

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 922**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2020 PCT/GB2020/050251**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2020 WO20161483**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2020 E 20705470 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2023 EP 3850089**

54 Título: **Polinucleótidos**

30 Prioridad:

04.02.2019 GB 201901512

06.12.2019 GB 201917910

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

14.05.2024

73 Titular/es:

**FREELINE THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
Sycamore House, Gunnels Wood Road
Stevenage, Hertfordshire SG1 2BP, GB**

72 Inventor/es:

**NATHWANI, AMIT;
MCINTOSH, JENNY;
CORBAU, ROMUALD;
KIA, AZADEH y
MIRANDA, CARLOS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 968 922 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polinucleótidos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de GBA que codifica β -glucocerebrosidasa (GCasa), partículas víricas que comprenden los polinucleótidos y tratamientos que utilizan los polinucleótidos.

10

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Gaucher (EG) es una enfermedad autosómica recesiva de almacenamiento de lípidos caracterizada por el depósito de glucocerebrósido en las células del sistema macrófago-monocito. La EG es causada por mutaciones en el gen de mantenimiento GBA que afecta a la actividad y/o producción de la enzima β -glucocerebrosidasa (GCasa).

15

20

25

Existen tres tipos principales de EG que se caracterizan por las mutaciones específicas que se han identificado, y cada tipo puede mostrar síntomas clínicos diferentes. La EG de tipo 1 tiene poca o ninguna afectación del sistema nervioso central, pero se caracteriza principalmente por manifestaciones viscerales como agrandamiento del bazo y el hígado, recuentos bajos de células sanguíneas, problemas hemorrágicos y enfermedad ósea. En los últimos 20 años, la terapia enzimática sustitutiva se ha convertido en el tratamiento de referencia para la EG de tipo 1. Además de su elevado coste (-200.000 dólares o ~150.000 libras/paciente/año), el tratamiento con la terapia enzimática sustitutiva en la EG suele requerir una o más inyecciones cada dos semanas de por vida. Esto hace que una elevada proporción de pacientes con EG presenten altos niveles de carga de tratamiento.

En consecuencia, existe la necesidad de proporcionar un vector terapéutico eficaz para el tratamiento de la EG, es decir, uno que permita un alto nivel de expresión de GCasa.

30

35

La presente solicitud se refiere a un enfoque de terapia génica para tratar EG, que implica administrar una partícula vírica que comprende un polinucleótido de GBA que codifica la GCasa. Los polinucleótidos y partículas víricas descritos en el presente documento pueden proporcionar una mayor expresión de GCasa en comparación con los polinucleótidos que comprenden un polinucleótido que codifica GCasa natural. Dicho enfoque de terapia génica evitaría la necesidad de inyecciones intravenosas frecuentes y de por vida de GCasa.

El documento de patente WO 2019/009979 describe el uso de vectores lentivíricos en el tratamiento de trastornos por almacenamiento lisosómico.

40 **Sumario de la invención**

45

50

La presente solicitud demuestra que las modificaciones específicas de una secuencia de nucleótidos de GBA que codifica GCasa pueden ayudar a mejorar el nivel de expresión y la actividad del polipéptido GCasa expresado *in vitro* y/o *in vivo*. Por ejemplo, la presente solicitud demuestra que el uso de una secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón puede mejorar la expresión y/o la actividad de la proteína GCasa codificada. Dichas secuencias de nucleótidos de GBA modificadas (es decir, no naturales) y/u optimizadas para el codón pueden modificarse aún más para proporcionar mejoras adicionales en la expresión y/o actividad de la proteína GCasa codificada. Las modificaciones adicionales pueden incluir modificaciones adicionales en la secuencia de nucleótidos de GBA, tales como la eliminación de motivos CpG, y/o el uso de elementos reguladores de genes particulares que comprenden secuencias promotoras y/o potenciadoras específicas. Se cree que dichas mejoras en una secuencia de nucleótidos de GBA pueden mejorar la eficacia de dicho nucleótido en el tratamiento de la EG.

55

Estas modificaciones proporcionan una secuencia de nucleótidos de GBA que se expresa altamente, por ejemplo, en el hígado, y que codifica un polipéptido de GCasa o un fragmento del mismo. Como se demuestra en los Ejemplos, los polinucleótidos de la invención expresan actividad de la GCasa a niveles más altos que GBA natural.

60

La presente invención se define en las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA, en donde la secuencia de nucleótidos de GBA codifica una proteína β -glucocerebrosidasa (GCasa) y en donde la secuencia de nucleótidos de GBA comprende una secuencia que es:

65

(i) 100 % idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5;

(ii) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % o al menos 99,8 % idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5, en donde la GCasa codificada por la secuencia de nucleótidos de GBA tiene actividad de la GCasa y se expresa en células hepáticas humanas a mayores niveles en comparación con una GCasa codificada por una secuencia de nucleótidos de GBA natural en un polinucleótido de referencia por lo demás idéntico; y/o

(iii) una variante de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5 que codifica una proteína GCasa que tiene actividad de la GCasa, en donde la variante es idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5, respectivamente, excepto que comprende sustituciones de nucleótidos tales que la proteína GCasa tiene 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9 o hasta 10 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25, en donde además la GCasa codificada por el nucleótido de GBA se expresa en células hepáticas humanas a mayores niveles en comparación con una GCasa codificada por una secuencia de nucleótidos de GBA natural en un polinucleótido de referencia por lo demás idéntico.

Cualquier aspecto, realización y ejemplo de la presente divulgación que no entre en el alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención y se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

En el presente documento se describe un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA, en donde la secuencia de nucleótidos de GBA codifica una proteína β -glucocerebrosidasa (GCasa) o un fragmento de la misma y en donde al menos una parte de la secuencia de nucleótidos de GBA no es natural.

También se describe en el presente documento un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA, en donde la secuencia de nucleótidos de GBA codifica una proteína GCasa o un fragmento de la misma y comprende una secuencia que es al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99.5 %, al menos 99.8 % o 100 % idéntica a un fragmento de al menos 1000, al menos 1200, al menos 1300, menos de 1494, menos de 1611, entre 1000 y 1494, entre 1000 y 1611, entre 1300 y 1494, entre 1300 y 1611, o aproximadamente 1494 nucleótidos de SEQ ID NO: 1-8.

En un aspecto de la invención, se proporciona una partícula vírica que comprende un genoma recombinante que comprende el polinucleótido de la invención.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende el polinucleótido o partícula vírica de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se describe en el presente documento un método de tratamiento que comprende administrar una cantidad eficaz del polinucleótido o partícula vírica de la invención a un paciente.

También se describe en el presente documento un uso del polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención en la fabricación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento.

También se describe en el presente documento el uso del polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención en la fabricación de un medicamento para lograr una actividad de la GCasa estable en un sujeto.

También se describe en el presente documento el uso del polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención en la fabricación de un medicamento para proporcionar una mayor biodisponibilidad de GCasa en un sujeto en comparación con la biodisponibilidad de la terapia sustitutiva de la enzima GCasa, en donde la biodisponibilidad se mide durante un periodo de 2 semanas desde la administración.

También se describe en el presente documento un método para lograr una actividad de la GCasa estable en un sujeto administrando al sujeto el polinucleótido, la partícula vírica o la composición de la invención.

También se describe en el presente documento un método para proporcionar una mayor biodisponibilidad de GCasa en un sujeto en comparación con la biodisponibilidad de la terapia sustitutiva de la enzima GCasa administrando al sujeto el polinucleótido, la partícula vírica o la composición de la invención, en donde la biodisponibilidad se mide durante un periodo de 2 semanas desde la administración.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención, para su uso en un método de expresar la secuencia de nucleótidos de GBA y lograr una actividad de la GCasa estable en un sujeto.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención, para su uso en un método de tratamiento en donde el método comprende expresar la secuencia de nucleótidos de GBA y proporcionar una mayor biodisponibilidad de GCasa en un sujeto en comparación con la biodisponibilidad de la terapia sustitutiva de la enzima GCasa, en donde la biodisponibilidad se mide durante un periodo de 2 semanas desde la administración.

También se describe en el presente documento el uso del polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención en la fabricación de un medicamento para reducir los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina en un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada a la deficiencia de GCasa.

También se describe en el presente documento un método de reducción de los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina en un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada con la deficiencia de GCasa

administrando al sujeto el polinucleótido, la partícula vírica o la composición de la invención.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención, para su uso en un método de reducción de los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina en un sujeto que padece una enfermedad o afección asociada a la deficiencia de GCasa, opcionalmente en donde la reducción de los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina conduce al tratamiento de la enfermedad o afección asociada a la deficiencia de GCasa.

Descripción de las figuras

Figura 1 - Esquemas de los casetes de GBA de las construcciones FLF-PL01, FLF-PL28 y FLF-PL64. LSP-S y LSP-L: promotores específicos de hígado; GBAtw: secuencia de nucleótidos de GBA humana natural; GBACo: secuencia de nucleótidos de GBA humana optimizada para el codón (excepto el tramo que codifica el péptido señalizador, cuyo extremo está representado por una línea de puntos).

Figura 2 - Expresión hepática dependiente de la dosis y secreción de GCasa humana en el torrente sanguíneo murino tras la inyección de AAV2/8-FLF-PL28. (A) Imagen representativa de hígados de ratón teñidos para GCasa 12 semanas después de la inyección de AAV2/8-PL28. Se usó DAB (3,3'-diaminobencidina) para visualizar la GCasa y la hematoxilina como contratinción. (B) Niveles de GCasa medidos mediante ensayo de actividad en suero de ratones tratados con dosis crecientes de AAV2/8-PL28. n=5, ratones C57BL/6 en cada grupo de tratamiento. Las barras de error muestran la media \pm DE.

Figura 3 - Niveles relativos de GCasa observados para cada construcción optimizada para el codón de GBA (FLF-PL16 a FLF-PL36; '16' a '36') tras la transfección en células Huh-7. Cada construcción se probó de forma independiente en 3 a 5 experimentos. Los datos mostrados en el presente documento representan la actividad de la GCasa en relación con la construcción de GBA natural FLF-PL01 ('01'). Las barras de error representan la media \pm DE.

Figura 4 - Medición de la actividad de la GCasa presente en el torrente sanguíneo del ratón tras la inyección de los vectores AAV2/8- FLF-PL-01, 21, 28, 30, 36 y 37 (véase el ejemplo 5 para la descripción de las construcciones). (A) Niveles de actividad de la GCasa encontrados en el suero de ratones 8 semanas después de la inyección de las construcciones de GBA probadas. (B) Niveles de actividad de la GCasa observados en suero de ratón a las 4, 8, 12 y 36 semanas tras la inyección de las construcciones FLF-PL01 y FLF-PL28. Las barras de error representan la media \pm DE, n = 5-8 animales por grupo experimental. * p \leq 0,05; ** p \leq 0,001 (ANOVA unidireccional).

Figura 5 - Niveles de captación de GCasa en el tejido del bazo y la médula ósea tras la inyección de AAV2/8-FLF-PL28 en ratones naturales. Se muestra una imagen representativa del tejido del bazo y la médula ósea teñido para GBA en ratones intactos o tratados con AAV2/8-PL28 a las 4 semanas tras la inyección. Se usó DAB (3,3'-diaminobencidina) para visualizar GBA y hematoxilina como contratinción.

Figura 6 - Niveles de colocalización de la GCasa humana con el marcador canónico de macrófagos murinos F4/80 observado en el bazo tras la inyección de ratones naturales con AAV2/8-FLF-PL28. Imagen representativa de inmunofluorescencia del tejido del bazo teñido para los anticuerpos contra GBA y F4/80. Se usó DAPI (azul) para visualizar los núcleos.

Figura 7 - Niveles de actividad de la GCasa encontrados en el torrente sanguíneo de ratones 4 semanas después de la inyección de AAV2/8- FLF-PL28 y FLF-PL64. Se determinó la actividad de la GCasa en el suero de ratones recogido 4 semanas después de la inyección a la dosis de 2×10^{12} gv/kg. Las barras de error representan la media \pm DE. N = 5, ratones C57BL/6 en cada grupo de tratamiento.

Figura 8 - Niveles de captación observados en bazo, médula ósea y pulmón tras la inyección de AAV2/8-FLF-PL28 y FLF-PL64 observada en ratones 5 semanas después del tratamiento.

Figura 9 - Listado de secuencias.

Figura 10 - Niveles de secreción de GCasa por líneas celulares derivadas de humano tras la transducción con AAV-FLF-PL64. Las células se transdujeron a una MOI de 1×10^5 vg/célula con el vector AAV-FLF-PL64. (A) Los niveles de GBA activa se determinaron fluorométricamente con 4MU-Glc como sustrato. (B) El nivel de transducción para cada línea celular se obtuvo mediante qPCR usando cebadores específicos para la secuencia de poliA. Se restaron los valores en blanco para cada línea celular para obtener un valor del nivel de GCasa activa. Las barras de error representan la media \pm DE de pocillos duplicados.

Figura 11: (A) Farmacocinética de la terapia enzimática sustitutiva (VPRIV® (60 U/kg)) y cálculo de la semivida en ratones naturales. Ecuación del modelo de decaimiento en una fase: Y0 es el valor Y cuando X (tiempo) es cero. Meseta es el valor Y en tiempos infinitos. K es la constante de velocidad. Tau es la constante de tiempo. La

semivida es en las unidades de tiempo del eje X. Alcance es la diferencia entre Y0 y Meseta. (B) Comparación entre el perfil farmacocinético sérico de la actividad GCasa tras una única inyección de terapia enzimática sustitutiva (VPRIV (60 U/kg), negro sólido) y terapia génica con FLF-PL64, tras su administración en ratones naturales.

Figura 12: Inmunotinción de GCasa en hígado, bazo y hueso murinos tras la administración de VPRIV o FLF-PL64. Se usó DAB (3,3'-diaminobencidina) para visualizar la GCasa y hematoxilina como contratinción. Las muestras de FLF-PL64 se obtuvieron cinco semanas después de la inyección, mientras que las muestras tratadas con VPRIV se recogieron en el momento marcado. Cada imagen representa n=5, ratones C57BL/6 para cada grupo de tratamiento. Todas las imágenes están al mismo aumento.

Figura 13: Aumento en la actividad de la GCasa observado en el hígado de ratones $gba^{9v/nulo}$ (a), glóbulos blancos (b), bazo (c) y médula ósea (d) tras la administración de velaglucerasa alfa (VPRIV®) (marcado ERT) o AAV-GBA (AAV-FLF-PL64). Las muestras de ERT se recogieron 1-2 horas después de la última inyección correspondiente al pico de captación en los tejidos. Las muestras de AAV-GBA (AAV-FLF-PL64) se recogieron 12 semanas después de la inyección y corresponden a los niveles de captación en estado estacionario. La actividad de la GCasa se representa como porcentaje de la actividad medida en ratones sanos naturales (a las 20 semanas de edad). Todos los ratones fueron tratados a la edad de 8 semanas antes de la sintomatología abierta. ERT a dosis de 60 U/kg y administrada mediante inyección cada dos semanas; AAV-FLF-PL64 inyectado a dosis de 2×10^{12} gv/kg. n=10. **** P ≤ 0.0001

Figura 14: La terapia génica AAV-GBA (AAV-FLF-PL64) reduce los macrófagos activados y la inflamación en el hígado de ratones $gba^{9v/nulo}$. Panel superior: secciones hepáticas teñidas con H&E mostrando una imagen representativa de cada grupo. Las células de almacenamiento se identifican con círculos. Panel inferior izquierdo: gráfico que muestra la comparación entre las células de almacenamiento contadas en los grupos tratados con AAV-FLF-PL64 y ERT en comparación con los grupos de control con vehículo. Panel inferior derecho: gráfico que muestra el recuento de células CD68 positivas en los grupos tratados con AAV-FLF-PL64 y ERT en comparación con los grupos de control con vehículo tras la tinción con anticuerpo anti-CD68. AAV-GBA (AAV-FLF-PL64) se inyectó a dosis de 2×10^{12} gv/kg; las muestras se recogieron a las 12 semanas p.i. ERT a dosis de 60 U/kg y administrada por inyección cada dos semanas. Las muestras de ERT se recogieron 1-2 horas después de la última inyección. Media ± EEM, (n=10), ** P ≤ 0,005, **** P ≤ 0,0005

Figura 15: La terapia génica con AAV-GBA (AAV-FLF-PL64) muestra una mejor eliminación del sustrato que la velaglucerasa alfa (VPRIV®, marcado ERT) en ratones $gba^{9v/nulo}$. Análisis de CL/EM de los niveles de hexosilceramida y hexosilesfingosina en hígado, bazo y médula ósea en los grupos tratados con AAV-FLF-PL64 y ERT. Los niveles se normalizaron con respecto a los niveles medidos en el grupo de control con vehículo. AAV-GBA (AAV-FLF-PL64) inyectado a dosis de 2×10^{12} gv/kg; muestras recogidas 12 semanas p.i.; ERT a dosis de 60 U/kg y administrado por inyección cada dos semanas. Las muestras de ERT se recogieron 1-2 horas después de la última inyección. Media ± EEM, (n=10), ** P ≤ 0,005, **** P ≤ 0,0005

Descripción detallada

Definiciones generales

A menos que se definan de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

En general, el término "*que comprende*" pretende significar que incluye, pero no se limita a. Por ejemplo, la frase "*un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA*" se debe interpretar que significa que el polinucleótido tiene una secuencia de nucleótidos de GBA, pero el polinucleótido puede contener nucleótidos adicionales.

En algunas realizaciones de la invención, la palabra "*que comprende*" se sustituye por la expresión "*que consiste en*". El término "*que consiste en*" pretende ser limitante. Por ejemplo, la frase "*un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de GBA*" debe entenderse en el sentido de que el polinucleótido tiene una secuencia de nucleótidos de GBA y ningún nucleótido adicional.

Como se usa en el presente documento, "*entre*", cuando se refiere a dos puntos finales para definir un intervalo de valores, debe entenderse que significa "*entre e incluyendo*". Así, un intervalo definido como "*entre 5 y 10*" incluye todos los valores mayores que 5 y menores que 10, así como los propios valores discretos 5 y 10.

Los términos "*proteína*" y "*polipéptido*" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos de cualquier longitud.

A los efectos de la presente invención, para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias (tales como dos secuencias de polinucleótidos o dos secuencias de polipéptidos), las secuencias se alinean con fines de

comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una primera secuencia para una alineación óptima con una segunda secuencia). A continuación, se comparan los residuos de nucleótidos o aminoácidos en cada posición. Cuando una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de nucleótido o aminoácido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces los nucleótidos o aminoácidos son idénticos en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas / número total de posiciones en la secuencia de referencia × 100).

Normalmente, la comparación de secuencias se lleva a cabo a lo largo la longitud de la secuencia de referencia. Por ejemplo, si el usuario desea determinar si una secuencia dada ("de prueba") es idéntica en un 95 % a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 1 sería la secuencia de referencia. Por ejemplo, para evaluar si una secuencia es al menos 80 % idéntica a SEQ ID NO: 1 (un ejemplo de secuencia de referencia), el experto llevaría a cabo un alineamiento a lo largo de la longitud de SEQ ID NO: 1, e identificaría cuántas posiciones en la secuencia de prueba son idénticas a las de SEQ ID NO: 1. Si al menos el 80 % de las posiciones son idénticas, la secuencia de prueba es al menos 80 % idéntica a SEQ ID NO: 1. Si la secuencia es más corta que SEQ ID NO: 1, los huecos o las posiciones que faltan deben considerarse posiciones no idénticas.

El experto conoce diferentes programas informáticos que están disponibles para determinar la homología o identidad entre dos secuencias. Por ejemplo, puede realizarse una comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias usando un algoritmo matemático. En una realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG de Accelrys (disponible en <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), usando una matriz Blosum 62 o una matriz PAM250, y un peso por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

A efectos de la presente invención, el término "*fragmento*" se refiere a una porción contigua de una secuencia. Por ejemplo, un fragmento de SEQ ID NO: 1 de 50 nucleótidos se refiere a 50 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1.

Un polinucleótido

En un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA, en donde la secuencia de nucleótidos de GBA codifica una proteína β-glucocerebrosidasa (GCasa) o fragmento de la misma y en donde al menos una porción de la secuencia de nucleótidos de GBA no es natural.

El polinucleótido puede comprender además una o más de las siguientes características. La secuencia de nucleótidos de GBA, o porción de la secuencia de nucleótidos de GBA que no es natural, puede estar optimizada para el codón. El polinucleótido puede comprender (adicionalmente) una porción que no esté optimizada para el codón. El polinucleótido puede comprender un intrón o un fragmento de un intrón.

El término "*polinucleótido*" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de los mismos. Por ejemplo, el polinucleótido puede comprender ADN (desoxirribonucleótidos) o ARN (ribonucleótidos). El polinucleótido puede consistir en ADN. El polinucleótido puede ser ARNm. Dado que el polinucleótido puede comprender ARN o ADN, todas las referencias a nucleótidos T (timina) pueden sustituirse por U (uracilo).

Una secuencia de nucleótidos de GBA que codifica la GCasa

En un aspecto, el polinucleótido proporcionado en el presente documento comprende una secuencia de nucleótidos de GBA. La secuencia de nucleótidos de GBA codifica normalmente la proteína β-glucocerebrosidasa (GCasa) o un fragmento de la misma.

El término "*secuencia que codifica*" se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende un marco de lectura abierto que comprende codones que codifican el polipéptido codificado. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína GCasa o un fragmento de la misma comprende codones que codifican la secuencia de aminoácidos de una proteína GCasa o un fragmento de la misma. Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos de GBA que codifica una proteína GCasa natural se proporciona en SEQ ID NO: 9.

Una secuencia de nucleótidos de GBA puede estar interrumpida por nucleótidos no codificantes (por ejemplo, un intrón), pero únicamente los nucleótidos que codifican el polipéptido deben considerarse parte de la secuencia de nucleótidos de GBA. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de GBA que codifica una proteína GCasa comprenderá cualquier codón que codifique un aminoácido que forme parte de la proteína GCasa que se expresa a partir de esa secuencia codificante, independientemente de si esos codones son contiguos en secuencia o están separados por uno o más nucleótidos no codificantes. En otras palabras, se considerará que un polinucleótido de GBA que contiene tramos de nucleótidos codificantes interrumpidos por un tramo de nucleótidos no codificantes comprende una "*secuencia de nucleótidos de GBA*" que consiste en los tramos codificantes no contiguos inmediatamente yuxtapuestos (es decir, menos el tramo no codificante). Sin embargo, en el presente documento, el

codón de parada se considerará parte de la secuencia codificante de longitud completa.

5 Una secuencia de nucleótidos de GBA que codifica GCasa y/o una secuencia codificante de GCasa como se describen en el presente documento también pueden incluir codones para un péptido señalizador. Es bien sabido que algunas proteínas, particularmente aquellas que se exportan a diferentes tejidos, se expresan con un péptido
 10 señalizador. Los péptidos señalizadores pueden estar en el extremo N de una secuencia de proteína (y en este caso en el extremo 5' de una secuencia codificante) y muchos péptidos señalizadores se escinden tras el procesamiento celular. Por lo tanto, en el presente documento, una proteína o polipéptido maduro (tal como una proteína o polipéptido GCasa maduro) se considerará que es la proteína o polipéptido resultante después de que el péptido
 15 señalizador se haya procesado y eliminado/escindido (y, por lo tanto, ya no forme parte de la secuencia de polipéptidos).

La siguiente Tabla describe los codones que codifican cada aminoácido:

Aminoácidos	Codón	Aminoácidos	Codón	Aminoácidos	Codón
Fenilalanina	TTC TTT	Prolina	CCT CCC CCA CCG	Asparagina	AAT AAC
Leucina	TTA TTG CTT CTC CTA CTG	Treonina	ACT ACC ACA ACG	Lisina	AAA AAG
Isoleucina	ATT ATC ATA	Alanina	GCT GCC GCA GCG	Ácido aspártico	GAT GAC
Metionina	ATG	Tirosina	TAT TAC	Ácido glutámico	GAA GAG
Valina	GTT GTC GTA GTG	Histidina	CAT CAC	Cisteína	TGT TGC
Serina	TCT TCC TCA TCG AGT AGC	Glutamina	CAA CAG	Triptófano	TGG
Arginina	CGT CGC CGA CGG AGA AGG	Glicina	GGT GGC GGA GGG		

15 Los codones de ARN correspondientes contendrán U en lugar de T de la Tabla anterior.

20 Se describe en el presente documento un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA, en donde la secuencia de nucleótidos de GBA codifica una proteína GCasa o un fragmento de la misma y comprende una secuencia que es al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a un fragmento de al menos 1000, al menos 1200, al menos 1300, menos de 1494, menos de 1611, entre 1000 y 1494, entre 1000 y 1611, entre 1300 y 1494, entre 1300 y 1611, o aproximadamente 1494 nucleótidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1-8. Opcionalmente, toda o una porción de la
 25 secuencia de nucleótidos de GBA está optimizada para el codón. La secuencia de nucleótidos de GBA puede comprender una secuencia que es al menos 98 % idéntica a un fragmento de al menos 1300 nucleótidos de SEQ ID NO: 1-8. La secuencia de nucleótidos de GBA puede comprender una secuencia que es al menos 99 %

idéntica a un fragmento de al menos 1300 nucleótidos de SEQ ID NO: 1-8.

En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos de GBA puede comprender una secuencia que es al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 1. En una realización, la secuencia de nucleótidos de GBA comprende una secuencia que es al menos 98 % idéntica a un fragmento de al menos 1300 nucleótidos de SEQ ID NO: 1. En una realización, la secuencia de nucleótidos de GBA comprende una secuencia que es al menos 99 % idéntica a un fragmento de al menos 1300 nucleótidos de SEQ ID NO: 1. La secuencia de nucleótidos de GBA puede comprender una secuencia que es al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 %, o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 5. La secuencia de nucleótidos de GBA puede comprender una secuencia que es al menos 98 % idéntica a SEQ ID NO: 1. La secuencia de nucleótidos de GBA puede comprender una secuencia que es al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1. La secuencia de nucleótidos de GBA puede comprender una secuencia que es al menos 98 % idéntica a SEQ ID NO: 5. La secuencia de nucleótidos de GBA puede comprender una secuencia que es al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 5. En una realización, la secuencia de nucleótidos de GBA puede comprender SEQ ID NO: 1. En otra realización, la secuencia de nucleótidos de GBA puede comprender SEQ ID NO: 5.

La secuencia de nucleótidos de GBA puede comprender una secuencia de SEQ ID NO: 1 o una variante de SEQ ID NO: 1 que codifica una proteína GCasa que tiene actividad de la GCasa. En estos ejemplos, una variante de SEQ ID NO: 1 es idéntica a SEQ ID NO: 1, excepto que comprende sustituciones de nucleótidos de tal manera que la proteína GCasa tiene 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, o hasta 10 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25. En estos ejemplos, la variante de SEQ ID NO: 1 puede tener 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, hasta 10, hasta 20, o hasta 30 sustituciones de nucleótidos con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1. La variante de SEQ ID NO: 1 puede tener 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, o hasta 6 sustituciones de nucleótidos con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1. En un ejemplo, la variante de SEQ ID NO: 1 tiene hasta 4 sustituciones de nucleótidos con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 y/o codifica una proteína GCasa que tiene hasta 3 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25. En un ejemplo, la variante de SEQ ID NO: 1 tiene hasta 3 sustituciones de nucleótidos con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 y/o codifica una proteína GCasa que tiene hasta 2 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25. En un ejemplo, la variante de SEQ ID NO: 1 tiene 1 sustitución de nucleótidos con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 y/o codifica una proteína GCasa que tiene hasta 1 sustitución de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25.

La secuencia de nucleótidos de GBA puede comprender una secuencia de SEQ ID NO: 5 o una variante de SEQ ID NO: 5 que codifica una proteína GCasa que tiene actividad de la GCasa. En estos ejemplos, una variante de SEQ ID NO: 5 es idéntica a SEQ ID NO: 5, excepto que comprende sustituciones de nucleótidos de tal manera que la proteína GCasa tiene 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, o hasta 10 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25. En estos ejemplos, la variante de SEQ ID NO: 5 puede tener 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, hasta 10, hasta 20, o hasta 30 sustituciones de nucleótidos con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 5. La variante de SEQ ID NO: 5 puede tener 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, o hasta 6 sustituciones de nucleótidos con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 5. En un ejemplo, la variante de SEQ ID NO: 5 tiene hasta 4 sustituciones de nucleótidos con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 5 y/o codifica una proteína GCasa que tiene hasta 3 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25. En un ejemplo, la variante de SEQ ID NO: 5 tiene hasta 3 sustituciones de nucleótidos con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 5 y/o codifica una proteína GCasa que tiene hasta 2 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25. En un ejemplo, la variante de SEQ ID NO: 5 tiene 1 sustitución de nucleótidos con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 5 y/o codifica una proteína GCasa que tiene hasta 1 sustitución de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25.

Proteína GCasa o fragmento de la misma

El polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos de GBA que codifica una proteína GCasa o un fragmento de la misma.

La β -glucocerebrosidasa (GCasa) es una enzima con actividad de glucosilceramidasa (EC 3.2.1.45) que hidroliza el enlace beta-glucosídico del glucocerebrósido químico, un producto intermedio en el metabolismo de los glucolípidos que abunda en las membranas celulares. Las mutaciones en el gen GBA (que codifica la GCasa) pueden conducir a una acumulación de glucocerebrósidos en los macrófagos que se infiltran en muchos órganos vitales, lo que se manifiesta como la enfermedad de Gaucher (EG). Un polipéptido de GCasa natural típico está codificado por SEQ ID NO: 9.

La GCasa (por ejemplo, una GCasa de SEQ ID NO: 25 codificada por SEQ ID NO: 9) se expresa inicialmente como una forma precursora "inmadura", que comprende un péptido señalizador (residuos de aminoácidos 1 a 39 de

SEQ ID NO: 25 y codones 1 a 39 de SEQ ID NO: 9), y una región polipeptídica de GCasa madura. Tras el procesamiento, la forma "*madura*" de la GCasa carece del péptido señalizador. El término "*GCasa madura*" o "*polipéptido de GCasa maduro*" se refiere a un polipéptido de GCasa que no comprende el péptido señalizador, tal como una GCasa codificada por SEQ ID NO: 1-4. Un péptido señalizador de GCasa típico es un péptido señalizador de GCasa maduro. Un péptido señalizador de GCasa típico puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17 y tener la secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 18.

La GCasa o fragmento de la misma puede ser una variante de la GCasa o fragmento de la misma, es decir, una GCasa que no tiene una secuencia idéntica a SEQ ID NO: 25. En una realización, la GCasa o fragmento de la misma que está codificada por un polipéptido de la presente invención y/o por una secuencia de nucleótidos de GBA es al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 %, o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 25; o al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a un fragmento de SEQ ID NO: 25 de al menos 300, al menos 350, al menos 400, inferior o igual a 536, inferior o igual a 497, entre 300 y 536, o entre 300 y 497 aminoácidos de longitud. En una realización, la proteína GCasa o fragmento de la misma es al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 25; o al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a un fragmento de SEQ ID NO: 25 de aproximadamente 497 aminoácidos de longitud. La proteína GCasa o fragmento de la misma puede tener una secuencia de SEQ ID NO: 25. Preferiblemente, la proteína GCasa o un fragmento de la misma no comprende el péptido señalizador de SEQ ID NO: 18. Preferiblemente, la proteína GCasa o fragmento de la misma es funcional. Una proteína o fragmento de GCasa funcional es aquella que lleva a cabo la hidrólisis del glucocerebrósido.

La secuencia de nucleótidos de GBA puede codificar una proteína GCasa que tiene 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, o hasta 5 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25. En dichos ejemplos, la secuencia de nucleótidos de GBA puede codificar una proteína GCasa que tiene hasta 3 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25. La secuencia de nucleótidos de GBA puede codificar una proteína GCasa que tiene hasta 2 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25. La secuencia de nucleótidos de GBA puede codificar una variante proteína GCasa que tiene hasta 1 sustitución de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25.

Está dentro de las capacidades del experto en la técnica determinar si una proteína GCasa o fragmento codificado por una secuencia de nucleótidos de GBA es funcional. El experto únicamente necesita expresar la secuencia de nucleótidos GCasa y comprobar si la proteína expresada es activa. Por ejemplo, el experto podría preparar una partícula vírica de la invención que comprenda una secuencia de nucleótidos de GBA unida a un promotor operable, y transducir células con la partícula vírica en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína GCasa o fragmento de la misma. La actividad (cantidad) de la proteína GCasa expresada o fragmento de la misma puede analizarse mediante un ensayo fluorométrico, como el "*ensayo de actividad GBA en suero*" descrito en el Ejemplo 1.

Por ejemplo, un ensayo fluorogénico adecuado es el siguiente. Se puede determinar fluorométricamente la actividad de la β -glucocerebrosidasa (β -glucosidasa ácida; GCasa) con 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (4MU-Glc) como sustrato. Brevemente, las muestras de suero (0,5 μ l, diluidas 1:50) pueden ensayarse en citrato de sodio 50 mM, taurocolato 25 mM, pH -5,75, 4MU-Glc 6 mM, durante 30 min a 37 °C. A continuación, se pueden evaluar los niveles relativos de fluorescencia (URF) usando longitudes de onda de excitación y emisión de 365 nm y 445 nm, respectivamente. La GCasa se expresa como nanomoles/h/ml de suero basándose en una curva patrón de 4-metilumbeliferona (4-MU).

Una porción de la secuencia de nucleótidos de GBA no es natural

Una porción de la secuencia de nucleótidos de GBA, por ejemplo, la secuencia codificante que codifica la proteína GCasa o un fragmento de la misma, puede no ser natural. La secuencia de nucleótidos de GBA codificante de GCasa natural está representada por SEQ ID NO: 9, y una secuencia de nucleótidos de GBA que comprende una porción que difiere en secuencia de la de SEQ ID NO: 9 comprende una porción que no es natural.

En una realización, la porción de la secuencia de nucleótidos de GBA que no es natural está optimizada para el codón. La optimización para el codón puede mejorar la expresión de la secuencia de nucleótidos, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de GBA, en un tejido particular y/o en un organismo particular. Por ejemplo, si una secuencia de nucleótidos se optimiza para el codón para su expresión en el hígado humano, la secuencia de nucleótidos se modifica para aumentar el número de codones que pueden verse favorecidos (en el sentido de que dichos codones corresponden a especies de ARNt que son más abundantes que otras especies de ARNt específicas para el mismo aminoácido) en el hígado humano. El experto apreciaría que la optimización para el codón de una secuencia puede no implicar el cambio de cada codón, entre otras cosas porque un "*codón favorecido*" puede estar ya presente en algunas posiciones.

Dicha optimización para el codón puede estar sujeta a otros factores. Por ejemplo, se puede observar que la presencia de CpG tiene un efecto adverso en la expresión y entonces el usuario puede decidir no usar codones

favorecidos en posiciones donde al hacerlo se introducen CpG en la secuencia; esto seguirá considerándose optimización para el codón. En una realización, un codón favorecido que termine con un nucleótido C no se incluirá en la porción de la secuencia codificante que está optimizada para el codón, donde el siguiente codón en la secuencia comienza con una G. Por ejemplo, el codón CTC codifica leucina. En los esquemas donde CTC es un codón favorecido, no debe usarse para codificar leucina donde el siguiente codón de la secuencia comienza con una G, tal como el codón GTT (o alternativamente, el siguiente codón, cuando sea posible, podría seleccionarse para evitar una G en la primera posición).

Es sencillo determinar la frecuencia de cada codón usado en una porción de una secuencia de nucleótidos. El experto únicamente necesita introducir la secuencia de esa porción en uno de los algoritmos disponibles que analizan el uso de codones y revisar los resultados. Alternativamente, el usuario podría simplemente contarlos.

En una realización, un polinucleótido de la invención comprende una secuencia de nucleótidos de GBA en donde el 67 % de los codones que codifican histidina son CAC y el 33 % de los codones que codifican histidina son CAT.

Opcionalmente, la porción de la secuencia de nucleótidos de GBA que está optimizada para el codón está optimizada para el codón para la expresión en células hepáticas humanas. Opcionalmente, la secuencia de nucleótidos de GBA está optimizada para el codón para su expresión en el hígado humano. Opcionalmente, la porción de la secuencia de nucleótidos de GBA que está optimizada para el codón es una porción contigua.

La porción que está optimizada para el codón puede corresponder a una secuencia que codifica parte o la totalidad de la proteína GCasa. Por ejemplo, la secuencia codificante podría ser de longitud completa (tal como SEQ ID NO: 9), incluido el péptido señalizador que no forma parte de la proteína GCasa madura, y toda la secuencia codificante podría estar optimizada para el codón. Por lo tanto, la referencia en el presente documento a *"una porción de la secuencia GBA está optimizada para el codón"* debe entenderse que significa *"al menos una porción de la secuencia de GBA está optimizada para el codón"*. Opcionalmente, la porción de la secuencia de nucleótidos de GBA que está optimizada para el codón tiene al menos 1000, al menos 1200, al menos 1300, menos de 1600, menos de 1500, entre 1000 y 1600, entre 1000 y 1500, entre 1300 y 1500, o aproximadamente 1494 nucleótidos de longitud. Opcionalmente, la porción de la secuencia de nucleótidos de GBA que está optimizada para el codón codifica (corresponde a) una proteína GCasa madura. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de GBA puede codificar una proteína GCasa precursora (es decir, incluido el péptido señalizador), y si la porción de la secuencia de nucleótidos de GBA que está optimizada para el codón corresponde a la proteína GCasa madura, el péptido señalizador no está optimizado para el codón.

Así, en algunas realizaciones, una porción de la secuencia de nucleótidos de GBA puede no estar optimizada para el codón, por ejemplo, una porción de la secuencia codificante no está optimizada para el codón para la expresión en el hígado. En algunas realizaciones, la porción que no está optimizada para el codón es de al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 110, menos de 200, menos de 170, menos de 140, o aproximadamente 117 nucleótidos. En algunas realizaciones, la porción que no está optimizada para el codón en una secuencia de nucleótidos de GBA es la porción que codifica el péptido señalizador.

Como se ha tratado anteriormente, proporcionar una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA que está parcial o totalmente optimizada para el codón puede garantizar que el polipéptido codificado (es decir, un polipéptido de GCasa) se exprese a un alto nivel. Se apreciará por un experto en la materia que la expresión de GCasa a partir de una secuencia de polinucleótidos, tal como una secuencia de nucleótidos de GBA de la presente invención, o a partir de una partícula vírica de la presente invención, requiere generalmente la presencia de una secuencia o región promotora aguas arriba de y/u operativamente unida a la secuencia de polinucleótidos. Así, en una realización, la presente invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA, en donde la secuencia de nucleótidos de GBA codifica un polipéptido GCasa que se expresa en células hepáticas humanas a altos niveles cuando la secuencia de nucleótidos de GBA está unida operativamente a una secuencia promotora. En algunas realizaciones, la secuencia promotora puede formar parte de un elemento regulador transcripcional. En algunas realizaciones, la secuencia promotora puede ser una secuencia promotora específica del hígado. En una realización, la secuencia promotora es un promotor que tiene SEQ ID NO: 12. En otra realización, la secuencia promotora es un promotor que tiene SEQ ID NO: 15.

También se apreciará por un experto en la materia que haciendo comparaciones entre polinucleótidos o vectores de la invención y polinucleótidos o vectores de referencia (comparador), tales como un polinucleótido de referencia o una partícula vírica que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA de SEQ ID NO: 9, los polinucleótidos o vectores de referencia pueden ser idénticos a los polinucleótidos o vectores de la invención, excepto que las secuencias de nucleótidos de GBA son diferentes. En otras palabras, las diferentes secuencias de nucleótidos de GBA que se comparan pueden estar unidas operativamente a la misma secuencia promotora. En algunas realizaciones, las diferentes secuencias de nucleótidos de GBA que se están probando pueden estar unidas operativamente a diferentes secuencias promotoras (especificadas).

Así, en una realización, un polipéptido de GCasa codificado por la secuencia de nucleótidos de GBA se expresa en células hepáticas humanas a niveles más altos en comparación con una secuencia GBA natural de referencia. La

secuencia de nucleótidos de GBA natural de referencia puede ser SEQ ID NO: 9. En una realización, un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de GBA se expresa en células hepáticas humanas a niveles más altos en comparación con un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA de SEQ ID NO: 9 y un elemento promotor de SEQ ID NO: 13 (en donde la secuencia de nucleótidos de GBA de SEQ ID NO: 9 y el elemento promotor de SEQ ID NO: 13 están preferiblemente unidos operativamente). En una realización, un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de GBA se expresa en células hepáticas humanas a niveles más altos en comparación con un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA de SEQ ID NO: 9 y un elemento regulador de la transcripción de SEQ ID NO: 10 (en donde la secuencia de nucleótidos de GBA de SEQ ID NO: 9 y el elemento promotor de SEQ ID NO: 10 están preferiblemente unidos operativamente). En dichas realizaciones, la GCasa codificada por la secuencia de nucleótidos de GBA puede expresarse en células hepáticas humanas al menos 1,1x, al menos 1,2x, al menos 1,3x, al menos 1,4x o al menos 1,5x más. En una realización, un polipéptido de GCasa codificado por la secuencia de nucleótidos de GBA se expresa en células hepáticas humanas a niveles diferentes más altos o no estadísticamente significativos en comparación con un polipéptido codificado por un polinucleótido de referencia por lo demás idéntico que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA de SEQ ID NO: 9 unida operativamente a un promotor de SEQ ID NO: 13, en donde los dos polinucleótidos se administran a las células de la misma forma y en las mismas cantidades.

En una realización, cuando la secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA se administra a un sujeto, o a un mamífero no humano, tal como un ratón, la GCasa está presente en el suero del sujeto o del animal no humano a niveles más altos (por ejemplo, a las 4, 8 o 12 semanas después de la administración) en comparación con la GCasa codificada por una secuencia de nucleótidos idéntica que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA de SEQ ID NO: 9 unida operativamente a un elemento promotor de SEQ ID NO: 12, 13 o 15, en donde los polinucleótidos que comprenden el nucleótido de GBA se administran de la misma forma y en las mismas cantidades.

El experto puede determinar si la GCasa se expresa a partir de una secuencia de nucleótidos de GBA dada (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón) a niveles más altos en comparación con una secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de GBA natural, tal como SEQ ID NO: 9) transduciendo algunas células con una partícula vírica que comprende la secuencia de nucleótidos de GBA, y algunas células con una partícula que comprende la secuencia de referencia. Las células pueden cultivarse en condiciones adecuadas para expresar la proteína GCasa o el fragmento de la misma codificado por la secuencia de nucleótidos de GBA, y puede compararse el nivel de proteína GCasa expresada. El nivel de proteína GCasa expresada puede evaluarse usando un ensayo fluorométrico como el descrito en la sección titulada "*Proteína GCasa o fragmento de la misma*", o un ELISA usando un anticuerpo específico de la GCasa. Las células adecuadas incluyen células hepáticas humanas cultivadas, como las células Huh-7.

Como se ha tratado anteriormente, la presencia de CpG (es decir, dinucleótidos CG) puede reducir la eficiencia de la expresión. Esto se debe a que los CpG pueden estar metilados, y su metilación puede provocar el silenciamiento del gen, reduciendo así la expresión. Además, es posible que un alto contenido de CpG pueda desencadenar una respuesta TLR, aumentando el riesgo de una respuesta inmunitaria anti-AAV. Por esta razón, se prefiere que la porción de la secuencia codificante que está optimizada para el codón comprenda un número reducido de CpG en comparación con una porción correspondiente de una secuencia de nucleótidos de GBA natural de referencia (tal como SEQ ID NO: 9). En una realización, la porción de la secuencia de nucleótidos de GBA que está optimizada para el codón (que puede ser toda la secuencia de nucleótidos de GBA) comprende menos de 40, menos de 20, menos de 10 o menos de 5 CpG. En una realización, la porción de la secuencia de nucleótidos de GBA que está optimizada para el codón (que puede ser toda la secuencia de nucleótidos de GBA) comprende menos de 5, menos de 4, menos de 3 o menos de 2 CpG por 100 nts. En algunas realizaciones, la parte de la secuencia codificante que está optimizada para el codón está libre de CpG, es decir, no contiene (0) dinucleótidos CG.

En una realización, la porción de la secuencia de nucleótidos de GBA que está optimizada para el codón es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 %, o 100 % idéntica a un fragmento de al menos 1000, al menos 1200, al menos 1300, inferior a 1494, entre 1000 y 1494, entre 1300 y 1494, o aproximadamente 1494 nucleótidos de SEQ ID NO: 1-4. En una realización, la porción de la secuencia codificante es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 1-4. En una realización, la porción de la secuencia de nucleótidos de GBA que está optimizada para el codón es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a un fragmento de al menos 1000, al menos 1200, al menos 1300, inferior a 1494, entre 1000 y 1494, entre 1300 y 1494, o aproximadamente 1494 nucleótidos de SEQ ID NO: 1. En una realización, la porción de la secuencia de nucleótidos de GBA que está optimizada para el codón es al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a un fragmento de al menos 1300 nucleótidos de SEQ ID NO: 1. En una realización, la porción de la secuencia codificante que está optimizada para el codón es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 1

La presente invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA que codifica una proteína GCasa o un fragmento de la misma y la secuencia GBA comprende una secuencia que es al

menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, la secuencia que es al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,8 % idéntica a SEQ ID NO: 1 está optimizada para el codón.

5 *Porción de la secuencia codificante que no está optimizada para el codón*

En una realización, la secuencia de nucleótidos de GBA comprende una porción que no está optimizada para el codón. La porción que no está optimizada para el codón puede ser una porción contigua.

10 Como se entendería en la técnica, la porción que no está optimizada para el codón no se modifica, por lo tanto, para incluir un mayor número de codones favorecidos en comparación con la secuencia natural. Una secuencia de polinucleótidos contigua no optimizada para el codón es una secuencia natural.

15 Opcionalmente, la porción que no está optimizada para el codón tiene al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 110, menos de 200, menos de 170, menos de 140, o aproximadamente 117 nucleótidos. En algunas realizaciones, la porción que no está optimizada para codón en una secuencia de nucleótidos de GBA es la porción que codifica (corresponde a) todo o una porción del péptido señalizador. Opcionalmente, la porción que no está optimizada para el codón codifica todo o una porción de un péptido señalizador de GCase. En algunas realizaciones, la porción que no está optimizada para codón en una secuencia de nucleótidos de GBA es una porción que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17.

El polinucleótido puede comprender además un elemento regulador de la transcripción

25 El polinucleótido puede comprender un elemento regulador de la transcripción.

30 En una realización, el elemento regulador de la transcripción es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 10. En una realización, el polinucleótido comprende un elemento regulador de la transcripción que es al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 10. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un elemento regulador de la transcripción al menos 98 % idéntico a SEQ ID NO: 10. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un elemento regulador de la transcripción de SEQ ID NO: 10. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un elemento regulador de la transcripción que consiste en SEQ ID NO: 10.

35 En otra realización, el elemento regulador de la transcripción es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 14. En una realización, el polinucleótido comprende un elemento regulador de la transcripción que es al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 14. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un elemento regulador de la transcripción que es al menos 98 % idéntico a SEQ ID NO: 14. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un elemento regulador de la transcripción de SEQ ID NO: 14. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un elemento regulador de la transcripción que consiste en SEQ ID NO: 14.

45 Puede usarse cualquier elemento regulador de la transcripción apropiado, tal como HLP2, HLP1, LP1, HCR-haAT, ApoE-haAT y LSP, que son todos elementos reguladores de la transcripción específicos del hígado. Estos elementos reguladores de la transcripción se describen con más detalle en las siguientes referencias: HLP1: McIntosh J. et al., Blood, 23 de abril de 2013, 121(17):3335-44; LP1: Nathwani et al., Blood. 1 de abril de 2006, 107(7): 2653-2661; HCR-haAT: Miao et al., Mol Ther. 2000;1: 522-532; ApoE-haAT: Okuyama et al., Human Gene Therapy, 7, 637-645 (1996); y LSP: Wang et al., Proc Natl Acad Sci USA. 30 de marzo de 1999, 96(7): 3906-3910.

50 El elemento regulador de la transcripción puede comprender un promotor y/o un potenciador, tal como el elemento promotor y/o el elemento potenciador de HLP2, HLP1, LP1, HCR-haAT, ApoE-haAT y LSP. Cada uno de estos elementos reguladores de la transcripción comprende un promotor, un potenciador y, opcionalmente, otros nucleótidos.

55 En una realización, el elemento regulador de la transcripción comprende un potenciador que es la región de control del locus hepático de la apolipoproteína E (ApoE) humana (HCR; Miao et al (2000), Molecular Therapy 1(6):522), o un fragmento de la misma. En una realización, el elemento regulador de la transcripción comprende un fragmento del potenciador HCR que es un fragmento de al menos 80, al menos 90, al menos 100, menos de 192, entre 80 y 192, entre 90 y 192, entre 100 y 250, o entre 117 y 192 nucleótidos de longitud. Opcionalmente, el fragmento del potenciador HCR tiene entre 100 y 250 nucleótidos de longitud. En otra realización, el fragmento de un potenciador HCR es un fragmento de al menos 150, al menos 190, al menos 230, menos de 400, entre 150 y 400, entre 190 y 370, entre 230 y 340, entre 250 y 340, o aproximadamente 321 nucleótidos de longitud. Opcionalmente, el fragmento del potenciador HCR tiene entre 250 y 340 nucleótidos de longitud.

- Los fragmentos del elemento potenciador HCR adecuados se describen en SEQ ID NO: 11 y 16. Opcionalmente, el elemento regulador de la transcripción comprende un potenciador que es de al menos 80, al menos 90, al menos 100, inferior a 192, entre 80 y 192, entre 90 y 192, entre 100 y 250, o entre 117 y 192 nucleótidos de longitud y el potenciador comprende una secuencia de polinucleótidos que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 11. Opcionalmente, el elemento regulador de la transcripción comprende un potenciador que tiene entre 117 y 192 nucleótidos de longitud y el potenciador comprende una secuencia de polinucleótidos que es al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 11. Opcionalmente, el elemento regulador de la transcripción comprende un potenciador que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a un fragmento de al menos 90, al menos 100, o al menos 110 nucleótidos de SEQ ID NO: 11. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un potenciador que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 11. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un potenciador que es al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 11. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un potenciador de SEQ ID NO: 11. Opcionalmente, el elemento regulador de la transcripción comprende un fragmento de un potenciador HCR que es de igual o inferior a 321 nucleótidos, igual o inferior a 192 nucleótidos o igual a o inferior a 117 nucleótidos de longitud y comprende SEQ ID NO: 11.
- En otra realización, el elemento regulador de la transcripción comprende un potenciador que es de al menos 150, al menos 190, al menos 230, inferior a 400, entre 150 y 400, entre 190 y 370, entre 230 y 340, entre 250 y 340, o aproximadamente 318 nucleótidos de longitud y el potenciador comprende una secuencia de polinucleótidos que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica SEQ ID NO: 16. Opcionalmente, el elemento regulador de la transcripción comprende un potenciador que es entre 250 y 340 nucleótidos de longitud y el potenciador comprende una secuencia de polinucleótidos que es al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 16. Opcionalmente, el elemento regulador de la transcripción comprende un potenciador que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a un fragmento de al menos 250 nucleótidos de SEQ ID NO: 16.
- En una realización, el elemento regulador de la transcripción comprende un promotor que es un promotor de alfa-1 antitripsina humana (A1AT; Miao et al. (2000), Molecular Therapy 1(6):522), o un fragmento del mismo. Opcionalmente, un fragmento de un promotor A1AT que tiene al menos 100, al menos 120, al menos 150, al menos 180, menos de 255, entre 100 y 255, entre 150 y 225, entre 150 y 300, o entre 180 y 255 nucleótidos de longitud. Opcionalmente, el fragmento de un promotor A1AT tiene entre 150 y 300 nucleótidos de longitud. En otra realización, un fragmento de un promotor de A1AT que tiene al menos 200, al menos 250, al menos 300, menos de 500, entre 200 y 500, entre 250 y 500, o entre 350 y 450 nucleótidos de longitud. Opcionalmente, el fragmento de un promotor A1AT tiene entre 350 y 450 nucleótidos de longitud.
- Los fragmentos promotores A1AT adecuados se describen en SEQ ID NO: 12 y 15. Opcionalmente, el elemento regulador de la transcripción comprende un promotor que es al menos 100, al menos 120, al menos 150, al menos 180, inferior a 255, entre 100 y 255, entre 150 y 300, o entre 180 y 255 nucleótidos de longitud y el promotor comprende una secuencia de polinucleótidos que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 12. Opcionalmente, el elemento regulador de la transcripción comprende un promotor que es entre 180 y 255 nucleótidos de longitud y el promotor comprende una secuencia de polinucleótidos que es al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 12. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un promotor que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a un fragmento de al menos 100, al menos 120, o al menos 150 nucleótidos de SEQ ID NO: 12. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un promotor que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 12. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un promotor que es al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 12. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un promotor de SEQ ID NO: 12. Opcionalmente, el elemento regulador de la transcripción comprende un fragmento de un promotor A1AT que es igual a o inferior a 418 nucleótidos, igual o inferior a 255 nucleótidos, o igual o inferior a 185 nucleótidos de longitud y comprende SEQ ID NO: 12.
- En otra realización, el elemento regulador de la transcripción comprende un promotor que es al menos 200, al menos 250, al menos 300, inferior a 500, entre 200 y 500, entre 250 y 500, entre 350 y 450, o aproximadamente 418 nucleótidos de longitud y el promotor comprende una secuencia de polinucleótidos que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 15. Opcionalmente, el elemento regulador de la transcripción comprende un promotor que es entre 350 y 450 nucleótidos de longitud y el promotor comprende una secuencia de polinucleótidos que es al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 15. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un promotor que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a un fragmento de al menos 350

nucleótidos de SEQ ID NO: 15. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un promotor que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 15. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un promotor que es al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 15. Opcionalmente, el polinucleótido comprende un promotor de SEQ ID NO: 15.

Si el polinucleótido está previsto para su expresión en el hígado, el promotor puede ser un promotor específico del hígado. Opcionalmente, el promotor es un promotor específico del hígado humano. Un "*promotor específico de hígado*" es un promotor que proporciona un nivel más alto de expresión en células hepáticas en comparación con otras células en general. Por ejemplo, el experto puede determinar si un promotor es un promotor específico del hígado comparando la expresión del polinucleótido en células hepáticas (tales como células Huh-7) con la expresión del polinucleótido en células de otros tejidos. Si el nivel de expresión es mayor en las células hepáticas, en comparación con las células de otros tejidos, el promotor es un promotor específico del hígado. Opcionalmente, el elemento regulador de la transcripción o el promotor es específico del hígado si promueve la expresión de la proteína a niveles más altos en las células hepáticas en comparación con las células de al menos otro órgano o tejido y el elemento regulador de la transcripción o el promotor promueve la expresión de la proteína en las células de al menos otro órgano o tejido a un nivel inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 25 %, inferior al 15 %, inferior al 10 % o inferior al 5 % del nivel que el elemento regulador de la transcripción o el promotor promueve la expresión de la proteína en las células hepáticas. Opcionalmente, las células de al menos otro órgano o tejido son al menos una de células renales, células pancreáticas, células de mama, células de neuroblastoma, células pulmonares y linfocitos B tempranos. Opcionalmente, las células de al menos otro órgano o tejido son células renales, células pancreáticas, células de mama, células de neuroblastoma, células pulmonares y linfocitos B tempranos. Opcionalmente, las células de al menos otro órgano o tejido son al menos una de células HEK293T, células PANC1, células BxPC-3, células MCF7, células 1643, células MRC-9 y células 697. Opcionalmente, las células de al menos otro órgano o tejido son células HEK293T, células PANC1, células BxPC-3, células MCF7, células 1643, células MRC-9 y células 697.

En una realización, el polinucleótido de la invención puede hacer que la GCasa se exprese específicamente en el hígado. En dichos ejemplos, el polinucleótido puede promover sustancialmente más expresión de GCasa en células hepáticas que en al menos otro tipo de tejido u órgano. En un ejemplo, el polinucleótido de la invención que permite que la GCasa se exprese específicamente en el hígado comprende un promotor específico de hígado.

Opcionalmente, el polinucleótido de la invención puede proporcionar que la GCasa se exprese a niveles más altos en células hepáticas en comparación con células de al menos otro órgano o tejido y de tal manera que la GCasa se exprese en el otro órgano o tejido a un nivel inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 25 %, inferior al 15 %, inferior al 10 % o inferior al 5 % del nivel de expresión de GCasa en células hepáticas, cuando se mide en el mismo ensayo.

Opcionalmente, las células de al menos otro órgano o tejido son al menos una de células renales, células pancreáticas, células de mama, células de neuroblastoma, células pulmonares y linfocitos B tempranos. Opcionalmente, las células de al menos otro órgano o tejido son células renales, células pancreáticas, células de mama, células de neuroblastoma, células pulmonares y linfocitos B tempranos. Opcionalmente, las células de al menos otro órgano o tejido son al menos una de células HEK293T, células PANC1, células BxPC-3, células MCF7, células 1643, células MRC-9 y células 697. Opcionalmente, las células procedentes de al menos otro órgano o tejido son células HEK293T, células PANC1, células BxPC-3, células MCF7, células 1643, células MRC-9 y células 697.

Una partícula vírica que comprende el polinucleótido

La invención proporciona además una partícula vírica que comprende un genoma recombinante que comprende polinucleótidos de la invención. A los efectos de la presente invención, el término "*partícula vírica*" se refiere a la totalidad o parte de un virión. Por ejemplo, la partícula vírica comprende un genoma recombinante y puede comprender además una cápside. La partícula vírica puede ser un vector de terapia génica. En el presente documento, los términos "*partícula vírica*" y "*vector*" se usan indistintamente. A efectos de la presente solicitud, un vector de "*terapia génica*" es una partícula vírica que puede usarse en terapia génica, es decir, una partícula vírica que comprende todos los elementos funcionales necesarios para expresar un transgén, tal como una secuencia de nucleótidos de GBA, en una célula hospedadora tras su administración.

Las partículas víricas adecuadas incluyen un parvovirus, un retrovirus, un lentivirus o un virus del herpes simple. El parvovirus puede ser un virus adenoasociado (AAV). La partícula vírica es preferiblemente un vector vírico adenoasociado (AAV) recombinante o un vector lentivírico. Más preferiblemente, la partícula vírica es una partícula vírica AAV. Los términos AAV y rAAV se usan indistintamente en el presente documento, a menos que el contexto sugiera obviamente lo contrario.

La organización genómica de todos los serotipos conocidos de AAV es muy similar. El genoma del AAV es una molécula lineal de ADN monocatenario que tiene menos de 5.000 nucleótidos de longitud. Las repeticiones terminales invertidas (ITR) flanquean las secuencias únicas de nucleótidos codificantes para las proteínas de replicación no estructurales (Rep) y las proteínas estructurales (VP). Las proteínas VP (VP1, -2 y -3) forman la

cápside. Los -145 nt terminales (ITR) son autocomplementarios y están organizados de tal manera que se puede formar un dúplex intramolecular energéticamente estable que forma una horquilla en forma de T. Estas estructuras de horquilla funcionan como un origen para la replicación del ADN vírico, sirviendo de cebadores para el complejo de ADN polimerasa celular. Tras la infección por AAV natural (wt) en células de mamífero, los genes Rep (es decir, que codifican las proteínas Rep78 y Rep52) se expresan a partir del promotor P5 y el promotor P19, respectivamente, y ambas proteínas Rep tienen una función en la replicación del genoma vírico. Un evento de corte y empalme en el ORF Rep da lugar a la expresión de cuatro proteínas Rep (es decir, Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40). Sin embargo, se ha demostrado que el ARNm no empalmado, que codifica las proteínas Rep78 y Rep52, en células de mamíferos es suficiente para la producción de vectores AAV. También en células de insecto las proteínas Rep78 y Rep52 son suficientes para la producción de vectores AAV.

El genoma vírico recombinante de la invención puede comprender ITR. Es posible que un vector AAV de la invención funcione con una sola ITR. Así, el genoma vírico comprende al menos una ITR, pero, más normalmente, dos ITR (generalmente con una en cada extremo del genoma vírico, es decir, una en el extremo 5' y otra en el extremo 3'). Puede haber secuencias intermedias entre el polinucleótido de la invención y una o más de las ITR. El polinucleótido puede incorporarse en una partícula vírica localizada entre dos ITR regulares o localizada a ambos lados de una ITR manipulada con dos regiones D.

Las secuencias AAV que pueden usarse en la presente invención para la producción de vectores AAV pueden derivar del genoma de cualquier serotipo AAV. Generalmente, los serotipos de AAV tienen secuencias genómicas de homología significativa a los niveles de aminoácidos y ácidos nucleicos, proporcionan un conjunto idéntico de funciones genéticas, producen vírones que son esencialmente equivalentes física y funcionalmente, y se replican y ensamblan mediante mecanismos prácticamente idénticos. Para la secuencia genómica de los diversos serotipos de AAV y una visión general de las similitudes genómicas véanse, por ejemplo, GenBank número de acceso U89790; GenBank número de acceso J01901; GenBank número de acceso AF043303; GenBank número de acceso AF085716; Chiorini *et al.*, 1997; Srivastava *et al.*, 1983; Chiorini *et al.*, 1999; Rutledge *et al.*, 1998; y Wu *et al.*, 2000. Los serotipos 1, 2, 3, 3B, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 de AAV pueden usarse en la presente invención. Las secuencias de los serotipos de AAV pueden mutarse o manipularse cuando se usan en la producción de vectores de terapia génica.

Opcionalmente, un vector AAV comprende secuencias ITR derivadas de AAV1, AAV2, AAV4 y/o AAV6. Preferiblemente, las secuencias de ITR son secuencias de ITR de AAV2. En el presente documento, el término AAVx/y se refiere a una partícula vírica que comprende componentes genómicos, tales como al menos ITR de AAVx (en donde x es un número de serotipo de AAV) y tiene la cápside de AAVy (en donde y es el número del mismo serotipo o de un serotipo diferente). Por ejemplo, un vector AAV2/8 puede comprender una porción de un genoma vírico, incluidos las ITR, de una cepa AAV2, y una cápside de una cepa AAV8.

En una realización, la partícula vírica es una partícula vírica AAV que comprende una cápside. Las cápsides de AAV están formadas generalmente por tres proteínas, VP1, VP2 y VP3. La secuencia de aminoácidos de VP1 comprende la secuencia de VP2. La porción de VP1 que no forma parte de VP2 se denomina VP1única o VP1U. La secuencia de aminoácidos de VP2 comprende la secuencia de VP3. La porción de VP2 que no forma parte de VP3 se denomina VP2única o VP2U. Opcionalmente, la partícula vírica comprende una cápside hepatotrópica o CNS-trópica. Puede evaluarse si una partícula vírica (cápside) es trópica para un tejido particular, por ejemplo, administrando una partícula que exprese un gen marcador, tal como la luciferasa, y obteniendo imágenes *in vivo* en múltiples momentos (por ejemplo, como se describe en Zincarelli *et al.* (2008), *Molecular Therapy*, 16:1073-1080). Una partícula que conduzca a una fuerte expresión del marcador en los tejidos del hígado o del SNC, respectivamente, especialmente si contrasta con una menor expresión en otros tejidos, se consideraría hepatotrópica o SNC-trópica.

En algunas realizaciones, una cápside hepatotrópica puede ser una cápside derivada de AAV3 o AAV3B. Opcionalmente, la cápside hepatotrópica comprende una secuencia al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 % idéntica a un fragmento de al menos 600, al menos 650, al menos 700, entre 600 y 736, entre 650 y 736 o entre 700 y 736 aminoácidos de SEQ ID NO: 19, 20 o 24. Opcionalmente, la cápside hepatotrópica comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 19. Opcionalmente, la cápside hepatotrópica comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 20. Opcionalmente, la cápside hepatotrópica comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 24. Opcionalmente, la cápside SNC-trópica comprende una secuencia al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 % idéntica a un fragmento de al menos 600, al menos 650, al menos 700, entre 600 y 736, entre 650 y 736 o entre 700 y 736 aminoácidos de SEQ ID NO: 21. Opcionalmente, la cápside CNS-trópica comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 21. Una partícula vírica de la invención puede ser una partícula "híbrida" en la que las ITR víricas y la cápside vírica proceden de parvovirus diferentes, tales como serotipos de AAV diferentes. Preferiblemente, las ITR víricos y la cápside son de serotipos diferentes de AAV, en cuyo caso dichas partículas víricas se conocen como transcapsidadas o pseudotipadas. Del mismo modo, el parvovirus puede tener una cápside "quimérica" (por ejemplo, que contenga secuencias de diferentes parvovirus, preferiblemente diferentes serotipos de AAV) o una cápside "dirigida" (por ejemplo, un tropismo dirigido).

En algunas realizaciones, el genoma de AAV recombinante comprende ITR intactas, que comprenden sitios de resolución terminal (TRS) funcionales. Dicho genoma de AAV puede contener una o dos ITR resolubles, es decir, ITR que contienen un TRS funcional en el que puede tener lugar un mellado específico del sitio para crear un grupo hidroxilo 3' libre que puede servir de sustrato para que la ADN polimerasa desenrole y copie la ITR. Preferiblemente, el genoma recombinante es monocatenario (es decir, está encapsidado en la partícula vírica en una forma monocatenaria). Opcionalmente, el genoma recombinante no está encapsidado en configuración autocomplementaria, es decir, el genoma no comprende una única cadena de polinucleótidos unida covalentemente con porciones autocomplementarias sustanciales que se hibridan en la partícula vírica. Alternativamente, el genoma recombinante puede encapsidarse en forma de "dúplex monomérico". Los "dúplex monoméricos" se describen en el documento de patente WO 2011/122950. El genoma puede encapsidarse como dos polinucleótidos sustancialmente complementarios, pero no unidos covalentemente que se hibridan en la partícula vírica.

La partícula vírica puede comprender además una secuencia de poli A. La secuencia de poli A puede estar situada aguas abajo de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína GCasa funcional. La secuencia poli A puede ser una secuencia de poli A de hormona de crecimiento bovina (bGHpA - SEQ ID NO: 23). La secuencia de poli A puede tener entre 250 y 270 nucleótidos de longitud.

La partícula vírica puede comprender además una secuencia de intrón, como una secuencia de intrón vírico, opcionalmente una secuencia de intrón SV40 (SEQ ID NO: 22).

En una realización, la partícula vírica comprende una secuencia de polinucleótidos que comprende un elemento promotor, una secuencia de intrón, tal como una secuencia de intrón de SV40, una secuencia de nucleótidos de GBA y una secuencia de poli A, tal como la secuencia de bGHpA. En dichas realizaciones, la secuencia de intrón, tal como la secuencia de intrón de SV40, puede estar situada entre el elemento promotor y la secuencia de nucleótidos de GBA. En dichas realizaciones, la secuencia de poli A, tal como la secuencia bGHpA, puede estar situada aguas abajo de la secuencia de nucleótidos de GBA.

La partícula vírica de la invención expresa opcionalmente GCasa altamente en las células hospedadoras. Por ejemplo, en la transducción en células Huh-7, la partícula vírica de la presente invención expresa la proteína GCasa o un fragmento de la misma a un nivel más alto en comparación con una partícula vírica por lo demás idéntica que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA de SEQ ID NO: 9 transducida en una cantidad comparable en una población comparable de células Huh-7. Opcionalmente, tras la transducción en una población de células Huh-7, la partícula vírica de la presente invención expresa la proteína GCasa a un nivel más alto que una partícula vírica que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA de SEQ ID NO: 9 y un elemento regulador de transcripción de SEQ ID NO: 10 o un promotor de SEQ ID NO: 12. Opcionalmente, tras la transducción en una población de células Huh-7, la partícula vírica de la presente invención expresa la proteína GCasa a un nivel más alto que una partícula vírica comparable que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA de SEQ ID NO: 9 y un elemento regulador de la transcripción de SEQ ID NO: 10 o una secuencia promotora de SEQ ID NO: 12 transducida en una cantidad comparable en una población comparable de células Huh-7. Opcionalmente, después de la transducción en una población de células Huh-7, la partícula vírica expresa la proteína GCasa a un nivel comparable (es decir, un nivel no significativamente diferente desde el punto de vista estadístico) a una partícula vírica que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA de SEQ ID NO: 9 y un elemento promotor de SEQ ID NO: 13 transducido en una cantidad comparable en una población comparable de células Huh-7. En dichas realizaciones, el término "*partícula vírica comparable*" se refiere a una partícula vírica que es la misma que una partícula vírica AAV de la invención, excepto que la partícula vírica comparable comprende una secuencia de nucleótidos de GBA diferente y un elemento regulador de transcripción diferente. Opcionalmente, la partícula vírica comparable comprende el mismo elemento regulador de la transcripción que la partícula vírica AAV de la invención. Opcionalmente, la actividad se evalúa usando un ensayo cromogénico, tal como el ensayo fluorométrico tratado anteriormente.

En una realización, se proporciona una partícula vírica que comprende una secuencia de polinucleótidos, comprendiendo la secuencia de polinucleótidos:

- a) una secuencia de nucleótidos de GBA que tenga al menos 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, unida operativamente a:
- b) una secuencia reguladora transcripcional que tenga al menos 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 14;

en donde la partícula vírica comprende además una cápside que tiene al menos un 98 % de identidad con SEQ ID NO: 20.

En una realización, se proporciona una partícula vírica que comprende una secuencia de polinucleótidos, comprendiendo la secuencia de polinucleótidos:

- a) una secuencia de nucleótidos de GBA que tenga al menos 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, unida operativamente a:
- b) una secuencia reguladora transcripcional que tenga al menos 98 % de identidad de secuencia con

SEQ ID NO: 10;

en donde la partícula vírica comprende además una cápside que tiene al menos un 98 % de identidad con SEQ ID NO: 20.

5

Composiciones, métodos y usos

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende el polinucleótido o partícula vectorial/vírica de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden comprender portadores, diluyentes y/u otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos o adyuvantes, etc. Opcionalmente, los excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden solución salina. Opcionalmente, los excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden seroalbúmina humana.

15

La presente invención proporciona además un método para expresar la secuencia de nucleótidos GBA y lograr una actividad de la GCasa estable en un sujeto y/o proporcionar una mayor biodisponibilidad de GCasa en un sujeto en comparación con la biodisponibilidad de la terapia sustitutiva de la enzima GCasa, en donde la biodisponibilidad se mide durante un periodo de 2 semanas a partir de la administración, en donde el método comprende la administración de un polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención a un sujeto.

20

La invención proporciona además un polinucleótido, partícula vectorial/vírica o composición de la invención para su uso en un método de tratamiento. Opcionalmente, el método de tratamiento comprende la administración de una cantidad eficaz del polinucleótido o partícula vectorial/vírica de la invención a un paciente.

25

También se describe en el presente documento un método de tratamiento que comprende administrar una cantidad eficaz del polinucleótido o partícula vectorial/vírica de la invención a un paciente.

30

También se describe en el presente documento un uso del polinucleótido, partícula vectorial/vírica o composición de la invención en la fabricación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento. Opcionalmente, el método de tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz del polinucleótido o partícula vectorial/vírica de la invención a un paciente. Opcionalmente, el método de tratamiento es una terapia génica. Una "terapia génica" implica administrar una partícula vectorial/vírica de la invención que es capaz de expresar un transgén (tal como una secuencia de nucleótidos de GBA) en el huésped al que se administra.

35

Opcionalmente, el método de tratamiento es un método de tratamiento de enfermedades asociadas con una deficiencia de GCasa. Como se trató anteriormente, la deficiencia de GCasa puede conducir a la acumulación de glucocerebrósidos en macrófagos que se infiltran en muchos órganos vitales que pueden causar una variedad de enfermedades incluyendo sinucleopatías (como se trató en el documento de patente WO08/144591) o la enfermedad de Parkinson. Opcionalmente, el método de tratamiento es un método de tratamiento de la enfermedad de Parkinson o una sinucleopatía.

40

Opcionalmente, el método de tratamiento es un método de tratamiento de un trastorno por almacenamiento lisosómico tal como la enfermedad de Gaucher (EG), por ejemplo, EG de tipo I, tipo II o tipo III. Preferentemente, el trastorno por almacenamiento lisosómico se caracteriza por hematomas, fatiga, anemia, recuento bajo de plaquetas y hepatoesplenomegalia. Opcionalmente, el método de tratamiento es un método de tratamiento de EG, por ejemplo, EG tipo I. En algunas realizaciones, el paciente es un paciente que padece EG, por ejemplo, EG de tipo I. Opcionalmente, el paciente tiene anticuerpos o inhibidores de la GCasa recombinante (por ejemplo, imiglucerasa, velaglucerasa alfa o taliglucerasa alfa) con los que el paciente ha sido tratado previamente como parte de una terapia enzimática sustitutiva. Opcionalmente, el polinucleótido y/o vector/partícula vírica se administra por vía intravenosa. Opcionalmente, el polinucleótido y/o partícula vectorial/vírica se administra una sola vez (es decir, una dosis única) a un paciente.

45

50

Cuando la EG se "trata" en el método anterior, esto significa que uno o más de los síntomas de la EG de tipo I mejoran. No significa que los síntomas de la EG de tipo I se hayan remediado por completo, de modo que ya no estén presentes en el paciente, aunque en algunos métodos puede ser así. Por lo tanto, en todos los casos, el término "tratamiento" puede sustituirse por el término "mejora". El método de tratamiento puede dar lugar a que uno o más de los síntomas de la EG tipo I sean menos graves que antes del tratamiento. Opcionalmente, en relación con la situación previa a la administración, el método de tratamiento produce un aumento de la cantidad/concentración de GCasa circulante en la sangre del paciente, y/o del nivel general de actividad de la GCasa detectable en un volumen determinado de sangre y/o en los macrófagos del paciente. En una realización, en relación con la situación previa a la administración, el método de tratamiento produce uno o más de: un aumento de la concentración de hemoglobina; un aumento del recuento de plaquetas; una disminución del tamaño del bazo; una disminución del tamaño del hígado.

55

60

65

Además, los métodos descritos en el presente documento pueden "prevenir" enfermedades tales como la enfermedad de Gaucher. La enfermedad de Gaucher se asocia generalmente con una acumulación de

glucocerebrosidasas en diversos tejidos, y si los métodos de la invención se llevan a cabo en sujetos jóvenes (tales como adolescentes, adultos jóvenes, niños o bebés), debería ser posible prevenir el establecimiento de la enfermedad de Gaucher. Por consiguiente, en todos los casos el término "tratamiento" puede sustituirse por el término "prevención".

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado, tal como elevar el nivel de GCasa funcional en un sujeto (de modo que se produzca GCasa funcional a un nivel suficiente para mejorar los síntomas de la EG, por ejemplo, la EG de tipo I).

Opcionalmente, la partícula vectorial/vírica se administra a una dosis de menos de 1×10^{11} , menos de 1×10^{12} , menos de 5×10^{12} , menos de 2×10^{12} , menos de $1,5 \times 10^{12}$, menos de 3×10^{12} , menos de 1×10^{13} , menos de 2×10^{13} , o menos de 3×10^{13} genomas vectoriales por kg de peso del paciente. Opcionalmente, la dosis de vector/partícula vírica que se administra se selecciona de forma que el sujeto exprese GCasa a un nivel del 10 %-90 %, 20 %-80 %, 30 %-70 %, 25 %-50 %, 20 %-150 %, 30 %-140 %, 40 %-130 %, 50 %-120 %, 60 %-110 % o 70 %-100 % del nivel de un sujeto sano que no padezca EG.

Opcionalmente, un paciente al que se administra el polinucleótido, la partícula vírica o la composición puede tener un nivel de actividad de la GCasa de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8 o al menos 9 $\mu\text{mol/h/ml}$. Opcionalmente, la actividad de la GCasa se mide usando un sustrato fluorométrico específico para la GCasa. Opcionalmente, la actividad de la GCasa se mide fluorométricamente con 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (4MU-Glc) como sustrato. Opcionalmente, la actividad de la GCasa se mide en suero, plasma, macrófagos, bazo, hígado y/o médula ósea del sujeto.

En una realización, la actividad de la GCasa puede determinarse fluorométricamente con 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (4MU-Glc) como sustrato de la siguiente manera: (1) se recogen muestras de suero o tejidos (hígado, bazo, médula ósea), se ultracongelan y se lisan; (2) el lisado tisular o la muestra de suero/plasma se mezcla en citrato sódico 50 mM, taurocolato 25 mM, pH=5,75, 4MU-Glc 6 mM, durante 30 min a 37 °C; (3) la reacción se detiene añadiendo un volumen (100 μl) de disolución de parada (glicina 0,5 M, NaOH 0,3 M, pH 10,0); (4) los niveles relativos de fluorescencia (URF) se evalúan con un Spectramax I3X (Molecular devices) usando longitudes de onda de excitación y emisión de 365 nm y 445 nm, respectivamente, y los niveles de fluorescencia se convirtieron en nanomoles/h/ml basándose en una curva patrón de 4-metilumbeliferona (4-MU, Sigma-Aldrich).

Opcionalmente, un paciente al que se le administra el polinucleótido, la partícula vírica o la composición puede tener un nivel de actividad de la GCasa mayor al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o al menos 35 semanas después de la administración en comparación con la actividad medida en un sujeto al que se le administra una dosis eficaz de una terapia sustitutiva de la enzima GCasa, cuando se mide en el mismo ensayo en el mismo momento después de la administración. Opcionalmente, un paciente al que se administra el polinucleótido, la partícula vírica o la composición puede tener un nivel de actividad de la GCasa superior en 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o 1000 veces al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o al menos 35 semanas después de la administración en comparación con la actividad medida en un sujeto al que se administra una dosis eficaz de una terapia sustitutiva de la enzima GCasa, cuando se mide en el mismo ensayo en el mismo momento después de la administración.

Opcionalmente, la dosis de vector/partícula vírica que se administra se selecciona de modo que haya una mayor biodisponibilidad de GCasa para el sujeto en comparación con la biodisponibilidad de la terapia sustitutiva de la enzima GCasa. La biodisponibilidad puede medirse (por ejemplo, estimarse o calcularse) mediante cualquier método conocido en la técnica. La biodisponibilidad de la GCasa puede medirse en el suero, los macrófagos, el bazo, el hígado y/o la médula ósea del sujeto. En un ejemplo, la biodisponibilidad puede estimarse usando el método del área bajo la curva ("ABC") según el Ejemplo 8. En un ejemplo, la biodisponibilidad puede estimarse estimando la actividad de la GCasa total disponible en el suero, plasma, macrófagos, bazo, hígado y/o médula ósea del sujeto. Opcionalmente, se calcula durante un periodo de tiempo definido, y se refiere a la actividad o concentración total de GCasa durante ese periodo de tiempo. Opcionalmente, la actividad de la GCasa se mide usando un sustrato fluorométrico que es específico para la GCasa. Opcionalmente, la actividad de la GCasa se mide fluorométricamente con 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (4MU-Glc) como sustrato. Opcionalmente, la actividad de la GCasa se mide en suero, plasma, macrófagos, bazo, hígado y/o médula ósea del sujeto. Opcionalmente, la actividad de la GCasa se mide en los glóbulos blancos del sujeto. Opcionalmente, la biodisponibilidad se mide durante un periodo de 2 semanas a partir de la administración. Opcionalmente, la biodisponibilidad se mide durante un periodo de 5 semanas desde la administración. Opcionalmente, la biodisponibilidad se mide en suero. En un ejemplo, se logra una mayor biodisponibilidad de GCasa en el sujeto durante un periodo de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o al menos 35 semanas después de la administración en comparación con la biodisponibilidad medida en un sujeto al que se le administra una dosis eficaz de una terapia de reemplazo enzimático de GCasa, cuando se mide en el mismo ensayo en el mismo momento después de la administración.

Opcionalmente, un paciente (por ejemplo, un paciente que padece una enfermedad o afección asociada con la deficiencia de GCasa) al que se le administra el polinucleótido, la partícula vírica o la composición de la invención

puede tener niveles reducidos de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina después de la administración, preferentemente cuando los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina se miden 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas o 12 semanas después de la administración. Los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina pueden reducirse 2 veces o más, 3 veces o más, 4 veces o más, 5 veces o más, 6 veces o más, 2 a 3 veces, 2 a 4 veces, 2 a 5 veces, 2 a 6 veces o 3 a 5 veces en comparación con los niveles (iniciales) de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina en el momento de la administración del polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención. Por ejemplo, después de la administración de la partícula vírica de polinucleótido o composición de la invención (por ejemplo 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas o 12 semanas después de la administración), los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina en el paciente pueden ser 50 % o menos, 40 % o menos, 30 % o menos, 25 % o menos, 20 % o menos en comparación con los niveles (iniciales) de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina en el momento de la administración del polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención. Opcionalmente, el paciente puede tener niveles aumentados de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina en comparación con un sujeto sano o un sujeto que no tiene una enfermedad o afección asociada con la deficiencia de GCasa. Por ejemplo, los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina se miden en el bazo, el hígado y/o la médula ósea del paciente/sujeto. Los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina pueden medirse en el suero y/o los glóbulos blancos (por ejemplo, macrófagos) del paciente/sujeto. Los métodos para medir los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina son conocidos en la técnica, y los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina se miden preferentemente usando espectrometría de masas (análisis de LC/EM), por ejemplo, mediante el método descrito en el Ejemplo 9. Opcionalmente, la reducción de los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina (por ejemplo, en el suero, los glóbulos blancos (por ejemplo, macrófagos), el bazo, el hígado y/o la médula ósea del paciente/sujeto) es mayor que la reducción lograda con el tratamiento de sustitución de la enzima GCasa, preferiblemente cuando los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina se miden después de al menos 6 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas o al menos 12 semanas después del inicio del tratamiento. Por ejemplo, los niveles después de al menos 6 semanas (por ejemplo, a las 6 semanas), al menos 8 semanas (por ejemplo, a las 8 semanas), al menos 10 semanas (por ejemplo, a las 10 semanas) o al menos 12 semanas (por ejemplo, a las 12 semanas) de la administración del polinucleótido, la partícula vírica o la composición de la invención pueden compararse con los niveles después de al menos 6 semanas (por ejemplo, a las 6 semanas), al menos 8 semanas (por ejemplo, a las 8 semanas), al menos 10 semanas (por ejemplo, a las 10 semanas) o al menos 12 semanas (por ejemplo, a las 12 semanas), respectivamente, desde la primera administración de la terapia sustitutiva de la enzima GCasa. Como un ejemplo particular, los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina pueden medirse después de al menos 12 semanas (por ejemplo, a las 12 semanas) después de la administración del polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención y compararse con los niveles medidos al menos 12 semanas (por ejemplo, a las 12 semanas) después de la primera administración de la terapia sustitutiva de la enzima GCasa. Preferiblemente, los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina se miden en el mismo ensayo en el mismo momento tras la administración. Opcionalmente, el tratamiento enzimático sustitutivo con GCasa puede administrarse cada dos semanas. Opcionalmente, la reducción de los niveles de hexosilceramida en el sujeto (o paciente) tras la administración del polinucleótido, la partícula vírica o la composición de la invención son tales que los niveles de hexosilceramida (por ejemplo en el suero, los glóbulos blancos (por ejemplo, macrófagos), el hígado y/o el bazo) no son superiores al 200 %, 150 % o 125 % de los niveles de hexosilceramida medidos en un sujeto sano o un sujeto que no padece una enfermedad o afección asociada con la deficiencia de GCasa. En un ejemplo, una reducción en los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina puede representar una reducción en los niveles de glucosilceramida y/o glucosilsfingosina, respectivamente. Por ejemplo, una reducción en la hexosilceramida puede representar una reducción en la glucosilceramida. Como otro ejemplo, una reducción en los niveles de hexosilesfingosina puede representar una reducción en los niveles de glucosilsfingosina.

En un ejemplo, una reducción en los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina es una reducción en la glucosilceramida y/o glucosilsfingosina respectivamente. En otras palabras, un paciente (por ejemplo, un paciente que padece una enfermedad o afección asociada con la deficiencia de GCasa) al que se le administra el polinucleótido, la partícula vírica o la composición de la invención puede tener niveles reducidos de glucosilceramida y/o glucosilsfingosina después de la administración, preferentemente cuando los niveles de glucosilceramida y/o glucosilsfingosina se miden 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas o 12 semanas después de la administración. Los niveles de glucosilceramida y/o glucosilsfingosina pueden reducirse 2 veces o más, 3 veces o más, 4 veces o más, 5 veces o más, 6 veces o más, 2 a 3 veces, 2 a 4 veces, 2 a 5 veces, 2 a 6 veces, o 3 a 5 veces en comparación con los niveles (iniciales) de glucosilceramida y/o glucosilsfingosina en el momento de la administración del polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención. Por ejemplo, después de la administración de la partícula vírica de polinucleótido o composición de la invención (por ejemplo, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas o 12 semanas después de la administración), los niveles de glucosilceramida y/o glucosilsfingosina en el paciente pueden ser 50 % o menos, 40 % o menos, 30 % o menos, 25 % o menos, 20 % o menos en comparación con los niveles (iniciales) de glucosilceramida y/o glucosilsfingosina en el momento de la administración del polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención. Opcionalmente, el paciente puede tener niveles aumentados de glucosilceramida y/o glucosilsfingosina en comparación con un sujeto sano o un sujeto que no tiene una enfermedad o afección asociada con la deficiencia de GCasa. Por ejemplo, los niveles de glucosilceramida y/o glucosilsfingosina se miden en el bazo, el hígado y/o la médula ósea del paciente/sujeto. Los niveles de glucosilceramida y/o glucosilsfingosina pueden medirse en el suero y/o los glóbulos blancos (por ejemplo, macrófagos) del paciente/sujeto. Los métodos para medir los niveles de glucosilceramida y/o glucosilsfingosina son conocidos en la técnica, y los niveles de glucosilceramida y/o glucosilsfingosina se miden preferentemente usando espectrometría de

masas (análisis de CL/EM), por ejemplo, mediante el método descrito en el Ejemplo 9. Opcionalmente, la reducción de los niveles de glucosilceramida y/o glucosil esfingosina (por ejemplo, en el suero, los glóbulos blancos (por ejemplo, macrófagos), el bazo, el hígado y/o la médula ósea del paciente/sujeto) es mayor que la reducción lograda con el tratamiento de sustitución de la enzima GCasa, preferiblemente cuando los niveles de glucosilceramida y/o glucosil esfingosina se miden después de al menos 6 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas o al menos 12 semanas después del inicio del tratamiento. Por ejemplo, los niveles después de al menos 6 semanas (por ejemplo, a las 6 semanas), al menos 8 semanas (por ejemplo, a las 8 semanas), al menos 10 semanas (por ejemplo, a las 10 semanas) o al menos 12 semanas (por ejemplo, a las 12 semanas) de la administración del polinucleótido, la partícula vírica o la composición de la invención pueden compararse con los niveles después de al menos 6 semanas (por ejemplo, a las 6 semanas), al menos 8 semanas (por ejemplo, a las 8 semanas), al menos 10 semanas (por ejemplo, a las 10 semanas) o al menos 12 semanas (por ejemplo, a las 12 semanas), respectivamente, desde la primera administración de la terapia sustitutiva de la enzima GCasa. Como un ejemplo particular, los niveles de glucosilceramida y/o glucosil esfingosina pueden medirse después de al menos 12 semanas (por ejemplo, a las 12 semanas) tras la administración del polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención y compararse con los niveles medidos al menos 12 semanas (por ejemplo, a las 12 semanas) tras la primera administración de la terapia sustitutiva de la enzima GCasa. Preferiblemente, los niveles de glucosilceramida y/o glucosil esfingosina se miden en el mismo ensayo en el mismo momento tras la administración. Opcionalmente, la terapia sustitutiva de la enzima GCasa puede administrarse cada dos semanas. Opcionalmente, la reducción de los niveles de glucosilceramida en el sujeto (o paciente) tras la administración del polinucleótido, partícula vírica o composición de la invención son tales que los niveles de glucosilceramida (por ejemplo en el suero, glóbulos blancos (por ejemplo macrófagos), hígado y/o bazo) no son superiores al 200 %, 150 % o 125 % de los niveles de glucosilceramida medidos en un sujeto sano o en un sujeto que no padece una enfermedad o afección asociada con la deficiencia de GCasa.

Opcionalmente, un paciente (por ejemplo, un paciente que padece una enfermedad o afección asociada con la deficiencia de GCasa) al que se le administra el polinucleótido, la partícula vírica o la composición de la invención puede mostrar un número reducido de células de almacenamiento y/o macrófagos activados en el hígado tras la administración, preferiblemente cuando las células se cuentan después de al menos 6 semanas (por ejemplo, a las 6 semanas), al menos 8 semanas (por ejemplo, a las 8 semanas), al menos 10 semanas (por ejemplo, a las 10 semanas) o al menos 12 semanas (por ejemplo, a las 12 semanas) tras la administración. La reducción en el número de células de almacenamiento y/o macrófagos activados en el hígado puede ser un indicio de reducción de la inflamación y, por tanto, de beneficio terapéutico. El número de macrófagos activados puede indicarse o estimarse midiendo el número de células CD68^{positivas}. La identificación de células de almacenamiento y células CD68^{positivas} puede realizarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los métodos descritos en el Ejemplo 9.

Una "terapia sustitutiva de la enzima GCasa" puede referirse a cualquier terapia que comprenda la administración de un polipéptido de GCasa a un sujeto. El polipéptido de GCasa puede ser natural, tal como un polipéptido de GCasa que tenga la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. El polipéptido GCasa puede administrarse a cualquier dosis adecuada, opcionalmente a una dosis entre 40 y 100, entre 50 y 80, entre 60 y 70, o aproximadamente 60 U/kg de peso corporal. El polipéptido de GCasa puede administrarse por cualquier vía adecuada, opcionalmente se administra mediante inyección intravenosa o inyección subcutánea.

Un nivel de actividad de la GCasa de al menos el X % (por ejemplo, al menos el 20 %) se refiere a un nivel de actividad de la GCasa que es al menos el X % (por ejemplo, el 20 %) del intervalo normal del nivel de GCasa medido a partir de una muestra de, por ejemplo, el bazo o la médula ósea. El experto en la materia comprenderá fácilmente lo que se entiende por referencia a un % de nivel de actividad de la GCasa normal, que se determina en la práctica clínica habitual mediante, por ejemplo, la comparación con una muestra de control de un sujeto sano.

El término "actividad de la GCasa estable" o "nivel de actividad de la GCasa estable" se refiere a un nivel de actividad de la GCasa que se mantiene en o por encima de un determinado nivel durante un periodo continuo de al menos 5 semanas. En otras palabras, la actividad puede fluctuar por encima de dicho nivel de actividad, pero se sigue diciendo que es estable mientras se mantenga por encima del umbral mínimo establecido. En algunas realizaciones, el nivel de actividad de la GCasa se mantiene en o por encima de un determinado nivel durante un periodo continuo de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 40 o al menos 50 semanas. Por ejemplo, un paciente tiene un nivel de actividad de la GCasa estable de al menos el 20 % si el nivel de actividad se mantiene en al menos el 20 % durante un periodo continuo de al menos 5 semanas. En dicho ejemplo, el nivel de actividad de la GCasa puede seguir siendo de al menos el 20 % después de las al menos 5 semanas y, por lo tanto, se mantiene en al menos el 20 % durante un periodo continuo acumulado de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o al menos 40 o al menos 50 semanas. Un paciente tiene un nivel de actividad de la GCasa estable si el nivel de actividad de la GCasa se mantiene en o por encima de un determinado nivel durante un periodo continuo de al menos 5 semanas. Opcionalmente, un paciente administrado con el polinucleótido, la partícula vírica o la composición puede tener un nivel de actividad de la GCasa estable de al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 % o al menos el 50 % en relación con la actividad de la GCasa de un sujeto sano. Opcionalmente, un paciente administrado con el polinucleótido, la partícula vírica o la composición puede tener un nivel de actividad de la GCasa estable de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8 o al menos 9 $\mu\text{mol/h/ml}$. Opcionalmente, la actividad de la GCasa se mide

usando un sustrato fluorométrico que es específico de la GCasa. Opcionalmente, la actividad de la GCasa se mide fluorométricamente con 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (4MU-Glc) como sustrato. Opcionalmente, la actividad de la GCasa se mide en el suero, los macrófagos, el bazo, el hígado y/o la médula ósea del sujeto.

5 Opcionalmente, el nivel de actividad de la GCasa es estable después de al menos 5 semanas, al menos 10 semanas, al menos 15 semanas, al menos 20 semanas, al menos 30 semanas, al menos 40 semanas o al menos 50 semanas desde la administración del polinucleótido, la partícula vírica o la composición. Por ejemplo, cuando un paciente tiene un nivel de actividad de la GCasa estable de al menos el 20 % después de al menos 5 semanas desde que se administra al paciente el polinucleótido, la partícula vírica o la composición, hay un nivel de actividad de la GCasa de al menos el 20 % que mantiene al menos el 20 % durante un periodo continuo de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o al menos 40 o al menos 50 semanas después de las al menos 5 semanas iniciales desde la administración.

15 Opcionalmente, el nivel de actividad de la GCasa está en o por encima de un determinado nivel (por ejemplo, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 40 %; y/o al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8 o al menos 9 μ mol/h/ml) en un momento al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40 o al menos 50 semanas después de la administración del polinucleótido, la partícula vírica o la composición. Por ejemplo, el nivel de actividad de la GCasa es igual o superior a un determinado nivel (por ejemplo, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 40 %; y/o al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8 o al menos 9 μ mol/h/ml) en un momento de aproximadamente 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 o 52 semanas después de la administración del polinucleótido, la partícula vírica o la composición.

25 La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

Listado de secuencias

Número de identidad de la secuencia	Descripción de la secuencia
1	Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL28, sin porción de péptido señalizador.
2	Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL21, sin porción de péptido señalizador.
3	Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL30, sin porción de péptido señalizador.
4	Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL36, sin porción de péptido señalizador.
5	Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL28, con porción de péptido señalizador.
6	Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL21, con porción de péptido señalizador.
7	Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL30, con porción de péptido señalizador.
8	Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL36, con porción de péptido señalizador.
9	Secuencia de nucleótidos de GBA humana natural con péptido señalizador (de GenBank NM_000157.3)
10	Elemento regulador de la transcripción de LSP-S
11	Porción de potenciador HCR de LSP-S
12	Porción de promotor A1AT de LSP-S
13	Promotor de CAG
14	Elemento regulador de la transcripción de LSP-L
15	Porción de promotor A1AT de LSP-L
16	Porción de potenciador HCR de LSP-L
17	Secuencia de nucleótidos de GBA natural correspondiente al péptido señalizador
18	Secuencia de polipéptidos de GCasa natural del péptido señalizador
19	Secuencia de polipéptidos de la cápside hepatotrópica
20	Secuencia de polipéptidos de la cápside hepatotrópica
21	Secuencia de polipéptidos de la cápside SNC-trópica
22	Secuencia de nucleótidos del intrón de SV40
23	Secuencia de nucleótidos de la secuencia de poliA de la hormona de crecimiento bovina

(continuación)

Número de identidad de la secuencia	Descripción de la secuencia
24	Secuencia de polipéptidos de la cápside hepatotrópica
25	Secuencia de polipéptidos de la GCasa humana natural

Ejemplos

5 Ejemplo 1 - Métodos

A menos que se especifique lo contrario, en los ejemplos que se describen a continuación se siguieron los siguientes métodos generales.

10 *Producción de rAAV*

Se produjeron partículas AAV2/8 por transfección transitoria de células HEK293T con plásmidos que codifican las funciones Rep y Cap de AAV, y auxiliares adenovíricas, así como el genoma recombinante que contiene la construcción de GBA. Se purificaron las partículas AAV2/8 mediante una columna de afinidad aPOROS CaptureSelect, y se valoraron mediante qPCR y se caracterizaron mediante análisis de gel alcalino.

Diseño del estudio en ratones

Se administraron partículas víricas AAV portadoras del transgén GBA bajo el control transcripcional de los promotores específicos de hepatocitos en la vena de la cola de ratones macho naturales (C57BL/6) a la edad de 6-8 semanas. Las dosis de AAV oscilaron entre 6×10^{11} gv/kg a 6×10^{12} gv/kg, como en el presente documento para cada estudio. Para cada experimento, se dejó un grupo adicional de animales sin tratar para que sirviera de control de los efectos del tratamiento. Para evaluar la cinética y la durabilidad de la expresión transgénica, se midieron los niveles de GCasa sérica en distintos intervalos de tiempo (4, 8 y 12 semanas) tras la inyección. Se realizó un seguimiento de los ratones hasta 12 semanas después del tratamiento con AAV y se sacrificaron para análisis bioquímicos y patológicos.

Ensayo de la actividad de GBA sérica y tisular

Se determinó fluorométricamente la actividad de la β -glucocerebrosidasa (β -glucosidasa ácida; GCasa) con 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (4MU-Glc) como sustrato. Se obtuvieron muestras de suero a partir de sangre de ratón y se almacenaron a -80 °C. Se recogieron los tejidos (hígado, bazo, médula ósea), se ultracongelaron y se lisaron. La actividad de la β -glucocerebrosidasa (β -glucosidasa ácida, GCasa) se determinó fluorométricamente con 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (4MU-Glc) como sustrato. El día del ensayo, se diluyó el suero (0,5 μ l, 1:50) y se analizó en citrato sódico 50 mM, taurocolato 25 mM de, pH=5,75, 4MU-Glc 6 mM, durante 30 min a 37 °C. Para muestras tisulares, se analizó directamente el lisado de proteínas tisulares. La reacción se detuvo añadiendo un volumen (100 μ l) de disolución de parada (glicina 0,5 M, NaOH 0,3 M, pH 10,0). Los niveles relativos de fluorescencia (URF) se evaluaron con un Spectramax I3X (Molecular devices) usando longitudes de onda de excitación y emisión de 365 nm y 445 nm, respectivamente. A continuación, los niveles de fluorescencia se convirtieron en nanomoles/h/ml (suero) o nmol/h/mg de proteína total (tejido) basándose en una curva patrón de 4-metilumbeliferona (4-MU, Sigma-Aldrich).

Número de copias de genomas de vector

Para determinar el número de genomas de vector por célula hepática tras la inyección de rAAV, se aisló ADN de muestras hepáticas congeladas usando el kit QIAGEN DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras aislar el ADN, se realizó una qPCR usando conjuntos de cebadores que se unen a una región común a ambos promotores LSP-S y LSP-L, lo que permite estimar el número de copias del AAV.

50 *Inmunohistoquímica*

Se usó anti-GCasa humana de conejo (Abcam ab125065; 1:100) para visualizar la GCasa en tejido de ratón. Se usó anti-F4/80 de rata (Abcam ab6640; 1:100) para visualizar macrófagos de ratón. Los tejidos de ratón fijados con formalina se desparafinaron con lavados con xileno y etanol, seguidos de recuperación de antígenos según las recomendaciones de uso del producto Ventana CC1. Se realizó tinción inmunohistoquímica usando el instrumento Ventana Discovery XT, usando el kit de detección Ventana DAB Map (760-124). Las secciones se contrateñían con hematoxilina. Durante la tinción inmunofluorescente se usaron anticuerpos secundarios conjugados con FITC y rojo Texas. Se usó DAPI para visualizar los núcleos. Las señales se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia confocal (Zeiss).

60

Transfección de Huh-7 y ensayo de potencia

El día antes de la transfección, se sembró la línea celular de hepatocitos hepáticos Huh-7 en una placa de 12 pocillos a una densidad celular de 3×10^5 células por pocillo. Para la transfección, se usó FuGENE en una relación de 4 μ l por μ g de plásmido y se añadió durante la noche a células Huh-7 en presencia de 10 % de suero (suero bovino fetal, FBS). Se cambió el medio de transfección y las células se incubaron durante 24 horas con medio suplementado con insulina-transferrina-selenio (ITS, ThermoFisher Scientific) y tampón Hepes 25 mM. La transducción de células Huh-7 se realizó a una multiplicidad de infección (MOI) definida en presencia de suero durante 24 horas, seguida de un cambio de medio y una incubación durante 24 horas en medio fresco. Se usaron 20 μ l de medio para medir la actividad de la GCasa usando 4MU-Glc como sustrato, como se ha descrito anteriormente.

Análisis estadístico

Se realizó análisis estadístico usando el software Prism 7 (Graph Pad). El análisis de columnas se realizó mediante ANOVA unidireccional. Los valores de p y el tamaño de la muestra se indican en las descripciones de las Figuras.

Para aproximar la biodisponibilidad (ABC), se usó una ecuación de modelo de decaimiento de una fase: $Y = (Y_0 - \text{Meseta}) \cdot \exp(-K \cdot X) + \text{Meseta}$ en GraphPad Prism. Y_0 es el valor Y cuando X (tiempo) es cero y se expresa en las mismas unidades que Y . Meseta es el valor Y a tiempos infinitos, expresado en las mismas unidades que Y . K es la constante de velocidad, expresada en unidades de tiempo recíprocas del eje X (es decir, si X está en minutos, entonces K se expresa en minutos⁻¹). Tau es la constante de tiempo, expresada en las mismas unidades que el eje X y se calcula como el recíproco de K . La semivida está en las unidades de tiempo del eje X , y se calcula como $\ln(2)/K$. Alcance es la diferencia entre Y_0 y Meseta, expresado en las mismas unidades que los valores Y . Para el cálculo del ABC se usó el método lineal trapezoidal. El ABC se expresa como $U \cdot h/l$, donde una unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol/h de sustrato de 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido a 37 °C.

Ejemplo 2 - Construcciones GBA

Para evaluar si se podría usar un enfoque de terapia génica dirigida al hígado para tratar la enfermedad de Gaucher (EG), se clonó la secuencia codificante de GBA humana de longitud completa (como se encuentra en el número de acceso del GenBank NM_000157.3; SEQ ID NO: 9) en un vector de virus adenoasociado (AAV) dirigido por un promotor específico del hígado. En la construcción FLF-PL01 AAV (Fig. 1A), la secuencia de GBA natural (GBAwT, sin optimización de codón) está dirigida por un promotor específico del hígado denominado en el presente documento "LSP-S" (SEQ ID NO: 10). Para determinar una secuencia óptima para la expresión, se diseñaron secuencias usando varias estrategias diferentes de optimización de codones. En una construcción de AAV de ejemplo (FLF-PL28) se optimizó la secuencia de codones GBA y está dirigida por el mismo promotor específico de hígado LSP-S (Fig. 1B). La construcción FLF-PL64 contiene la misma secuencia de codones GBA optimizada que FLF-PL28, pero difiere en que contiene un elemento regulador de la transcripción más largo, denominado en el presente documento "LSP-L" (SEQ ID NO: 14) en lugar de LSP-S (Fig. 1C).

Ejemplo 3 - Análisis de la expresión del transgén GBA natural

Para evaluar si la construcción de GBA (natural) FLF-PL01 podía conducir a la expresión hepática y posterior secreción de β -glucocerebrosidasa (GCasa) en el torrente sanguíneo, se pseudotipó FLF-PL01 en AAV2/8. Se produjeron partículas de rAAV y se valoraron como se ha descrito anteriormente, y se caracterizaron mediante análisis de gel alcalino, antes de ser usadas en ratones. Se trató a ratones naturales (C57BL/6) de ocho semanas con una única inyección de AAV2/8-FLF-PL01 a una dosis que oscilaba de 6×10^{11} a 6×10^{12} gv/kg. Se dejaron sin tratar los ratones de control (intactos). Se recogieron muestras de suero a las cuatro, ocho y 12 semanas después de la inyección del AAV y se usaron para evaluar los niveles de GCasa activa circulante. Se determinó la actividad de la GCasa y se realizaron tinciones inmunohistoquímicas como se ha descrito anteriormente. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina.

La inyección de ratones naturales con AAV2/8-FLF-PL01 produjo un aumento de la expresión de GCasa humana en el hígado de los animales tratados (Fig. 2A). Se pudo observar un mayor nivel de expresión de GCasa en el hígado con el aumento de la dosis del vector, observándose un aumento de aproximadamente 12 veces en la dosis del vector de 6×10^{11} gv/kg grupo, 43 veces en la dosis de 2×10^{12} gv/kg y 57 veces en la dosis de 6×10^{12} gv/kg (Fig. 2B). Estos datos muestran que el AAV2/8-FLF-PL01 impulsó la expresión de GCasa a niveles que produjeron una liberación significativa de GCasa al torrente sanguíneo y un posible acceso a los macrófagos en los tejidos afectados por la EG.

Ejemplo 4 - Análisis de la expresión *in vitro* de la GCasa a partir de construcciones optimizadas para el codón

Se usaron tablas de uso de codones de varias secuencias expresadas en el hígado para generar secuencias de GBA optimizadas para el codón en todo el tramo correspondiente a la proteína GCasa madura (pero no en la región codificante del péptido señalizador). A excepción de una de dichas secuencias de GBA optimizadas para el codón

(‘FLF-PL36’), las secuencias resultantes se modificaron manualmente para eliminar CpG, sitios de empalme crípticos, codones de parada prematuros y sustituciones de aminoácidos no deseadas. Se crearon veintiuna secuencias de GBA optimizadas para el codón y se comprobaron los niveles de expresión de la GCasa tras la transfección en la línea celular de hígado humano Huh-7. Las células Huh-7 se sembraron en una placa de 12 pocillos con una densidad celular de 3×10^5 por pocillo y se transfectaron como se ha descrito anteriormente. Se usaron veinte microlitros de medio para medir la actividad de la GCasa usando 4MU-Glc como sustrato. Los resultados de este análisis permitieron la identificación de las optimizaciones de codones de GBA (FLF-PL21, -PL28, -PL30 y -PL36) que demostraron una mayor expresión de GCasa (en relación con la secuencia de GBA natural, FLF-PL01) cuando se transfectaron en células Huh-7 (Fig. 3).

Ejemplo 5 - Análisis de la actividad *in vivo* de la GCasa a partir de construcciones optimizadas para el codón

Las cuatro construcciones (FLF-PL21, FLF-PL28, FLF-PL30 y FLF-PL36) identificadas en el Ejemplo 4 se pseudotiparon como AAV2/8 y se inyectaron en ratones naturales a la dosis de 2×10^{12} gv/kg. También se incluyó en el experimento la construcción sin optimización de codón FLF-PL01, así como una construcción (FLF-PL37) que contenía la misma secuencia de GBA natural que FLF-PL01 impulsada por el promotor sintético fuerte CAG. No se trataron los ratones de control (intactos). En todos los momentos hasta las 36 semanas después de la inyección, los animales se sacrificaron y se recogieron muestras de suero y tejidos.

La Fig. 4A muestra los resultados a las 8 semanas después de la inyección de la actividad de la GCasa encontrada en ratones inyectados con la secuencia de GBA sin optimización de codón impulsada por el promotor LSP-S (FLF-PL01), las construcciones de GBA optimizadas para el codón (FLF-PL21, FLF-PL28, FLF-PL30 y FLF-PL36) también impulsadas por el promotor LSP-S, y la secuencia GBA sin optimización de codón impulsada por el promotor CAG (FLF-PL37). Las cuatro construcciones de GBA optimizadas para el codón mostraron mayores niveles de actividad de la GCasa presente en el torrente sanguíneo cuando se inyectaron en ratones (Fig. 4A), en relación con FLF-PL01. La construcción FLF-PL28 mostró el mayor aumento (aproximadamente 6 veces) en la liberación de GCasa al torrente sanguíneo en comparación con la construcción sin optimización de codón impulsada por el mismo promotor LSP-S (FLF-PL01). El elevado nivel de GCasa impulsada por FLF-PL28 en relación con FLF-PL01 se observó durante todo el período de estudio de 36 semanas (Fig. 4B).

Cabe destacar que los niveles de GCasa observados en ratones inyectados con el promotor específico de hígado FLF-PL28 eran tan altos como los niveles de GCasa impulsados por la construcción FLF-PL37 en el que la secuencia de GBA natural se expresa a partir del promotor CAG ubicuo y fuerte (Fig. 4A).

En la fase final, se recogieron el bazo y la médula ósea, y se fijaron en formol y se incorporaron en parafina. El análisis de inmunotinción de GBA realizado en secciones de parafina muestra que, de acuerdo con los niveles circulantes de GCasa, la captación tisular de GCasa aumenta en los ratones tratados con la construcción optimizada para el codón FLF-PL28 GBA en comparación con la construcción sin optimización de codón FLF-PL01 (Fig. 5).

Para evaluar los niveles de captación de macrófagos en el bazo tras la expresión de GBA dirigida al hígado por FLF-PL28, se realizó un análisis de inmunofluorescencia con el marcador panmacrófago de ratón F4/80 y un anticuerpo contra GBA. La mayoría de las células F4/80 positivas muestran expresión de GBA específico de humano, lo que indica que la mayor parte de la captación de GCasa en el bazo se produce en los macrófagos (Fig. 6).

Ejemplo 6 - Análisis del efecto promotor sobre la actividad de la GCasa *in vivo*

Para probar si la manipulación de promotores podría aumentar aún más la expresión de una secuencia optimizada para el codón de GBA, la construcción de GBA de FLF-PL28 se puso bajo un promotor específico del hígado (denominado en el presente documento "LSP-L"; SEQ ID NO: 14) para generar la construcción FLF-PL64 (Ejemplo 2, Fig. 1C).

Se prepararon vectores AAV2/8 con la nueva construcción y se inyectaron en ratones naturales a la dosis de 2×10^{12} gv/kg. No se trataron los ratones de control (intactos). Tras 5 semanas, se sacrificaron los animales y se recogieron suero y tejidos.

El análisis de la actividad de la GCasa en el suero muestra que AAV2/8-FLF-PL64 produce un aumento de la expresión (aproximadamente 2,5 veces, $P=0,0001$, ANOVA unidireccional) de la GCasa en el torrente sanguíneo del ratón en comparación con los ratones tratados con AAV2/8-FLF-PL28 (Fig. 7).

Al igual que la construcción FLF-PL28, FLF-PL64 permite una captación robusta de GCasa en tejidos diana de EG tales como el bazo, la médula ósea y el pulmón (Fig. 8).

Ejemplo 7 - Selectividad de la expresión en el hígado a partir de vectores AAV con construcciones de GBA

Para analizar la selectividad del promotor LSP-L por una línea celular hepática, se seleccionaron ocho líneas celulares derivadas de humano de una variedad de tejidos. En la tabla siguiente se resumen los detalles de cada

línea celular y su origen.

Tabla 1. Líneas celulares humanas evaluadas en este ejemplo

Línea celular	Origen	Crecimiento	Especie de origen
HUH-7	Carcinoma hepatocelular (hígado)	Adherente	Humano
HEK293T	Riñón	Adherente	Humano
PANC-1	Páncreas (carcinoma epitelioide)	Adherente	Humano
BxPC-3	Páncreas (adenocarcinoma)	Adherente	Humano
MCF7	Mama (epitelial; adenocarcinoma)	Adherente	Humano
1643	Neuroblastoma	Adherente	Humano
MRC-9	Fibroblasto pulmonar normal (embrión)	Adherente	Humano
697	Leucemia de linfocitos B (linfocitos B tempranos)	Suspensión	Humano

5 Las ocho líneas celulares derivadas de humano descritas en la Tabla 1 se cultivaron en medios DMEM, IMDM o RPMI, suplementados con 10 % de FBS. Para cada línea celular, se transdujeron 2×10^4 células/pocillo a una multiplicidad de infección (MOI) de 1×10^5 gv/célula con AAV-FLF-PL64 (AAV con cápside hepatotrópica = SEQ ID NO: 20). Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Se contaron las células en suspensión y se transdujeron en medio sin suero (300 μ l/pocillo) en placas de 48 pocillos. Para las líneas celulares adherentes, se aspiró el medio, seguido de lavado con PBS (1X) y tratamiento con 5 ml de TripLE durante cinco minutos a 37 °C, 5 % de CO₂, para disociar las células. La reacción se detuvo añadiendo 5 ml de medio completo. Las células disociadas se contaron usando un contador celular automatizado Countess™ II (ThermoFisher) y se centrifugaron (250 x g durante cinco minutos), seguido de resuspensión en medio completo a una densidad de 2×10^5 células/ml. Estas células se sembraron en placas de 96 pocillos (2×10^4 células/pocillo) para que se adhieran durante cinco horas antes de la transducción. La mezcla de transducción se preparó en medio X-VIVO (50 μ l/pocillo) y se añadió a las células. Tras tres horas, se añadieron 100 μ l/pocillo de medio completo. Un día después de la transducción, se cambiaron el medio de cada línea celular a medio completo (HEPES +25 mM para el análisis de secreción).

20 Se determinó fluorométricamente la actividad de la GCasa con 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (4MU-Glc) como sustrato.

25 Se midió la actividad de la GCasa a partir del sobrenadante de cultivo de cada línea celular para determinar los niveles de GCasa secretada tras la transducción con AAV-FLF-PL64 (Figura 10). Cuando el promotor LSP-L impulsa al transgén GBA, la secreción de GCasa se detectó únicamente en la línea celular HUH-7. El nivel de GCasa activa observado en las células HUH-7 fue de aproximadamente 5,0 nmol/h/ml [$5,1 \pm 0,1$ nmol/h/ml]. No se observaron niveles detectables de GCasa activa en ninguna de las otras líneas celulares analizadas.

Ejemplo 8 - Comparación con la terapia ERT

30 El objetivo de este ejemplo era comparar FLF-PL64 con VPRIV® (60 U/kg de PC) cuando se administra en ratones como inyección única. VPRIV® contiene la misma secuencia de aminoácidos y un patrón de glucosilación similar al de la enzima nativa, la GCasa (es decir, SEQ ID NO: 25), y por lo tanto proporciona una comparación adecuada. Los pacientes sometidos a terapia enzimática sustitutiva (ERT) se tratarían normalmente con una infusión IV de ERT (duración de la infusión de 1-2 horas, la dosis clínica de VPRIV® es de 60 U/kg) en semanas alternas.

35 Se obtuvo VPRIV® en polvo (400 unidades, Shire) para la preparación de una disolución para infusión, y se mantuvo refrigerado y protegido de la luz hasta su reconstitución. Se reconstituyó un vial (400 U) con 4,3 ml de agua estéril para obtener una disolución a 100 U/ml, según las recomendaciones del fabricante. Tras la reconstitución, la disolución VPRIV se ultracongeló rápidamente en alícuotas de un solo uso y se almacenó a (-80 °C) para su uso posterior.

45 Se administró una única inyección IV de VPRIV® (60 U/kg de PC) o FLF-PL64 (formulado como partículas AAV2/8, 2×10^{12} gv/kg) a ratones naturales. Se determinaron los niveles de GCasa activa en el suero y tejido en momentos hasta una semana y también a las tres semanas y cinco semanas después de la inyección. Los niveles de GCasa activa se determinaron fluorométricamente con 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (4MU-Glc).

50 Como se muestra en la Figura 11(A), VPRIV se elimina rápidamente de la sangre murina. VPRIV alcanzó una C_{máx} de 12,7 μ mol/h/ml a los dos minutos después de la inyección, con una semivida estimada de aproximadamente 5,6 minutos. Aproximadamente 20 minutos después de la inyección, únicamente podían detectarse niveles residuales de GCasa activa en el suero. Estos niveles se mantuvieron próximos a los de los controles no tratados durante el resto del periodo de estudio. Se realizó una comparación de VPRIV con FLF-PL64 analizando ratones con expresión estable de GCasa (Figura 11B). El tratamiento con FLF-PL64 también produjo un aumento de los niveles de GCasa activa en la sangre murina (C_{máx} 9,4 μ mol/h/ml) (Figura 11B). Sin embargo, aunque los niveles de GCasa activa no fueron tan altos como los observados tras la inyección de VPRIV®, estos niveles se mantuvieron constantes durante la duración del estudio. La Tabla 2 a continuación muestra la biodisponibilidad predicha durante un intervalo de 2 55 semanas en ratones tras la inyección de ERT o FLF-PL64.

Tabla 2. Biodisponibilidad prevista (ABC) durante un intervalo de 2 semanas en ratones C57BL/6 tras una inyección única de ERT (60 U/kg de PC) o AAV-FLF-PL64 (2×10^{12} gv/kg).

	ERT (VPRIV) [®]	FLF-PL64
AC _{2semanas} (min.U/ml)	18,6 ± 5,6	3.161,6 ± 348.2

5 La Figura 12 muestra la inmunotinción de GCasa en hígado, bazo y médula ósea murinos tras la administración de VPRIV[®] o AAV2/8-FLF-PL64. Se muestra una imagen representativa de cada grupo de animales. Se usó DAB (3,3'-diaminobencidina) para visualizar la GCasa y se usó hematoxilina como contratinción. Las muestras tratadas con FLF-PL64 se obtuvieron cinco semanas después de la inyección, mientras que las muestras tratadas con VPRIV[®] se recogieron como estaba marcado. En la Tabla 3 se presenta un análisis semicuantitativo de las imágenes:

10 **Tabla 3: Niveles relativos de inmunorreactividad de la GCasa observados en hígado, bazo y médula ósea murinos después de la administración de ERT (VPRIV[®]) o FLF-PL64. "-" se refiere a tinción negativa para la GCasa; "+" representa tinción positiva para la GCasa.**

Grupo	Hígado	Bazo	Médula ósea
Ingenuo	-	-	-
ERT - 20 min	+	++	++
ERT - 60 min	+	+++	++
ERT - 240 min	+	-/+	-
ERT - 1440 min	-/+	-	-
FLF-PL64	+++	+++	++/+++

15 Ejemplo 9 - Estudio *in vivo* del potencial terapéutico

1. Métodos

Métodos con ratones

20 Se usaron ratones 9V/nulos portadores de la mutación D409V/D409V de *Gba1* (9V/9V) como modelo de la enfermedad de Gaucher en este estudio. Los ratones 9V/nulos tienen una esperanza de vida casi normal con anomalías viscerales (inflamación y células de almacenamiento) y acumulación de sustrato (Xu et al. Am J Pathol. 2003 Nov;163(5):2093-101; Xu et al. PLoS One. 2010 May 20;5(5):e10750). Los ratones 9V/nulos se generaron cruzando ratones portadores de la mutación D409V/D409V de *Gba1* (9V/9V) y *Gba1* nulo/WT. En cada camada se producen aproximadamente dos 9V/nulos. Las cepas de origen de los ratones 9V/nulos y WT son C57BL/6, 129SvEvBrd y FVB. Los ratones 9V/nulos de múltiples camadas se asignaron aleatoriamente a cada grupo de tratamiento de forma rotatoria. En cada grupo se incluyeron ratones tanto machos como hembras, intentando equilibrar los sexos en los grupos. Todos los ratones fueron alojados en condiciones sin patógenos y fueron monitorizados diariamente y pesados semanalmente. Todos los ratones tratados con AAV mostraron un crecimiento y un aumento de peso normales.

30 Al final del estudio, los ratones fueron eutanasiados con pentobarbital (100 mg/kg). Los ratones fueron perfundidos transcárdialmente con solución salina. A continuación, se diseccionaron el hígado, el bazo y el pulmón.

35 Preparación y administración de AAV/VPRIV

Se almacenaron alícuotas de AAV8-FLF-PL64 a -80 °C. Antes de la inyección, la alícuota se descongeló en hielo y se diluyó con X-VIVO 10 (Lonza, pH7,4, 4 °C), y se mezcló suavemente agitando brevemente en vórtex a baja velocidad. El AAV diluido se mantuvo en hielo antes de la inyección y se usó en un plazo de 2 horas.

40 Se resuspendió VPRIV[®] y se separó en alícuotas (25, 50, 100 µl) y se almacenó a -80 °C. Antes de la inyección, la alícuota se descongeló en hielo y se diluyó con X-VIVO 10 acidificado (Lonza, pH 5,5, 4 °C) hasta la dosis indicada, y se mezcló suavemente agitando brevemente en vórtex a baja velocidad. La enzima diluida se mantuvo en hielo antes de la inyección y se usó en un plazo de 2 horas.

45 Se administró AAV (2×10^{12} gv/kg) y vehículo (X-vivo) una sola vez a ratones 9V/nulos a las 8 semanas de edad con las dosis indicadas a 5 µl/g de peso corporal (PC). A los ratones WT se les administró vehículo. La administración del AAV y del vehículo se realizó a través de la vena de la cola de los ratones mientras estaban brevemente bajo isoflurano. VPRIV[®] se administró mediante inyección en bolo en la vena de la cola a ratones 9V/nulos anestesiados con una mezcla de isoflurano y oxígeno en una sala de bioburbujas a 60 U/kg y 2,5 µl/g de peso corporal, a partir de las 8 semanas de edad, quincenalmente, durante 7 inyecciones.

50 Recogida de tejidos

55 Se recogió sangre (~100 µl) de la vena de la cola en un tubo que contenía EDTA 0,5 M (5 µl) a las 12, 16 y 20

semanas de edad. Las muestras de sangre recién recogidas se mantuvieron en hielo y se separaron en plasma para analizar la actividad de la GCasa en un plazo de 2 horas. Cada recogida de plasma y ensayo de actividad del grupo de tratamiento con VPRIV® se realizó en las 2 horas siguientes a la inyección programada de la enzima. Se procesó una porción separada de sangre (~400 µl) para aislar los glóbulos blancos (WBC) para el ensayo de actividad de la GCasa. Los glóbulos blancos recogidos se almacenaron a -80 °C.

Se recogieron tejidos (hígado, pulmón, bazo, médula ósea) al final del experimento (20 semanas de edad). La recogida de tejidos del grupo de VPRIV® se realizó 2 horas después de la inyección enzimática programada final. Las muestras de hígado, pulmón y bazo se dividieron en 4 partes, 3 de las cuales se congelaron en tubos individuales y se almacenaron a -80 °C antes del ensayo de actividad de la GCasa, análisis de proteínas y sustratos. La parte restante se fijó en formol al 10 % para el análisis histológico. Se recogieron células de médula ósea de fémur y tibia de ambas patas de los ratones y se congelaron en dos tubos almacenados en congelador a -80 °C para los ensayos de actividad de la GCasa y sustrato.

15 *Ensayo de actividad de la GCasa*

Se homogeneizaron tejidos en 1 % de taurocolato de Na y 1 % de Tritón X-100 (Tc/Tx) usando un homogeneizador de tejidos Precellys Evolution durante dos ciclos (20 segundos cada uno, intervalo de 30 segundos) a 4 °C. Las células (médula ósea (MO) y glóbulos blancos (WBC)) se homogeneizaron en 1 % de Tc/Tx con sonicación a 4 °C. Los lisados de tejidos y células (2 µl) se diluyeron (5 x) con tampón de reacción en la mezcla de ensayo (tampón citrato-fosfato 0,025 M, pH5,6). Los lisados diluidos (10 µl) (por triplicado por muestra) se cargaron en la placa de reacción. La actividad de la GCasa se determinó fluorométricamente con 4-metilumbeliferil-β-D-glucopiranosido (4MU-Glucosa, 4 mM) (Biosynth AG, Suiza) en presencia y ausencia de epóxido de conduritol B 2 mM (Millipore, CA) incubado durante 1 hora a 37 °C. Las concentraciones de proteínas se determinaron usando el reactivo de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL).

El plasma se diluyó en tampón citrato-fosfato 0,025 M, pH 5,6. La actividad de la GCasa se determinó fluorométricamente con 4-metilumbeliferil-β-D-glucopiranosido (4MU-Glucosa, 4 mM) (Biosynth AG, Suiza) como antes.

30 *Análisis de sustratos*

Se pesaron y homogeneizaron tejidos congelados en 3,6 ml de metanol/cloroformo/H₂O (2:1:0,6 v/v/v). Se sometieron alícuotas (500 µl) del lisado a análisis de CL/EM. Se normalizaron la hexosilceramida y la hexosilesfingosina cuantificadas por peso de tejido.

El plasma se diluyó en agua (40 µl de plasma + 60 µl de agua) y se sometió a análisis de CL/EM. El nivel de sustrato se normalizó por volumen de plasma.

Las células de médula ósea se suspendieron en 200 µl de agua y se sometieron a sonicación y se removieron en vórtex para obtener el lisado celular. Se sometieron 160 µl de lisado a análisis de CL/EM. Se determinó la concentración de proteínas en el lisado restante. El nivel de sustrato se normalizó por mg de proteína.

Se realizaron análisis de CL/EM para analizar las concentraciones de hexosilceramida y hexosilesfingosina. Dado que los niveles de galatosilceramida y galatosilsfingosina son muy bajos en este modelo de ratón, las concentraciones medidas de hexosilceramida y hexosilesfingosina representan los niveles de glucosilceramida y glucosilsfingosina, respectivamente.

50 *Análisis histológico*

Se diseccionaron hígado, pulmón, bazo y médula ósea de ratones perfundidos con solución salina, se fijaron en formol (10 %) y se incorporaron en parafina. Los tejidos fijados se cortaron en secciones de 4 µm y se montaron en portaobjetos.

55 *Recuento de células de almacenamiento*

Se tiñeron secciones de tejido con hematoxilina y eosina (H&E) mediante Autostainner (Leica Autostainner XL). Los tejidos teñidos se escanearon con Aperio AT2 (Leica, 40X). Las imágenes de los tejidos se procesaron con Aperio ImageScope (V12.4.0.0543). Se eligieron para el análisis 10 fotos de magnitud 20X (imagen de 500 µm X 800 µm) de hígado y pulmón por ratón. Se contaron las células almacenadas de cada imagen. Se calculó la media de los recuentos de células de 10 imágenes para el gráfico de datos. La definición de "células de almacenamiento" se basa en el tamaño de las células (macrófago), por ejemplo, el tamaño de las células de almacenamiento en el hígado es > 10 µm, en el pulmón es > 15 µm.

Tinción y cuantificación de CD68

Se tiñeron secciones de tejido con anticuerpo de ratón anti-CD68 de conejo (1:25. Abcam Ab53444) en la máquina automatizada de tinción de portaobjetos IHC/ISH Discover Ultra. Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina en los núcleos celulares. Los tejidos teñidos se barrieron con Aperio AT2 (Leica, 40X) y las imágenes se adquirieron con Aperio ImageScope (V12.4.0.0543). Las imágenes de hígado y pulmón a una magnitud de 20X (500 μ m X 800 μ m) se usaron para el análisis cuantitativo. Las señales IHC de 5 imágenes de hígado o pulmón por ratón se analizaron usando Image J (Fiji, v5.1). Se calculó la media de señales CD68 por ratón para el gráfico de datos.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron mediante la prueba de la *t* de Student o ANOVA unidireccional. Los gráficos de las figuras y los análisis estadísticos se generaron con el software PRISM 8 (PRISM versión 8.0.1).

2. Resultados*Actividad de la GCasa*

El tratamiento con AAV-FLF-PL64 para restaurar los niveles de GCasa activa en ratones 9V/nulos se estudió midiendo la actividad de la GCasa en células y tejidos. Se recogieron muestras de glóbulos blancos (WBC), médula ósea y tejidos al final del experimento, como antes (es decir, 12 semanas después de la inyección de AAV-FLF-PL64 o en la administración final de VPRIV[®]), cuando los ratones tenían 20 semanas.

Se mostró que VPRIV[®] aumentaba la actividad en todas las células y tejidos analizados (Figura 13). Como se ha indicado anteriormente, los tejidos del grupo tratado con VPRIV[®] se recogieron en el plazo de 2 horas desde la última inyección, y esto está en línea con datos anteriores que muestran que esto está dentro del periodo donde VPRIV[®] alcanza su C_{máx} en los tejidos.

También se mostró que AAV-FLF-PL64 aumentaba significativamente la actividad de la GCasa en todos los tejidos tras una única administración (Figura 13). En comparación con el vehículo-9V/nulo, la actividad de la GCasa hepática aumentó en 4,7 veces, y la actividad de la GCasa hepática aumento en 2,5 veces. En los glóbulos blancos, se observó que la actividad de la GCasa aumentó significativamente en los grupos tratados con AAV-FLF-PL64 en 7-9 veces. En particular, el nivel de actividad de la GCasa en los glóbulos blancos alcanzó aproximadamente el 82 % de los niveles de actividad de WT.

Histología de tejidos

La patología visceral en ratones 9V/nulos se determinó contando los macrófagos espumosos como células de almacenamiento y cuantificando las señales de tinción de CD68 en macrófagos activados. Se contaron las células de almacenamiento en secciones de hígado teñidas con H&E. La intensidad de la señal de CD68 (color marrón) se cuantificó en secciones de hígado y pulmón teñidas con anticuerpos anti-CD68.

Las células de almacenamiento de tamaño $\geq 10 \mu$ m en el hígado se contaron a partir de 10 imágenes por tejido de cada ratón. En el hígado, el número de células de almacenamiento fue indetectable en los grupos tratados con AAV-FLF-PL64, así como en el grupo de VPRIV[®]. (Figura 14).

Las señales CD68 en el hígado también disminuyeron significativamente en los grupos tratados con AAV-FLF-PL64. El tratamiento con AAV-FLF-PL64 redujo las señales de CD68 a aproximadamente el 25 % del nivel de Vehículo-9V/nulo. En comparación, las señales de CD68 en el grupo de VPRIV fueron aproximadamente el 37 % del nivel de Vehículo-9V/nulo. (Figura 14)

Acumulación de sustrato

Se sabe que los ratones 9V/nulos desarrollan acumulación de sustratos de glucolípidos en hígado, pulmón y bazo (Xu et al. PLoS One. 2010 May 20;5(5):e10750). Por ejemplo, el estudio demostró que la hexosilceramida en el grupo de control Vehículo-9V/nulo es superior al nivel WT en 7,97 veces en el hígado y 3,57 veces en el bazo (datos no mostrados).

Los grupos tratados con AAV-FLF-PL64 mostraron una reducción significativa de la hexosilceramida y la hexosilesfingosina en el hígado y el bazo en comparación con el vehículo-9V/nulo (Figura 15). En particular, los grupos tratados con AAV-FLF-PL64 tenían niveles de hexosilceramida reducidos a 1,20 veces el nivel natural en el hígado y 1,03 veces el nivel natural en el bazo (datos no mostrados). Tras el análisis en la médula ósea se observó una reducción similar, cercana al nivel de WT (datos no mostrados).

Por otra parte, el tratamiento con VPRIV[®] únicamente mostró una reducción significativa de la hexosilceramida en el hígado, sin que los demás tejidos probados mostraran cambios significativos en los niveles de hexosilceramida. No pareció que VPRIV[®] tuviera efecto significativo sobre los niveles de hexosilesfingosina en ningún tejido analizado.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA, en donde la secuencia de nucleótidos de GBA codifica una proteína β -glucocerebrosidasa (GCasa) y en donde la secuencia de nucleótidos de GBA comprende una secuencia que es:

- (i) 100 % idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5;
- (ii) al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o al menos 99,8 % idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5, en donde la GCasa codificada por la secuencia de nucleótidos de GBA tiene actividad de la GCasa y se expresa en células hepáticas humanas a mayores niveles en comparación con una GCasa codificada por una secuencia de nucleótidos de GBA natural en un polinucleótido de referencia por lo demás idéntico; y/o
- (iii) una variante de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5 que codifica una proteína GCasa que tiene actividad de la GCasa, en donde la variante es idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5 respectivamente, excepto que comprende sustituciones de nucleótidos tales que la proteína GCasa tiene 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9 o hasta 10 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25, en donde además la GCasa codificada por el nucleótido de GBA se expresa en células hepáticas humanas a mayores niveles en comparación con una GCasa codificada por una secuencia de nucleótidos de GBA natural en un polinucleótido de referencia por lo demás idéntico.

2. El polinucleótido de la reivindicación 1, en donde:

(a) la variante es una variante de SEQ ID NO: 1 y la variante de SEQ ID NO: 1:

- (i) es idéntica a SEQ ID NO: 1, excepto que comprende sustituciones de nucleótidos tales que la proteína GCasa tiene 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9 o hasta 10 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25;
- (ii) tiene 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, hasta 10, hasta 20 o hasta 30 sustituciones de nucleótidos en relación con la secuencia de SEQ ID NO: 1;
- (iii) tiene 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5 o hasta 6 sustituciones de nucleótidos en relación con la secuencia de SEQ ID NO: 1;
- (iv) tiene hasta 4 sustituciones de nucleótidos en relación con la secuencia de SEQ ID NO: 1 y/o codifica una proteína GCasa que tiene hasta 3 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25;
- (v) tiene hasta 3 sustituciones de nucleótidos en relación con la secuencia de SEQ ID NO: 1 y/o codifica una proteína GCasa que tiene hasta 2 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25; y/o
- (vi) tiene 1 sustitución de nucleótidos en relación con la secuencia de SEQ ID NO: 1 y/o codifica una proteína GCasa que tiene hasta 1 sustitución de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la GCasa natural de SEQ ID NO: 25; o

(b) la variante es una variante de SEQ ID NO: 5 y la variante de SEQ ID NO: 5:

- (i) es idéntica a SEQ ID NO: 5, excepto que comprende sustituciones de nucleótidos tales que la proteína GCasa tiene 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9 o hasta 10 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos GCasa natural de SEQ ID NO: 25;
- (ii) tiene 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, hasta 10, hasta 20 o hasta 30 sustituciones de nucleótidos en relación con la secuencia de SEQ ID NO: 5;
- (iii) tiene 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5 o hasta 6 sustituciones de nucleótidos en relación con la secuencia de SEQ ID NO: 5;
- (iv) tiene hasta 4 sustituciones de nucleótidos en relación con la secuencia de SEQ ID NO: 5 y/o codifica una proteína GCasa que tiene hasta 3 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos GCasa natural de SEQ ID NO: 25;
- (v) tiene hasta 3 sustituciones de nucleótidos en relación con la secuencia de SEQ ID NO: 5 y/o codifica una proteína GCasa que tiene hasta 2 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la GCasa natural de SEQ ID NO: 25; y/o
- (vi) tiene 1 sustitución de nucleótidos en relación con la secuencia de SEQ ID NO: 5 y/o codifica una proteína GCasa que tiene hasta 1 sustitución de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de GCasa natural de SEQ ID NO: 25.

3. El polinucleótido de la reivindicación 1 o 2, en donde la variante tiene:

- (i) hasta 3 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la GCasa natural de SEQ ID NO: 25;
- (ii) hasta 2 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la GCasa natural de SEQ ID NO: 25; y/o

(iii) hasta 1 sustitución de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la GCasa natural de SEQ ID NO: 25.

4. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la GCasa codificada por la secuencia de nucleótidos de GBA se expresa en células hepáticas humanas a niveles más altos en comparación con una GCasa codificada por una secuencia de nucleótidos de GBA natural en un polinucleótido de referencia por lo demás idéntico y en donde:

(a) la secuencia de nucleótidos de GBA está optimizada para el codón para su expresión en células hepáticas humanas; y/o

(b) la secuencia de nucleótidos de GBA comprende un número reducido de CpG en comparación con una secuencia de nucleótidos de GBA natural; opcionalmente, en donde la secuencia de nucleótidos de GBA comprende menos de 40, menos de 20, menos de 18, menos de 10 o menos de 5 CpG, más opcionalmente, en donde la secuencia de nucleótidos de GBA comprende menos de 5, menos de 4, menos de 3 o menos de 2 CpG por 100 nucleótidos, más opcionalmente, en donde la secuencia de nucleótidos de GBA está libre de CpG, preferentemente, en donde la secuencia de nucleótidos de GBA natural es SEQ ID NO: 9.

5. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polinucleótido comprende además un elemento regulador de la transcripción, opcionalmente en donde el elemento regulador de la transcripción comprende un promotor y/o un potenciador específico del hígado; más opcionalmente en donde:

(I)

(a) el elemento regulador de la transcripción comprende un promotor A1AT o un fragmento de un promotor A1AT, opcionalmente en donde:

(i) el promotor A1AT o el fragmento de un promotor A1AT tiene al menos 100, al menos 120, al menos 150, al menos 180, menos de 255, entre 100 y 255, entre 150 y 225, entre 150 y 300, o entre 180 y 255 nucleótidos de longitud, más opcionalmente en donde el fragmento de un promotor A1AT tiene entre 180 y 255 nucleótidos de longitud;

(ii) el promotor A1AT o el fragmento de un promotor A1AT tiene al menos 200, al menos 250, al menos 300, menos de 500, entre 200 y 500, entre 250 y 500, entre 350 y 450, o 418 nucleótidos de longitud, más opcionalmente en donde el fragmento de un promotor A1AT tiene entre 350 y 450 nucleótidos de longitud; y/o

(iii) el polinucleótido comprende un promotor que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 12; y/o

(b) en donde el potenciador es un potenciador HCR o un fragmento de un potenciador HCR, opcionalmente en donde:

(i) el potenciador HCR o el fragmento de un potenciador HCR es un fragmento de al menos 80, al menos 90, al menos 100, menos de 192, entre 80 y 192, entre 90 y 192, entre 100 y 250, o entre 117 y 192 nucleótidos de longitud, más opcionalmente en donde el fragmento de un potenciador HCR tiene entre 117 y 192 nucleótidos de longitud;

(ii) el potenciador HCR o el fragmento de un potenciador HCR es un fragmento de al menos 150, al menos 190, al menos 230, menos de 400, entre 150 y 400, entre 190 y 370, entre 230 y 340, entre 250 y 340, o 321 nucleótidos de longitud, más opcionalmente en donde el fragmento de un potenciador HCR tiene entre 250 y 340 nucleótidos de longitud; o

(iii) el polinucleótido comprende un potenciador que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 11; o

(II) en donde el elemento regulador de la transcripción es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,8 % o 100 % idéntico a SEQ ID NO: 14 o 10.

6. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la GCasa codificada por la secuencia de nucleótidos de GBA se expresa en células hepáticas humanas al menos 1,1x, al menos 1,2x, al menos 1,3x, al menos 1,4x, o al menos 1,5x más en comparación con una GCasa codificada por una secuencia de nucleótidos de GBA natural en un polinucleótido de referencia idéntico, opcionalmente en donde el polinucleótido de referencia comprende una secuencia de nucleótidos de GBA natural de SEQ ID NO: 9, más opcionalmente en donde el polinucleótido de referencia comprende un promotor de SEQ ID NO: 13.

7. Una partícula vírica que comprende un genoma recombinante que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes; opcionalmente, en donde:

(a) la partícula vírica es una partícula vírica AAV, adenovírica o lentivírica, más opcionalmente una partícula vírica AAV;

(b) la partícula vírica comprende una cápside hepatotrópica o SNC-trópica, más opcionalmente en donde: (i) la cápside hepatotrópica comprende una secuencia al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 % idéntica a un fragmento de al menos 600, al menos 650, al menos 700, entre 600 y 736, entre 650 y 736 o entre 700 y 736 aminoácidos de SEQ ID NO: 19, 20 o 24, opcionalmente en donde la cápside hepatotrópica comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 19 o 20; o (ii) en donde la cápside SNC-trópica comprende una secuencia al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 99,5 % idéntica a un fragmento de al menos 600, al menos 650, al menos 700, entre 600 y 736, entre 650 y 736 o entre 700 y 736 aminoácidos de SEQ ID NO: 21, opcionalmente en donde la cápside SNC-trópica comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 21;

(c) el genoma recombinante comprende además:

- i) ITR de AAV2;
- ii) una secuencia de poliA; y/o
- iii) un intrón;

opcionalmente, en donde el genoma recombinante es monocatenario; y/o

(d) en la transducción en células Huh-7, la partícula vírica expresa GCasa de tal manera que la actividad de la GCasa en la célula transducida es mayor que la actividad de la GCasa en una célula transducida con una partícula vírica por lo demás idéntica que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA de SEQ ID NO: 9, opcionalmente en donde en la transducción en células Huh-7, la partícula vírica expresa GCasa de tal manera que la actividad de la GCasa en la célula transducida es al menos 2x, al menos 3x, al menos 4x, al menos 5x, al menos 10x, o al menos 20x mayor que la actividad de la GCasa en una célula transducida con una partícula vírica idéntica que comprende una secuencia de nucleótidos de GBA de SEQ ID NO: 9, más opcionalmente en donde la actividad se mide usando un sustrato fluorométrico que es específico para GCasa.

8. Una composición que comprende el polinucleótido o la partícula vírica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

9. El polinucleótido, partícula vírica o composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en un método de tratamiento, opcionalmente en donde el método de tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz del polinucleótido, composición o partícula vírica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 a un paciente; más opcionalmente en donde el método de tratamiento es:

- (a) un método de tratamiento de la enfermedad de Parkinson; o
- (b) un método de tratamiento de la enfermedad de Gaucher, opcionalmente en donde:

- (i) la enfermedad de Gaucher es enfermedad de Gaucher de tipo I, II o III; y/o
- (ii) el paciente tiene anticuerpos o inhibidores contra una GCasa recombinante con la que el paciente ha sido tratado previamente como parte de una terapia enzimática sustitutiva.

10. El polinucleótido, partícula vírica o composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en un método de tratamiento, comprendiendo el método: (a) expresar la secuencia de nucleótidos de GBA y lograr una actividad de la GCasa estable en un sujeto; o (b) expresar la secuencia de nucleótidos de GBA y proporcionar una mayor biodisponibilidad de GCasa en un sujeto en comparación con la biodisponibilidad de la terapia enzimática sustitutiva de GCasa, en donde la biodisponibilidad se mide durante un periodo de 2 semanas a partir de la administración.

11. El polinucleótido, partícula vírica o composición para uso en el método de tratamiento de la reivindicación 10, en donde:

- (a) lograr una actividad estable de la GCasa y/o proporcionar una mayor biodisponibilidad de la GCasa conduce al tratamiento de una enfermedad en el sujeto, opcionalmente en donde la enfermedad es la enfermedad de Gaucher, más opcionalmente en donde la enfermedad de Gaucher es la enfermedad de Gaucher tipo I, II o III; y/o
- (b)

- (i) la actividad de la GCasa es estable a un nivel de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8 o al menos 9 $\mu\text{mol/h/ml}$ en el sujeto;
- (ii) la actividad de la GCasa es estable a un nivel de al menos 3 $\mu\text{mol/h/ml}$ en el sujeto;
- (iii) la actividad de la GCasa es estable a un nivel de al menos 5 $\mu\text{mol/h/ml}$ en el sujeto;
- (iv) la actividad de la GCasa es estable a un nivel de al menos 9 $\mu\text{mol/h/ml}$ en el sujeto;
- (v) el método comprende administrar una dosis eficaz del polinucleótido, partícula vírica o composición al sujeto;
- (vi) la actividad de la GCasa estable es una actividad de la GCasa de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 % o al menos 50 % en relación con la actividad de la GCasa de un sujeto sano;
- (vii) la actividad de la GCasa estable es una actividad de la GCasa de entre 10 % y 100 %, entre 20 % y

90 %, entre 30 % y 70 %, entre 40 % y 70 %, o entre 50 % y 70 % en relación con la actividad de la GCasa de un sujeto sano;

(viii) la actividad de la GCasa estable es estable durante al menos 5 semanas desde la administración;

(ix) la actividad de la GCasa estable es estable durante al menos 10 semanas desde la administración;

5 (x) la actividad de la GCasa estable es estable durante al menos 15 semanas desde la administración;

(xi) la actividad de la GCasa estable es estable durante al menos 20 semanas desde la administración;

(xii) la actividad de la GCasa estable es estable durante al menos 25 semanas desde la administración;

(xiii) la actividad de la GCasa estable es estable durante al menos 30 semanas desde su administración;

10 (xiv) la actividad de la GCasa estable es estable durante al menos 35 semanas desde la administración;

(xv) la actividad de la GCasa estable es estable durante al menos 40 semanas desde la administración;

(xvi) la actividad de la GCasa en el hígado, el bazo y/o la médula ósea del sujeto al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o al menos 35 semanas después de la administración es mayor en comparación con la actividad medida en un sujeto al que se administra una dosis eficaz de una

15 terapia sustitutiva de la enzima GCasa, cuando se mide en el mismo ensayo en el mismo momento después de la administración; y/o

(xvii) la biodisponibilidad de la GCasa en el hígado, el bazo y/o la médula ósea del sujeto durante un periodo de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o al menos 35 semanas después de la administración es mayor en comparación con la biodisponibilidad medida en un sujeto al que se administra una dosis eficaz de una terapia sustitutiva de la enzima GCasa, cuando se mide en el mismo

20 ensayo en el mismo momento tras la administración;

y opcionalmente, en donde la enfermedad es la enfermedad de Gaucher, y más opcionalmente, en donde la enfermedad de Gaucher es la enfermedad de Gaucher tipo I, II o III.

25 12. El polinucleótido, partícula vírica o composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en un método de reducción de los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina en un sujeto que padece enfermedad de Parkinson o enfermedad de Gaucher, opcionalmente en donde la reducción de los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina conduce al tratamiento de la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Gaucher, más

30 opcionalmente en donde:
(i) los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina se reducen 2 veces o más, 3 veces o más, 4 veces o más, 5 veces o más, 6 veces o más, 2 a 3 veces, 2 a 4 veces, 2 a 5 veces, 2 a 6 veces, o 3 a 5 veces en comparación con los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina en el momento de la administración del polinucleótido, partícula vírica o composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;

35 (ii) la reducción en los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina es mayor que la reducción lograda en un sujeto al que se administra una dosis eficaz de una terapia sustitutiva de la enzima GCasa, opcionalmente cuando los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina se miden al menos 6 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas o al menos 12 semanas después de la administración;

(iii) los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina se miden en los macrófagos del sujeto;

40 (iv) los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina se miden en el bazo del sujeto;

(v) los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina se miden en el hígado del sujeto;

(vi) los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina se miden en el suero del sujeto;

(vii) los niveles de hexosilceramida y/o hexosilesfingosina se miden por espectrometría de masas; y/o

45 (viii) la enfermedad de Gaucher es enfermedad de Gaucher de tipo I, II o III.

13. El polinucleótido, partícula vírica o composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde el paciente tiene anticuerpos o inhibidores contra una GCasa recombinante con la que el paciente ha sido tratado previamente como parte de una terapia enzimática sustitutiva.

FIGURA 1

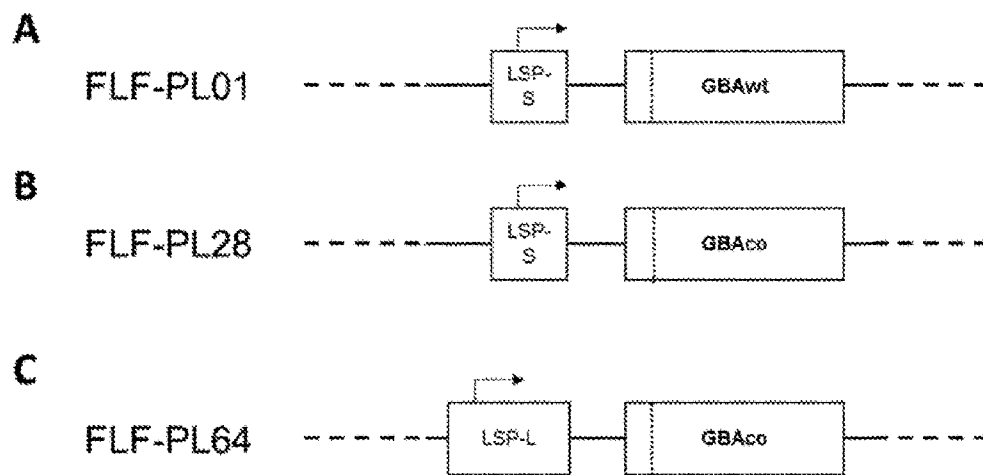


FIGURA 2

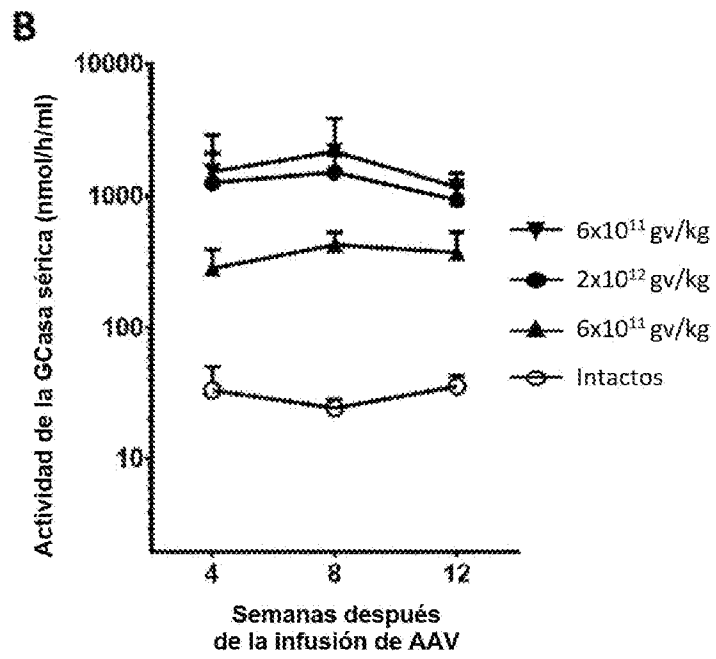
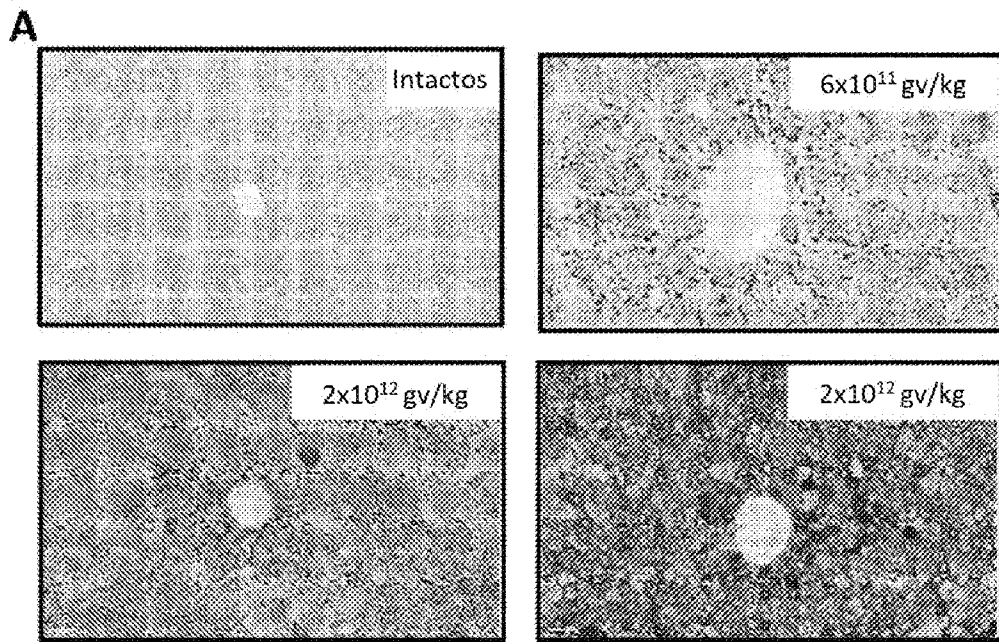


FIGURA 3

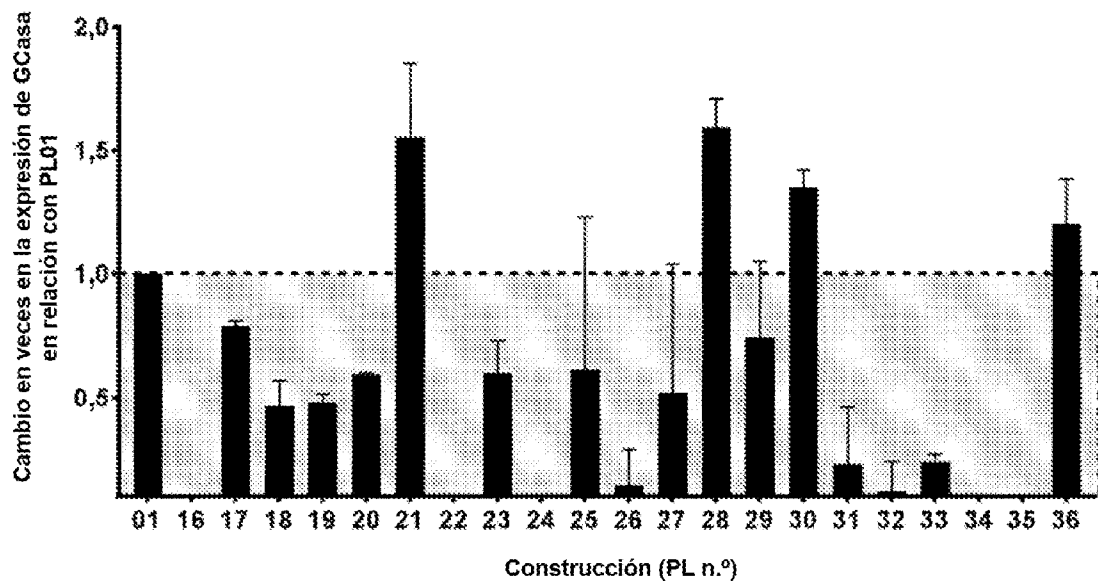
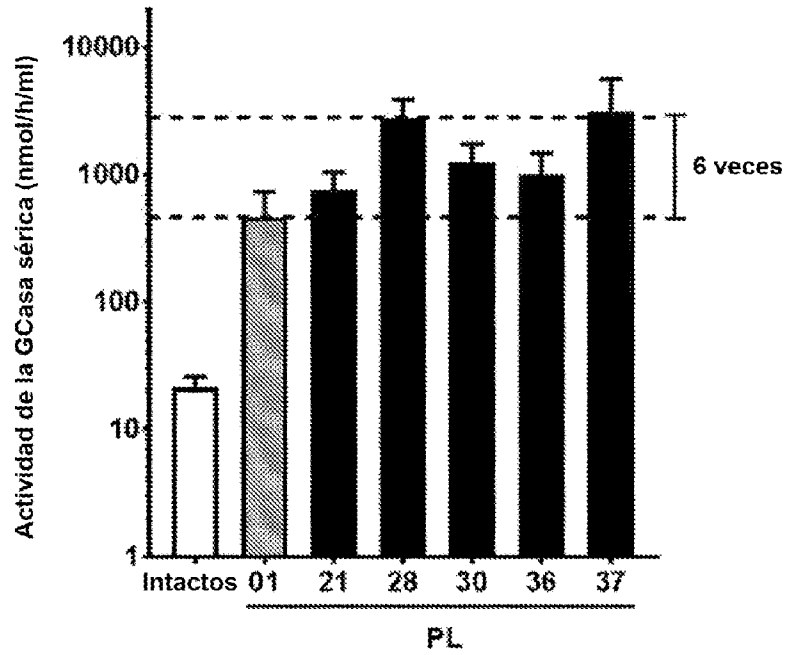


FIGURA 4

A



B

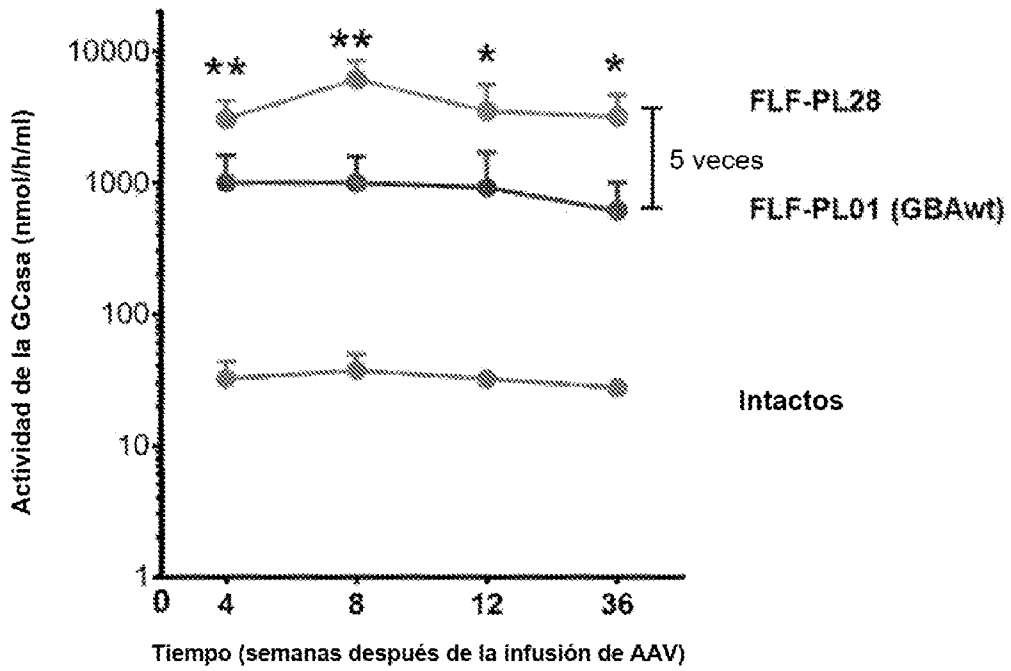


FIGURA 5

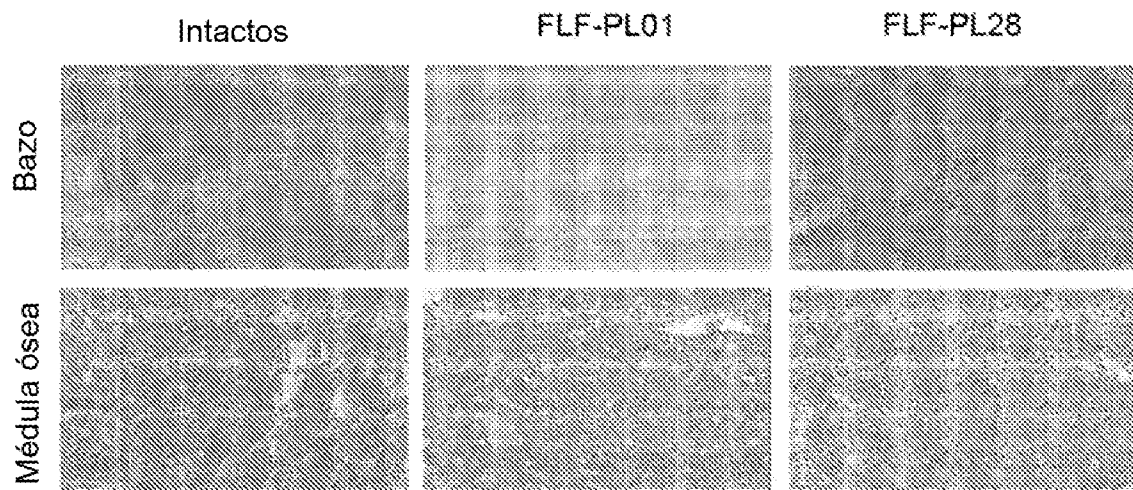


FIGURA 6

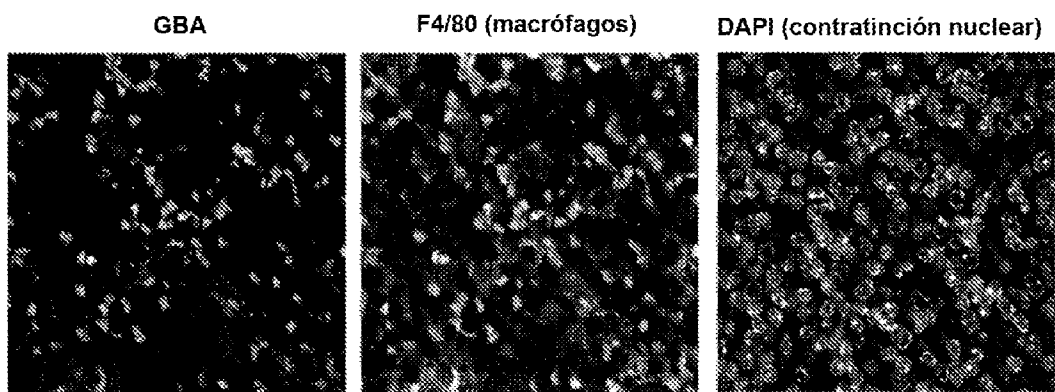


FIGURA 7

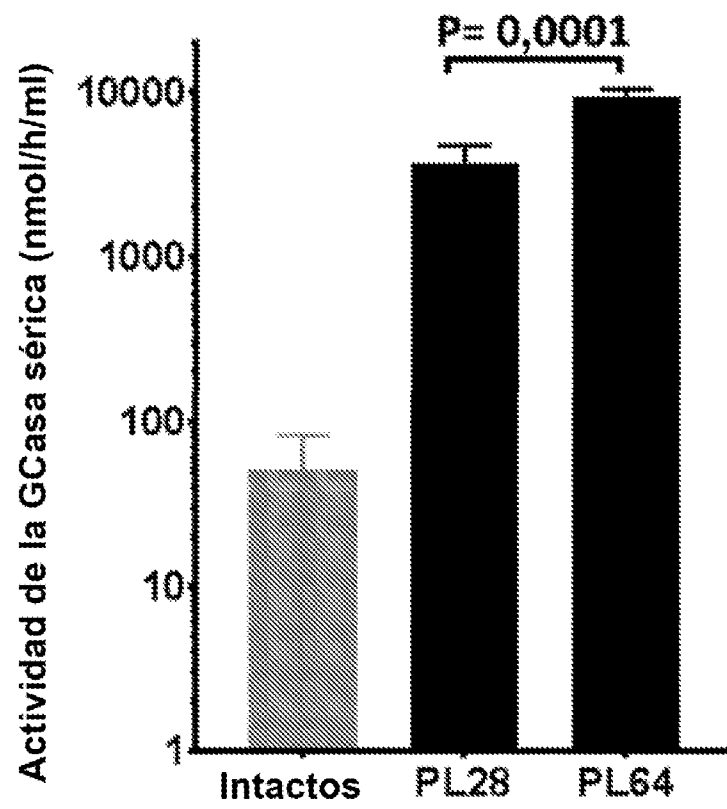


FIGURA 8

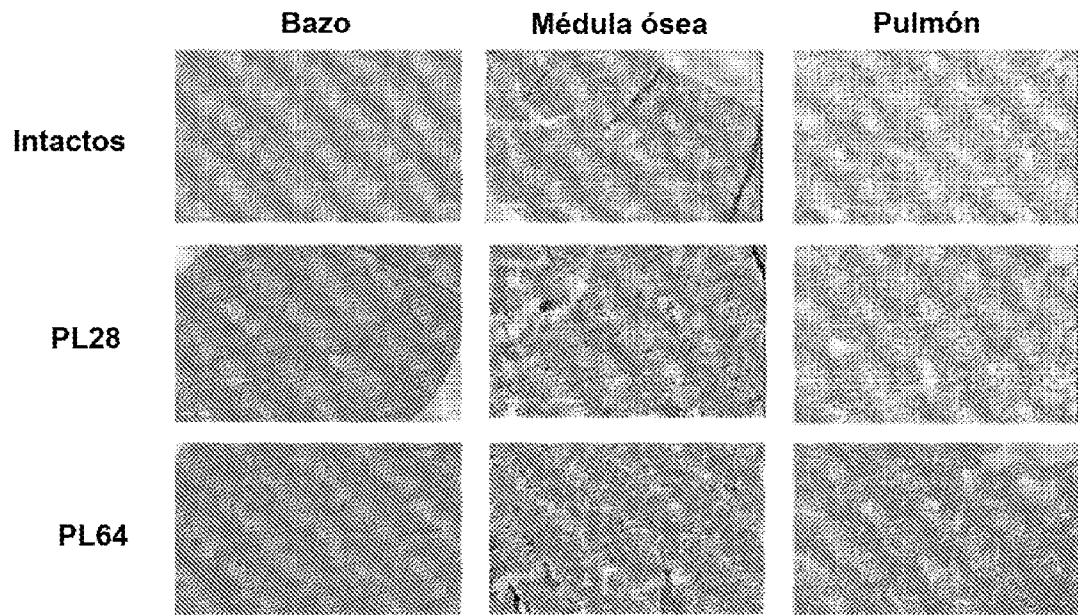


FIGURA 9

SEQ ID NO: 1 - Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL28, sin porción de péptido señalizador

GCCAGGCCCTGCATCCCTAAGAGCTTTGGCTACAGCTCTGTGGTGTGTGTGTGCAATGCCACCTAC
 TGTGACAGCTTTGACCCCCACCTTTCCTGCCCTGGGCACCTTCAGCAGATATGAGAGCACCAGGT
 CTGGGAGGAGGATGGAGCTGAGCATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACTGGCACTGGCCTGCTG
 CTGACCCTGCAGCCTGAGCAGAAGTTCCAGAAAGTAAAGGGCTTTGGAGGGGCCATGACTGATGCT
 GCTGCTCTGAACATCCTGGCCCTGAGCCCCCTGCCAGAATCTGCTGCTGAAGAGCTACTTCTCTG
 AGGAGGGCATTGGCTATAACATCATCAGGGTGCCCATGGCCAGCTGTGACTTCAGCATCAGGACCT
 ACACCTATGCTGACACCCCTGATGATTTCCAGCTGCACAACCTTCAGCCTGCCTGAGGAGGATACCAA
 GCTGAAGATCCCACTGATCCACAGGGCTCTGCAGCTGGCCAGAGGCTGTGAGCCTGCTGGCCAG
 CCCCTGGACCAGCCCCACTTGGCTGAAGACCAATGGGGCTGTGAATGGGAAGGGGAGCCTGAAGG
 GACAGCCTGGAGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGC
 TGAGCACAAGCTGCAGTTCTGGGCTGTGACTGCTGAGAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGCTGTCTGG
 CTACCCCTTCCAATGCCTGGGCTTACCCCTGAGCATCAGAGGGACTTCATTGCCAGGGACCTGGG
 CCTACCCCTGGCCAACAGCACTCACCATAATGTTAGGCTGCTGATGCTGGATGACCAGAGGCTGCT
 GCTGCCCCACTGGGCTAAGGTGGTGTGACTGACCCTGAGGCTGCTAAATATGTGCATGGCATTGC
 TGTGCATTGGTACCTGGACTTTCTGGCTCCTGCCAAGGCCACCCTGGGGGAGACCCACAGGCTGTT
 CCCC AACACCATGCTGTTTGCCTCTGAGGCCTGTGTGGGCAGCAAGTTCTGGGAGCAGTCTGTGAG
 GCTGGGCAGCTGGGATAGGGGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATACCAACCTGCTGTACCATGT
 GGTGGGCTGGACTGACTGGAACCTGGCCCTGAACCCTGAGGGAGGACCTAACTGGGTGAGAACTT
 TGTGGACAGCCCCATCATTGTGGACATACCAAGGACACCTTTTACAAGCAGCCCATGTTCTACCAC
 CTGGGCCACTTCAGCAAGTTCATCCCTGAGGGCAGCCAGAGAGTGGGGCTGGTGGCCAGCCAGAA
 GAATGACCTGGATGCTGTGGCTCTGATGCATCCTGATGGCTCTGCTGTGGTGGTGGTGTGAACAG
 GAGCTCTAAGGATGTGCCTCTGACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCTGGAGACCATCAGCCC
 TGGCTACAGCATCCACACCTACCTGTGGAGGAGGCAGTGA

SEQ ID NO: 2 - Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL30, sin porción de péptido señalizador

GCCAGGCCCTGTATCCCTAAGAGCTTTGGCTACAGCTCAGT_aGTtTGTGTCTGTAATGCCACATACTG
 TGACTCCTTtGACCCCCCTACCTTCCCTGCCCTGGGAACCTTCAGCAG_aTATGAGTCAACAAG_aTCAG
 GAAGGAGGATGGAGCTGTCAATGGGACCCATCCAGGCTAATCACACAGGCACAGGCCTGCTGCTGA
 CCCTGCAGCCAGAACAGAAGTTCCAGAA_aGTGAAGGGATTtGGAGGAGCCATGACAGATGCTGCTG
 CTCTCAACATCCTGGCCCTGTACCCCCCTGCCAGAATCTGCTGCTGAAGTCATACTTCTCTGAAGA
 AGGAATtGGATATAACATCATCAGGGTGCCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCATCAGGACCTACACC
 TATGctGACACCCCTGATGATTTCCAGCTGCACAACCTTCAGCCTCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAA
 GATCCCtCTGAT_aCaTAgGCaCTGCAGCTGGCCCCAGAGGCctGTGTACTCCTGGCCAGCCCCCTGGA
 CATCACCCACTTGGCTCAAGACCAATGGAGctGTGAATGGAAAGGGATCACTCAAGGGACAGCCtGG
 AGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAG_aTACTTtGTGAAGTTCTGGATGCCTATGCTGAGCACAAG
 CTGCAGTTCTGGGCaGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGACTGCTGTGAGGATACCCCTTCC
 AGTGTCTGGGCTTACCCCTGAACATCAGAGGGACTTCATtGCCAGGGACCTGGGACCTACCCCTtGC
 CAACTCAACTCACCACAATGTcAGGCTGCTCATGCTGGATGACCAGAGGCTGCTGCTGCCCACTGG
 GCCAAGGTGGTGTGACAGACCCAGAAGctGCTAA_aTATGTGCATGGCATtGCTGTGCATTGGTACC
 TGGACTTCTGGCTCCAGCCAAGGCCACCCTGGGAGAGACACACAGGCTGTTCCCCAACACCATGCT
 CTTtGCCTcTgAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTCTGGGAGCAGTCAGTgAGGCTGGGCTCCTGGGA
 TAGGGGAATGCAGTACAGCCACAGCATCATCAAAACCTCCTGTACCATGTGGTgGGCTGGACTGAC
 TGGAACCTGGCCCTGAACCCtGAAGGAGGACCCAAcTGGGTcagaAAtTTtGtGACTCACCCATCATt
 GTGGACATACCAAGGACACATTCTACAAGCAGCCCATGTTCTACCACCTGGGCCACTTCAGCAAGT
 TCATCCCTGAGGGCTCCAGAGGGTGGGACTGGTGGCCTCACAGAAAGAtGACCTGGAtGC_aGTGG

CCCTGATGCATCCtGATGGCTCTGCTGTGGTGGTtGTGCTGAAtAGaTCCTCTAAGGATGTGCCTCT
GACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATCCACACCTAC
CTGTGGAGGAGGCAGTGA

SEQ ID NO: 3 - Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL21,
sin porción de péptido señalizador

GCCAGGCCCTGCATCCCTAAGAGCTTTGGCTACAGCTCTGTGGTGTGTGTGTGCAATGCCACATAC
TGTGACTCCTTTGACCCCCCACCTTCTGCCCTGGGCACaTTctccAGaTATGAGAGCACAAGATC
TGGGAGAAGGATGGAGCTGAGCATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACTGGCACAGGCCTGCTGCT
GACCCTGCAGCCTGAACAGAAGTTTCAGAAaGTGAAGGGATTTGGAGGGGCCATGACAGATGCTGC
TGCTCTGAATATCCTGGCCCTGTCACCCCCTGCCAGAATCTGCTGCTGAAGAGCTACTTTTCAGAA
GAAGGAATTGGATATAATATCATCAGAGTGCCCATGGCCAGCTGTGACTTTTCCATCAGAACCTACA
CCTATGCAGACACCCCTGATGATTTTCAGCTGCACAATTTTAGCCTGCCTGAGGAAGATACCAAGCT
GAAGATACCCCTGATTCACAGGGCCCTGCAGCTGGCCAGAGGCCTGTTTCACTGCTGGCCAGCCC
CTGGACATCACCCACCTGGCTGAAGACCAATGGAGCTGTGAATGGGAAGGGGTCACTGAAGGGACA
GCCTGGAGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTTCTGGATGCCTATGCTGA
GCACAAGCTGCAGTTTTGGCAGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCAGCTGGGCTGCTGTCAGGATA
CCCCTTTCAGTGCCTGGGCTTTACCCCTGAACATCAGAGGGACTTTATTGCCAGGGACCTGGGCCCT
ACCCTGGCCAATAGCACCCAcCATAATGTgAGgttGCTGATGCTGGATGACCAGAGGCTGCTGCTGCC
CCACTGGGCAAAGGTGGTGTGCTGACAGACCCTGAAGCAGCTAAaTATGTTTCATGGCATTGCTGTGCA
TTGGTACCTGGACTTTCTGGCTCCTGCCAAGGCCACCCTGGGGGAGACACACAGGCTGTTCCCAA
TACCATGCTGTTTGCCCTtGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTTTGGGAGCAGTCTGTGAGGCTGGG
CTCCTGGGATAGAGGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACCATCTGCTGTACCATGTGGTGGG
CTGGACTGACTGGAATCTGGCCCTGAATCCTGAAGGAGGACctAacTGGGTcAGgAATTTTGTGGAC
AGCCCCATCATTGTGGACATACCAAGGACACCTTTTACAAGCAGCCCATGTTTTACCACCTGGGCC
ACTTTAGCAAGTTTATTCTGAGGGCTCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGCCAGAAGAATGACC
TGGATGCAGTGGCACTGATGCATCCTGATGGCTCAGCTGTTGTGGTGGTGTGCTGAATAGATCCAGCA
AGGATGTGCCTCTGACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTTCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTC
CATTACACCTACCTGTGGAGAAGGCAGTGA

SEQ ID NO: 4 - Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL36,
sin porción de péptido señalizador

GCCAGGCCTTGCATCCCAAAGTCTTTCCGGCTACAGCTCCGTGGTGTGCGTGTGCAACGCCACCTATT
GTGACTCCTTCGATCCCCCTACCTTTCCCGCCCTGGGCACATTTTCTAGATACGAGTCTACACGCAG
CGGCCGGAGAATGGAGCTGAGCATGGGCCCTATCCAGGCCAATCACACAGGAACAGGCCTGCTGCT
GACCCTGCAGCCAGAGCAGAAGTTCCAGAAGGTGAAGGGCTTTGGCGGAGCCATGACAGATGCAGC
CGCCCTGAACATCCTGGCCCTGTCCCCACCCGCCAGAATCTGCTGCTGAAGTCTACTTCTCTGAG
GAGGGCATCGGCTATAACATCATCCGGGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTTTCCATCAGAACCTACA
CATATGCCGATACCCCTGACGATTTCCAGCTGCACAATTTTTCCCTGCCAGAGGAGGATACAAAGCT
GAAGATCCCCCTGATTCACCGGGCCCTGCAGCTGGCACAGCGGCCCGTGAGCCTGCTGGCCAGCCC
CTGGACCTCCCCTACATGGCTGAAGACCAACGGCGCCGTGAATGGCAAGGGCTCTCTGAAGGGACA
GCCTGGCGACATCTACCACCAGACATGGGCCAGATATTTTCGTGAAGTTTCTGGATGCCTACGCCGA
GCACAAGCTGCAGTTCTGGGCCGTGACAGCAGAGAATGAGCCTTCTGCCGGCCTGCTGAGCGGCTA
TCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTTACACCTGAGCACCAGCGGGACTTTATCGCCAGAGATCTGGGCC
AACCTGGCCAACCTCCACACACCACAATGTGAGGCTGCTGATGCTGGACGATCAGCGCCTGCTGCT
GCCTCACTGGGCCAAGGTGGTGTGCTGACCGACCCAGAGGCCGCAAGTACGTGCACGGCATCGCCGT
GCACTGGTATCTGGATTTCTGGCACCTGCAAAGGCCACCCTGGGAGAGACACACCGGCTGTTCCC
TAACACCATGCTGTTTGGCAGCGAGGCCTGCGTGGGCTCCAAGTTTTGGGAGCAGTCCGTGAGGCT
GGGATCTTGGGACAGAGGCATGCAGTACTCCACTCTATCATCACCATCTGCTGTATCACGTGGTG
GGCTGGACAGACTGGAACCTGGCCCTGAATCCAGAGGGCGGCCCAACTGGGTGAGAAATTTCTGTG
GATAGCCCCATCATCGTGGACATACCAAGGATACATTTCTACAAGCAGCCAATGTTTTATCACCTGG
GCCACTTCTAAGTTTATCCCTGAGGGCAGCCAGAGGGTGGGCCCTGGTGGCCAGCCAGAAGAACC

TACAGCCACAGCATCATCACAAACCTCCTGTACCATGTGGTgGGCTGGACTGACTGGAACCTGGCCC
 TGAACCCtGAAGGAGGACCCAAcTGGGTcagaAAtTTtGTgGACTCACCCATCATtGTGGACATCACCA
 AGGACACATTCTACAAGCAGCCATGTTCTACCACCTGGGCCACTTCAGCAAGTTCATCCCTGAGGG
 CTCCCAGAGGGTGGGACTGGTGGCCTCACAGAAGAAtGACCTGGAtGCaGTGGCCCTGATGCATCCt
 GATGGCTCTGCTGTGGTGGTtGTGCTGAAtAGaTCCTCTAAGGATGTGCCTCTGACCATCAAGGATC
 CTGCTGTGGGCTTCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATCCACACCTACCTGTGGAGGAGGC
 AGTGA

SEQ ID NO: 7 - Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL30, con porción de péptido señalizador

ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCT
 GGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCTGGGCATCAGGTGCCAGGCCCTGCATC
 CCTAAGAGCTTTGGCTACAGCTCTGTGGTGTGTGTGTGCAATGCCACATACTGTGACTCCTTTGACC
 CCCCCACCTTCTGCCCTGGGCACaTTctccAGaTATGAGAGCACAAAGATCTGGGAGAAGGATGGA
 GCTGAGCATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACTGGCACAGGCCTGCTGCTGACCCTGCAGCCTGA
 ACAGAAGTTTCAGAAaGTGAAGGGATTTGGAGGGGCCATGACAGATGCTGCTGCTCTGAATATCCT
 GGCCCTGTACCCCCCTGCCAGAATCTGCTGCTGAAGAGCTACTTTTCAGAAGAAGGAATTGGATAT
 AATATCATCAGAGTGCCCATGGCCAGCTGTGACTTTTCCATCAGAACCCTACACCTATGCAGACACCC
 CTGATGATTTTCAGCTGCACAATTTTAGCCTGCCTGAGGAAGATACCAAGCTGAAGATACCCCTGAT
 TCACAGGGCCCTGCAGCTGGCCCAGAGGCCTGTTTCACTGCTGGCCAGCCCCCTGGACATCACCCAC
 CTGGCTGAAGACCAATGGAGCTGTGAATGGGAAGGGTCACTGAAGGGACAGCCTGGAGACATCTA
 CCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTTCTGGATGCCTATGCTGAGCACAAGCTGCAGTTT
 TGGGCAGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCAGCTGGGCTGCTGTCAGGATACCCCTTTTCAGTGCCTG
 GGCTTTACCCCTGAACATCAGAGGGACTTTATTGCCAGGGACCTGGGCCCTACCCTGGCCAATAGC
 ACCCAcCAtAATGTgAGgttgCTGATGCTGGATGACCAGAGGCTGCTGCTGCCCCACTGGGCAAAGGT
 GGTGCTGACAGACCCTGAAGCAGCTAAaTATGTTTCATGGCATTGCTGTGCATTGGTACCTGGACTTT
 CTGGCTCCTGCCAAGGCCACCCCTGGGGGAGACACACAGGCTGTTTCCAATACCATGCTGTTTGCC
 TctGAGGCCTGTGTGGCTCCAAGTTTTGGGAGCAGTCTGTGAGGCTGGGCTCCTGGGATAGAGG
 GATGCAGTACAGCCACAGCATCATACCAATCTGCTGTACCATGTGGTGGGCTGGACTGACTGGAA
 TCTGGCCCTGAATCCTGAAGGAGGACctAacTGGGTcAGgAATTTTGTGGACAGCCCCATCATTGTG
 GACATCACCAAGGACACCTTTTACAAGCAGCCCATGTTTTACCACCTGGGCCACTTTAGCAAGTTTA
 TTCCTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGTTTCCAGCCAGAAGAATGACCTGGATGCAGTGGCAC
 TGATGCATCCTGATGGCTCAGCTGTTGTGGTGGTGTGAATAGATCCAGCAAGGATGTGCCTCTGA
 CCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTTCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTACACCTACCT
 GTGGAGAAGGCAGTGA

SEQ ID NO: 8 - Secuencia de nucleótidos de GBA optimizada para el codón de FLF-PL36, con porción de péptido señalizador

ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCT
 GGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCTGGGCATCAGGTGCCAGGCCCTGCATC
 CCAAAGTCTTTCCGGCTACAGCTCCGTGGTGTGCGTGTGCAACGCCACCTATTGTGACTCCTTCGATC
 CCCCTACCTTTCCCGCCCTGGGCACATTTTCTAGATACGAGTCTACACGCAGCGGCCGGAGAATGGA
 GCTGAGCATGGGCCCTATCCAGGCCAATCACACAGGAACAGGCCTGCTGCTGACCCTGCAGCCAGA
 GCAGAAGTTCAGAAGGTGAAGGGCTTTGGCGGAGCCATGACAGATGCAGCCGCCCTGAACATCCT
 GGCCCTGTCCCCACCCGCCAGAACTGCTGCTGAAGTCTACTTCTCTGAGGAGGGCATCGGCTA
 TAACATCATCCGGGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTTTCCATCAGAACCCTACACATATGCCGATACC
 CCTGACGATTTCCAGCTGCACAATTTTCCCTGCCAGAGGAGGATACAAAGCTGAAGATCCCCCTGA
 TTCACCGGGCCCTGCAGCTGGCACAGCGGCCGTGAGCCTGCTGGCCAGCCCCCTGGACCTCCCCTA
 CATGGCTGAAGACCAACGGCGCCGTGAATGGCAAGGGCTCTCTGAAGGGACAGCCTGGCGACATCT
 ACCACCAGACATGGGCCAGATATTTCTGTAAGTTTCTGGATGCCTACGCCGAGCACAAGCTGCAGTT
 CTGGGGCCGTGACAGCAGAGAATGAGCCTTCTGCCGGCCTGCTGAGCGGCTATCCCTTCCAGTGCCT
 GGGCTTTACACCTGAGCACCAGCGGGACTTTATCGCCAGAGATCTGGGCCCAACCCTGGCCAACCT

CACACACCACAATGTGAGGCTGCTGATGCTGGACGATCAGCGCCTGCTGCTGCCTCACTGGGCCAA
 GGTGGTGCTGACCGACCCAGAGGCCGCCAAGTACGTGCACGGCATCGCCGTGCACTGGTATCTGGA
 TTTCCTGGCACCTGCAAAGGCCACCCTGGGAGAGACACACCGGCTGTTCCCTAACACCATGCTGTTT
 GCCAGCGAGGCCTGCGTGGGCTCCAAGTTTTGGGAGCAGTCCGTGAGGCTGGGATCTTGGGACAG
 AGGCATGCAGTACTCCCACTCTATCATACCAATCTGCTGTATCACGTGGTGGGCTGGACAGACTGG
 AACCTGGCCCTGAATCCAGAGGGCGGCCCAACTGGGTGAGAAATTCGTGGATAGCCCCATCATC
 GTGGACATCACCAAGGATACATTCTACAAGCAGCCAATGTTTTATCACCTGGGCCACTTCTCTAAGT
 TTATCCCTGAGGGCAGCCAGAGGGTGGCCTGGTGGCCAGCCAGAAGAACGACCTGGATGCCGTG
 GCCCTGATGCACCCTGATGGCTCCGCCGTGGTGGTGGTGTGAATCGCTCTAGCAAGGACGTGCCCT
 CTGACCATCAAGGATCCAGCCGTGGGATTTCTGGAGACTATTTACCTGGCTATTCAATTCATACCT
 ACCTGTGGAGGAGGCAGTGA

SEQ ID NO: 9 - Secuencia de nucleótidos de GBA humana natural con péptido señalizador
 (de GenBank NM_000157.3)

ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCT
 GGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTGCTGGGCATCAGGTGCCCGCCCCTGCATC
 CCTAAAAGCTTCGGCTACAGCTCGGTGGTGTGTGCTGCAATGCCACATACTGTGACTCCTTTGACC
 CCCCAGCTTTCTGCCCTTGGTACCTTCAGCCGCTATGAGAGTACACGCAGTGGGCGACGGATGG
 AGCTGAGTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGCACAGGCCTGCTACTGACCCTGCAGCCAG
 AACAGAAGTTCAGAAAGTGAAGGGATTTGGAGGGGCCATGACAGATGCTGCTGCTCTCAACATCC
 TTGCCCTGTCACCCCCTGCCAAAATTTGCTACTTAAATCGTACTTCTCTGAAGAAGGAATCGGATA
 TAACATCATCCGGGTACCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCATCCGCACCTACACCTATGCAGACACC
 CCTGATGATTTCCAGTTGCACAACCTTCAGCCTCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAAGATACCCCTGA
 TTCACCGAGCCCTGCAGTTGGCCCAGCGTCCCGTTTCACTCCTTGCCAGCCCCTGGACATCACCCAC
 TTGGCTCAAGACCAATGGAGCGGTGAATGGGAAGGGTCACTCAAGGGACAGCCCGGAGACATCTA
 CCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCTGAGCACAAGTTACAGTTC
 TGGGCAGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGTGGATACCCCTTCCAGTGCCTG
 GGCTTACCCCTGAACATCAGCGAGACTTCATTGCCCGTGACCTAGGTCTACCCCTGCCAACAGTA
 CTCACCACAATGTCCGCCTACTCATGCTGGATGACCAACGCTTGCTGCTGCCCCACTGGGCAAAGGT
 GGTACTGACAGACCCAGAAGCAGCTAAATATGTTTCATGGCATTGCTGTACATTGGTACCTGGACTTT
 CTGGCTCCAGCCAAAGCCACCCTAGGGGAGACACACCGCCTGTTCCCAACACCATGCTCTTTGCCCT
 CAGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTCTGGGAGCAGAGTGTGCGGCTAGGCTCCTGGGATCGAGGG
 ATGCAGTACAGCCACAGCATCATCAGAACCTCCTGTACCATGTGGTCCGGCTGGACCGACTGGAACC
 TTGCCCTGAACCCGAAGGAGGACCCAATTGGGTGCGTAACTTTGTGACAGTCCCATCATTGTAGA
 CATACCAAGGACACGTTTTACAAACAGCCATGTTCTACCACCTTGGCCACTTCAGCAAGTTCATTC
 CTGAGGGCTCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGTCAGAAGAACGACCTGGACGCAGTGGCACTG
 ATGCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTCTGTGCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGTGCTCTTACCA
 TCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTACACCTACCTGTG
 GCGTCGCCAGTGA

SEQ ID NO: 10 - Elemento regulador de la transcripción de LSP-S

CCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTT
 GGAGCTGGGGCAGAGGTGAGACACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAAGTGGACACAGGACGCTG
 TGGTTTCTGAGCCAGGGGGCGACTCAGATCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGTCTCCTCCGA
 TAACTGGGGTGAACCTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTT
 AAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACAGTGA
 AT

SEQ ID NO: 11 - Porción de potenciador HCR de LSP-S

CCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTT
GGAGCTGGGGCAGAGGTCAGACACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAAC

SEQ ID NO: 12 - Porción de promotor A1AT de LSP-S

GGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGTCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTT
GGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGAC
AGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT

SEQ ID NO: 13 - Promotor de CAG

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATG
GAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCCGCCCAT
TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT
GGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCT
ATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGCCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTC
CTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTG
CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTAATTATTTTG
TGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGG
GGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTT
TCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCG

SEQ ID NO: 14 - Elemento regulador de la transcripción de LSP-L

AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCT
CCAGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTA
AAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGC
TGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATT
TCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGCTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGTACCCGGGGAT
CTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACT
CTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGC
CAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAGCGTCCGGG
CAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGTCTCCTCCGATAACTG
GGGTGACCTTGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATAC
GGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATGATC
CCCCTGATCTGCGGCC

SEQ ID NO: 15 - Porción de promotor A1AT de LSP-L

GGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGG
TACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGACACAGGACGCTGTGGTTTCT
GAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAGCGTC
CGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGTCTCCTCCGATA
ACTGGGGTGACCTTGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAA
ATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT
GATCCCCCTGATCTGCGGCC

SEQ ID NO: 16 - Porción de potenciador HCR de LSP-L

AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCT
CCAGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTA
AAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGC
TGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATT
TCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGCTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGG

SEQ ID NO: 17 - Secuencia de nucleótidos de GBA natural correspondiente al péptido señalizador

ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCT
GGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCTGTTGGGCATCAGGT

SEQ ID NO: 18 - Secuencia de polipéptidos de GCase natural del péptido señalizador

MEFSSPSREECPKPLSRVSI MAGSLTGLLLLQAVSWASG

SEQ ID NO: 19 - Secuencia de polipéptidos de la cápside hepatotrópica

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLGPNGLDKGEPVNEA
DAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFAQKRRILEPLGLVEEAAKT
APGKKRPVDQSPQEPDSSSGVKGSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGG
APMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDVVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYST
PWGYFDNRFHCHFSRPRDWQRLINNNWGFPRKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSE
YQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFED
VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQGTTSGTTNQSRLLSQAGPQSMSLQARNWLPGPCYRQQ
RLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNDRSLVNP GPAMASHKDDEEKFFPMHGNI LIFGKEGTTASNAELDN
VMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDYYLQGPWAKIPHTD
GHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN
EIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

SEQ ID NO: 20 - Secuencia de polipéptidos de la cápside hepatotrópica

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPNGLDKGEPVNAA
DAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFAQKRRVLEPLGLVEEGAK
TAPGKKRPVDQSPQEPDSSSGVKGSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPPAAPTSLGSNTMASGG
GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDVVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGY
STPWGYFDNRFHCHFSRPRDWQRLINNNWGFPRKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTD
SEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTF
EDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQGTTSGTTNQSRLLSQAGPQSMSLQARNWLPGPCYR
QQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNDRSLVNP GPAMASHKDDEEKFFPMHGNI LIFGKEGTTASNAEL
DNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDYYLQGPWAKIPHT
DGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN
PEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

SEQ ID NO: 21 - Secuencia de polipéptidos de la cápside SNC-trópica

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLDKGEPVNAA
DAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQKRRILEPLGLVEEAAKT
APGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQAQKRLNFGQTGDTESVDPQPPIGEPPAAPSGVGLTMSAGGG
APVADNNEGADGVGSSGNWHCDSQWLGDVVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGSSNDNAYFGY
STPWGYFDNRFHCHFSRPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTD
SDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYFE
NVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNTLKFVSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRV
STTVTQNNNSEFAWPGASSWALNDRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKV
MITNEEEIKTTNPVATESYQVATNHQSAQAQAQTGWVQNGILPGMVWQDRDYYLQGPWAKIPHTDG
NFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN
QYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

SEQ ID NO: 22 - Secuencia de nucleótidos del intrón de SV40

GTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTAAACTACTGATTCTAATTGTTTCTCTCTTTTAG

SEQ ID NO: 23 - Secuencia de nucleótidos de la secuencia de poliA de la hormona de crecimiento bovina

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGG
TGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAT
TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA
TGCTGGGGA

SEQ ID NO: 24 - Secuencia de polipéptidos de la cápside hepatotrópica

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNA
DAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKKRLLLEPLGLVEEAAKT
APGKKRPVDQSPQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGG
APMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTSRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYST
PWGYDFNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGFPRPKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSE
YQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFED
VPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLNRTOGTTSGTTNQSRLLSQAGPQSMQLQARNWLPGPCYRQQ
RLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPMHGNIIFGKEGTTASNAELDN
VMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANLQSSNTAPTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTD
GHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNP
EIQYTSNYNKSVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRPL

SEQ ID NO: 25 - Secuencia de polipéptidos de la GCasa humana natural

MEFSSPSREECPKPLSRVSIAGSLTGLLLLQAVSWASGARPCIPKSFYSSVVCNATYCDSDPPTFPAL
GTFSRYESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTQPEQKFQKVGFGGAMTDAALNILALSPPAQNLLL
KSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPW
TSPTWLKTNGAVNGKGSLLKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQC
LGFTPEHQRFIARDLGPPLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIHVHWYLDFLA
PAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPE
GGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSAYVV
VLNRSSKDVPLTIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ

FIGURA 10

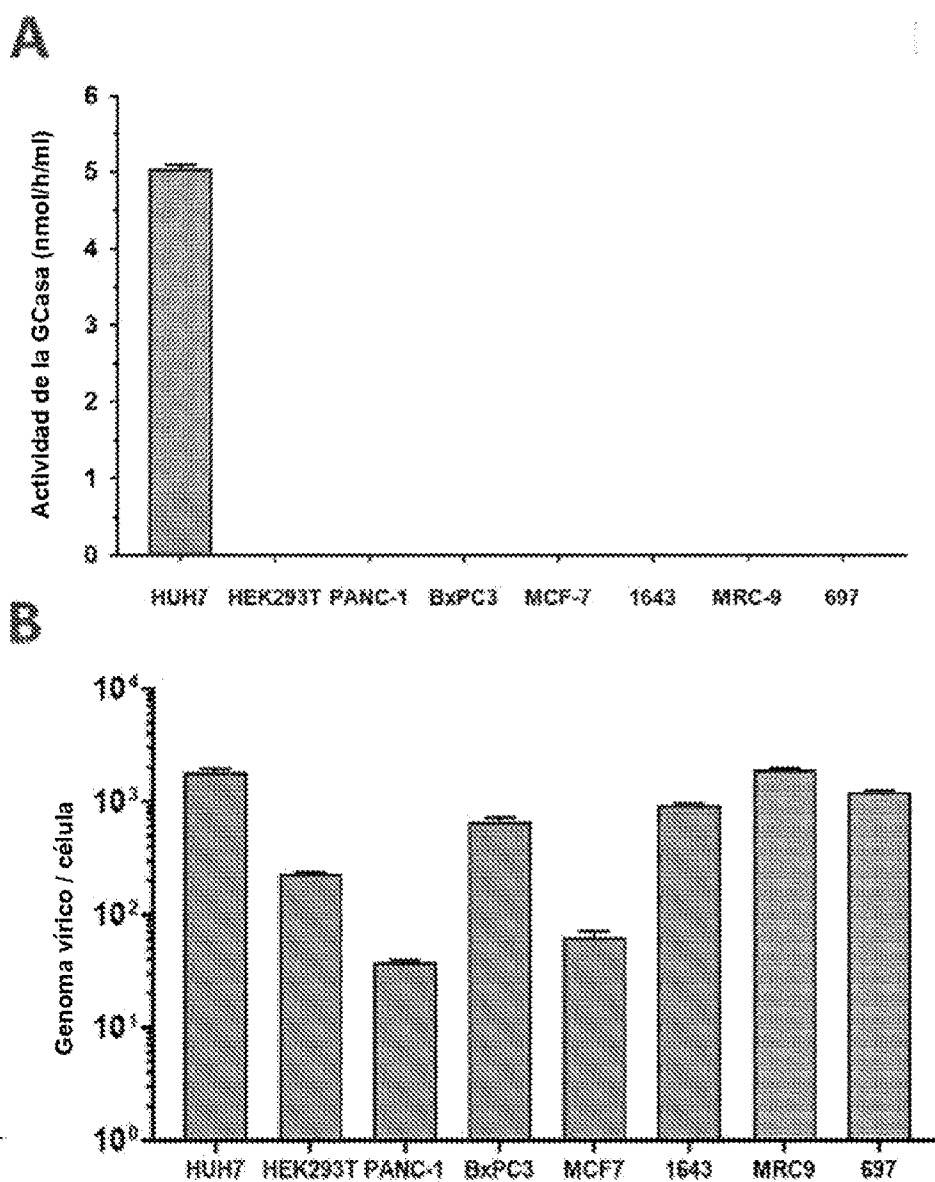
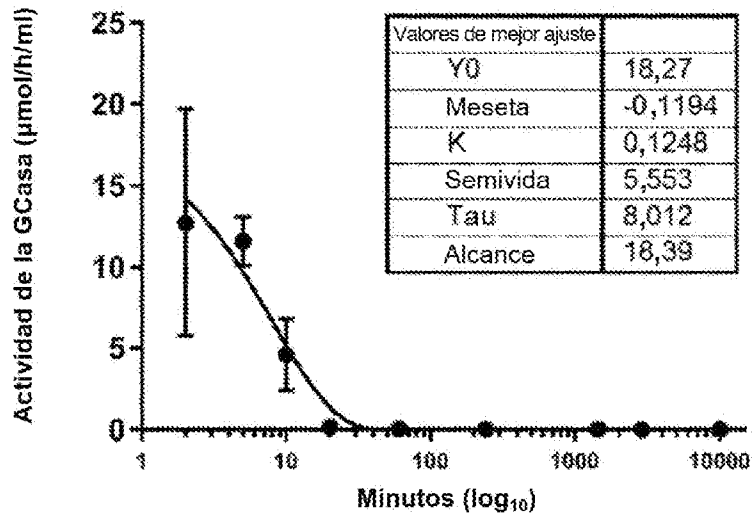


FIGURA 11

A



B

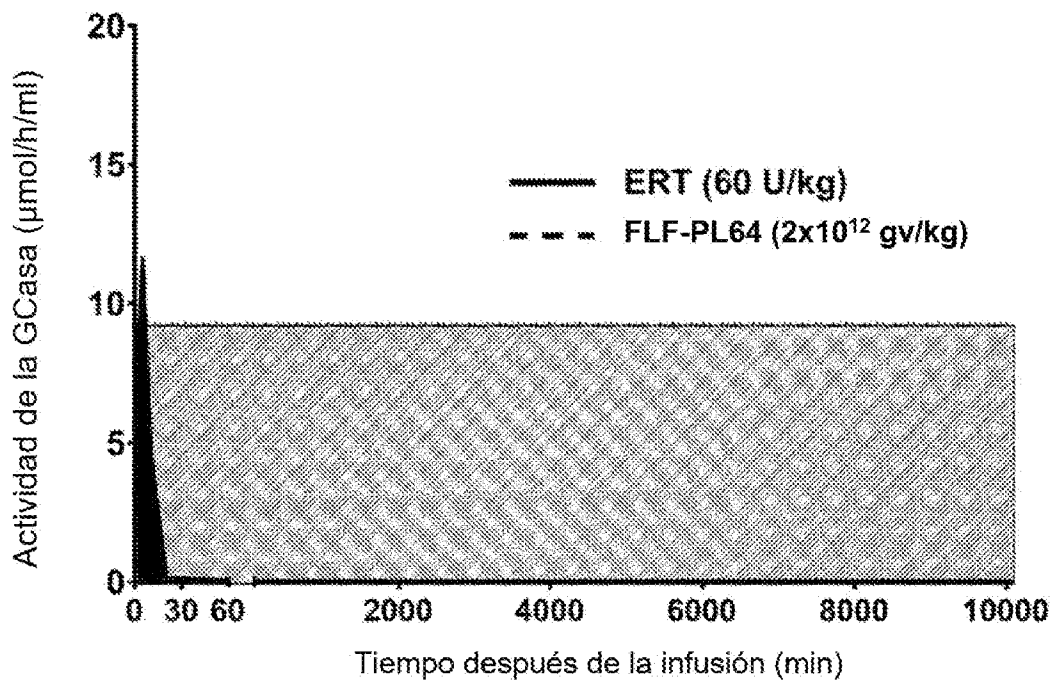


FIGURA 12

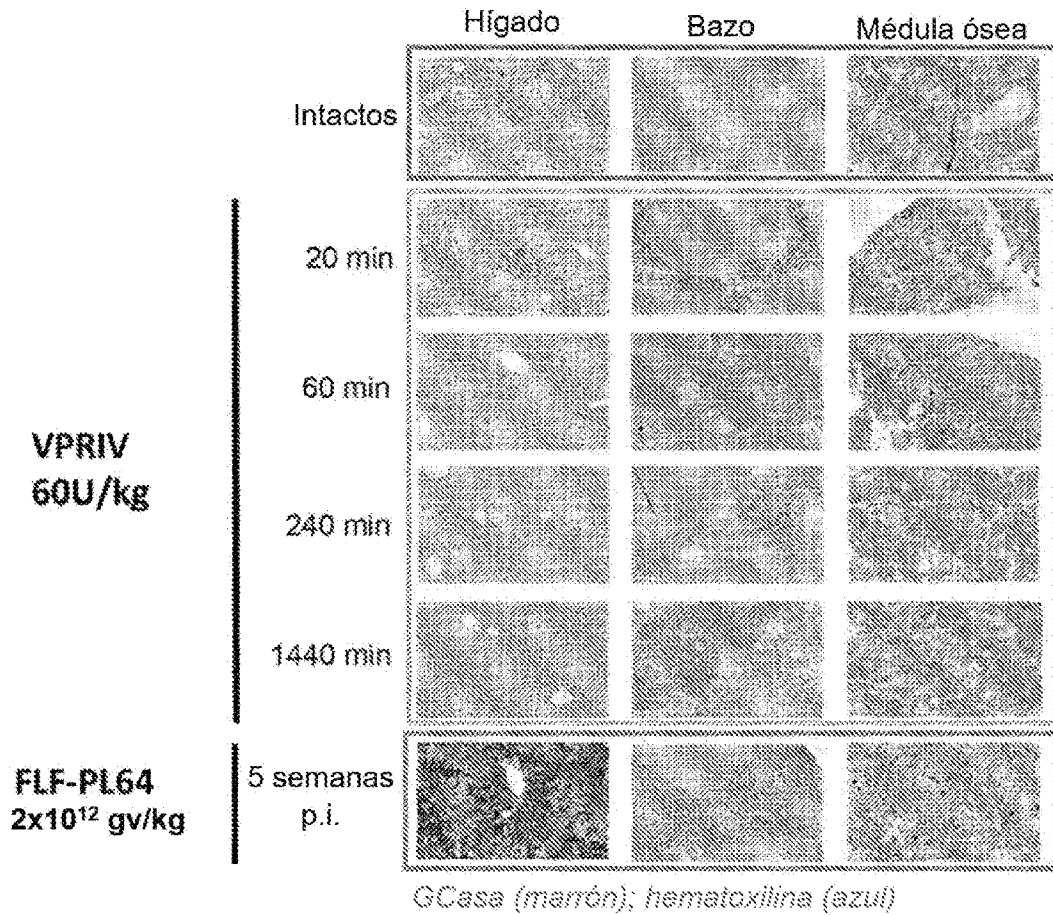


FIGURA 13

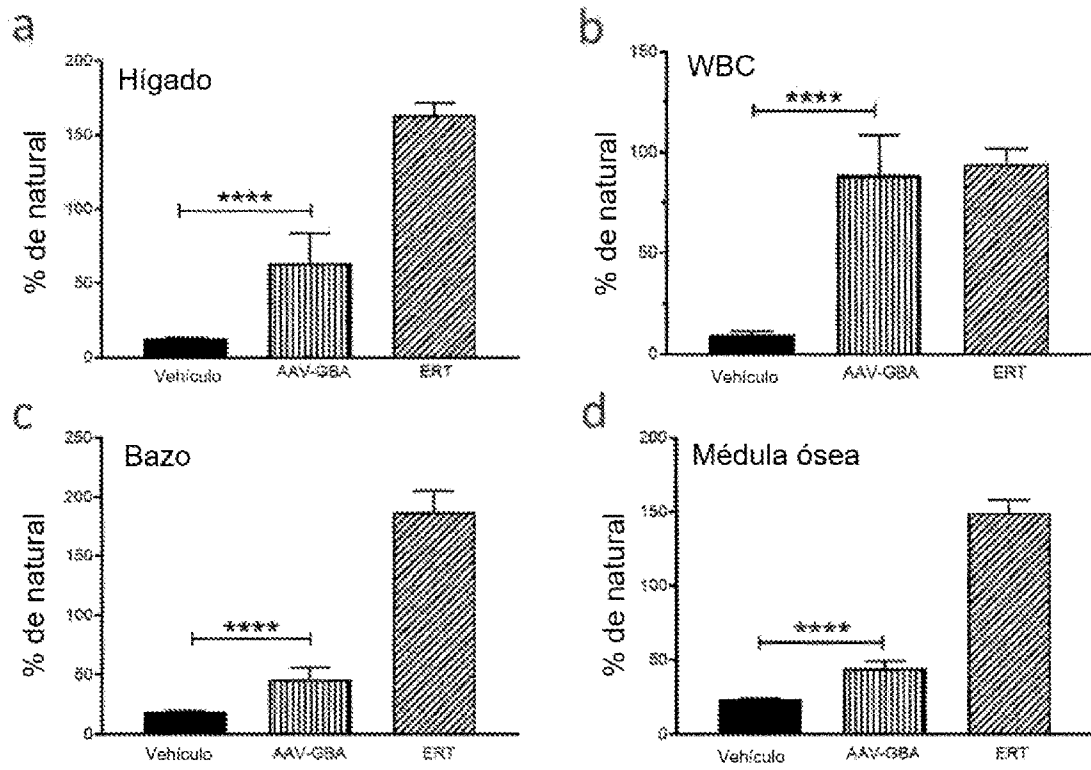


FIGURA 14

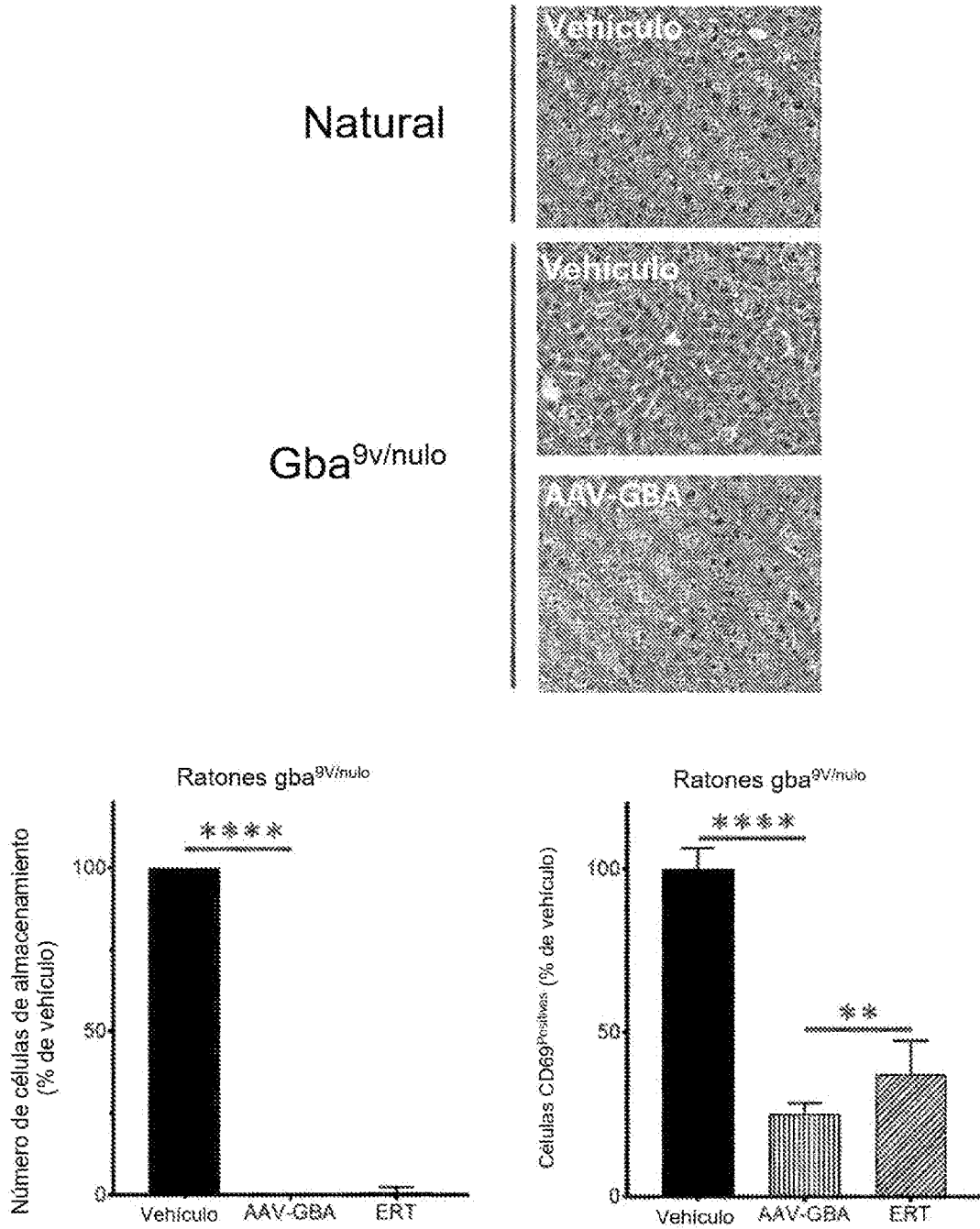
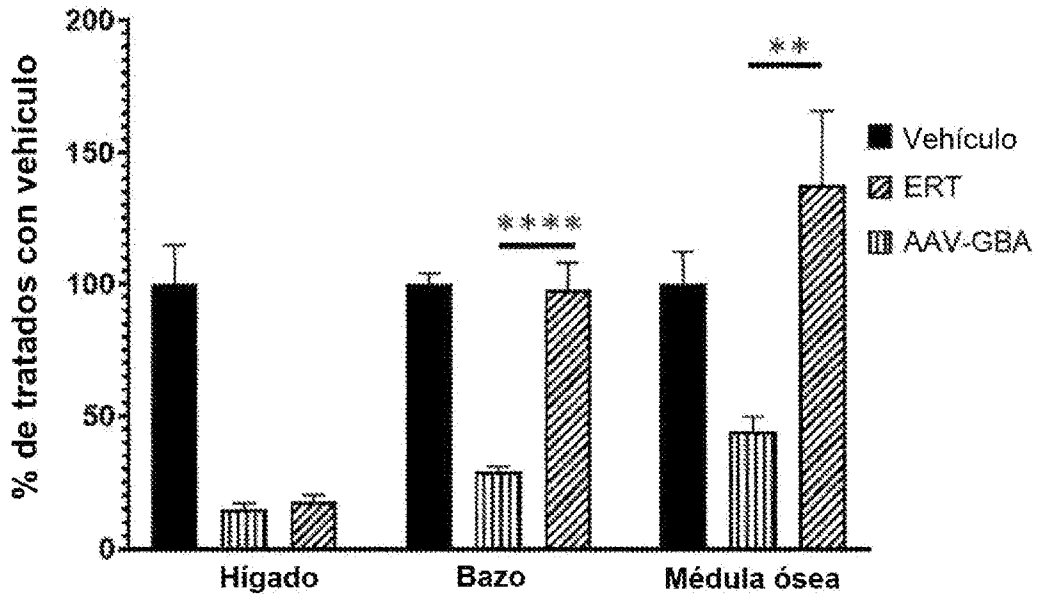


FIGURA 15

Hexosilceramida



Hexosilesfingosina

