador, conforme indicado clinicamente.

[00160] As avaliações de eficácia incluirão função neurocognitiva, capacidade auditiva, ressonância magnética cerebral, tamanho do fígado e baço e medições dos níveis de biomarcadores farmacodinâmicos (DP) no LCR, plasma e urina. Escalas neurocognitivas ou adaptativas, executadas como parte do padrão de atendimento dos sujeitos durante a participação no estudo, também podem ser coletadas, conforme determinado pelo patrocinador do estudo após discussão com o local.

[00161] Pontos finais

[00162] Pontos finais principais:

- Segurança até a semana 24: EAs e eventos adversos graves (EAs)

[00163] Pontos finais secundários:

- Segurança na semana 104: relatórios de EA, avaliações laboratoriais, sinais vitais, ECGs, exames físicos e avaliações neurológicas.

- Biomarcadores no LCR (GAGs, atividade I2S), plasma (GAGs, atividade I2S) e urina (GAGs)
- Parâmetros do desenvolvimento neurológico da função cognitiva, comportamental e adaptativa:
 - Escalas Bayley de desenvolvimento de bebês e crianças pequenas, 3ª edição (BSID-III) (Bayley, 2005) ou Bateria de avaliação Kaufman para crianças, 2ª edição (KABC-II) (Kaufman, 2004).
 - Escalas de comportamento adaptativo de Vineland, 2ª edição, formulário de entrevista abrangente (VABS-II) (Sparrow *et al.*, 2005)
- Concentração de vetores no LCR, plasma e urina por reação quantitativa em cadeia da polimerase (PCR) para a Construção 1 de ácido desoxirribonucleico (DNA)

[00164] Parâmetros exploratórios:

- Medições de imunogenicidade
 - Títulos de anticorpos neutralizantes para AAV9 e os títulos de anticorpos de ligação para I2S no LCR e no soro.
 - Ensaio de imunoespaco ligado à enzima (ELISPOT): resposta das células T ao AAV9 e I2S
 - Citometria de fluxo: células T reguladoras específicas de AAV e I2S
- Anormalidades estruturais do SNC avaliadas por ressonância magnética (MRI) do cérebro
- Tamanho do fígado e baço avaliado por ressonância magnética e ultrassonografia do abdome

- Alterações da capacidade auditiva medidas pelo teste de resposta auditiva do tronco cerebral (PEATE)
- GAGs plasmáticos e urinários em indivíduos que descontinuem temporariamente a TRE IV (ELAPRASE®)
- PedsQL (versão 4)
- Impressão global da escala do sono

[00165] A duração total do estudo pode ser de 104 semanas após a dose, com um ponto de avaliação da segurança primária de 24 semanas. A triagem pode levar até 35 dias.

[00166] DIAGNÓSTICO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

[00167] Para ser elegível para participar deste estudo, um sujeito deve atender a todos os seguintes critérios de inclusão:

1. O (s) responsável (is) legal (is) do (s) sujeito (s) está (ão) disposto (s) a fornecer (m) consentimento informado (s) por escrito e assinado após a explicação da natureza do estudo e antes de qualquer procedimento relacionado à pesquisa.

2. É um homem

3. Atende a um dos seguintes critérios:

a. Tem um diagnóstico documentado de MPS II *E* tem ≥ 4 meses a <5 anos de idade *E* tem uma pontuação no teste neurocognitivo > 55 e ≤ 77 (BSID-III ou KABC-II), *OU*

b. Tem um diagnóstico documentado de MPS II *E* é ≥ 4 meses e <5 anos de idade *E* tem um declínio de ≥ 1 desvio padrão no teste neurocognitivo sequencial (BSID-III ou KABC-II) e uma pontuação no teste > 55 , *OU*

c. Tem um parente diagnosticado com MPS II grave que possui a mesma mutação *IDS* do sujeito E, na opinião de um geneticista, herdou uma forma grave de MPS II

4. Possui capacidade auditiva e visual suficiente, com ou sem auxiliares, para concluir o teste de protocolo necessário e ser compatível com o uso do auxílio, se aplicável, nos dias de teste.

[00168] Os indivíduos que atenderem a qualquer um dos seguintes critérios de exclusão não serão elegíveis para participar do estudo:

1. Tem uma contra-indicação para uma injeção de CI, incluindo qualquer um dos seguintes:

a. A revisão dos exames de ressonância magnética de base pela equipe de neurorradiologistas/neurocirurgiões participantes do estudo (1 por local) mostra uma contra-indicação para uma injeção de CI

b. História de cirurgia prévia de cabeça/pescoço, que resultou em contraindicação à injeção de CI, com base na revisão das informações disponíveis pela equipe de neurorradiologistas/neurocirurgiões participantes do estudo

c. Tem alguma contra-indicação para tomografia computadorizada (TC), agente de contraste ou anestesia geral

d. Tem alguma contra-indicação para ressonância magnética ou gadolínio

e. Tem taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) <30 mL/min/1.73 m²

2. Tem alguma condição que contra indique o tratamento com prednisona, tacrolimus ou sirolimus

3. Tem algum déficit neurocognitivo não atribuível à MPS II ou diagnóstico de uma condição neuropsiquiátrica que, na opinião do PI, possa confundir a interpretação dos resultados do estudo
4. Tem alguma contraindicação para punção lombar
5. Possui derivação ventricular
6. Foi submetido a transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH)
7. Teve tratamento prévio com um produto de terapia genética baseado em AAV
8. Recebeu idursulfase [ELAPRASE®] por administração intratecal (TI)
9. Recebeu idursulfase [ELAPRASE®] IV e sofreu uma reação de hipersensibilidade grave, incluindo anafilaxia, considerada relacionada à administração de idursulfase IV [ELAPRASE®].
10. Recebeu qualquer produto sob investigação no prazo de 30 dias a partir da meia-vida do Dia 1 ou 5 antes da assinatura do TCLE, o que for maior
11. Tem alguma história de linfoma ou história de outro câncer, além de células escamosas ou carcinoma basocelular da pele, que não tenha sido em plena remissão por pelo menos 3 meses antes da triagem
12. Tem uma contagem de plaquetas <100.000 por microlitro (µL)
13. Tem aminotransferase (ALT) ou aspartato aminotransferase (AST) > 3 × LSN ou bilirrubina total > 1,5 × LSN na triagem, a menos que o sujeito tenha um histórico previamente conhecido da síndrome de Gilbert e uma bilirrubina fracionada que mostre bilirrubina conjugada <35% da bilirrubina total

14. Hipertensão não controlada (pressão arterial sistólica [PA]> 180 mmHg, pressão diastólica> 100 mmHg) apesar do tratamento médico máximo

15. Tem histórico de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou hepatite B ou vírus da hepatite C, ou testes de triagem positivos para antígeno de superfície da hepatite B ou anticorpo central da hepatite B ou anticorpos para hepatite C ou HIV

16. É um membro da família de primeiro grau de um funcionário do local clínico ou qualquer outro indivíduo envolvido na condução do estudo ou é um funcionário do local clínico ou outro indivíduo envolvido na condução do estudo

17. Apresenta uma anormalidade eletrocardiográfica clinicamente significativa que, na opinião do PI, comprometeria a segurança do indivíduo

18. Tem uma condição médica ou psicológica grave ou instável que, na opinião do PI, comprometeria a segurança do sujeito ou a participação bem-sucedida no estudo ou interpretação dos resultados do estudo

19. Convulsões não controladas que, na opinião do PI, colocariam o sujeito em risco indevido

Critérios de exclusão relacionados à terapia imunossupressora:

20. Tem histórico de reação de hipersensibilidade ao tacrolimus, sirolimus ou prednisona

21. Possui histórico de imunodeficiência primária (por exemplo, síndrome da imunodeficiência variável comum), esplenectomia ou

qualquer condição subjacente que predisponha o sujeito à infecção

22. Tem infecção por herpes zoster (VZV), citomegalovírus (CMV) ou vírus de Epstein-Barr (EBV) que não foi completamente resolvida pelo menos 12 semanas antes da triagem

23. Alguma infecção que exija hospitalização ou tratamento com anti-infecciosos parentéricos não foi resolvida pelo menos 8 semanas antes da Visita 2

24. Tem alguma infecção ativa que exija anti-infecciosos orais (incluindo antivirais) dentro de 10 dias antes da Visita 2

25. Tem um histórico de tuberculose ativa (TB) ou um teste Quantiferon-TB Gold positivo durante a triagem

26. Tem alguma vacina viva dentro de 8 semanas antes da assinatura da CIF

27. Realizou uma grande cirurgia dentro de 8 semanas antes de assinar a CIF ou uma grande cirurgia planejada durante o período do estudo

28. Antecipar a necessidade de adenoidectomia ou amigdalectomia dentro de 6 meses após a inscrição

29. Tem uma contagem absoluta de neutrófilos $<1,3 \times 10^3/\mu\text{L}$

30. Tem alguma condição ou anormalidade laboratorial que o IP acredita que não seria apropriada para terapia imunossupressora

[00169] MÉTODOS ESTATÍSTICOS

[00170] Todos os dados serão apresentados nas listagens de dados do sujeito. As variáveis categóricas serão resumidas usando frequências e porcentagens, e as variáveis contínuas

serão resumidas usando estatística descritiva (n, média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo). Exibições gráficas serão apresentadas conforme apropriado. Os parâmetros de segurança e DP serão relatados por grupo de doses e também podem ser relatados para os 2 grupos de doses combinados.

[00171] Tamanho da amostra e cálculo de potência: Nenhum cálculo formal foi realizado para determinar o tamanho da amostra.

6.2.2 ABREVIATURAS E TERMOS

Abreviação	Termos
AAV	Vírus adeno-associado

Abreviação	Termos
AAV9	Vetor AAV do sorotipo 9
AE (s)	Eventos Adversos
ALP	Alcalina fosfatase
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BBB	Barreira hematoencefálica
BID	Duas vezes ao dia
BP	Pressão sanguínea
BSID	Escalas de Bayley de desenvolvimento de bebês e crianças pequenas
BSL	Nível de biossegurança
CB7	C4 e CB híbridos (promotor de actina beta de frango)
CBC	Hemograma completo
cDNA	DNA consenso
CFR	Código de Regulamentos Federais
CI	Intervalo de confiança
CMV	Citomegalovírus
CNS	Sistema Nervoso Central
CoA	Certificado de análise
CRF	Formulário de Relatório de Caso

Abreviação	Termos
CSF	Líquido cefalorraquidiano
CT	Tomografia computadorizada
CTA	Contrato de Ensaio Clínico
CTCAE	Critérios comuns de terminologia para eventos adversos
CZ	Crystal Zenith®
DLT (s)	Toxicidade (s) limitadora de dose (s)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRG	Gânglios da raiz dorsal
EBV	Vírus Epstein - Barr
ECG	Eletrocardiograma
EDC	Captura eletrônica de dados
eGFR	Taxa de filtração glomerular estimada
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ELISPOT	Imunoespaco ligado a enzima
EOS	Fim do estudo
ERT	Terapia de reposição enzimática
ET	Rescisão antecipada
FDA	Administração de Medicamentos e Alimentos dos EUA

Abreviação	Termos
GAG (s)	Glicosaminoglicano (s)
GAN	Neuropatia Axonal Gigante
GC	Cópias do genoma
GCP	Boas Práticas Clínicas
BPL	Boas Práticas de Laboratório
GM3	Monossialodihexosilgangliosídeo
HDL	Lipoproteína de alta densidade
Hep	Hepatite
Hex	Hexosaminidase
hIDS	Iduronato-2-sulfatase humana
HIPAA	Lei de Portabilidade e Contabilidade de Seguros de Saúde
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSCT	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
I2S	Iduronato-2-sulfatase
IB	Brochura do Investigador
IC	Intracisternal (ly)
ICF	Termo de Consentimento Informado
ICH	Conselho Internacional de Harmonização
ICV	Intracerebroventricular

Abreviação	Termos
IDMC	Comitê Independente de Monitoramento de Dados
IDS	Gene iduronato-2-sulfatase
IEC (s)	Comitê (s) de Ética Independente
IgG	Imunoglobulina G
IND	Investigação de novo medicamento
IP	Produto em investigação
QI	Quociente de inteligência
IRB	Quadro de Revisão Institucional
IS	supressão imunológica / imunossupressão
IT	Intratecal (ly)
ITR (s)	Repetição (ões) invertida (s) do terminal
IV	Intravenoso (ly)
KABC	Bateria de Avaliação Kaufman para Crianças
KIDS	Escala de desenvolvimento infantil Kinder
KSPD	Escala de Quioto do Desenvolvimento Psicológico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LIMP2	Proteína de membrana lisossômica

Abreviação	Termos
MED	Dose eficaz mínima
MedDRA	Dicionário Médico de Atividades Regulatórias
MMF	Micofenolato de mofetil
MPS I	Mucopolissacaridose tipo I
MPS II	Mucopolissacaridose tipo II
MPS III	Síndrome de Sanfilippo
MPS VII	Mucopolissacaridose tipo VII
MRI	Imagem de Ressonância magnética
MTD	Dose máxima tolerada
mTORC1	Alvo mamífero / mecanicista do complexo rapamicina 1
N	Número na amostra
NAB	Anticorpo neutralizante
NCI	Instituto Nacional do Câncer
NHP (s)	Primata (s) não humano
NIH	Instituto Nacional de Saúde
NOAEL	Nenhum nível de efeito adverso observável
PBMC (s)	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD	Farmacodinâmica (s)

Abreviação	Termos
PgP	Glicoproteína P
PI	Pesquisador Principal
PML	Leucoencefalopatia multifocal progressive
PO	Via boca / oral
PT	Tempo de protrombina ou Termo preferido
PTT	Tempo parcial de tromboplastina
PVAN	Nefropatia associada ao vírus do polioma
QD	Diariamente
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RBC	Hemácia
RG1	Grupo de Risco 1
Construção 1 ou Construto 1	Cápsula recombinante do sorotipo 9 do vírus adeno-associado que contém a cassete de expressão iduronato-2-sulfatase humana
SAE (s)	Eventos adversos graves
SEIVA	Plano de análise estatística
SDV	Verificação do documento de origem

Abreviação	Termos
SMA	Atrofia muscular espinhal
SOC	Classe de órgão do sistema
SRT	Gatilho de revisão de segurança
TB	Tuberculose
TEAE (S)	Eventos adversos emergentes do tratamento
Treg	Célula T reguladora
ULN	Limite superior do normal
NOS	Estados Unidos
NOS	Ultrassom
USMs	Medidas de segurança urgentes
VZV	Vírus varicela zoster
WBC	Glóbulo branco (contagem)
WHO	Organização Mundial da Saúde

6.2.3 PLANO INVESTIGACIONAL

[00172] Pontos finais

[00173] Pontos finais primários

- Segurança até a semana 24: EAs e SAEs

[00174] Pontos finais secundários

- Segurança na semana 104: relatórios de EA, avaliações laboratoriais, sinais vitais, eletrocardiogramas (ECGs), exames físicos e avaliações neurológicas

- * Biomarcadores no LCR (GAGs, atividade I2S), plasma (GAGs, atividade I2S) e urina (GAGs)
- * Parâmetros do desenvolvimento neurológico da função cognitiva, comportamental e adaptativa:
 - o Escalas Bayley de desenvolvimento de bebês e crianças pequenas, 3ª edição (BSID-III) (Bayley, 2005) ou Bateria de avaliação Kaufman para crianças, 2ª edição (KABC-II) (Kaufman, 2004)
 - o Escalas de comportamento adaptativo de Vineland, 2ª edição, formulário de entrevista abrangente (VABS-II) (Sparrow *et al.*, 2005)
- * Concentração de vetores no LCR, plasma e urina por reação quantitativa em cadeia da polimerase (PCR) para o DNA da Construção 1

[00175] Pontos exploratórios finais

- Medições de imunogenicidade
 - o Neutralizando os títulos de anticorpos para AAV9 e ligando os títulos de anticorpos para I2S no LCR e no soro
 - o Ensaio de imunoespaco ligado à enzima (ELISPOT): resposta das células T ao AAV9 e I2S
- Citometria de fluxo: células T reguladoras específicas de AAV e I2S
- Anormalidades estruturais do SNC avaliadas por ressonância magnética do cérebro
- Tamanho do fígado e baço avaliado por ressonância magnética do abdômen

- Alterações da capacidade auditiva medidas pelo teste de resposta auditiva do tronco cerebral (PEATE)
- GAGss no plasma e na urina em indivíduos que descontinuem temporariamente a TRE IV (ELAPRASE®)
- PedsQL (versão 4)
- Impressão global da escala do sono

[00176] PROJETO DE ESTUDO

[00177] Este é um estudo de escalonamento de dose de braço único, fase I/II, primeiro em humano, multicêntrico, de rótulo aberto, e braço único da Construção 1. Aproximadamente 6 indivíduos pediátricos com MPS II grave podem ser incluídos em dois tempos de dose, $1,3 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral (Dose 1) ou $6,5 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral (Dose 2) e receberão uma dose única da Construção 1 administrado por injeção de IC. A segurança será o foco principal das primeiras 24 semanas após o tratamento (período do estudo primário). Após a conclusão do período primário do estudo, os sujeitos continuarão a ser avaliados (segurança e eficácia) por até um total de 104 semanas após o tratamento com a Construção 1. No final do estudo, todos os sujeitos serão convidados a participar de um estudo de acompanhamento a médio prazo.

[00178] Os indivíduos em potencial serão rastreados até 35 dias antes da dosagem para determinar a elegibilidade para o estudo. Os indivíduos que atenderem aos critérios de elegibilidade serão admitidos no hospital entre o dia 2 e a manhã do dia 1 (de acordo com a prática institucional), e as avaliações da linha de base serão realizadas pré-dose. Os indivíduos receberão uma dose única de CI da Construção 1 no Dia 1 e

permanecerão no hospital por aproximadamente 30 a 36 horas após a administração para observação. As avaliações subsequentes no período primário do estudo (ou seja, até a Semana 24) serão realizadas semanalmente até a Semana 4 e nas Semanas 8, 12, 16, 20 e 24. Após o período do estudo primário, as visitas serão realizadas nas Semanas 28, 32, 40, 48, 52, 56, 64, 78 e 104. As visitas da semana 12, 40 e 64 podem ser realizadas por uma enfermeira em casa. As estimativas da semana 20 e 28 serão limitadas à avaliação de EAs e terapias concomitantes por contato telefônico.

[00179] Todos os indivíduos receberão inicialmente o SI no estudo com base nos resultados dos estudos não clínicos. A terapia com IS incluirá corticosteróides (metilprednisolona 10 mg/kg IV uma vez no dia 1 pré-dose e prednisona oral a partir de 0,5 mg/kg/dia no dia 2 com redução gradual e descontinuação até a semana 12), tacrolimus (1 mg duas vezes ao dia [BID] por via oral [PO] do dia 2 à semana 24, com nível sanguíneo de 4-8 ng/mL e redução gradual durante 8 semanas entre as semanas 24 e 32) e sirolimus (uma dose inicial de 1 mg / m² a cada 4 horas x 3 doses no dia 2 e depois no dia 1: sirolimus 0,5 mg/m²/dia dividido em duas vezes ao dia com dose no sangue de 4-8 ng/ml até a semana 48). As avaliações neurológicas e o monitoramento do nível sanguíneo de tacrolimus/sirolimus serão realizados conforme Tabela 3. As doses de sirolimus e tacrolimus serão ajustadas para manter os níveis sanguíneos no intervalo alvo.

[00180] Nenhuma terapia de EI é planejada após a Semana 48. Se o EI for necessário após a Semana 48 para controlar uma resposta imune clinicamente relevante, o regime imunossupressor apropriado será determinado pelo investigador principal (PI), em

discussão com o Médico Monitor e o Patrocinador, conforme indicado clinicamente.

[00181] A segurança e tolerabilidade da Construção 1 serão monitoradas por meio da avaliação de EAs e eventos adversos graves (SAEs), química, hematologia, urinálise, marcadores de inflamação no LCR, imunogenicidade, derramamento de vetor (concentração de vetor), sinais vitais, eletrocardiogramas (ECGs) e exames físicos, incluindo avaliações neurológicas.

[00182] As avaliações de eficácia incluirão função neurocognitiva e adaptativa, capacidade auditiva, ressonância magnética cerebral, tamanho do fígado e baço, medições dos níveis de biomarcadores de DP no LCR, plasma e urina.

6.2.4 POPULAÇÃO E SELEÇÃO

[00183] SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

[00184] Aproximadamente 6 indivíduos pediátricos com idade $\geq$ 4 meses a $<$ 5 anos que documentaram déficits neurocognitivos devido à MPS II ou que têm um genótipo e histórico familiar consistentes com uma forma herdada de MPS II grave serão tratados com produto em investigação (IP).

[00185] CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

[00186] Para ser elegível para participar deste estudo, o indivíduo deve atender a todos os seguintes critérios:

1. O responsável legal do indivíduo está disposto e apto a fornecer um consentimento informado por escrito e assinado após a explicação da natureza do estudo e antes de qualquer procedimento relacionado à pesquisa.

2. É um homem

3. Atende a um dos seguintes critérios:

a. Tem um diagnóstico documentado de MPS II *E* tem ≥ 4 meses a < 5 anos de idade *E* tem uma pontuação no teste neurocognitivo > 55 e ≤ 77 (BSID-III ou KABC-II), *OU*

b. Tem um diagnóstico documentado de MPS II *E* ≥ 4 meses e < 5 anos de idade *E* tem um declínio de ≥ 1 desvio padrão no teste neurocognitivo sequencial (BSID-III ou KABC-II) e uma pontuação no teste > 55 , *OR*

c. Parente diagnosticado com MPS II grave com a mesma mutação *IDS* do sujeito *E*, na opinião de um geneticista, herdou uma forma grave de MPS II

4. Possui capacidade auditiva e visual suficiente, com ou sem auxiliares, para concluir o teste de protocolo necessário e ser compatível com o uso do auxílio, se aplicável, nos dias de teste.

[00187] CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

[00188] Um sujeito que atenda a qualquer um dos seguintes critérios de exclusão não será elegível para participar do estudo:

1. Tem uma contra-indicação para uma injeção de CI, incluindo qualquer um dos seguintes:

a. A revisão dos exames de ressonância magnética de base pela equipe de neurorradiologistas/neurocirurgiões participantes do estudo (1 por local) mostra uma contra-indicação para uma injeção de CI

b. História de cirurgia prévia de cabeça/pescoço, que resultou em contraindicação à injeção de CI, com base na revisão

das informações disponíveis pela equipe de neurorradiologistas/neurocirurgiões participantes do estudo

c. Tem alguma contra-indicação para tomografia computadorizada (TC), contraste ou anestesia geral

d. Tem alguma contra-indicação para ressonância magnética ou gadolínio

e. Tem taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) <30 mL/min/1.73 m²

2. Tem alguma condição que contraindique o tratamento com prednisona, tacrolimus ou sirolimus.

3. Tem algum déficit neurocognitivo não atribuível à MPS II ou diagnóstico de uma condição neuropsiquiátrica que, na opinião do PI, possa confundir a interpretação dos resultados do estudo.

4. Tem alguma contra-indicação para punção lombar

5. Possui derivação ventricular

6. Foi submetido a transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH).

7. Teve tratamento prévio com um produto de terapia genética baseado em AAV.

8. Recebeu idursulfase via administração intratecal (TI)

9. Recebeu idursulfase IV [ELAPRASE®] e sofreu uma reação de hipersensibilidade grave, incluindo anafilaxia, considerada relacionada à administração de idursulfase IV [ELAPRASE®].

10. Recebeu qualquer produto sob investigação no prazo de 30 dias a partir da meia-vida do Dia 1 ou 5 antes da assinatura do TCLE, o que for maior

11. Tem algum histórico de linfoma ou histórico de outro câncer, além de células escamosas ou carcinoma basocelular da pele, que não está em remissão completa por pelo menos 3 meses antes da triagem.

12. Contagem de plaquetas < 100.000 por microlitro (μL)

13. Tem aminotransferase (ALT) ou aspartato aminotransferase (AST) $> 3 \times \text{ULN}$ ou bilirrubina total $> 1,5 \times \text{LSN}$ na triagem, a menos que o sujeito tenha um histórico previamente conhecido da síndrome de Gilbert e uma bilirrubina fracionada que mostre bilirrubina conjugada $< 35\%$ da bilirrubina total.

14. Hipertensão não controlada (pressão arterial sistólica [PA] > 180 mmHg, pressão diastólica > 100 mmHg) apesar de tratamento médico.

15. Tem histórico de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou hepatite B ou vírus da hepatite C, ou testes de triagem positivos para antígeno de superfície da hepatite B ou anticorpo do núcleo da hepatite B ou anticorpos para hepatite C ou HIV.

16. É um membro da família de primeiro grau de um funcionário do local clínico ou qualquer outro indivíduo envolvido na condução do estudo ou é um funcionário do local clínico ou outro indivíduo envolvido na condução do estudo.

17. Possui uma anormalidade eletrocardiográfica clinicamente significativa que, na opinião do PI, comprometeria a segurança do indivíduo.

18. Possui uma condição médica ou psicológica grave ou instável que, na opinião do PI, comprometeria a segurança do sujeito ou

a participação bem-sucedida no estudo ou interpretação dos resultados do estudo.

19. Tem convulsões não controladas que, na opinião do PI iria colocar o assunto em risco indevido.

Critérios de exclusão relacionados à terapia imunossupressora:

20. História de reação de hipersensibilidade ao tacrolimus, sirolimus ou prednisona

21. Um histórico de imunodeficiência primária (por exemplo, síndrome comum de imunodeficiência variável), esplenectomia ou qualquer condição subjacente que predisponha o sujeito a infecção

22. Infecção por herpes zoster (VZV), citomegalovírus (CMV) ou vírus de Epstein - Barr (EBV) que não foi completamente resolvida pelo menos 12 semanas antes da triagem

23. Qualquer infecção que exija hospitalização ou tratamento com anti-infecciosos parenterais não foi resolvida pelo menos 8 semanas antes da Visita 2

24. Qualquer infecção ativa que exija anti-infecciosos orais (incluindo antivirais) dentro de 10 dias antes da Visita 2

25. Histórico de tuberculose ativa (TB) ou um teste Quantiferon-TB Gold positivo durante a triagem

26. Qualquer vacina ativa dentro de 8 semanas antes da assinatura da CIF

27. Cirurgia importante dentro de 8 semanas antes de assinar a CIF ou cirurgia importante planejada durante o período do estudo

28. Antecipe a necessidade de adenoidectomia ou amigdalectomia dentro de 6 meses após a inscrição

29. Contagem absoluta de neutrófilos $<1,3 \times 10^3/\mu\text{L}$

30. Qualquer condição ou anormalidade laboratorial que o IP acredite não seria apropriada para terapia imunossupressora

31.

6.2.5 TRATAMENTOS

[00189] TRATAMENTOS ADMINISTRADOS

[00190] O produto em investigação ou experimental (PI), Construção 1 (veja a Figura 5), será administrado como uma administração de IC de dose única. Dois níveis de dose: $1,3 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral (Dose 1) ou $6,5 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral (Dose 2). A dose total administrada (GC total) será ajustada para levar em consideração as diferenças no tamanho do cérebro por idade. O volume total do produto administrado não excederá 5 mL.

[00191] Nenhuma terapia de referência será administrada durante este estudo. A terapia IS será administrada além da IP, conforme descrito abaixo.

[00192] PRODUTO EM INVESTIGAÇÃO

[00193] A Construção 1 é um AAV recombinante não replicante do capsídeo do sorotipo 9 contendo uma cassete de expressão hIDS. Ver parágrafo [0019].

Nome do Produto	Constructo ou construção1
Inserções de genes:	hIDS
Elementos de Controle:	Promotor CB7, íntron beta- actina de frango, sinal de poliadenilação da beta-globina de coelho
Serótipo AAV:	9

AAV = vírus adeno-associado; CB = beta-actina de frango; hIDS = iduronato-2-sulfatase humana

[00194] A Construção 1 é um vetor AAV9 recombinante não replicante que permite a expressão eficiente do produto iduronato-2-sulfatase humana (hIDS) no sistema nervoso central (CNS) após administração intratecal (IT). O genoma do vetor contém um cassete de expressão HIDS, flanqueado por repetições terminais invertidas AAV2 (ITRs). A expressão do cassete é conduzida por um promotor CB7, um híbrido entre um intensificador imediato do citomegalovírus (CMV) e o promotor de β -actina de frango. A transcrição deste promotor é aumentada pela presença do intrón de β -actina de frango (CI). O sinal de poliadenilação para a cassete de expressão é do gene da β -globina de coelho (RBG). Uma representação esquemática da Construção 1 é ilustrada na FIG.5)

[00195] O IP final é fornecido como uma solução congelada do ingrediente ativo do vetor AAV (AAV9.CB7.hIDS) em solução Elliotts B® modificada com Pluronic® F68 a 0,001%, preenchida em 2 mL em frascos injetáveis de CRYSTAL ZENITH® (CZ), e selados

com uma rolha de borracha sem látex e selo flip-off de alumínio. Os frascos para injetáveis devem ser armazenados a $\leq -60^{\circ}\text{C}$. A concentração (em GC/mL) de cada lote IP será relatada no certificado de análise (CoA). Instruções detalhadas de dosagem, com base na concentração do produto, serão fornecidas no manual de administração.

[00196] TERAPIA IMUNOSSUPRESSORA

[00197] Corticosteróides

- Na manhã da administração do vetor (dia 1 pré-administração), os indivíduos receberão metilprednisolona 10 mg/kg IV (máximo de 500 mg) por pelo menos 30 minutos. A metilprednisolona deve ser administrada antes da punção lombar e injeção intravenosa de IP. A pré-medicação com acetaminofeno e um anti-histamínico é opcional e a critério do investigador.
- No dia 2, a prednisona oral será iniciada com o objetivo de interromper a prednisona até a semana 12. A dose de prednisona será a seguinte:
 - Dia 2 até o final da Semana 2: 0,5 mg/kg/dia
 - Semana 3 e 4: 0,35 mg/kg/dia
 - Semana 5-8: 0,2 mg/kg/dia
 - Semana 9-12: 0,1 mg/kg
 - A prednisona será descontinuada após a semana 12. A dose exata de prednisona pode ser ajustada para a próxima dose clinicamente prática mais alta.

[00198] Sirolimus

- 2 dias antes da administração do vetor (dia -2): será administrada uma dose de carga de sirolimus 1 mg/m² a cada 4 horas x 3 doses
- A partir do dia -1: sirolimus 0,5 mg/m²/dia dividido em duas vezes ao dia com dosagem sanguínea alvo de 4-8 ng/ml
- Sirolimus será descontinuado após a visita da Semana 48.

[00199] Tacrolimus

- O tacrolimus será iniciado no dia 2 (no dia seguinte à administração da IP) na dose de 1 mg duas vezes ao dia e ajustado para atingir um nível sanguíneo de 4-8 ng/mL por 24 semanas.
- A partir da visita da semana 24, o tacrolimus será diminuído ao longo de 8 semanas. Na semana 24, a dose será reduzida em aproximadamente 50%. Na semana 28, a dose será ainda mais reduzida em aproximadamente 50%. O tacrolimus será descontinuado na semana 32.
- A monitorização dos níveis sanguíneos de tacrolimus e sirolimus será realizada conforme Tabela 3. Os ajustes de dose são discutidos nos parágrafos [00220] - [00222].

[00200] MÉTODO DE ATRIBUIÇÃO DE ASSUNTOS AO TRATAMENTO

[00201] Os indivíduos elegíveis serão inscritos e atribuídos sequencialmente a uma doses de corte com os três indivíduos iniciais designados para obter 1,3 × 10¹⁰ GC/g de massa cerebral; os três sujeitos subsequentes serão designados para obter 6,5 × 10¹⁰ GC/g de massa cerebral, aguardando revisão dos dados de segurança pelo IDMC.

[00202] CONSIDERAÇÕES DE DOSAGEM

[00203] PRODUTO EM INVESTIGAÇÃO OU EXPERIMENTAL

[00204] Consulte os parágrafos [00175] a [00186] para obter uma descrição do plano para dosar sequencialmente os indivíduos, incluindo a revisão dos dados de segurança entre indivíduos e após a dosagem de cada um em qualquer nível de dose.

[00205] TERAPIA IMUNOSSUPRESSORA

[00206] A dosagem de prednisona começará em 0,5 mg/kg/dia e será gradualmente reduzida pela visita da Semana 12.

[00207] Serão feitos ajustes na dose de tacrolimus para manter as concentrações mínimas de sangue total dentro de 4 a 8 ng/mL nas primeiras 24 semanas. Na semana 24, a dose será reduzida em aproximadamente 50%. Na semana 28, a dose será ainda mais reduzida em aproximadamente 50%. O tacrolimus será descontinuado na semana 32. Serão feitos ajustes na dose de sirolimus para manter as concentrações mínimas no sangue total dentro de 4 a 8 ng/mL. Na maioria dos indivíduos, os ajustes de dose podem ser baseados na equação: $\text{nova dose} = \text{dose atual} \times (\text{concentração alvo} / \text{concentração atual})$. Os indivíduos devem continuar com a nova dose de manutenção por pelo menos 7 a 14 dias antes de mais ajustes na dosagem com monitoramento da concentração.

[00208] Os seguintes medicamentos e procedimentos são proibidos:

- Nenhum IT ERT é permitido dentro de 6 meses após a triagem.
- Qualquer produto experimental dentro de 30 dias ou 5 meias-vidas, o que for maior, antes da assinatura da CIF ou a qualquer momento durante o estudo (até a Semana 104)
- As vacinas ativas devem ser evitadas durante o uso de sirolimus e/ou tacrolimus

- Inibidores fortes do CYP3A4 e/ou glicoproteína P (PgP) (como cetozonazol, voriconazol, itraconazol, posaconazol, eritromicina, telitromicina ou claritromicina) ou fortes indutores do CYP3A4 e ou PgP (como rifutina ou rifampina) sirolimus e/ou tacrolimus
- O suco de toranja (Grapefruit) inibe as enzimas CYP3A, resultando em aumento das concentrações mínimas de tacrolimus e sirolimus no sangue total. Os indivíduos devem evitar comer toranja ou beber suco de toranja com tacrolimus e/ou sirolimus.

[00209] MEDICAMENTOS E PROCEDIMENTOS PERMITIDOS

[00210] Os indivíduos poderão permanecer em um regime estável de IV ERT, bem como quaisquer medidas de suporte (por exemplo, fisioterapia). De acordo com o padrão de atendimento do hospital local, os indivíduos poderão receber medicação para prevenir a claustrofobia durante a ressonância magnética e receber anestesia geral para punção lombar, ressonância magnética e estudos de neurocondução (PEATES ou potenciais evocados sensoriais).

[00211] Outros medicamentos além dos descritos acima, que são considerados necessários para a segurança e o bem-estar do indivíduo (por exemplo, para hipertensão), podem ser administrados a critério do Investigador, de acordo com o padrão local de atendimento e registrados nas seções apropriadas. do CRF.

EQUIVALENTES

[00212] Embora a invenção seja descrita em detalhes com referência as formas de realização específicas da mesma, será

entendido que variações que são funcionalmente equivalentes estão dentro do escopo desta invenção. De fato, várias modificações da invenção, além das mostradas e descritas aqui, tornar-se-ão evidentes para os especialistas na técnica a partir da descrição anterior e dos desenhos anexos. Tais modificações devem se enquadrar no escopo das reivindicações anexas. Os especialistas na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar, usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes às formas de realizações específicas da invenção aqui descritas. Tais equivalentes devem ser abrangidos pelas reivindicações a seguir.

[00213] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados nesta especificação são aqui incorporados por referência na especificação na mesma extensão como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicado para ser incorporado aqui por referência em sua totalidade.

REINVIDICAÇÕES

1. Precursor de iduronato-2-sulfatase humana recombinante glicosilada (IDS) **caracterizado pelo fato de** ser produzido por células neuronais humanas ou gliais humanas.

2. Precursor de IDS humana recombinante glicosilada de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de** apresentar aproximadamente 90 kDa, medido por eletroforese em gel de poliacrilamida.

3. Precursor de IDS humana recombinante glicosilada de acordo com as reivindicações 1 e 2 **caracterizado pelo fato de** conter uma formilglicina, ser α 2,6-sialilado, não conter NeuGc detectável, não conter antígeno α -Gal detectável e/ou é manose-6-fosforilada.

4. Precursor de IDS humana recombinante glicosilada de acordo com as reivindicações 1 a 3 **caracterizado pelo fato de** ser secretado a partir de um depósito de células no sistema nervoso central, geneticamente modificado por engenharia genética para secretar o referido precursor da glicoproteína IDS humana.

5. Precursor de IDS humano recombinante glicosilado, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo fato de** que o depósito é formado no cérebro de um humano.

6. Precursor de IDS humano recombinante glicosilado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo fato de** que as células neuronais ou gliais humanas são deficientes na atividade de IDS.

7. Precursor de IDS humano recombinante glicosilado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado pelo fato de** que o precursor de IDS humano recombinante glicosilado compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.1

8. Método para tratar um sujeito humano diagnosticado com mucopolissacaridose tipo II (MPS II), **caracterizado pelo fato de** compreender a entrega ao líquido cefalorraquidiano (LCR) do referido sujeito humano uma quantidade terapeuticamente eficaz de um precursor iduronato-2-sulfatase recombinante glicosilado humano (IDS) produzido por células neuronais ou gliais humanas.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo fato de** que o precursor de IDS humano recombinante glicosilado tem aproximadamente 90 kDa, conforme medido por eletroforese em gel de poliacrilamida.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo fato de** que o precursor de IDS humano recombinante glicosilado tem aproximadamente 90 kDa, medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, contém uma formilglicina, é $\alpha 2$, 6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável, e/ou é manose-6-fosforilada.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, **caracterizado pelo fato de** que o precursor de IDS humano recombinante glicosilado é secretado a partir de um depósito de células no sistema nervoso central geneticamente modificado por engenharia genética para secretar o referido precursor de IDS humano recombinante glicosilado.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado pelo fato de** que o depósito é formado no cérebro de um sujeito humano.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, **caracterizado pelo fato de** que o sujeito humano é deficiente na atividade do IDS.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 13, **caracterizado pelo fato de** que o precursor de IDS humano recombinante glicosilado compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.1

15. Método para tratar um sujeito humano diagnosticado com MPS II, **caracterizado pelo fato de** compreender a administração ao CSF do referido sujeito humano de um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano, em que o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante quando usado para transduzir uma célula neuronal humana primária em cultura direciona a expressão de um precursor de IDS humano glicosilado secretado de aproximadamente 90 kDa, medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, que contém formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose -6-fosforilado.

16. Método para tratar um sujeito humano diagnosticado com MPS II, **caracterizado pelo fato de** compreender a administração ao CSF do referido sujeito humano de um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica IDS humano, de modo que um depósito seja formado no sistema nervoso central humano que secreta um precursor de IDS humano glicosilado que tem aproximadamente 90 kDa, medido por eletroforese em gel de

poliacrilamida, contém uma formilglicina, é α 2,6-sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém antígeno α -Gal detectável e/ou é manose-6-fosforilado.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado pelo fato de** que a secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado é confirmada pela transdução de uma linha celular neuronal humana com o referido vetor de expressão de nucleotídeo recombinante em cultura de células.

18. Método, de acordo com a reivindicação 16 ou 17, **caracterizado pelo fato de** que a secreção do referido precursor de IDS humano glicosilado é confirmada na presença e ausência de manose-6-fosfato.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18, **caracterizado pelo fato de** que o IDS humano compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO.1

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 19, **caracterizado pelo fato de** que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante compreende um promotor específico de neurônio que controla a expressão do precursor de IDS humano glicosilado em células neuronais humanas ou um promotor específico de célula glial que controla a expressão do precursor de IDS humano glicosilado em células gliais humanas.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 20, **caracterizado pelo fato de** que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante codifica um peptídeo líder que garante o processamento co- e pós-tradução adequado do precursor do IDS humano glicosilado em células neuronais humanas ou células gliais humanas.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 21, **caracterizado pelo fato de** que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é um vetor de AAV.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado pelo fato de** que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é um vetor de AAV com defeito de replicação.

24. Método, de acordo com a reivindicação 22 ou 23, **caracterizado pelo fato de** que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é um vetor AAV9 ou AAVrh10.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 24, **caracterizado pelo fato de** que o vetor de expressão de nucleotídeo recombinante é entregue ao CFS do sujeito humano por punção intratecal, intracerebroventricular, lombar ou administração intranasal.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 25, **caracterizado pelo fato de** que o sujeito humano é deficiente na atividade do IDS.

27. Método para tratar um sujeito humano diagnosticado com MPS II, **caracterizado pelo fato de** compreender a administração ao CSF do referido sujeito humano uma formulação contendo um vetor de expressão de nucleotídeo recombinante que codifica o IDS humano, em que a formulação é adequada para administração ao CSF do cérebro humano, de modo que um depósito é formado no sistema nervoso central humano que secreta um precursor de IDS humano glicosilado que é de aproximadamente 90 kDa, medido por eletroforese em gel de poliacrilamida, que contém uma

formilglicina, é $\alpha 2,6$ -sialilado, não contém NeuGc detectável, não contém α -Gal antígeno detectável, e/ou manose-6-fosforilada.

RESUMO

PRECURSOR DE IDURONATO-2-SULFATASE HUMANA RECOMBINANTE
GLICOSILADA (IDS), MÉTODO PARA TRATAR UM SUJEITO HUMANO
DIAGNOSTICADO COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II (MPS II)

São descritas composições e métodos para a entrega de iduronato-2-sulfatase recombinante humano (IDS) produzida por células neuronais ou gliais humanas no líquido cefalorraquidiano do sistema nervoso central (SNC) de um indivíduo humano diagnosticado com mucopolissacaridose II (MPS II).

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P4137 Listagem de Sequência.txt
- Data de Geração do Código: 14/10/2019
- Hora de Geração do Código: 15:30:22
- Código de Controle:
 - Campo 1: 71A260B8FDB39399
 - Campo 2: 461DA879DE04222A