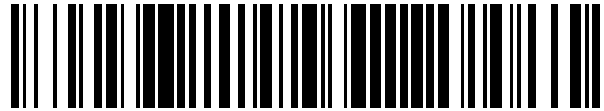


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 926 977**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2017 PCT/US2017/014164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.07.2017 WO17127565**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2017 E 17741940 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2022 EP 3405215**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de la enfermedad de Danon y otros trastornos de autofagia**

30 Prioridad:

19.01.2016 US 201662280269 P

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

31.10.2022

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 5th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**ADLER, ERIC, D.;
NELSON, BRADLEY y
HASHEM, SHERIN**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 926 977 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

Métodos para el tratamiento de la enfermedad de Danon y otros trastornos de autofagia

5 Antecedentes

La enfermedad de Danon es una miocardiopatía familiar asociada con una autofagia alterada debido a mutaciones en el gen que codifica la proteína 2 asociada a la membrana lisosomal (LAMP-2, también conocida como CD107b). La evidencia emergente ha resaltado la importancia de la autofagia en la regulación de la bioenergética, la función y la supervivencia de los cardiomiocitos. Sin embargo, los mecanismos responsables de la disfunción celular y la muerte en cardiomiocitos con flujo autofágico alterado siguen sin estar claros. En un estudio anterior, para investigar los mecanismos moleculares responsables de la enfermedad de Danon, generamos células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) de dos pacientes con diferentes mutaciones en LAMP-2 (Hashem, y otros, Stem Cells. Julio de 2015; 33(7):2343-50). Los cardiomiocitos derivados de hiPSC de Danon (hiPSC-CM) exhibieron un flujo autofágico alterado y características clave de la insuficiencia cardíaca, tales como un mayor tamaño celular, una mayor expresión de péptidos natriuréticos y un manejo anormal del calcio en comparación con los hiPSC-CM de control. Además, los hiPSC-CM de Danon demostraron cantidades excesivas de estrés oxidativo mitocondrial y apoptosis. El uso del antioxidante sulfhidrilo N-acetilcisteína para eliminar los radicales libres resultó en una reducción significativa de la muerte celular apoptótica en los hiPSC-CM de Danon. También usamos un vector lentiviral para introducir la secuencia codificante de la isoforma LAMP-2B bajo el control de un promotor inducible por doxiciclina en una de las líneas hiPSC de Danon. La sobreexpresión de LAMP-2B con la adición de doxiciclina también redujo los niveles de estrés oxidativo y la muerte celular apoptótica en los hiPSC-CM de Danon, lo que confirma la importancia de LAMP-2B en la fisiopatología de la enfermedad. En resumen, modelamos la enfermedad de Danon mediante el uso de los hiPSC-CM de pacientes con mutaciones en LAMP-2, lo que nos permitió obtener una visión mecánica de la patogénesis de esta enfermedad. Demostramos que la deficiencia de LAMP-2 condujo a un deterioro en el flujo autofágico, lo que resultó en un estrés oxidativo excesivo y la posterior apoptosis de los cardiomiocitos. La eliminación del exceso de radicales libres con antioxidantes y la sobreexpresión de LAMP-2B mejoró el fenotipo de la enfermedad *in vitro*. El estado de la técnica no describe estrategias de tratamiento eficaces para la enfermedad de Danon u otras enfermedades asociadas con autofagia, por lo que los estudios *in vivo* presentados en la presente descripción fueron necesarios para validar el enfoque.

Resumen

35 Modalidad

En la presente descripción se describen vectores de terapia génica, por ejemplo, para su uso en el aumento sistémico o local de la expresión de la isoforma 2B de la proteína asociada a la membrana lisosomal (LAMP-2B) en un sujeto. Los vectores de terapia génica encuentran uso para prevenir, mitigar, mejorar, reducir, inhibir y/o tratar uno o más síntomas de la enfermedad de Danon u otro trastorno de flujo autofágico insuficiente. Los vectores de terapia génica comprenden un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la isoforma 2B de la proteína asociada a la membrana lisosomal (LAMP-2B). El vector es de un (AAV) de serotipo 9. En diversas modalidades, el vector viral se encapsula en un liposoma aniónico. En diversas modalidades, el casete de expresión comprende unido operativamente en la dirección de 5' a 3' (desde la perspectiva del ARNm a transcribir), una primera repetición terminal inversa, un potenciador, un promotor, el polinucleótido que codifica la isoforma LAMP-2B, una región sin traducir 3', señal de poliadenilación (poli A) y una segunda repetición terminal inversa. En diversas modalidades, el promotor se selecciona del grupo que consiste en promotor de citomegalovirus (CMV) y promotor de beta actina de pollo (CAG). En diversas modalidades, el polinucleótido que codifica la isoforma LAMP-2B comprende la isoforma LAMP-2B humana. En diversas modalidades, el polinucleótido que codifica la isoforma LAMP-2B tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos aproximadamente 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, a la SEQ ID NO: 2. En diversas modalidades, el polinucleótido que codifica la isoforma LAMP-2B comprende la SEQ ID NO: 2.

Las referencias a los métodos de tratamiento en el presente párrafo de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. En otro aspecto, se proporcionan métodos para prevenir, mitigar, mejorar, reducir, inhibir, eliminar y/o revertir uno o más síntomas de la enfermedad de Danon u otro trastorno de autofagia en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar al sujeto un vector de terapia génica como se ha descrito anteriormente y en la presente descripción (consulte, por ejemplo, la Figura 2). En otro aspecto, se proporcionan métodos para prevenir, mitigar, mejorar, reducir, inhibir, eliminar y/o revertir uno o más síntomas de la enfermedad de Danon u otro trastorno de autofagia en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar al sujeto un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la isoforma 2B de la proteína asociada a la membrana lisosomal (LAMP-2B). En diversas modalidades, el vector se administra a través de una vía que se selecciona del grupo que consiste en intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intracoronaria, intramiocárdica, intrarrenal, intrauretral, epidural, intracaneal, subcutánea e intramuscular. En diversas modalidades, el vector se suministra o administra a través de un método físico o mecánico que se selecciona del grupo que consiste en

microinyección, inyección a chorro, bombardeo de partículas, infusión hidrodinámica, electroporación, sonoporación, irradiación láser, magnetofección. En diversas modalidades, el vector se administra múltiples veces con o sin inmunosupresión o plasmaféresis del paciente. En diversas modalidades, el trastorno de autofagia se selecciona del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca en etapa terminal, infarto de miocardio, toxicidades por fármacos, diabetes, insuficiencia renal en etapa terminal y envejecimiento. En diversas modalidades, el sujeto es un ser humano. En diversas modalidades, el sujeto presenta síntomas de la enfermedad de Danon u otro trastorno de autofagia. En diversas modalidades, se ha identificado que el sujeto tiene una expresión de LAMP-2 reducida o no detectable. En diversas modalidades, se ha identificado que el sujeto tiene un gen LAMP-2 mutado.

10 Definiciones

El término "enfermedad de Danon" se refiere a un trastorno del músculo cardíaco y esquelético dominante ligado al cromosoma X con manifestaciones clínicas multisistémicas. Las mutaciones de la enfermedad de Danon conducen a una ausencia de la expresión de la proteína 2 asociada a la membrana lisosomal (LAMP-2). Las principales características clínicas incluyen miopatía esquelética y cardíaca, anomalías en la conducción cardíaca, dificultades cognitivas y enfermedad de la retina. Los hombres se ven típicamente afectados antes y con mayor gravedad que las mujeres.

Los términos "proteína 2 asociada a la membrana lisosomal" y "LAMP-2" se refieren indistintamente a ácidos nucleicos y variantes polimórficas de polipéptidos, alelos, mutantes y homólogos entre especies que: (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, por ejemplo, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o mayor identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente en una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 300, 400 o más aminoácidos, o en toda la longitud, con una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico LAMP-2 (consulte, por ejemplo, núms. de acceso de GenBank NM_002294.2 (isoforma A), NM_013995.2 (isoforma B), NM_001122606.1 (isoforma C)) o con una secuencia de aminoácidos de un polipéptido LAMP-2 (consulte, por ejemplo, núms. de acceso de GenBank NP_002285.1 (isoforma A), NP_054701.1 (isoforma B), NP_001116078.1 (isoforma C)); (2) se unen a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales, producidos contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido LAMP-2 (por ejemplo, polipéptidos LAMP-2 descritos en la presente descripción); o una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico LAMP-2 (por ejemplo, polinucleótidos LAMP-2 descritos en la presente descripción), y variantes modificadas de forma conservadora de la misma; (3) se hibridan específicamente en condiciones de hibridación estrictas con una hebra antisentido correspondiente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína LAMP-2, y variantes modificadas de forma conservadora de la misma; (4) tienen una secuencia de ácidos nucleicos que tiene más de aproximadamente 90 %, preferentemente más de 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor de identidad de secuencia de nucleótidos, preferentemente sobre una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 o más nucleótidos, o en toda la longitud, con un ácido nucleico LAMP-2 (por ejemplo, polinucleótidos LAMP-2, como se describe en la presente descripción, y polinucleótidos LAMP-2 que codifican polipéptidos LAMP-2, como se describe en la presente descripción).

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como también a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos sintéticos y de origen natural, así como también a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como también aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, α -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido de origen natural.

En la presente descripción, se puede hacer referencia a los aminoácidos mediante sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Asimismo, puede hacerse referencia a los nucleótidos por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

Las "variantes modificadas de forma conservadora" se aplican tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas de forma conservadora se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a las secuencias

esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican, todos, el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de forma conservadora. Cada secuencia de ácidos nucleicos en la presente descripción que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para la metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para el triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altera, añade o elimina un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservadora" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen bien en la técnica. Dichas variantes modificadas de forma conservadora se suman y no excluyen las variantes polimórficas, los homólogos entre especies y los alelos de la invención.

Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina I, Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); y
- 7) Serina (S), Treonina (T)

Un "polinucleótido" es un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídos desde el extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan como pares de bases (abreviado "pb"), nucleótidos ("nt") o kilobases ("kb"). Cuando el contexto lo permita, los dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que son monocatenarios o bicatenarios. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias, se usa para indicar la longitud total y se entenderá que es equivalente al término "pares de bases". Los expertos en la técnica reconocerán que las dos hebras de un polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos del mismo pueden estar escalonados como resultado de la escisión enzimática; por lo tanto, todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido bicatenario pueden no estar emparejados.

Los términos "identidad" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos o ácidos nucleicos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (es decir, comparten al menos un 80 % de identidad, por ejemplo, al menos un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad sobre una región específica con una secuencia de referencia, por ejemplo, secuencia de polipéptidos o polinucleótidos LAMP-2 como se describe en la presente descripción, cuando se compara y alinea para obtener la máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o región designada según se mide mediante el uso de uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Entonces se dice que dichas secuencias son "sustancialmente idénticas". Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. Preferentemente, la identidad existe en una región que tiene al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, por ejemplo, en una región que tiene 50, 100, 200, 300, 400 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o en toda la longitud de una secuencia de referencia.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Pueden usarse parámetros de programa predeterminados o pueden designarse parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencias para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa. Para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas con ácidos nucleicos y proteínas LAMP-2, se usan los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 y los parámetros predeterminados.

Una "ventana de comparación", como se usa en la presente descripción, incluye la referencia a un segmento de cualquiera de las posiciones contiguas que se seleccionan del grupo que consiste en 20 a 600, normalmente de

aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más normalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén óptimamente alineadas. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación se conocen bien en la técnica. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (consulte, por ejemplo, Ausubel y otros, eds., Current Protocols in Molecular Biology (suplemento de 1995)). Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y otros, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990) y Altschul y otros, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1977), respectivamente. El programa informático para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (en la web mundial en ncbi.nlm.nih.gov/).

Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe más abajo. Por lo tanto, un polipéptido típicamente es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren solo por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones estrictas, como se describe más abajo. Otra indicación más de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que pueden usarse los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

Como se usa en la presente descripción, "administrar" se refiere a la administración local y sistémica, por ejemplo, que incluye administración enteral, parenteral, pulmonar y tópica/transdérmica. Las vías de administración para compuestos (por ejemplo, polinucleótido que codifica una o más isoformas LAMP-2) que encuentran uso en los métodos descritos en la presente descripción incluyen, por ejemplo, administración oral (*per os* (PO)), administración nasal o por inhalación, administración como supositorio, contacto tópico, suministro transdérmico (por ejemplo, a través de un parche transdérmico), administración intratecal (IT), administración intravenosa ("iv"), administración intraperitoneal ("ip"), administración intramuscular ("im"), administración intralesional o administración subcutánea ("sc"), o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, una bomba miniosmótica, una formulación de depósito, etc., a un sujeto. La administración puede ser por cualquier vía, que incluye parenteral y transmucosa (por ejemplo, oral, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, intravenoso, intramuscular, intraarterial, intrarrenal, intrauretral, intracardíaco, intracoronario, intramiocárdico, intradérmico, epidural, subcutáneo, intraperitoneal, intraventricular, ionoforético e intracraneal. Otros modos de suministro incluyen, pero no se limitan a, el uso de formulaciones liposomales, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

Los términos "administración sistémica" y "administrado sistémicamente" se refieren a un método de administración de un compuesto o una composición a un mamífero para que el compuesto o la composición se suministre a sitios del cuerpo, que incluyen el sitio diana de la acción farmacéutica, a través del sistema circulatorio. La administración sistémica incluye, pero no se limita a, la administración oral, intranasal, rectal y parenteral (por ejemplo, distinta de la del tracto alimentario, tales como la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, transdérmica y subcutánea).

El término "administración conjunta" o "administración concurrente", cuando se usa, por ejemplo, con respecto a los compuestos (por ejemplo, polinucleótidos LAMP-2) y/o análogos de los mismos y otro agente activo, se refiere a la administración del compuesto y/o los análogos y el agente activo de manera que ambos puedan lograr simultáneamente un efecto fisiológico. Los dos agentes, sin embargo, no necesitan administrarse juntos. En determinadas modalidades, la administración de un agente puede preceder a la administración del otro. El efecto fisiológico simultáneo no necesita necesariamente la presencia de ambos agentes en la circulación al mismo tiempo. Sin embargo, en determinadas modalidades, la administración conjunta típicamente da como resultado que ambos agentes estén presentes simultáneamente en el cuerpo (por ejemplo, en el plasma) en una fracción significativa (por ejemplo, 20 % o más, por ejemplo, 30 % o 40 % o más, por ejemplo, 50 % o 60 % o más, por ejemplo, 70 % o 80 % o 90 % o más) de su concentración máxima en suero para cualquier dosis dada.

El término "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad y/o la dosificación y/o el régimen de dosificación de uno o más compuestos (por ejemplo, vectores de terapia génica) necesarios para lograr el resultado deseado, por ejemplo, aumento de la expresión de una o más isoformas LAMP-2 en una cantidad suficiente para reducir la gravedad final de una enfermedad caracterizada por autofagia alterada o deficiente (por ejemplo, enfermedad de Danon).

La frase "hacer que se administre" se refiere a las acciones realizadas por un profesional médico (por ejemplo, un médico), o una persona que controla la atención médica de un sujeto, que controla y/o permite la administración de

agente(s)/compuesto(s) en cuestión al sujeto. Hacer que se administre puede implicar el diagnóstico y/o la determinación de un régimen terapéutico o profiláctico apropiado, y/o la prescripción de agente(s)/compuesto(s) particulares para un sujeto. Dicha prescripción puede incluir, por ejemplo, redactar un formulario de prescripción, anotar un registro médico, y similares.

5 La frase "junto con" cuando se usa en referencia al uso del agente o los agentes activos descritos en la presente descripción (por ejemplo, una o más isoformas de un polinucleótido LAMP-2) junto con uno o más fármacos descritos en la presente descripción (por ejemplo, un inhibidor de la acetilcolinesterasa), el(los) agente(s) activo(s) y el(los) otro(s) fármaco(s) se administran de modo que haya al menos cierta superposición cronológica en su actividad fisiológica en el organismo. Cuando no se administran en conjunto, no hay superposición cronológica en la actividad fisiológica sobre el organismo. En determinadas modalidades preferidas, los "otros fármacos" no se administran en absoluto (por ejemplo, no se administran conjuntamente) al organismo.

10 Como se usa en la presente descripción, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a retrasar el inicio, retrasar o revertir el progreso, reducir la gravedad, aliviar o prevenir la enfermedad o la afección a la que se aplica el término, o uno o más síntomas de tal enfermedad o afección.

15 El término "mitigar" se refiere a la reducción o la eliminación de uno o más síntomas de esa patología o enfermedad, y/o una reducción en la tasa o el retraso en el inicio o la gravedad de uno o más síntomas de esa patología o enfermedad, y/o la prevención de esa patología o enfermedad. En determinadas modalidades, la reducción o la eliminación de uno o más síntomas de la patología o la enfermedad pueden incluir, por ejemplo, el aumento medible y sostenido en los niveles de expresión de una o más isoformas de LAMP-2.

20 Como se usa en la presente descripción, la frase "que consiste esencialmente en" se refiere a los géneros o especies de agentes farmacéuticos activos mencionados en un método o una composición, y además puede incluir otros agentes que, por sí solos, no tienen una actividad sustancial para la indicación o propósito mencionado.

25 Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se refieren indistintamente a un mamífero, preferentemente un humano o un primate no humano, pero también a mamíferos domesticados (por ejemplo, caninos o felinos), mamíferos de laboratorio (por ejemplo, ratones, rata, conejo, hámster, conejillo de indias) y mamíferos agrícolas (por ejemplo, equino, bovino, porcino, ovino). En varias modalidades, el sujeto puede ser un ser humano (por ejemplo, hombre adulto, mujer adulta, hombre adolescente, mujer adolescente, niño, niña) bajo el cuidado de un médico u otro trabajador de la salud en un hospital, centro de atención psiquiátrica, tal como un paciente ambulatorio u otro contexto clínico. En determinadas modalidades, el sujeto puede no estar bajo el cuidado o la prescripción de un médico u otro trabajador de la salud.

30 Los términos "transferencia de genes" o "suministro de genes" se refieren a métodos o sistemas para insertar de forma fiable ADN extraño en células huésped. Dichos métodos pueden dar como resultado la expresión transitoria de ADN transferido no integrado, la replicación extracromosómica y la expresión de replicones transferidos (por ejemplo, episomas), o la integración de material genético transferido en el ADN genómico de las células huésped.

35 Por un "vector AAV" se entiende un vector derivado de un serotipo de virus adenoasociado, que incluye, pero no se limita a, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, etc. Los vectores AAV pueden tener uno o más de los genes AAV de tipo salvaje eliminados en su totalidad o en parte, por ejemplo, los genes rep y/o cap, pero retienen secuencias de repetición terminal invertida (ITR) flanqueantes funcionales. Las secuencias ITR funcionales son necesarias para el rescate, la replicación y el empaquetamiento del virión AAV. Por lo tanto, un vector AAV se define en la presente descripción para incluir al menos aquellas secuencias requeridas en cis para la replicación y el empaquetamiento (por ejemplo, ITR funcionales) del virus. No es necesario que las ITR sean las secuencias de nucleótidos de tipo salvaje y pueden alterarse, por ejemplo, por la inserción, la eliminación o la sustitución de nucleótidos, siempre que las secuencias proporcionen rescate, replicación y empaquetamiento funcional. Los vectores de expresión de AAV se construyen mediante el uso de técnicas conocidas para proporcionar al menos componentes unidos operativamente en la dirección de la transcripción, elementos de control que incluyen una región de inicio transcripcional, el ADN de interés (es decir, el gen LAMP-2) y una región de terminación transcripcional.

55 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra esquemas de construcciones de suministro de genes LAMP-2 de virus adenoasociados. La región codificante de LAMP-2 de la proteína asociada a la membrana lisosomal (LAMP) indicada generalmente debe entenderse que incluye la secuencia de unión al ribosoma en dirección 5' y el codón de inicio, pero en algunas modalidades el elemento nativo puede sustituirse por uno heterólogo. El sitio de unión al ribosoma en dirección 5' no se usa en combinación con regiones codificantes en dirección 3' de un IRES o péptido autoescindible. El codón de inicio no está necesariamente presente en las regiones codificantes en dirección 3' de un péptido autoescindible. Las Figuras 1A-1F muestran genomas de vectores que contienen una isoforma LAMP-2. Las Figuras 1G-1K muestran genomas de vectores que contienen dos isoformas LAMP-2. Las Figuras 1L-1O muestran genomas de vectores que contienen las tres isoformas LAMP-2. En la figura se usan las siguientes abreviaturas: ITR: repetición terminal inversa; LAMP-2: proteína asociada a la membrana lisosomal

tipo 2; UTR: región sin traducir; Poli A: señal de poliadenilación; CAG: región promotora que comprende secuencias potenciadoras de CMV y promotoras de CBA; CMV: citomegalovirus; CBA: beta-actina de pollo; WPRE: elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota; RBG: señal de poliadenilación de beta-globina de conejo; EF-1: factor de elongación humano 1; IRES: sitio interno de entrada al ribosoma; P2A: péptido 2A.

La Figura 1A muestra un esquema de una construcción que contiene información de codificación de proteínas para una isoforma LAMP-2 (A, B o C) con regiones de control genéricas en 5' y 3'.

La Figura 1B muestra un esquema de la construcción de algunas modalidades y se usa en los Ejemplos a continuación que consisten en los elementos de repetición terminal inversa 5' y 3', una región promotora de CAG que contiene las secuencias potenciadoras de CMV y promotoras de CBA, el intrón de CBA, la secuencia codificante para una de las isoformas LAMP-2 que incluye la secuencia de unión ribosomal en dirección 5' y el codón de inicio, la secuencia WPRE como la 3' UTR y la señal de poliadenilación de beta-globina de conejo.

La Figura 1C muestra un esquema de una construcción que contiene la región promotora de LAMP-2 humana nativa. En algunas modalidades, esta construcción se usa para expresar el transgén en respuesta a señales celulares que típicamente darían como resultado la expresión de LAMP-2 en células normales.

La Figura 1D muestra un esquema de una construcción que contiene el promotor alfa del factor de elongación humano 1. En algunas modalidades, esta construcción se usa para expresar el transgén de forma constitutiva bajo el control de una región promotora humana. También podrían usarse otros promotores humanos activos de forma constitutiva en lugar de EF-1 alfa.

La Figura 1E muestra un esquema de una construcción que contiene un promotor específico del corazón tal como, pero no se limita a, el promotor T2 de la troponina cardiaca. En algunas modalidades, esta construcción se usa para expresar el transgén solo en tejido cardíaco (y, por ejemplo, evitar la expresión hepática).

La Figura 1F muestra un esquema de una construcción que contiene un promotor específico de músculo tal como, pero no se limita a, el promotor de creatinina cinasa de músculo. En algunas modalidades, esta construcción se usa para expresar el transgén en el músculo cardíaco y esquelético (y evitar la expresión extramuscular).

La Figura 1G muestra un esquema de una construcción que contiene las secuencias codificantes de dos isoformas LAMP-2 (mediante el uso de cualquier combinación potencial) bajo el control de diferentes regiones promotoras. En algunas modalidades, esta construcción (y las de las Figuras 1H a 1K) se usa para expresar dos isoformas LAMP-2 diferentes mediante el uso del mismo genoma viral.

La Figura 1H muestra un esquema de una construcción que contiene las secuencias de dos isoformas LAMP-2 (mediante el uso de cualquier combinación potencial) bajo el control de diferentes regiones promotoras. Una isoforma está codificada en la dirección (+) en el genoma de AAV monocatenario y la otra isoforma está codificada en la dirección (-). En algunas modalidades, esta construcción se usa para expresar dos isoformas LAMP-2 diferentes en hebras de ADN separadas.

La Figura 1I muestra un esquema de una construcción que contiene las secuencias codificantes para dos isoformas LAMP-2 (mediante el uso de cualquier combinación potencial) bajo el control de una región promotora y un sitio interno de entrada al ribosoma, respectivamente, y seguido por 3' UTR y señales de Poli A. En algunas modalidades, esta construcción se usa para expresar dos isoformas LAMP-2 diferentes mediante el uso del mismo genoma viral.

La Figura 1J muestra un esquema de una construcción que contiene las secuencias codificantes de dos isoformas LAMP-2 (mediante el uso de cualquier combinación potencial) separadas por un sitio de escisión de P2A. En algunas modalidades, esta construcción se usa para expresar un ARNm que codifica dos isoformas LAMP-2 diferentes en un solo polipéptido, que se escindiría espontáneamente en las isoformas de proteína LAMP-2 individuales después de la traducción a través de la autoescisión del péptido 2A, mediante el uso del mismo genoma viral.

La Figura 1K muestra un esquema de una construcción que contiene la secuencia codificante para los exones 1-8 de LAMP-2 seguida de una región intrónica (que contiene todas las señales de corte y empalme necesarias), la secuencia codificante del exón 9 para una de las isoformas LAMP-2 con la 3' UTR y la señal de Poli A, una segunda región intrónica (que contiene todas las señales de corte y empalme necesarias) y la secuencia codificante del exón 9 para una isoforma LAMP-2 diferente (en cualquier combinación potencial) con la 3' UTR y la señal de Poli A. En algunas modalidades, esta construcción se usa para expresar ARNm para dos isoformas LAMP-2 diferentes a través de corte y empalme alternativo, que es el mecanismo que genera los diferentes ARNm de LAMP-2 en células normales, mediante el uso del mismo genoma viral.

La Figura 1L muestra un esquema de una construcción que contiene las secuencias codificantes para las tres isoformas LAMP-2, con 3' UTR y señales de Poli A, bajo el control de diferentes regiones promotoras. En algunas modalidades, esta construcción se usa para expresar las tres isoformas LAMP-2 diferentes mediante el uso del mismo genoma viral y permitiría la restauración de todas las funciones potenciales de LAMP-2.

La Figura 1M muestra un esquema de una construcción que contiene las secuencias codificantes para las tres isoformas LAMP-2, en cualquier orden, bajo el control de una región promotora y dos sitios internos de entrada al ribosoma diferentes, seguidos por 3' UTR y señales de Poli A. En algunas modalidades, esta construcción se usa para expresar las tres isoformas LAMP-2 mediante el uso del mismo genoma viral.

La Figura 1N muestra un esquema de una construcción que contiene las secuencias codificantes para las tres isoformas LAMP-2, en cualquier orden potencial, separadas por sitios de escisión de P2A. En algunas modalidades, esta construcción se usa para expresar un ARNm que codifica las tres isoformas LAMP-2 diferentes en un solo polipéptido, que se escindiría espontáneamente en las isoformas de proteína LAMP-2

individuales después de la traducción a través de la autoescisión del péptido 2A, mediante el uso del mismo genoma viral.

La Figura 1O muestra un esquema de una construcción que contiene la secuencia codificante para los exones 1-8 de LAMP-2 seguida de una región intrónica (que contiene todas las señales de corte y empalme necesarias), la secuencia codificante del exón 9 para una de las isoformas LAMP-2 con la 3' UTR y la señal de Poli A, una segunda región intrónica (que contiene todas las señales de corte y empalme necesarias) y la secuencia codificante del exón 9 para una segunda isoforma LAMP-2 con la 3' UTR y la señal de Poli A, una tercera región intrónica (que contiene todas las señales de corte y empalme necesarias), y la secuencia codificante del exón 9 para una tercera isoforma LAMP-2 con 3' UTR y señal de Poli A. En algunas modalidades, esta construcción se usa para expresar ARNm para las tres isoformas LAMP-2 a través de corte y empalme alternativo, que es el mecanismo que genera los diferentes ARNm de LAMP-2 en células normales, mediante el uso del mismo genoma viral. Las secuencias codificantes del exón 9 podrían colocarse en cualquier orden y combinación posibles.

La Figura 2 ilustra un diagrama de flujo de un método de tratamiento terapéutico (por ejemplo, de la enfermedad de Danon u otra enfermedad provocada al menos en parte por una deficiencia de autofagia) lo que promueve la expresión de una o más isoformas de LAMP-2.

Las Figuras 3A-F representan las secuencias codificantes y de proteína de isoforma LAMP-2: Figura 3A: secuencia codificante de LAMP-2A; Figura 3B: secuencia de proteína LAMP-2A; Figura 3C: secuencia codificante de LAMP-2B; Figura 3D: secuencia de proteína LAMP-2B; Figura 3E: secuencia codificante de LAMP-2C; y Figura 3F: secuencia de proteína LAMP-2C.

La Figura 4A-C presenta una comparación de los últimos 90 aminoácidos de las secuencias de proteína humana y de ratón de LAMP-2A (Figura 4A), LAMP-2B (Figura 4B) y LAMP-2C (Figura 4C) que muestra identidades de secuencia.

La Figura 5A-B ilustra el aumento dependiente de la dosis en la expresión de ARNm de LAMP-2B (Figura 5A) y LAMP-2A (Figura 5B) después de la administración de vectores AAV9 que portan esos genes.

La Figura 6 ilustra el aumento dependiente de la dosis en la expresión de las proteínas LAMP-2B y LAMP-2A después de la administración de vectores AAV9 que portan esos genes.

La Figura 7A-C muestra micrografías fluorescentes de secciones de corazón teñidas con DAPI (azul) y anticuerpo anti-LAMP-2 marcado con fluorescencia (blanco). La Figura 7A muestra una sección de corazón de un ratón con inserción génica (KO) *Lamp-2* tratado con AAV9.LAMP-2B. La Figura 7B muestra una sección de corazón de un ratón *Lamp-2* KO tratado con AAV9.EGFP. La Figura 7C muestra una sección de corazón de un ratón de tipo salvaje (WT) sin tratar.

La Figura 8A-B muestra micrografías fluorescentes de secciones de corazón teñidas con DAPI (azul) y anticuerpo anti-LAMP-2 marcado con fluorescencia (blanco; algunos ejemplos resaltados con flechas). La Figura 7A muestra una sección de corazón de un ratón *Lamp-2* KO tratado con AAV9.LAMP-2B. La Figura 7B muestra una sección de corazón de un ratón *Lamp-2* KO tratado con AAV9.EGFP.

La Figura 9A-H ilustra el sistema indicador de autofagia CAG-RFP-EGFP-LC3B. La Figura 9A presenta una representación esquemática del funcionamiento del sistema. Las Figuras 9B-G' son imágenes de microscopía de fluorescencia; las imágenes X' (X prima) son ampliaciones de las inserciones delineadas en las imágenes marcadas con la misma letra sin la prima. Con respecto a la cuadrícula de la Figura 9B-G'; la primera columna son imágenes de fluorescencia roja; la segunda columna son imágenes de fluorescencia verde; la tercera columna son imágenes combinadas de la primera y la segunda columnas, el amarillo representa la fluorescencia roja + verde; las dos filas superiores son imágenes de secciones de corazón de ratones WT que expresan la construcción indicadora de autofagia CAG-RFP-EGFP-LC3B; las dos filas inferiores son imágenes de secciones de corazón de ratones *Lamp-2* KO que expresan la construcción indicadora de autofagia CAG-RFP-EGFP-LC3B. Los autofagosomas inmaduros emiten fluorescencia verde y roja (o amarilla en las imágenes combinadas). Los autolisosomas maduros solo emiten fluorescencia roja. Las flechas amarillas resaltan las vacuolas autofágicas que emiten fluorescencia en ambos colores, mientras que las flechas blancas resaltan las vacuolas autofágicas que emiten fluorescencia solo en rojo. La Figura 9H ilustra el número de vacuolas autofágicas que son autofagosomas o autolisosomas en ratones WT y *Lamp-2* KO.

La Figura 10A-E ilustra el efecto de la terapia génica -2 mediante el uso del sistema indicador de autofagia CAG-RFP-EGFP-LC3B. La Figura 10A es una imagen de una sección de corazón de ratón WT sin tratar. La Figura 10B es una imagen de una sección de corazón que muestra células transducidas de un ratón *Lamp-2* KO tratado con el vector de control AAV9.EGFP. La Figura 10C es una imagen de una sección de corazón de un ratón *Lamp-2* KO tratado con el vector de terapia génica AAV9.LAMP-2A. La Figura 10D es una imagen de una sección de corazón de un ratón *Lamp-2* KO tratado con el vector de terapia génica AAV9.LAMP-2B. En las imágenes de las Figuras 10A, 10C y 10D se usan flechas rojas para resaltar algunos de los autolisosomas presentes. La Figura 10E ilustra la proporción de vacuolas autofágicas totales representadas por autofagosomas y autolisosomas para las cuatro condiciones.

La Figura 11A-C' presenta micrografías electrónicas de tejido cardíaco de ratones WT (Figura 11A, A') y *Lamp-2* KO (Figura 11B, B'), y un ratón *Lamp-2* KO tratado con AAV9.LAMP-2B (Figura 11C, C'). Las flechas blancas resaltan algunas de las vacuolas autofágicas. Las flechas negras resaltan algunas de las mitocondrias dañadas.

Descripción detallada

1. Introducción

La enfermedad de Danon es provocada por mutaciones que dan como resultado una expresión reducida o ausente del gen de la proteína 2 asociada a la membrana lisosomal (LAMP-2, también conocida como CD107b). Los presentes métodos se basan en parte en la introducción de uno o más polinucleótidos que codifican la isoforma LAMP-2B, empaquetados en un vector de serotipo 9 del virus adenoasociado (AAV), para suministrar el gen LAMP-2B/isoforma individual a los pacientes con Danon. Después del suministro de uno o más polinucleótidos que codifican la isoforma LAMP-2B, las propias células del paciente expresan el transgén LAMP-2. La restauración de la expresión del gen LAMP-2 en pacientes con Danon puede resultar en una mejora del fenotipo de la enfermedad, lo que sirve como terapia para esta enfermedad. El suministro a un sujeto de uno o más polinucleótidos que codifican la isoforma LAMP-2B también puede usarse para el tratamiento de otros trastornos de autofagia que incluyen, pero no se limitan a, insuficiencia cardíaca en etapa terminal, infarto de miocardio, toxicidades por fármacos, diabetes, insuficiencia renal en etapa terminal y envejecimiento. Las anomalías en la autofagia, en particular la disminución del flujo autofágico, se han implicado en estos trastornos, así como también en muchos otros. La expresión de niveles más altos del gen LAMP-2 aumenta el flujo autofágico y, por lo tanto, sirve como tratamiento para estos trastornos.

No existe técnica actual para tratar la enfermedad de Danon mediante métodos de terapia génica. La enfermedad de Danon no es un trastorno de almacenamiento lisosomal tradicional, que generalmente se define como una deficiencia en una proteína lisosomal (por ejemplo, un transportador o una enzima) que se requiere para procesar un sustrato celular específico, lo que resulta en una acumulación tóxica de ese sustrato específico dentro de los lisosomas. Se entiende por enfermedad de Danon un trastorno de autofagia o una miopatía vacuolar autofágica, que afecta a la degradación de todos los componentes celulares procesados por la vía autofágica y no es provocada por la acumulación de sustrato específico. Además, ninguna técnica existente describe explícitamente el suministro del gen LAMP-2/isoformas individuales para el tratamiento de la enfermedad de Danon u otros trastornos de autofagia. Por lo tanto, los presentes métodos proporcionan un método único para tratar la enfermedad de Danon y mejoran las tecnologías AAV existentes al incluir explícitamente el suministro del gen LAMP-2 como un medio para mejorar los trastornos de autofagia.

2. Pacientes sujetos a tratamiento

Los sujetos/pacientes susceptibles al tratamiento que usan los métodos descritos en la presente descripción incluyen individuos en riesgo de una enfermedad o un trastorno caracterizado por un flujo autofágico insuficiente (por ejemplo, enfermedad de Danon, así como también otros trastornos conocidos de autofagia que incluyen, pero no se limitan a, insuficiencia cardíaca sistólica y diastólica, infarto de miocardio, toxicidades por fármacos (por ejemplo, antraciclinas, cloroquina y sus derivados), diabetes, enfermedad renal en etapa terminal y envejecimiento) pero que no muestran síntomas, así como también sujetos que muestran síntomas actualmente. Tal sujeto puede haberse identificado por tener un gen LAMP-2 mutado o por tener niveles reducidos o no detectables de la expresión de LAMP-2.

En algunas modalidades, el sujeto presenta síntomas de una enfermedad o un trastorno caracterizado por un flujo autofágico insuficiente (por ejemplo, enfermedad de Danon, así como también otros trastornos conocidos de autofagia que incluyen, pero no se limitan a, insuficiencia cardíaca sistólica y diastólica, infarto de miocardio, toxicidades por fármacos, diabetes, enfermedad renal terminal y envejecimiento). Los síntomas pueden manifestarse activamente, o pueden suprimirse o controlarse (por ejemplo, mediante medicación) o en remisión. El sujeto puede o no haberse diagnosticado con el trastorno, por ejemplo, por un médico calificado.

El sujeto puede ser cualquier mamífero en cualquier etapa de desarrollo en el momento del suministro, por ejemplo, embrionario, fetal, infantil, juvenil o adulto. En diversas modalidades, el sujeto es un niño, un joven o un adulto. En diversas modalidades, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un humano o un mamífero domesticado (por ejemplo, un canino o un felino).

3. Vectores de suministro del polinucleótido LAMP-2

En general, los vectores de terapia génica descritos en la presente descripción comprenden un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la isoforma 2B de la proteína asociada a la membrana lisosomal (LAMP-2B), que permite la expresión de LAMP-2 para rectificar parcial o totalmente los niveles de expresión deficiente de la proteína LAMP-2 y el flujo autofágico en un sujeto que lo necesite (por ejemplo, un sujeto que tenga la enfermedad de Danon u otro trastorno caracterizado por un flujo autofágico deficiente al menos en parte debido a una expresión deficiente de LAMP-2). El vector Z de terapia génica es un virus adenoasociado de serotipo 9.

El vector J Z porta una sola isoforma Z LAMP-2B; Z consulte, por ejemplo, la Figura 1A-F que muestra un esquema de un vector AAV que porta un gen para una sola isoforma LAMP-2. En otras modalidades, el vector porta genes para dos isoformas LAMP-2; consulte, por ejemplo, la Figura 1G-K que muestra un esquema de vectores AAV que portan un gen para dos isoformas LAMP-2, LAMP-2B en una hebra de ADN y LAMP-2A en la otra hebra de ADN. Aún otras modalidades portan las tres isoformas (Consulte Figura 1L-O). Además de las estructuras genómicas representadas, también podrían construirse tres vectores de isoformas al hacer híbridos de las diversas modalidades mostradas. Por ejemplo, podría haber dos promotores, uno que dirige la expresión de una única isoforma y el otro que dirige la expresión de un casete de dos isoformas al hacer uso de un IRES, un péptido

autoescindible o corte y empalme alternativo. En varias modalidades que comprenden múltiples isoformas, las isoformas aparecen en cualquier orden, ya sea al reflejar el orden natural de B, A, C, o al alterarlo. Al portar múltiples isoformas en un solo vector, puede garantizarse la expresión conjunta de las isoformas en las células transfectadas y usar menos partículas de vector totales en una dosis.

Los vectores virales de suministro de genes útiles en la práctica de la presente invención pueden construirse mediante el uso de metodologías bien conocidas en la técnica de la biología molecular. Típicamente, los vectores virales que portan transgenes se ensamblan a partir de polinucleótidos que codifican el transgén, elementos reguladores adecuados y elementos necesarios para la producción de proteínas virales que median en la transducción celular,

Dichos virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, al transfectar células de empaquetamiento o mediante la transfección transitoria con plásmidos auxiliares o virus. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen, pero no se limitan a, células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir tales virus recombinantes con replicación defectuosa pueden encontrarse, por ejemplo, en los documentos núms. WO95/14785, WO96/22378, la patente de los Estados Unidos núm. 5,882,877, la patente de los Estados Unidos núm. 6,013,516, la patente de los Estados Unidos núm. 4,861,719, la patente de los Estados Unidos núm. 5,278,056 y el documento núm. WO94/19478,

El vector viral del gen es un vector del virus adenoasociado de serotipo 9 (AAV9). Los vectores AAV recombinantes (rAAV) se usan con frecuencia para el suministro de genes terapéuticos y se han estudiado en ensayos clínicos en humanos. Los vectores rAAV pueden diseñarse para suministrar transgenes específicos a las células de un paciente para su expresión. Después de la infección y la introducción del genoma viral por el vector rAAV, los genes virales existen principalmente como estructuras extracromosómicas que no se integran en el genoma del huésped, sino que se expresan por la maquinaria de traducción de la célula huésped. Para una infección exitosa de la célula huésped y la expresión génica, los vectores rAAV requieren varios componentes (consulte la Figura 1): elementos de repetición terminal inversa (ITR), región promotora y/o potenciadora, transgén y región sin traducir 3' y señal de poliadenilación. Después de la infección viral de las células huésped, la región promotora inicia señales para la traducción del transgén suministrado por el virus por la maquinaria de traducción de la célula huésped.

Generalmente, los elementos de control se seleccionan para que sean funcionales en una célula de mamífero. La construcción resultante que contiene los componentes unidos operativamente está unida (5' y 3') con secuencias ITR de AAV funcionales. Por "repeticiones terminales invertidas de virus adenoasociados" o "ITR de AAV" se entiende las regiones reconocidas en la técnica que se encuentran en cada extremo del genoma de AAV que funcionan juntas en cis como orígenes de la replicación del ADN y como señales de empaquetamiento para el virus. Las ITR de AAV, junto con la región codificante de rep de AAV, proporcionan la escisión y el rescate eficientes, y la integración de una secuencia de nucleótidos interpuesta entre dos ITR flanqueantes en el genoma de una célula de mamífero. Las secuencias de nucleótidos de las regiones ITR de AAV se conocen. Consulte, por ejemplo, Kotin, 1994; Berns, K I "Parvoviridae and their Replication" en *Fundamental Virology*, 2da Edición, (B. N. Fields y D. M. Knipe, eds.) para la secuencia AAV2. Como se usa en la presente descripción, una "ITR de AAV" no comprende necesariamente la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje, pero puede alterarse, por ejemplo, mediante la inserción, la eliminación o la sustitución de nucleótidos.

Además, la ITR de AAV puede derivar de cualquiera de varios serotipos de AAV, que incluyen, pero no se limitan a, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AA5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAVrh10. Además, las ITR 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector AAV no necesitan ser necesariamente idénticas o derivar del mismo serotipo o aislado de AAV, siempre que funcionen según lo previsto, es decir, para permitir la escisión y el rescate de la secuencia de interés de un genoma o vector de célula huésped, y para permitir la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de la célula receptora cuando los productos del gen Rep de AAV están presentes en la célula. Además, las ITR de AAV pueden derivar de cualquiera de varios serotipos de AAV, que incluyen, pero no se limitan a, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AA5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAVrh10. Además, las ITR 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector de expresión de AAV no tienen que ser necesariamente idénticas o derivar del mismo serotipo o aislado de AAV, siempre que funcionen según lo previsto, es decir, para permitir la escisión y el rescate de la secuencia de interés de un genoma o vector de una célula huésped, y para permitir la integración de la molécula de ADN en el genoma de la célula receptora cuando los productos del gen Rep de AAV están presentes en la célula.

En diversas modalidades, se emplean vectores derivados de serotipos de AAV que tienen tropismo y altas eficiencias de transducción en células del miocardio de mamífero, particularmente cardiomiocitos y progenitores de cardiomiocitos. Se proporciona una revisión y comparación de las eficiencias de transducción de diferentes serotipos en Cearley C N y otros, *Molecular Therapy* 16(10); 1710-1718, 2008.

En diversas modalidades, la secuencia de nucleótidos seleccionada se une operativamente a elementos de control que dirigen la transcripción o la expresión de la misma en el sujeto in vivo. Dichos elementos de control pueden comprender secuencias de control normalmente asociadas con el gen seleccionado.

Alternativamente, pueden emplearse secuencias de control heterólogas. Las secuencias de control heterólogas útiles generalmente incluyen aquellas derivadas de secuencias que codifican genes virales o de mamíferos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, el promotor de la fosfoglicerato cinasa (PKG), el promotor de CAG (potenciador de CMV con promotor de beta-actina de pollo que incluye la secuencia a través del primer intrón y el aceptor de corte y empalme del gen de la beta-globina de conejo), promotor de MCK (creatina cinasa de músculo), promotor temprano de SV40, promotor de LTR de virus del tumor mamario de ratón; promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP); un promotor de virus del herpes simple (HSV), un promotor de citomegalovirus (CMV) tal como la región promotora temprana inmediata (CMVIE) de CMV, el promotor de virus del sarcoma de Rous (RSV), promotores sintéticos, promotores híbridos y similares. Los promotores pueden ser de origen humano o de otras especies, que incluye de ratones. Además, las secuencias derivadas de genes no virales, tales como el gen de la metalotioneína marina, también encontrarán uso en la presente descripción. Dichas secuencias promotoras están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Stratagene (San Diego, California). Los ejemplos de promotores heterólogos incluyen, pero no se limitan a, el promotor de CMV. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, elementos sensibles al ADN para ecdisona, tetraciclina e hipoxia y aúfina. Cuando se codifican múltiples isoformas en un solo vector, preferentemente, pero no necesariamente, se unen operativamente a diferentes secuencias de control.

De manera similar, los elementos de control en el extremo 3' de una región codificante, que incluye una región sin traducir 3' (3' UTR) y una señal de poliadenilación, pueden derivar del gen insertado o de una fuente heteróloga. Modalidades particulares usan el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) como una 3' UTR o una señal de poliadenilación de beta-globina de conejo o ambas. Los elementos de control 3' también pueden incluir elementos de control que se conectan a regiones codificantes. Por ejemplo, es posible expresar múltiples isoformas LAMP-2 bajo el control de un solo promotor al colocar un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) (consulte por ejemplo la Figura 1I y 1M) o una secuencia de péptido autoescindible (tal como un péptido picornaviral 2A; consulte, por ejemplo, las Figuras 1J y 1N) entre las isoformas 1^a y 2^a, y 2^a y 3^a (si están presentes). En el caso de un IRES, se traducen 2 o 3 polipéptidos. En el caso de un péptido autoescindible, las isoformas LAMP-2 junto con el péptido autoescindible intermedio están presentes en el vector como un único marco de lectura que se traduce como un solo polipéptido que se escinde en sus isoformas LAMP-2 sustituyentes después o durante la traducción.

La transcripción bajo el control de un solo promotor también puede lograrse cuando el vector se construye para soportar el corte y empalme alternativo. En tales construcciones, los primeros ocho exones de LAMP-2 están presentes como cortados y empalmados juntos en ADNc seguidos de dos o tres pares de intrones-exones para incluir dos o los tres exones alternativos que dan lugar a las tres isoformas LAMP-2 (consulte ejemplo las Figuras 1K y 1O). En diversas modalidades, los pares intrón-exón se producen en cualquier orden, ya sea al reflejar el orden natural de B, A, C, o al alterarlo. Los intrones nativos son demasiado largos para incluirlos en vectores que tienen restricciones de tamaño, tal como AAV. En tales casos, los intrones se truncan mediante la eliminación de las secuencias centrales mientras se conservan los sitios de corte y empalme 5' y 3' necesarios y las señales de corte y empalme. Típicamente, la retención de unas pocas bases en el extremo 5' del intrón y aproximadamente 100-200 bases en el extremo 3' del intrón es suficiente para asegurar el corte y empalme. Alternativamente, los intrones nativos pueden sustituirse por intrones heterólogos.

El vector de expresión de AAV que alberga la molécula de ADN de interés unida por ITR de AAV puede construirse al insertar directamente la(s) secuencia(s) seleccionada(s) en un genoma de AAV del que se han eliminado los principales marcos de lectura abiertos ("ORF") de AAV. También pueden eliminarse otras partes del genoma de AAV, siempre que quede una parte suficiente de las ITR para permitir las funciones de replicación y empaquetamiento. Dichas construcciones pueden diseñarse mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica. Consulte, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 5,173,414 y 5,139,941; la publicación internacional núm. WO 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y el documento núm. WO 93/03769 (publicado el 4 de marzo de 1993); Lebkowski y otros, 1988; Vincent y otros, 1990; Carter, 1992; Muzyczka, 1992; Kotin, 1994; Shelling y Smith, 1994; y Zhou y otros, 1994.

Alternativamente, las ITR de AAV pueden escindirse del genoma viral o de un vector AAV que contiene los mismos y fusionarse a 5' y 3' de una construcción de ácido nucleico seleccionada que está presente en otro vector mediante el uso de técnicas de ligación estándar. Los vectores AAV que contienen las ITR se han descrito en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,139,941. En particular, se describen varios vectores AAV que están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") con los Núms. de acceso 53222, 53223, 53224, 53225 y 53226. Además, los genes quiméricos pueden producirse sintéticamente para incluir secuencias ITR de AAV dispuestas en 5' y 3' de una o más secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas. Pueden usarse codones preferidos para la expresión de la secuencia del gen quimérico en células del SNC de mamíferos. La secuencia quimérica completa se ensambla a partir de oligonucleótidos superpuestos preparados mediante métodos estándar. Consulte, por ejemplo, Edge Nature, vol. 292, 1981, página 756; Nambair y otros, Science, vol. 223, 1984, página 1299; Jay y otros, J. Biol. Chem. vol. 259, 1984, página 6311. Para producir viriones de AAV, se introduce un vector de expresión de AAV en una célula huésped adecuada mediante el uso de técnicas conocidas, tal como por transfección. Generalmente se conocen en la técnica varias técnicas de transfección. Consulte, por ejemplo, Graham y otros, Virology, 52, 456-467, (1973); Sambrook y otros (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual,

Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis y otros (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, y Chu y otros (1981) Gene 13:197. Los métodos de transfección especialmente adecuados incluyen la precipitación conjunta con fosfato de calcio (Graham y otros, 1973), la microinyección directa en células cultivadas (Capeechi, 1980), la electroporación (Shigekawa y otros, 1988), la transferencia de genes mediada por liposomas (Mannino y otros, 1988), transducción mediada por lípidos (Felgner y otros, 1987, PNAS USA, 84, 21, 7413-17), y el suministro de ácidos nucleicos mediante el uso de microproyectiles de alta velocidad (Klein y otros, 1987, Endocrinology 120:2339-45).

En una modalidad, el AAV comprende, además de la(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos que codifica la isoforma LAMP-2B, la cadena del vector AAV con ITR derivado de AAV2, el promotor, tal como el gen de la PGK (fosfoglicerato cinasa) de ratón o el promotor híbrido de citomegalovirus/beta-actina de pollo (CAG) que consiste en el potenciador del gen inmediato de citomegalovirus y el promotor, el donante de corte y empalme, y el intrón del gen de beta-actina de pollo, el aceptor de corte y empalme de la globina β de conejo, o cualquier promotor tal como PGK, CAG, MCK, EF-1 o el promotor de LAMP-2 nativo. En diversas modalidades, el vector viral se encapsula con un liposoma aniónico, por ejemplo, como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2015/0284691.

En diversas modalidades, la estructura del casete de expresión dentro del vector comprende repeticiones terminales inversas (ITR) primera y segunda (por ejemplo, 5' y 3') de cualquier serotipo o subgrupo de AAV conocido, que incluye scAAV, cualquier región promotora conocida (por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV) o un promotor de beta actina de pollo) con o sin ningún elemento potenciador conocido (por ejemplo, un potenciador de CMV), el gen LAMP-2E Z, Z y una señal de poliadenilación (que incluye, pero no se limita a, beta-globina de conejo).

La traducción del gen de la isoforma LAMP-2 suministrado viralmente, o una combinación de varios genes de la isoforma, da como resultado la expresión de la proteína LAMP-2 para esa isoforma en particular, que luego se dirige a las membranas lisosomales de la célula huésped por la maquinaria de la célula huésped. La restauración de la expresión y la función de la(s) isoforma(s) LAMP-2 luego restaura el flujo autofágico (que incluyen potencialmente, pero no se limita necesariamente a, todas las formas conocidas de autofagia tales como macroautofagia, mitofagia, autofagia mediada por chaperonas y autofagia de ADN/ARN), que es deficiente y causal en los pacientes con Danon, lo que permite que las células huésped enfermas eliminen los componentes celulares tóxicos y los orgánulos dañados y, por lo tanto, mejora la función celular y la supervivencia. En última instancia, la restauración de la expresión de la(s) isoforma(s) LAMP-2 sirve para tratar la deficiencia genética subyacente que provoca la enfermedad de Danon y alivia el fenotipo y los síntomas de la enfermedad. En otros trastornos de autofagia en los que puede expresarse LAMP-2, pero no en un nivel suficiente para generar un flujo autofágico adecuado y, por lo tanto, promover la función y la supervivencia celular normal, el suministro de la(s) isoforma(s) LAMP-2 transgénica(s) por el vector rAAV da como resultado sobreexpresión de la(s) proteína(s) LAMP-2 resultante(s). Esta sobreexpresión restaura el flujo autofágico a niveles casi normales, normales o supranormales. La restauración del flujo autofágico en enfermedades que provocan una interrupción de la autofagia normal alivia, mitiga y/o revierte el fenotipo y los síntomas de la enfermedad.

4. Composiciones farmacéuticas de vector

Se proporcionan composiciones farmacéuticas, por ejemplo, para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno caracterizado por un flujo autofágico deficiente (por ejemplo, enfermedad de Danon) que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de un polinucleótido que codifica la isoforma LAMP-2B.

Se entenderá que la dosificación única o la dosificación diaria total de los compuestos y las composiciones de la presente invención la decidirá el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o de manera coincidente con el ácido nucleico o polipéptido específico empleado; y factores bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está bien dentro de la experiencia en la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo por adulto por día. La cantidad terapéuticamente eficaz del vector de acuerdo con la invención que debe administrarse, así como también la dosificación para el tratamiento de una afección patológica con el número de partículas virales o no virales y/o las composiciones farmacéuticas en la presente descripción descritas, dependerán de numerosas factores, que incluyen la edad y el estado del paciente, la gravedad de la alteración o el trastorno, el método y la frecuencia de administración y el péptido particular a usar.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el vector pueden estar en cualquier forma que sea adecuada para el modo de administración seleccionado, por ejemplo, para la administración intraventricular, intramiocárdica,

intracoronaria, intravenosa, intraarterial, intrarrenal, intrauretral, epidural o intramuscular. El vector de terapia génica que comprende un polinucleótido que codifica la isoforma LAMP-2B puede administrarse, como agente activo único, o en combinación con otros agentes activos, en forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos.

En diversas modalidades, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede inyectarse. Éstas pueden ser, en particular, soluciones salinas estériles, isotónicas (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o las mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que, al añadir las, en dependencia del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

Las formas farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de maní o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las soluciones que comprenden los vectores de terapia génica como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y las mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Los vectores de terapia génica pueden formularse en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares.

El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo filtrada previamente en condiciones estériles.

5. Métodos de tratamiento de enfermedades de autofagia

Las referencias a los métodos de tratamiento en el presente párrafo de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. Además, se proporcionan métodos para prevenir, mitigar, mejorar, reducir, inhibir, eliminar y/o revertir uno o más síntomas de la enfermedad de Danon u otro trastorno de autofagia en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar al sujeto un virus adenoasociado de serotipo 9 (AAV9) que comprende un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la isoforma 2B de la proteína asociada a la membrana lisosomal (LAMP-2B). El vector se suministra al sujeto que lo necesita y por lo que el polinucleótido que codifica la isoforma LAMP-2B se expresa en las células transducidas a un nivel terapéuticamente eficaz.

El vector es un AAV9.

En diversas modalidades, el vector se administra a través de una vía seleccionada del grupo que consiste en intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intracoronaria, intramiocárdica, intrarrenal, intrauretral, epidural, subcutánea e intramuscular. En diversas modalidades, el vector se suministra directamente en el miocardio mediante inyección

epicárdica a través de una minitoracotomía, mediante inyección intracoronaria, mediante inyección endomiocárdica o mediante otro tipo de inyección útil en el corazón. Las vías de administración adicionales también pueden comprender la aplicación local del vector bajo visualización directa, por ejemplo, aplicación cortical superficial u otra aplicación no estereotáctica.

5 Los vectores virales típicamente provocarán una respuesta inmunitaria que puede incluir una respuesta de anticuerpos que puede reducir o inhibir completamente la eficacia de un vector particular en ese individuo cuando se vuelve necesaria o conveniente la repetición de la dosificación. La dosificación repetida puede ser apropiada, por ejemplo, porque el vector puede perderse con el tiempo debido a la proliferación celular, especialmente los vectores episomales. Los tejidos a los que es más difícil acceder pueden requerir múltiples administraciones de vector para transfectar un número suficiente de células para el tratamiento eficaz de la enfermedad. La expresión del transgén también puede perderse con el tiempo. La necesidad de administrar un vector de terapia génica frente a una respuesta de anticuerpos inhibidores puede abordarse de varias maneras. Por ejemplo, los títulos de anticuerpos pueden reducirse mediante aféresis antes de la administración del vector o puede inmunosuprimirse al paciente con un régimen médico adecuado. Alternativamente, podría administrarse la cápside de AAV vacía para unir los anticuerpos del huésped y las células inmunitarias antes de la inyección de AAV terapéutico que contenga el(los) transgén(es) LAMP-2. En dependencia del tejido diana, una administración local directa en lugar de una administración sistémica puede ser útil para superar o mejorar el efecto inhibitor de los anticuerpos anti-vector. En otro enfoque más, puede usarse un vector basado en un serotipo diferente del virus del que se derivó. Por ejemplo, si inicialmente se usó un vector AAV9 y surge un problema con el título de anticuerpos anti-AAV, pero se necesita una terapia génica adicional, puede administrarse un vector AAV8 que porte la misma construcción génica (o diferente).

25 Tras la formulación, las soluciones pueden administrarse de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tal como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos y similares. También pueden administrarse dosis múltiples.

30 Según corresponda, los vectores descritos en la presente descripción pueden formularse en cualquier vehículo adecuado para el suministro. Por ejemplo, pueden colocarse en una suspensión, solución o emulsión farmacéuticamente aceptable. Los medios adecuados incluyen preparaciones salinas y liposomales. Más específicamente, los portadores farmacéuticamente aceptables pueden incluir soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son el propilenglicol, el polietilenglicol, los aceites vegetales tales como el aceite de oliva y los ésteres orgánicos inyectables tal como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen medios salinos y amortiguados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares.

40 También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

45 También puede usarse un sistema de dispersión coloidal para el suministro de genes dirigidos. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas.

50 Un régimen apropiado puede determinarse por un médico y dependerá de la edad, el sexo, el peso del sujeto y la etapa de la enfermedad. Como un ejemplo, para el suministro de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido LAMP-2 mediante el uso de un vector de expresión viral, cada dosificación unitaria del vector que expresa el polipéptido LAMP-2 puede comprender de 2,5 μ l a 100 μ l de una composición que incluye un vector de expresión viral en un fluido farmacéuticamente aceptable a una concentración que varía de 10^{11} a 10^{16} genoma viral por ml, por ejemplo.

55 En algunos regímenes, se usa un vector que porta un gen para una única isoforma LAMP-2, por ejemplo, LAMP-2B. En otros regímenes, se usa un vector que porta un gen para dos isoformas LAMP-2, por ejemplo, LAMP-2B y LAMP-2A. En algunas modalidades, las dos isoformas se portan en diferentes preparaciones de vectores. En un aspecto, ambas preparaciones de vectores se derivan del mismo vector, por ejemplo, un vector AAV9 o cualquier otro vector particular descrito anteriormente. En otras modalidades, ambos polipéptidos están codificados en un solo vector; consulte por ejemplo la Figura 1. De manera similar, si el régimen comprende la administración de secuencias de ácidos nucleicos que codifican las tres isoformas, las isoformas pueden portarse en vectores individuales o en un solo vector. En regímenes que usan múltiples isoformas portadas por vectores individuales, los múltiples vectores pueden administrarse al mismo tiempo, individualmente o mezclados, o pueden administrarse secuencialmente a intervalos de horas, días o semanas.

65

6. Kits

Además, se proporcionan kits que comprenden un vector de terapia génica que comprende un polinucleótido que codifica la isoforma LAMP-2B, como se describe anteriormente y en la presente descripción. En diversas modalidades, los kits proporcionan los vectores de terapia génica preparados en una o más formas de dosificación unitaria listas para administrar a un sujeto, por ejemplo, en una jeringa precargada o en una ampolla. En diversas modalidades, el vector de terapia génica se proporciona en forma liofilizada.

Ejemplos

Ejemplo 1. Terapia génica con AAV9

Se construyeron vectores particulares, consistentes con las descripciones anteriores, como un vector AAV9 con las ITR derivadas de AAV2 y que codifican LAMP-2A o LAMP-2B bajo el control de un promotor de beta-actina de pollo con un potenciador de CMV (promotor de CAG). Además, estos vectores incorporaron el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota y la señal de poliadenilación de beta-globina de conejo (consulte la Figura 1B). Estos vectores se obtuvieron de la instalación del Núcleo de Vector Preclínico del Programa de Recursos de Terapia Génica del Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre en la Universidad de Pensilvania. Las secuencias LAMP-2 humanas se incorporaron con la expectativa de que fueran funcionales en ratones debido al alto grado de identidad de secuencia entre los homólogos, especialmente en la región del extremo C, que forma los componentes de la cola transmembrana y citoplasmática de la proteína (consulte la Figura 4).

El vector se usa para suministrar las isoformas LAMP-2 *in vivo*. El serotipo AAV9 tiene un excelente tropismo por el músculo cardíaco y esquelético, así como también por el tejido nervioso, los órganos más afectados por la enfermedad de Danon. Sin embargo, Danon es un trastorno multisistémico y muchos órganos diferentes pueden estar potencialmente involucrados; por lo tanto, la expresión de las isoformas LAMP-2 transgénicas está bajo el control de un promotor de beta-actina de pollo (CBA) de forma constitutiva activo con un potenciador de citomegalovirus (CMV) (construcción de CAG). Este promotor es ubicuitariamente activo y permitirá la expresión del transgén LAMP-2 en todos los tejidos en dependencia de la eficacia de la infección. También se obtuvo un vector AAV9 que porta un gen de proteína fluorescente verde mejorada (eGFP) para su uso como un reactivo de control.

Ejemplo 2. Administración de vectores de isoforma LAMP-2 de AAV9 a ratones con inserción génica LAMP-2.

Los ratones Lamp-2 KO (Nature. 2000 Aug 24;406(6798):902-6; Basic Res Cardiol. Julio de 2006; 101(4):281-91) desarrollan un síndrome similar al de Danon, aunque la gravedad de la enfermedad es más moderada que la enfermedad humana, probablemente, al menos en parte, debido a que la vida útil más corta de los ratones proporciona menos tiempo para que se acumule el daño debido a la alteración del flujo autofágico. Por lo tanto, es conveniente esperar hasta que los ratones tengan al menos 3 meses de edad y preferentemente 5-6 meses de edad antes de iniciar el tratamiento para que haya suficiente acumulación de la patología para que su reversión sea fácilmente detectable.

En un procedimiento idealizado, los ratones Lamp-2 KO de seis meses de edad reciben 5×10^{11} , 1×10^{12} o 2×10^{12} copias del genoma (gc) del vector AAV mediante inyección intravenosa en la vena yugular externa. En varios experimentos, los ratones WT reciben los vectores de isoforma LAMP-2 y los ratones Lamp-2 KO reciben el vector eGFP como controles. Se usa un número suficiente de ratones para que las subpoblaciones puedan sacrificarse y evaluarse en varios momentos, por ejemplo, 1, 2 y 6 meses después de la administración.

Ejemplo 3. Evaluación de la transcripción del gen de la isoforma LAMP-2 después del vector

Administración

Los ratones Lamp-2 KO, de aproximadamente 3-4 meses de edad, recibieron dosis crecientes de los vectores AAV9.LAMP-2B y AAV9.LAMP-2A (consulte la Figura 1B y las descripciones anteriores) a 5×10^{11} , 1×10^{12} , y 2×10^{12} gc/ratón. Se sacrificó un ratón por condición y se realizó RT-qPCR, por triplicado, en tejido cardíaco digerido para evaluar la expresión de ARNm (transcripción génica) de los transgenes humanos. Se usó un ratón WT sin tratar para demostrar que no había expresión de las isoformas LAMP-2 humanas. Los datos muestran un aumento dependiente de la dosis en la expresión de los transgenes humanos (consulte la Figura 5).

Ejemplo 4. Evaluación de la expresión de la proteína isoforma LAMP-2 después del vector

Administración

Mediante el uso de los mismos ratones que en el Ejemplo 3, se realizó una inmunotransferencia en tejido cardíaco digerido para evaluar la expresión de proteínas de los transgenes humanos en relación con GAPDH. Un ratón Lamp-2 KO de control tratado con AAV9.EGFP no demostró una expresión significativa de la proteína LAMP-2. Los datos muestran un aumento dependiente de la dosis en la expresión de los transgenes humanos en ratones que reciben los vectores virales (consulte la Figura 6).

Ejemplo 5. Localización subcelular de LAMP-2B transgénico después del vector

Administración

5 Las secciones de corazón de un ratón Lamp-2 KO que había recibido 2×10^{12} gc/ratón de AAV9.LAMP-2B o AAV9.EGFP, sacrificado 1 mes después del suministro, se tiñeron con DAPI (que se une al ADN rico en AT y por lo tanto hace visibles los núcleos de las células) y el anticuerpo anti-LAMP-2 marcado con fluorescencia (consulte la Figura 7). El patrón de tinción de LAMP-2 indica la localización de la proteína LAMP-2B transgénica humana en vacuolas intracelulares y es similar a la tinción observada en un control de ratón WT para la proteína Lamp-2 de ratón. No se observa tinción de LAMP-2 humana en el ratón Lamp-2 KO que recibe el control de vector AAV9.EGFP. Estos datos demuestran que el tratamiento con el vector AAV9.LAMP-2B conduce a la expresión de la proteína LAMP-2B humana en una ubicación fisiológicamente apropiada.

15 En un experimento similar, la tinción de LAMP-2 humana se mantuvo 2 meses después del suministro de AAV9.LAMP-2B a una dosis de 5×10^{11} gc/ratón en un ratón de prueba. Aunque consistente con el Ejemplo 4, se observó menos tinción con esta dosificación más baja de vector. En comparación, 3 meses después del suministro de 5×10^{11} gc/ratón del vector AAV9.EGFP no reveló ninguna tinción de LAMP-2 humana. Consulte la Figura 8.

20 Ejemplo 6. El sistema indicador de autofagia CAG-RFP-EGFP-LC3B

El sistema indicador de autofagia CAG-RFP-EGFP-LC3B permite la evaluación del flujo macroautofágico. La cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos (LC3) se expresa en la superficie de los autofagosomas. Se construye una fusión de genes para expresar LC3 fusionado con proteína fluorescente roja (RFP) y eGFP. Cuando se expresa esta proteína fusionada, el componente RFP emite fluorescencia tanto en los autofagosomas como en los lisosomas, mientras que el componente eGFP emite fluorescencia en los autofagosomas, pero se inactiva por el entorno ácido de los lisosomas. Como un resultado, en una imagen combinada, los autofagosomas son amarillos y los lisosomas son rojos (consulte la Figura 9A). Cuando se expresa en un fondo WT, se ven más puntos rojos que puntos verdes en imágenes rojas y verdes separadas y una mezcla de puntos rojos y amarillos en imágenes combinadas (véanse las Figuras 9B-D'). Lamp-2 es necesaria para la fusión normal de autofagosomas con lisosomas para formar autolisosomas. Por lo tanto, cuando esta construcción se expresa en un ratón Lamp-2 KO, se ven números aproximadamente iguales de puntos rojos y verdes en imágenes rojas y verdes separadas con puntos casi completamente amarillos en las imágenes combinadas (consulte las Figuras 9E-G'). La acumulación de autofagosomas y la casi ausencia de autolisosomas, junto con un mayor número general de vacuolas autofágicas (AV), refleja un defecto en el flujo autofágico debido a la ausencia de Lamp-2 (consulte la Figura 9H).

35 Ejemplo 7. La administración de vector portador de LAMP-2A o LAMP-2B restaura el flujo autofágico

A los ratones Lamp-2 KO que expresan la construcción CAG-RFP-EGFP-LC3B (ratones indicadores Lamp-2 KO/CAG-RFP-EGFP-LC3B) se les administró AAV9.LAMP-2B o AAV9.LAMP-2A y se compararon con ratones Lamp-2 KO que expresan el sistema indicador de autofagia CAG-RFP-EGFP-LC3B (ratones indicadores CAG-RFP-EGFP-LC3B). Un mes después del suministro del vector, se sacrificaron los ratones y se evaluaron las secciones de corazón mediante microscopía fluorescente para evaluar el flujo autofágico. Los ratones Lamp-2 KO/indicador sin tratar siguieron mostrando casi únicamente vacuolas autofágicas amarillas, es decir, autofagosomas (consulte la Figura 10B y la Figura 9G'). Por el contrario, los ratones Lamp-2 KO/indicador que recibieron cualquiera de los vectores de terapia génica, AAV9.LAMP-2B o AAV9.LAMP-2A, mostraron muchas vacuolas autofágicas rojas, es decir, autolisosomas, en una proporción similar a un ratón indicador WT control (consulte las Figuras 10 A, C y D y los puntos ilustrativos de las mismas indicados con flechas). La cuantificación de AV demostró que la proporción entre autofagosomas inmaduros y autolisosomas maduros fue similar en ratones KO Lamp-2 tratados en comparación con ratones WT (consulte la Figura 10E). Por lo tanto, la terapia génica con AAV9.LAMP-2B o AAV9.LAMP-2A restauró la fusión normal de autofagosoma-lisosoma en los cardiomiocitos de ratones Lamp-2 KO.

60 Ejemplo 9. Restauración de la ultraestructura de cardiomiocitos evaluada por microscopía electrónica

Se inyectó por vía intravenosa a un ratón Lamp-2 KO con 5×10^{11} gc/ratón de AAV9.LAMP-2B y se comparó con un ratón Lamp-2 KO de la misma edad y un ratón WT que no se trató. Un mes después del suministro del vector, los ratones se sacrificaron y las secciones de corazón se analizaron mediante microscopía electrónica. En comparación con WT (consulte las Figuras 11A, A'), el ratón Lamp-2 KO sin tratar mostró una acumulación y un aumento en el tamaño de AV (consulte las Figuras 11B, B', flechas amarillas) y un aumento en el número de mitocondrias anormales (consulte la Figura 11B, flechas rojas). Por el contrario, las micrografías electrónicas del ratón Lamp-2 KO tratado con AAV9.LAMP-2B se parecían más a la ultraestructura del ratón WT sin tratar (consulte las Figuras 11C, C'). Por lo tanto, el tratamiento con el vector de terapia génica restaura la ultraestructura de los cardiomiocitos.

En resumen, estos ejemplos muestran que los vectores de terapia génica basados en virus adenoasociados que codifican las isoformas LAMP-2A y LAMP-2B pueden administrarse por vía intravenosa para lograr con éxito la expresión transgénica en tejido cardíaco. Además, dicha expresión conduce a la reversión de defectos en el flujo autofágico y la ultraestructura de los cardiomiocitos, defectos que también están asociados con la enfermedad de

Danon. Estos datos respaldan el uso de dichos vectores para la terapia génica en el tratamiento de la enfermedad de Danon y otros trastornos relacionados con defectos en el flujo autofágico.

Para terminar, debe entenderse que, aunque los aspectos de la presente descripción se destacan al hacer referencia a modalidades específicas, un experto en la técnica apreciará fácilmente que estas modalidades descritas son solo ilustrativas de los principios del tema descrito en la presente descripción. Como tal, pueden realizarse varias modificaciones o cambios o configuraciones alternativas del objetivo descrito de acuerdo con las enseñanzas en la presente descripción sin apartarse del espíritu de la presente descripción. En consecuencia, la presente invención no se limita precisamente a lo que se muestra y describe.

Determinadas modalidades de la presente invención se describen en la presente descripción, que incluye el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, las variaciones de estas modalidades descritas resultarán evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción anterior. El inventor espera que los expertos en la técnica empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la presente invención se practique de cualquier otra manera a la descrita específicamente en la presente descripción.

A menos que se indique de cualquier otra manera, todos los números que expresan una característica, artículo, cantidad, parámetro, propiedad, término, etc., usados en la presente descripción y reivindicaciones, deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Como se usa en la presente descripción, el término "aproximadamente" significa que la característica, artículo, cantidad, parámetro, propiedad o término 31 así calificado abarca un intervalo de más o menos diez por ciento por encima y por debajo del valor de la característica, artículo, cantidad, parámetro, propiedad o término. En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la descripción y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada indicación numérica debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos informados y aplicando técnicas ordinarias de redondeo. A pesar de que los valores y los intervalos numéricos que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores y los intervalos numéricos establecidos en los ejemplos específicos se indican con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor o intervalo numérico contiene inherentemente determinados errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba. La mención de intervalos numéricos de valores en la presente descripción está destinada simplemente a servir como un método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor numérico separado que se encuentre dentro del intervalo. A menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción, cada valor individual de un intervalo numérico se incorpora en la descripción presente como si se mencionara individualmente en la presente descripción.

Los términos "un", "una", "el/la" y referencias similares usadas en el contexto de la descripción de la presente invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción o el contexto lo contradiga claramente. Todos los métodos descritos en la presente descripción pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción o que el contexto lo contradiga claramente de cualquier otra manera. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en la presente descripción está destinado simplemente a explicar mejor la presente invención y no supone una limitación en el alcance de la invención reivindicada de cualquier otra manera. Ningún lenguaje en la presente descripción debe interpretarse como indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

Listado de secuencias

<110> Los Regentes de la Universidad de California

<120> MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE DANON Y OTROS TRASTORNOS DE AUTOFAGIA

<130> 1959169-00006

<150> US62/280,269

<151> 2016-01-19

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1233

ES 2 926 977 T3

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 1

5
atgggtgtgct tccgcctctt cccggttccg ggctcagggc tcgttctggt ctgcctagtc 60
ctgggagctg tgcggcttta tgcattggaa cttaatttga cagattcaga aaatgccact 120
10 tgcctttatg caaaatggca gatgaatttc acagttcgct atgaaactac aaataaaact 180
tataaaactg taaccatttc agaccatggc actgtgacat ataatggaag catttgtggg 240
gatgatcaga atgggtccaa aatagcagtg cagttcggac ctggcttttc ctggattgcg 300
15 aattttacca aggcagcatc tacttattca attgacagcg tctcattttc ctacaacact 360
ggtgataaca caacatttcc tgatgctgaa gataaaggaa ttcttactgt tgatgaactt 420
ttggccatca gaattccatt gaatgacctt tttagatgca atagtttatc aactttggaa 480
20 aagaatgatg ttgtccaaca ctactgggat gttcttctac aagcttttgt ccaaaatggc 540
acagtgagca caaatgagtt cctgtgtgat aaagacaaa cttcaacagt ggcaccacc 600
25 atacacacca ctgtgccatc tcctactaca acacctactc caaaggaaaa accagaagct 660
ggaacctatt cagttaataa tggcaatgat acttgtctgc tggctacat ggggctgcag 720
ctgaacatca ctcaggataa gtttgcttca gttattaaca tcaaccccaa tacaactcac 780
30 tccacaggca gctgccgttc tcacactgct ctacttagac tcaatagcag caccattaag 840
tatctagact ttgtctttgc tgtgaaaaat gaaaaccgat tttatctgaa ggaagtgaac 900
atcagcatgt atttggttaa tggctccgtt ttcagcattg caaataacaa tctcagctac 960
35 tgggatgcc ccttggaag ttcttatatg tgcaacaaag agcagactgt ttcagtgtct 1020
ggagcatttc agataaatac ctttgatcta agggttcagc ctttcaatgt gacacaagga 1080
40 aagtattcta cagctcaaga ctgcagtgca gatgacgaca acttctagtg gcccatagcg 1140
gtgggagctg ccttggcagg agtacttatt ctagtgttgc tggcttattt tattggtctc 1200
aagcaccatc atgctggata tgagcaattt tag 1233

45 <210> 2
<211> 1233
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2

50
atgggtgtgct tccgcctctt cccggttccg ggctcagggc tcgttctggt ctgcctagtc 60
ctgggagctg tgcggcttta tgcattggaa cttaatttga cagattcaga aaatgccact 120
55 tgcctttatg caaaatggca gatgaatttc acagttcgct atgaaactac aaataaaact 180
tataaaactg taaccatttc agaccatggc actgtgacat ataatggaag catttgtggg 240
60 gatgatcaga atgggtccaa aatagcagtg cagttcggac ctggcttttc ctggattgcg 300
aattttacca aggcagcatc tacttattca attgacagcg tctcattttc ctacaacact 360
ggtgataaca caacatttcc tgatgctgaa gataaaggaa ttcttactgt tgatgaactt 420

65

ES 2 926 977 T3

ttggccatca gaattccatt gaatgacctt tttagatgca atagtttatc aactttggaa 480
 aagaatgatg ttgtccaaca ctactgggat gttcttgtac aagcttttgt ccaaaatggc 540
 5 acagtgagca caaatgagtt cctgtgtgat aaagacaaaa cttcaacagt ggcacccacc 600
 atacacacca ctgtgccatc tcctactaca acacctactc caaaggaaaa accagaagct 660
 10 ggaacctatt cagttaataa tggcaatgat acttgtctgc tggctacat ggggctgcag 720
 ctgaacatca ctcaggataa ggttgcttca gttattaaca tcaaccccaa tacaactcac 780
 tccacaggca gctgccgttc tcacactgct ctacttagac tcaatagcag caccattaag 840
 15 tatctagact ttgtctttgc tgtgaaaaat gaaaaccgat tttatctgaa ggaagtgaac 900
 atcagcatgt atttggttaa tggctccgtt ttcagcattg caaataacaa tctcagctac 960
 20 tgggatgccc ccctgggaag ttcttatatg tgcaacaaag agcagactgt ttcagtgtct 1020
 ggagcatttc agataaatac cttgatcta agggttcagc ctttcaatgt gacacaagga 1080
 aagtattcta cagccaaga gtgttcgctg gatgatgaca ccattctaata cccaattata 1140
 25 gttggtgctg gtctttcagg cttgattatc gttatagtga ttgcttacgt aattggcaga 1200
 agaaaaagtt atgctggata tcagactctg taa 1233

30 <210> 3
 <211> 1236
 <212> AND
 <213> Homo sapiens

35 <400> 3
 atgggtgtgct tccgcctctt cccggttccg ggctcagggc tcgttctggt ctgcctagtc 60
 ctgggagctg tgccgtctta tgcattggaa ctttaattga cagattcaga aaatgccact 120
 40 tgcctttatg caaaatggca gatgaatttc acagttcgct atgaaactac aaataaaaact 180
 tataaaaactg taaccatttc agaccatggc actgtgacat ataatggaag ctttgtggg 240
 gatgatcaga atggctctca aatagcagtg cagttcggac ctggcttttc ctggattgcg 300
 45 aattttacca aggcagcatc tacttattca attgacagcg tctcattttc ctacaacact 360
 ggtgataaca caacatttcc tgatgctgaa gataaaggaa ttcttactgt tgatgaactt 420
 50 ttggccatca gaattccatt gaatgacctt tttagatgca atagtttatc aactttggaa 480
 aagaatgatg ttgtccaaca ctactgggat gttcttgtac aagcttttgt ccaaaatggc 540
 acagtgagca caaatgagtt cctgtgtgat aaagacaaaa cttcaacagt ggcacccacc 600
 55 atacacacca ctgtgccatc tcctactaca acacctactc caaaggaaaa accagaagct 660
 ggaacctatt cagttaataa tggcaatgat acttgtctgc tggctacat ggggctgcag 720
 60 ctgaacatca ctcaggataa ggttgcttca gttattaaca tcaaccccaa tacaactcac 780

65

ES 2 926 977 T3

tccacaggca gctgccgttc tcacactgct ctacttagac tcaatagcag caccattaag 840
 tatctagact ttgtctttgc tgtgaaaaat gaaaaccgat tttatctgaa ggaagtgaac 900
 5 atcagcatgt atttgggttaa tggctccggt ttcagcattg caaataacaa tctcagctac 960
 tgggatgccc ccctgggaag ttcttatatg tgcaacaaag agcagactgt ttcagtgtct 1020
 10 ggagcatttc agataaatac ctttgatcta agggttcagc ctttcaatgt gacacaagga 1080
 aagtattcta cagctgaaga atgttctgct gactctgacc tcaactttct tattcctggt 1140
 gcagtgggtg tggccttggg cttccttata attggtgtct ttatctctta tatgattgga 1200
 15 agaaggaaaa gtcgtactgg ttatcagtct gtgtaa 1236

<210> 4

<211> 90

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 4

25 Trp Asp Ala Pro Leu Gly Ser Ser Tyr Met Cys Asn Lys Glu Gln Thr
 1 5 10 15

30 Val Ser Val Ser Gly Ala Phe Gln Ile Asn Thr Phe Asp Leu Arg Val
 20 25 30

35 Gln Pro Phe Asn Val Thr Gln Gly Lys Tyr Ser Thr Ala Gln Asp Cys
 35 40 45

40 Ser Ala Asp Asp Asp Asn Phe Leu Val Pro Ile Ala Val Gly Ala Ala
 50 55 60

45 Leu Ala Gly Val Leu Ile Leu Val Leu Leu Ala Tyr Phe Ile Gly Leu
 65 70 75 80

45 Lys His His His Ala Gly Tyr Glu Gln Phe
 85 90

50 <210> 5

<211> 90

<212> PRT

<213> Mus musculus

55 <400> 5

60

65

ES 2 926 977 T3

5
 10
 15
 20
 25

Trp Asp Ala Pro Leu Gly Ser Ser Tyr Met Cys Asn Lys Glu Gln Val
 1 5 10 15

Leu Ser Val Ser Arg Ala Phe Gln Ile Asn Thr Phe Asn Leu Lys Val
 20 25 30

Gln Pro Phe Asn Val Thr Lys Gly Gln Tyr Ser Thr Ala Gln Glu Cys
 35 40 45

Ser Leu Asp Asp Asp Thr Ile Leu Ile Pro Ile Ile Val Gly Ala Gly
 50 55 60

Leu Ser Gly Leu Ile Ile Val Ile Val Ile Ala Tyr Leu Ile Gly Arg
 65 70 75 80

Arg Lys Thr Tyr Ala Gly Tyr Gln Thr Leu
 85 90

30
 <210> 8
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35
 40
 45
 50
 55
 60

<400> 8

Trp Asp Ala Pro Leu Gly Ser Ser Tyr Met Cys Asn Lys Glu Gln Thr
 1 5 10 15

Val Ser Val Ser Gly Ala Phe Gln Ile Asn Thr Phe Asp Leu Arg Val
 20 25 30

Gln Pro Phe Asn Val Thr Gln Gly Lys Tyr Ser Thr Ala Glu Glu Cys
 35 40 45

Ser Ala Asp Ser Asp Leu Asn Phe Leu Ile Pro Val Ala Val Gly Val
 50 55 60

Ala Leu Gly Phe Leu Ile Ile Val Val Phe Ile Ser Tyr Met Ile Gly
 65 70 75 80

Arg Arg Lys Ser Arg Thr Gly Tyr Gln Ser Val
 85 90

65

ES 2 926 977 T3

<210> 9
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 9

Trp Asp Ala Pro Leu Gly Ser Ser Tyr Met Cys Asn Lys Glu Gln Val
 1 5 10 15
 Leu Ser Val Ser Arg Ala Phe Gln Ile Asn Thr Phe Asn Leu Lys Val
 20 25 30
 Gln Pro Phe Asn Val Thr Lys Gly Gln Tyr Ser Thr Ala Glu Glu Cys
 35 40 45
 Ala Ala Asp Ser Asp Leu Asn Phe Leu Ile Pro Val Ala Val Gly Val
 50 55 60
 Ala Leu Gly Phe Leu Ile Ile Ala Val Phe Ile Ser Tyr Met Ile Gly
 65 70 75 80
 Arg Arg Lys Ser Arg Thr Gly Tyr Gln Ser Val
 85 90

<210> 10
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 10

Met Val Cys Phe Arg Leu Phe Pro Val Pro Gly Ser Gly Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Val Cys Leu Val Leu Gly Ala Val Arg Ser Tyr Ala Leu Glu Leu Asn
 20 25 30
 Leu Thr Asp Ser Glu Asn Ala Thr Cys Leu Tyr Ala Lys Trp Gln Met
 35 40 45
 Asn Phe Thr Val Arg Tyr Glu Thr Thr Asn Lys Thr Tyr Lys Thr Val
 50 55 60
 Thr Ile Ser Asp His Gly Thr Val Thr Tyr Asn Gly Ser Ile Cys Gly
 65 70 75 80
 Asp Asp Gln Asn Gly Pro Lys Ile Ala Val Gln Phe Gly Pro Gly Phe
 85 90 95

65

ES 2 926 977 T3

Ser Trp Ile Ala Asn Phe Thr Lys Ala Ala Ser Thr Tyr Ser Ile Asp
 100 105 110
 5
 Ser Val Ser Phe Ser Tyr Asn Thr Gly Asp Asn Thr Thr Phe Pro Asp
 115 120 125
 10
 Ala Glu Asp Lys Gly Ile Leu Thr Val Asp Glu Leu Leu Ala Ile Arg
 130 135 140
 15
 Ile Pro Leu Asn Asp Leu Phe Arg Cys Asn Ser Leu Ser Thr Leu Glu
 145 150 155 160
 20
 Lys Asn Asp Val Val Gln His Tyr Trp Asp Val Leu Val Gln Ala Phe
 165 170 175
 25
 Val Gln Asn Gly Thr Val Ser Thr Asn Glu Phe Leu Cys Asp Lys Asp
 180 185 190
 30
 Lys Thr Ser Thr Val Ala Pro Thr Ile His Thr Thr Val Pro Ser Pro
 195 200 205
 35
 Thr Thr Thr Pro Thr Pro Lys Glu Lys Pro Glu Ala Gly Thr Tyr Ser
 210 215 220
 40
 Val Asn Asn Gly Asn Asp Thr Cys Leu Leu Ala Thr Met Gly Leu Gln
 225 230 235 240
 45
 Leu Asn Ile Thr Gln Asp Lys Val Ala Ser Val Ile Asn Ile Asn Pro
 245 250 255
 50
 Asn Thr Thr His Ser Thr Gly Ser Cys Arg Ser His Thr Ala Leu Leu
 260 265 270
 55
 Arg Leu Asn Ser Ser Thr Ile Lys Tyr Leu Asp Phe Val Phe Ala Val
 275 280 285
 60
 Lys Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Leu Lys Glu Val Asn Ile Ser Met Tyr
 290 295 300
 Leu Val Asn Gly Ser Val Phe Ser Ile Ala Asn Asn Asn Leu Ser Tyr
 305 310 315
 Trp Asp Ala Pro Leu Gly Ser Ser Tyr Met Cys Asn Lys Glu Gln Thr
 325 330 335
 Val Ser Val Ser Gly Ala Phe Gln Ile Asn Thr Phe Asp Leu Arg Val

ES 2 926 977 T3

<210> 12
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5
 <400> 12

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

ES 2 926 977 T3

Thr Thr Thr Pro Thr Pro Lys Glu Lys Pro Glu Ala Gly Thr Tyr Ser
 210 215 220
 5
 Val Asn Asn Gly Asn Asp Thr Cys Leu Leu Ala Thr Met Gly Leu Gln
 225 230 235 240
 10
 Leu Asn Ile Thr Gln Asp Lys Val Ala Ser Val Ile Asn Ile Asn Pro
 245 250 255
 15
 Asn Thr Thr His Ser Thr Gly Ser Cys Arg Ser His Thr Ala Leu Leu
 260 265 270
 20
 Arg Leu Asn Ser Ser Thr Ile Lys Tyr Leu Asp Phe Val Phe Ala Val
 275 280 285
 25
 Lys Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Leu Lys Glu Val Asn Ile Ser Met Tyr
 290 295 300
 30
 Leu Val Asn Gly Ser Val Phe Ser Ile Ala Asn Asn Asn Leu Ser Tyr
 305 310 315 320
 35
 Trp Asp Ala Pro Leu Gly Ser Ser Tyr Met Cys Asn Lys Glu Gln Thr
 325 330 335
 40
 Val Ser Val Ser Gly Ala Phe Gln Ile Asn Thr Phe Asp Leu Arg Val
 340 345 350
 45
 Gln Pro Phe Asn Val Thr Gln Gly Lys Tyr Ser Thr Ala Glu Glu Cys
 355 360 365
 50
 Ser Ala Asp Ser Asp Leu Asn Phe Leu Ile Pro Val Ala Val Gly Val
 370 375 380
 55
 Ala Leu Gly Phe Leu Ile Ile Val Val Phe Ile Ser Tyr Met Ile Gly
 385 390 395 400
 60
 Arg Arg Lys Ser Arg Thr Gly Tyr Gln Ser Val
 405 410

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de terapia génica que comprende un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la proteína 2B asociada a la membrana lisosomal (LAMP-2B) unida operativamente al promotor, en donde el vector es un virus adenoasociado de serotipo 9 (AAV9).
2. El vector de terapia génica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el promotor es un promotor humano activo de forma constitutiva.
- 10 3. El vector de terapia génica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el casete de expresión comprende unido operativamente en la dirección de 5' a 3', una primera repetición terminal inversa, una región potenciadora/promotora, el polinucleótido que codifica la isoforma LAMP-2B, una región sin traducir 3' que incluye una señal de poliadenilación y una segunda repetición terminal inversa.
- 15 4. El vector de terapia génica de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en donde el promotor es un promotor de citomegalovirus (CMV) o un promotor de CAG.
- 20 5. El vector de terapia génica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polinucleótido que codifica LAMP-2B comprende la SEQ ID NO: 2.
6. Un vector de terapia génica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Danon en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende administrar dicho vector al sujeto.
- 25 7. El vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el vector se administra sistémicamente.
8. El vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el vector se administra por administración intravenosa.
- 30 9. El vector para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el vector se administra múltiples veces.
10. El vector para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde el método trata uno o más síntomas de la enfermedad de Danon que se seleccionan del grupo que consiste en miopatía esquelética y cardíaca, anomalías en la conducción cardíaca, dificultades cognitivas y enfermedad de la retina.
- 35 11. El vector para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el sujeto es un ser humano.
- 40 12. El vector para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en donde se ha identificado que el sujeto tiene una expresión de LAMP-2 reducida o no detectable.
- 45 13. El vector para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en donde se ha identificado que el sujeto tiene un gen de LAMP-2 mutado.

Figura 1A

ITR	Promotor	LAMP-2 (A, B, C)	3' UTR	Poli A	ITR
-----	----------	------------------	--------	--------	-----

Figura 1B

ITR	Promotor de CAG	Intrón de CBA	LAMP-2 (A, B, C)	WPRE	RBG	ITR
-----	-----------------	---------------	------------------	------	-----	-----

Figura 1C

ITR	Promotor de LAMP-2 nativo	LAMP-2 (A, B, C)	3' UTR	Poli A	ITR
-----	---------------------------	------------------	--------	--------	-----

Figura 1D

ITR	Promotor de EF-1 alfa	LAMP-2 (A, B, C)	3' UTR	Poli A	ITR
-----	-----------------------	------------------	--------	--------	-----

Figura 1E

ITR	Promotor específico del corazón	LAMP-2 (A, B, C)	3' UTR	Poli A	ITR
-----	---------------------------------	------------------	--------	--------	-----

Figura 1F

ITR	Promotor específico de músculo	LAMP-2 (A, B, C)	3' UTR	Poli A	ITR
-----	--------------------------------	------------------	--------	--------	-----

Figura 1G

ITR	Promotor 1	LAMP-2 (A, B, C)/3' UTR/Poli A	Promotor 2	LAMP-2 (A, B, C)/3' UTR/Poli A	ITR
-----	------------	--------------------------------	------------	--------------------------------	-----

Figura 1H

ITR	Promotor 1	(+) LAMP-2 (A, B, C)/3' UTR/Poli A	(-) LAMP-2 (A, B, C)/3' UTR/Poli A	Promotor 2	ITR
-----	------------	------------------------------------	------------------------------------	------------	-----

Figura 1I

ITR	Promotor	LAMP-2 (A, B, C)	IRES	LAMP-2 (A, B, C)	3'UTR	Poli A	ITR
-----	----------	------------------	------	------------------	-------	--------	-----

Figura 1J

ITR	Promotor	LAMP-2 (A, B, C)	P2A	LAMP-2 (A, B, C)	3'UTR	Poli A	ITR
-----	----------	------------------	-----	------------------	-------	--------	-----

Figura 1K

ITR	Promotor	LAMP-2 Exones 1-8	Intrón	LAMP-2 (A, B, C)Exones 9/3'UTR/Poli A	Intrón	LAMP-2 (A, B, C)Exones 9/3'UTR/Poli A	ITR
-----	----------	-------------------	--------	---------------------------------------	--------	---------------------------------------	-----

Figura 1L

ITR	Promotor 1	LAMP-2 (A, B, C)/3' UTR/Poli A	Promotor 2	LAMP-2 (A, B, C)/3' UTR/Poli A	Promotor 3	LAMP-2 (A, B, C)/3' UTR/Poli A	ITR
-----	------------	--------------------------------	------------	--------------------------------	------------	--------------------------------	-----

Figura 1M

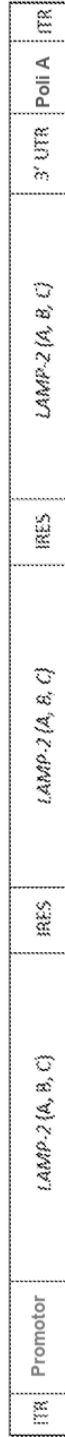


Figura 1N

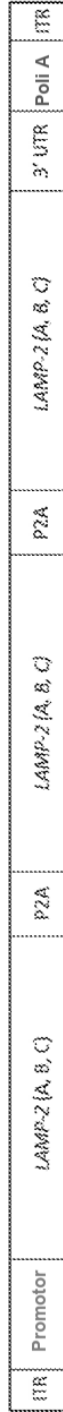


Figura 1O



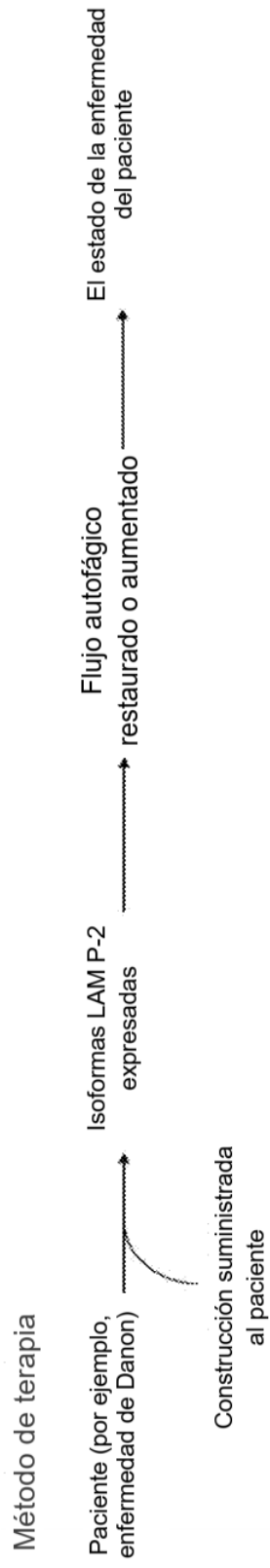


Figura 2

Figura 3A

Secuencia codificante de LAMP-2A (humana) (SEQ ID NO: 1)

ATGGTGTGCTTCCGCCTCTTCCCGGTTCCGGGCTCAGGGCTCGTTCTGGTCTGCCTA
 GTCCTGGGAGCTGTGCGGCTTATGCATTGGAACCTAATTTGACAGATTGAGAAAAT
 GCCACTTGCCTTTATGCAAAATGGCAGATGAATTTACAGTTCGCTATGAAACTACA
 AATAAACTTATAAACTGTAACCATTTCCAGACCATGGCACTGTGACATATAATGGA
 AGCATTTGTGGGGATGATCAGAATGGTCCCAAAATAGCAGTGCAGTTCGGACCTGGC
 TTTTCTGGATTGCGAATTTTACCAAGGCAGCATCTACTTATTCATTGACAGCGTC
 TCATTTTCTTACAACACTGGTGATAACACAACATTTCTGATGCTGAAGATAAAGGA
 ATTCCTACTGTTGATGAACCTTTGGCCATCAGAATTCATTGAATGACCTTTTTAGA
 TGCAATAGTTTATCAACTTTGGAAAAGAATGATGTTGTCCAACACTACTGGGATGTT
 CTTGTACAAGCTTTTGTCCAAAATGGCACAGTGGCACAAAATGAGTTCTGTGTGAT
 AAAGCAAACTTCAACAGTGGCACCCACCATACACACCCTGTGCCATCTCCTACT
 ACAACACCTACTCCAAAGGAAAAACCAGAAGCTGGAACCTATTGAGTTAATAATGGC
 AATGATACTTGTCTGCTGGCTACCATGGGGCTGCAGTGAACATCACTCAGGATAAG
 GTTCTTTCAGTTATTAACATCAACCCCAATAACAACCTCACTCCACAGGAGCTGCCGT
 TCTCACACTGCTCTACTTAGACTCAATAGCAGCACCATTAAGTATCTAGACTTTGTC
 TTTGCTGTGAAAAATGAAAACCGATTTTATCTGAAGGAAGTGAACATCAGCATGTAT
 TTGGTTAATGGCTCCGTTTTTTCAGCATGCAATAACAATCTCAGCTACTGGGATGCC
 CCCCTGGGAAGTTCTTATATGTGCAACAAAGAGCAGACTGTTTCAGTGTCTGGAGCA
 TTTTCAGATAAATACCTTTGATCTAAGGGTTTCAGCCTTTCATTGTGACACAAGGAAAG
 TATTCTACAGCTCAAGACTGCAGTGCAGATGACGACAACTTCTAGTGCCCATAGCG
 GTGGGAGCTGCCTTGGCAGGAGTACTTATTCTAGTGTGCTGGCTTATTTTATTGGT
 CTCAAGCACCATCATGCTGGATATGAGCAATTTTAG

Figura 3B

Secuencia de proteína LAMP-2A (humana) (SEQ ID NO: 10)

MVCFRLFPVPGSGLVLVCLVLGAVRSYALELNLTDSENATCLYAKWQMNFTVRYETT
 NKTYKTVTISDHGTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFSWIANFTKAASTYSIDSV
 SFSYNTGDNTTTFDAEDKGILTVDELLAIRIPLNDLFRCNLSLSTLEKNDVVQHYWDV
 LVQAFVQNGTVSTNEFLCDKDKTSTVAPTIIHTTVPSPTTPTPKKEPEAGTYSVNGG
 NDTCLLATMGLQLNITQDKVASVININPNTTHSTGSCRSHALLRLNSSTIKYLDV
 FAVKNENRFYLKEVNI SMYLVNGSVFSIANNNLSYWDAPLGSSYMCNKEQTVSVSGA
 FQINTFDLRVQPFNVQTKYSTAQDCSADDDNFLVPIAVGAALAGVLLLVLLAYFIG
 LKHHHAGYEQF

Figura 3C

Secuencia codificante de LAMP-2B (humana) (SEQ ID NO:2)

ATPGGTGTGCTTCCGCCTCTTCCCGGTTCCGGGCTCAGGGCTCGTTCTGGTCTGCCTA
 GTCCTGGGAGCTGTGCGGTCTTATGCATTTGGAACCTTAATTTGACAGATTGAGAAAAT
 GCCACTTGCCTTTATGCAAAATGGCAGATGAATTTACAGTTCGCTATGAAACTACA
 AATAAAACTTATAAACTGTAACCATTTAGACCATGGCACTGTGACATATAATGGA
 AGCATTGTGGGGATGATCAGAATGGTCCCAAAATAGCAGTGCAGTTCGGACCTGGC
 TTTTCCTGGATTGCGAATTTTACCAAGGCAGCATCTACTTATTCAAATGACAGCGTC
 TCATTTTCTTACAACACTGGTGATAACACAACATTTCTGATGCTGAAGATAAAGGA
 ATTCTTACTGTTGATGAACCTTTGGCCATCAGAATTCATTGAAATGACCTTTTTAGA
 TGCAATAGTTTATCAACTTTGAAAAGAATGATGTTGTCCAACACTACTGGGATGTT
 CTTGTACAAGCTTTGTCCAAAATGGCACAGTGAGCACAAATGAGTTCCTGTGTGAT
 AAAGACAAAACCTCAACAGTGGCACCCACCATACACACCCTGTGCCATCTCCTACT
 ACAACACCTACTCCAAAGGAAAAACCAGAAGCTGGAACCTATTCAGTTAATAATGGC
 AATGATACTTGTCTGCTGGCTACCATGGGGCTGCAGCTGAACATCACTCAGGATAAG
 GTTGCTTTCAGTTATTAACATCAACCCCAATAACAACCTCACTCCACAGGCAGCTGCCGT
 TCTCACACTGCTCTACTTAGACTCAATAGCAGCACCATTAAGTATCTAGACTTTGTCT
 TTTGCTGTGAAAAATGAAAACCGATTTTATCTGAAGGAAGTGAACATCAGCATGTAT
 TTGGTTAATGGCTCCGTTTTTCAGCATTGCAATAACAATCTCAGCTACTGGGATGCC
 CCCCTGGGAAGTTCCTATATGTGCAACAAAGAGCAGACTGTTTCAGTGTCTGGAGCA
 TTTTCAGATAAAATACCTTTGATCTAAGGGTTCAGCCTTTCATGTGACACAAGGAAAG
 TATTCTACAGCCCAAGAGTGTTCGCTGGATGATGACACCATTCTAATCCCAATTATA
 GTTGGTGCTGGTCTTTTCAGGCTTGATTATCGTTATAGTGATTGCTTACGTAATTGGC
 AGAAGAAAAAGTTATGCTGGATATCAGACTCTGTAA

Figura 3D

Secuencia de proteína LAMP-2B (humana) (SEQ ID NO: 11)

MVCFRLFPVPGSGLVCLVCLVGLGAVRSYALELNLTDSENATCLYAKWQMNFTVRYETT
 NKTYKTVTISDHGTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFSWIANFKAASTYSIDSV
 SFSYNTGDNTTTPDABDKGILTVDELLAIRIPLNDLFRCNLSLTLBKNDVVQHYWDV
 LVQAFVQNGTVSTNBFLCDKDKTSTVAPTHTTVPSPTTPTPKKPEAGTYSVNNG
 NDTCLLATMGLQLNITQDKVASVININPNTTHSTGSCRSHALLRLNSSTIKYLDV
 FAVKNENRFYLKEVNI SMYLVNGSVFSLANNLSYWDAPLGSSYMCNKEQTVSVSGA
 FQINTFDLRVQPFNVQTKYSTAQECSLDDDTILIPIIIVGAGLSGLIIVIVIAYVIG
 RRKSYAGYQTL

Figura 3E

Secuencia codificante de LAMP-2C (humana) (SEQ ID NO:3)

ATGGTGTGGCTTCCGCCTCTTCCCGGTTCCGGGCTCAGGGCTCGTTCTGGTCTGCCTA
 GTCCTGGGAGCTGTGCGGTCTTATGCATTGGAACCTAATTTGACAGATTCAGAAAAT
 GCCACTTGCCTTTATGCAAAATGGCAGATGAATTTACAGTTTCGCTATGAAACTACA
 AATAAAACTTATAAACTGTAACCATTTTCAGACCATGGCACTGTGACATATAATGGA
 AGCATTGTGGGGATGATCAGAATGGTCTCAAAATAGCAGTGCAGTTCCGACCTGGC
 TTTTCTGGATTGCGAATTTTACCAAGGCAGCATCTACTTATTCAATTGACAGCGTC
 TCATTTTCCCTACAACACTGGTGATAACACAACATTTCTGATGCTGAAGATAAAGGA
 ATTCTTACTGTGATGAACCTTTGGCCATCAGAATTCATTTGAATGACCTTTTTTAGA
 TGCAATAGTTTATCAACTTTGGAAAAGAATGATGTTGTTCCAACACTACTGGGATGTT
 CTTGTACAAGCTTTTGTCCAAAATGGCACAGTGAGCACAAAATGAGTTCTGTGTGAT
 AAAGACAAAACCTCAACAGTGGCACCCACCATACACACCCTGTGCCATCTCCTACT
 ACAACACCTACTCCAAAGGAAAAACCAGAAGCTGGAACCTATTTCAGTTAATAATGGC
 AATGATACCTTGTCTGCTGGCTACCATGGGGCTGCAGCTGAACATCACTCAGGATAAG
 GTTGCTTCAGTTATTAACATCAACCCCAATACAACCTCACTCCACAGGCAGCTGCCGT
 TCTCACACTGCTCTACTTAGACTCAATAGCAGCACCATTAAGTATCTAGACTTTGTC
 TTTGCTGTGAAAAATGAAAACCGATTTTATCTGAAGGAAGTGAACATCAGCATGTAT
 TTGGTTAATGGCTCCGTTTTTTCAGCATTGCAAAATAACAATCTCAGCTACTGGGATGCC
 CCCCTGGGAAGTTCTTATATGTGCAACAAAGAGCAGACTGTTTCAGTGTCTGGAGCA
 TTTTCAGATAAAATACCTTTGATCTAAGGGTTCAGCCTTTCAATGTGACACAAGGAAAG
 TATTCTACAGCTGAAGAATGTTCTGCTGACTCTGACCTCAACTTTCTTATTCCTGTT
 GCAGTGGGTGTGGCCTTGGGCTTCCTTATAAATGTTGTCCTTTATCTCTTATATGAT
 GGAAGAAGGAAAAGTCGTACTGGTTATCAGTCTGTGTAA

Figura 3F

Secuencia de proteína LAMP-2C (humana) (SEQ ID NO: 12)

MVCFRLFPVPGSGLVCLVCLVGLGAVRSYALELNLTDSENAATCLYAKWQMNFTVRYETT
 NKTYKTVTISDHGTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFSWIANFTKAASTYSIDSV
 SFSYNTGDNTPFDAEDKGILTVDELLAIRIPLNDLFRCNLSLTLEKNDVVQHYWDV
 LVQAFVQNGTVSTNEFLCDKDKTSTVAPTIIHTTVPSPTTTPKPEAGTYSVNNG
 NDTCLLATMGLQLNITQDKVASVININPNTTHSTGSCRSHALLRLNSSTIKYLDV
 FAVKNENRFYLKEVNI SMYLVNGSVFSIANNLSYWDAPLGSSYMCNKEQTVSVSGA
 FQINTFDLRVQPFNVITQKYSTAEECSADSDLNFLIPVAVGVALGFLIIVVFISYMI
 GRRKSRTGYQSV

Figura 4A LAMP-2A

Humano (SEQ ID NO: 4) WDAPLGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFNVITQGGKYSTAQDCSADDDNLFVPIAVGAALAGVLIILVLL
 Identidades WDAPLGSSYMCNKEQ SVS AFQINTF L VQPFNVT G YSTAQDCSAD CNFLVPIAVGAAL GVLIIIVLL
 Ratón (SEQ ID NO: 5) WDAPLGSSYMCNKEQVLSVSRAPQINTFFNLKVQPFNVITKGGQYSTAQDCSADDDNLFVPIAVGAALGGVLIILVLL

Humano AYFIGLKRHHHAGYEQF
 Identidades AYFIGLKH HH GYEQF
 Ratón AYFIGLKRHHHAGYEQF

Figura 4B LAMP-2B

Humano (SEQ ID NO: 6) WDAPLGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFNVITQGGKYSTAQDCSLEDDTILPIIIVGAGLSGLIIVIVIA
 Identidades WDAPLGSSYMCNKEQ SVS AFQINTF L VQPFNVT G YSTAQDCSLEDDTILPIIIVGAGLSGLIIVIVIA
 Ratón (SEQ ID NO: 7) WDAPLGSSYMCNKEQVLSVSRAPQINTFFNLKVQPFNVITKGGQYSTAQDCSLEDDTILPIIIVGAGLSGLIIVIVIA

Humano VIGRRKSYAGYQTL
 Identidades IGRK YAGYQTL
 Ratón LIGRRKTYAGYQTL

Figura 4C LAMP-2C

Humano (SEQ ID NO: 8) WDAPLGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDLRVQPFNVITQGGKYSTAEECSADSDLNFLIPVAVGVALGFLIIVFISYMG
 Identidades WDAPLGSSYMCNKEQ SVS AFQINTF L VQPFNVT G YSTAEEC ADSLDNFLIPVAVGVALGFLIIVFISYMG
 Ratón (SEQ ID NO: 9) WDAPLGSSYMCNKEQVLSVSRAPQINTFFNLKVQPFNVITKGGQYSTAEECAADSDLNFLIPVAVGVALGFLIIVFISYMG

Humano RRSRTGYQSV
 Identidades RRSRTGYQSV
 Ratón RRSRTGYQSV

Figura 5A

AAV9.LAMP-2B
mRNA expresión

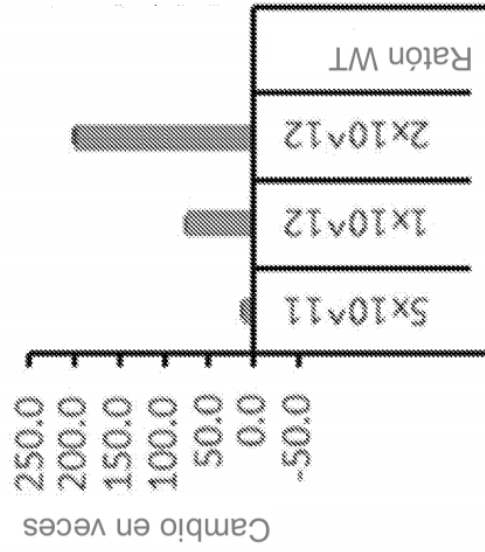


Figura 5B

AAV9.LAMP-2A
mRNA expresión

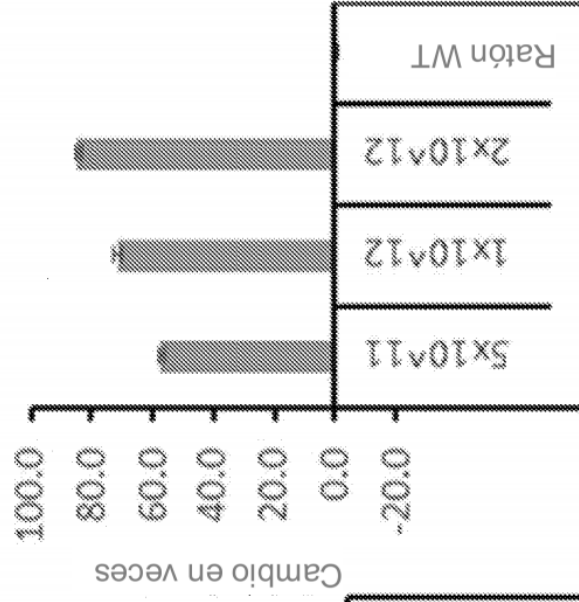


Figura 6

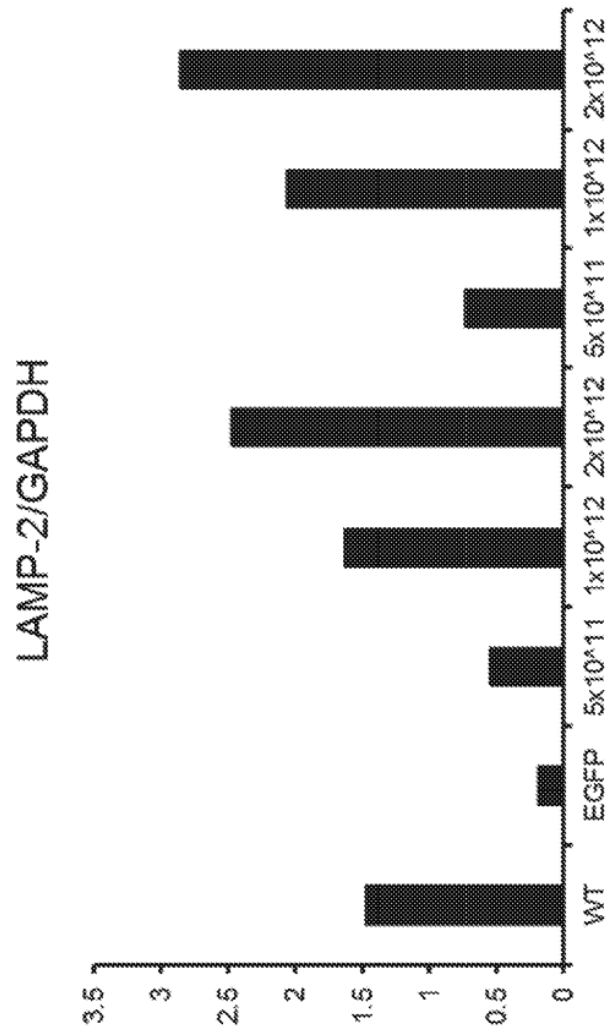
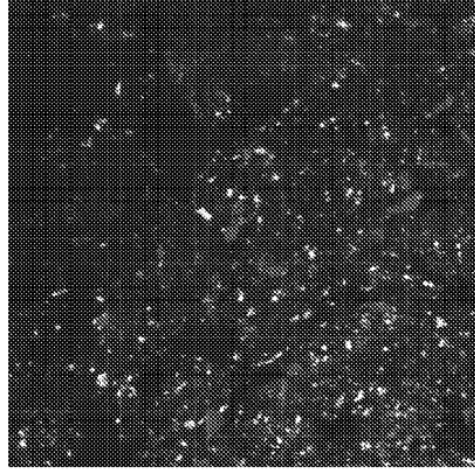
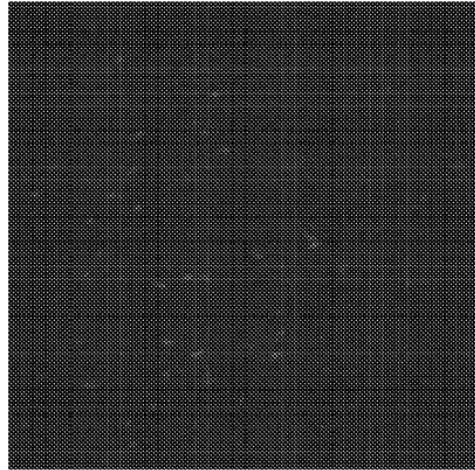


Figura 7C



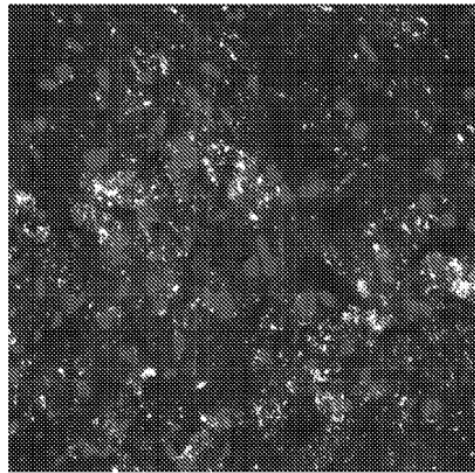
Control WT

Figura 7B



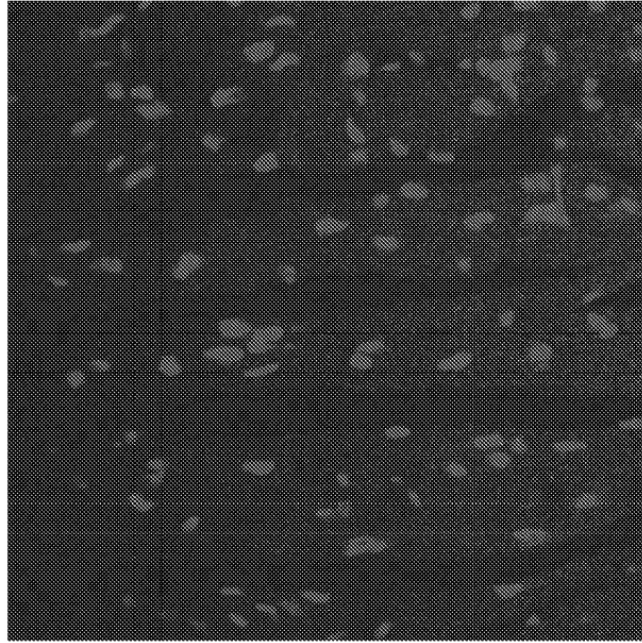
AAV9.EGFP (2x10¹² gc)

Figura 7A



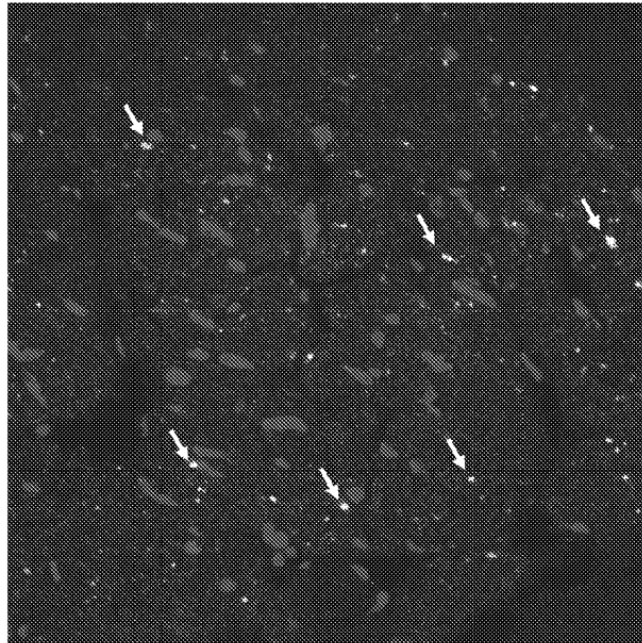
AAV9.LAMP-2B (2x10¹² gc)

Figura 8B



AAV9.EGFP (5×10^{11} gc)

Figura 8A



AAV9.LAMP-2B (5×10^{11} gc)

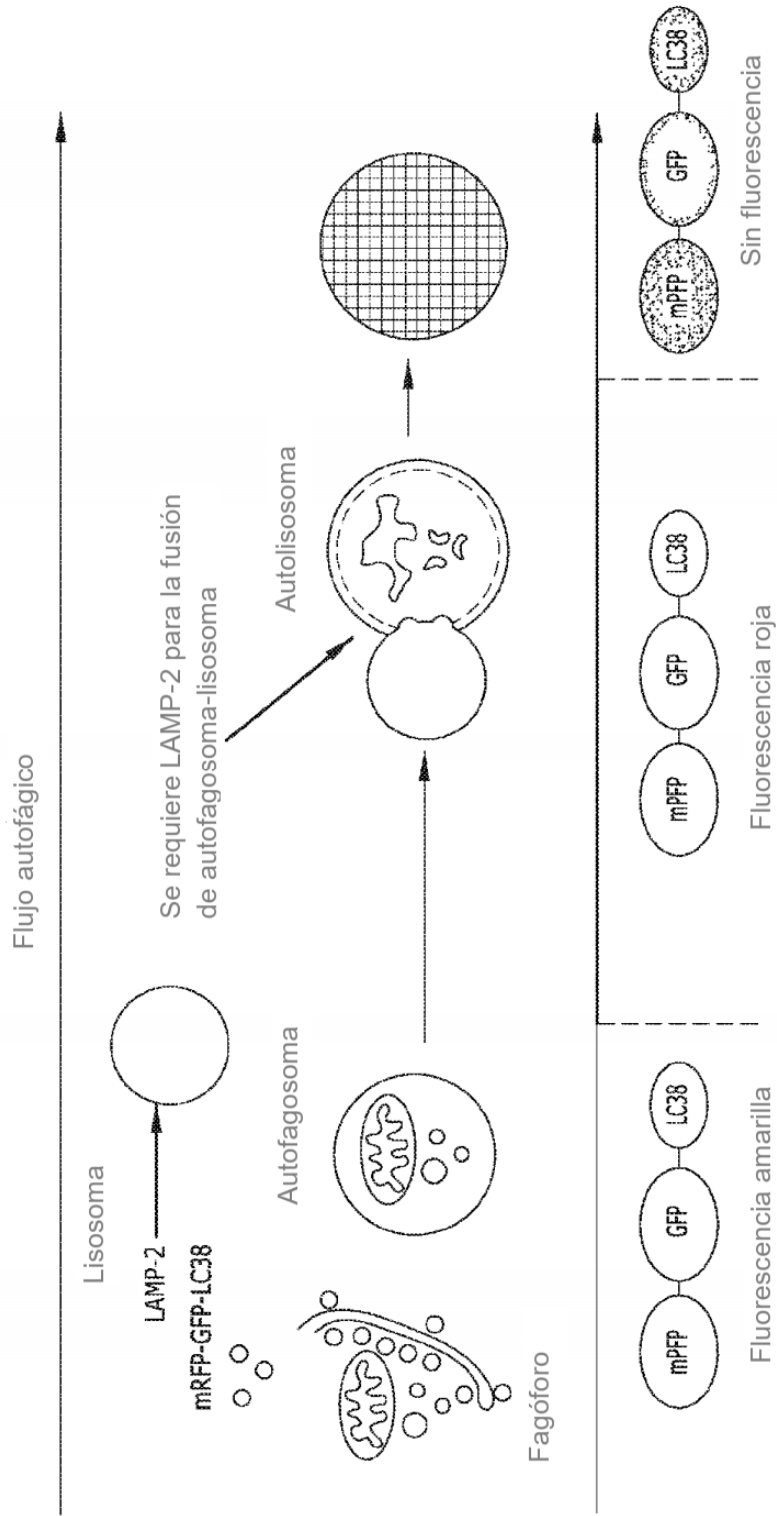


Figura 9A

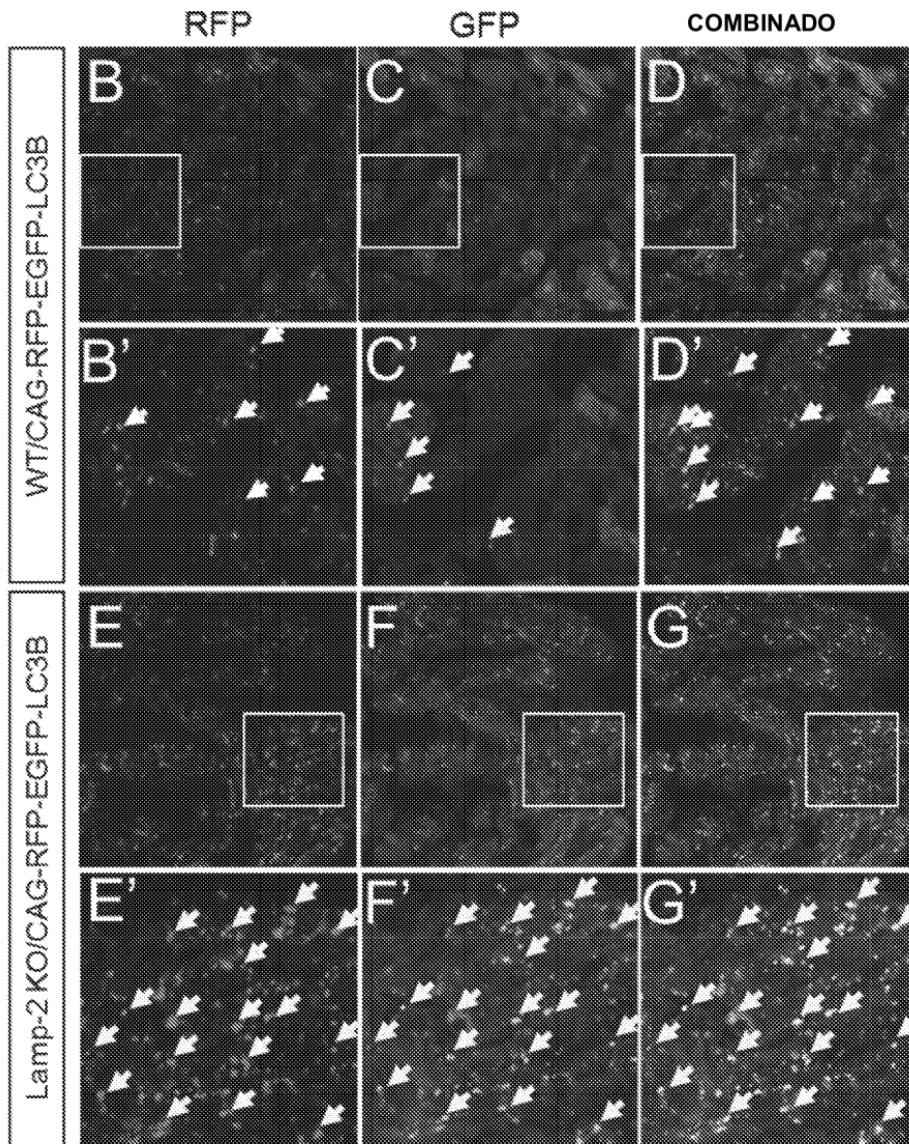


Figura 9B- G'

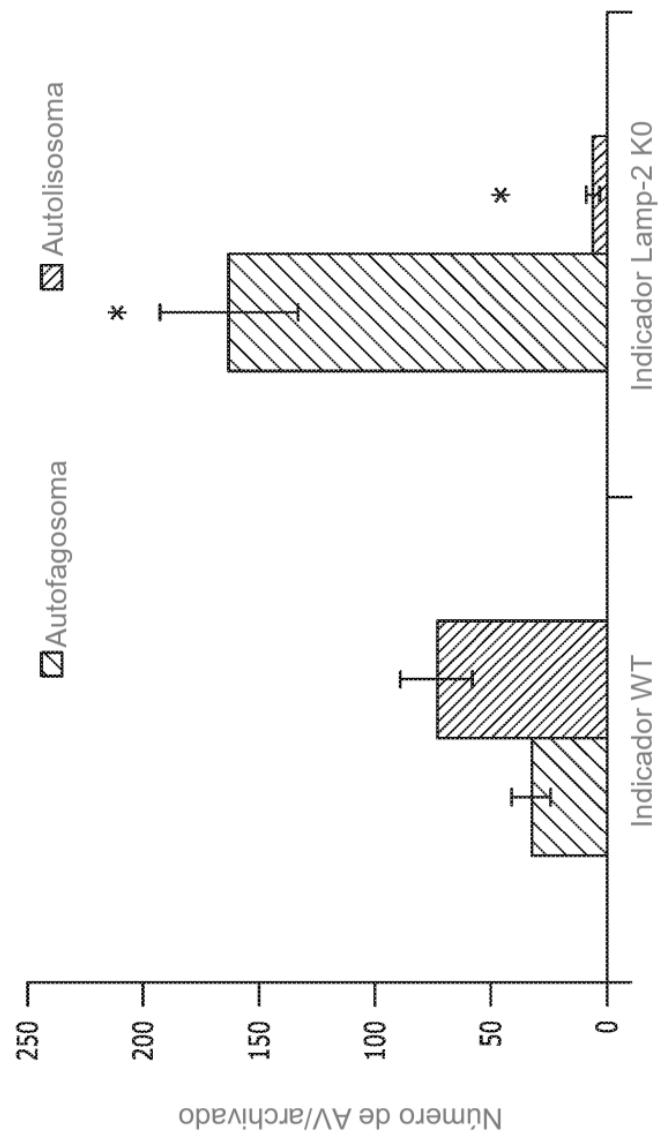
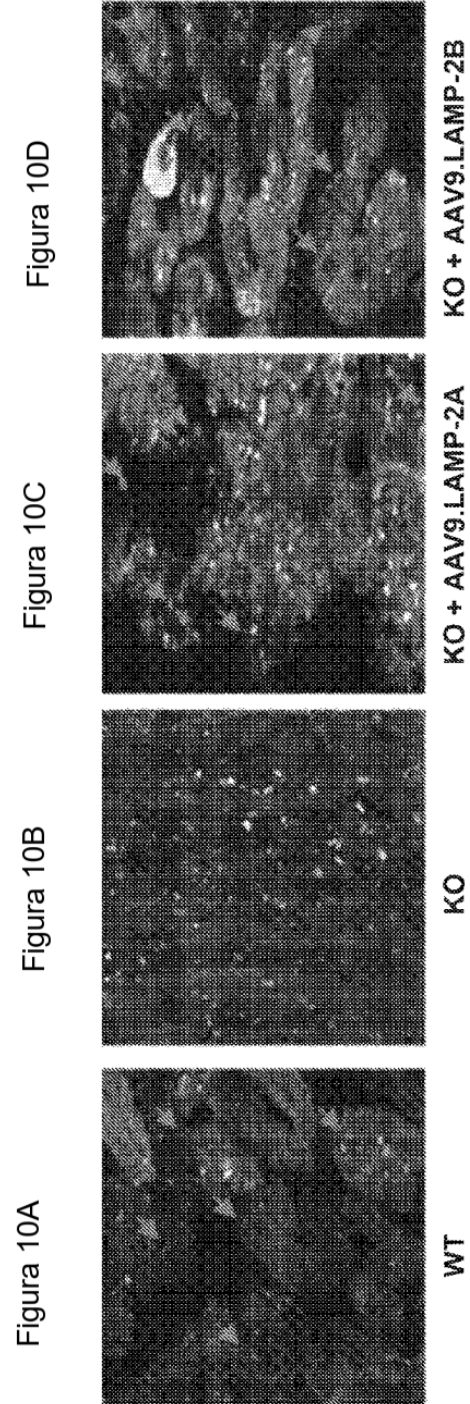


Figura 9H



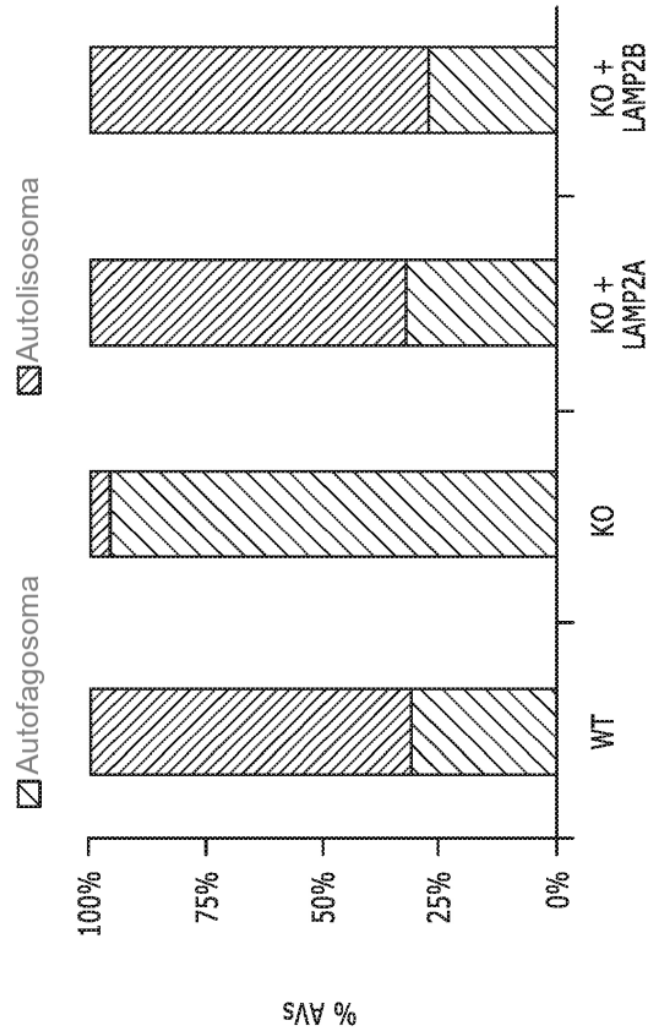


Figura 10E

Figura 11A

Control WT

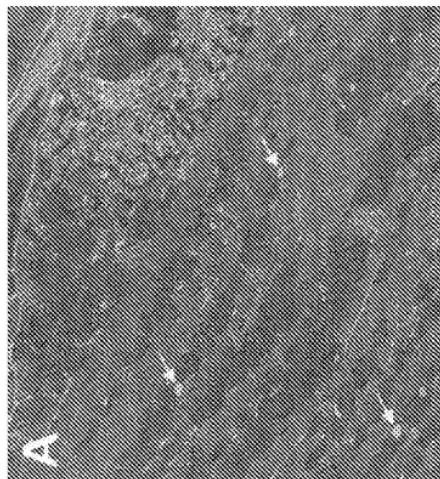


Figura 11B

Control KO

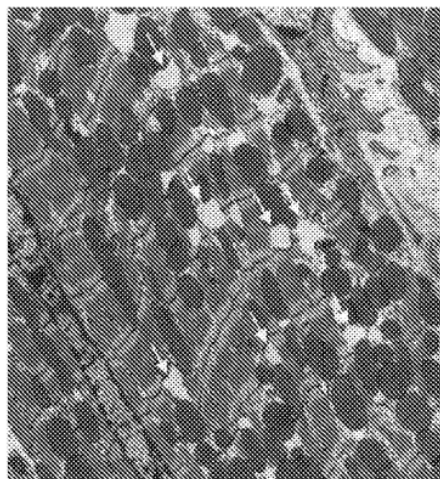


Figura 11C

KO + AAV9.LAMP-2B

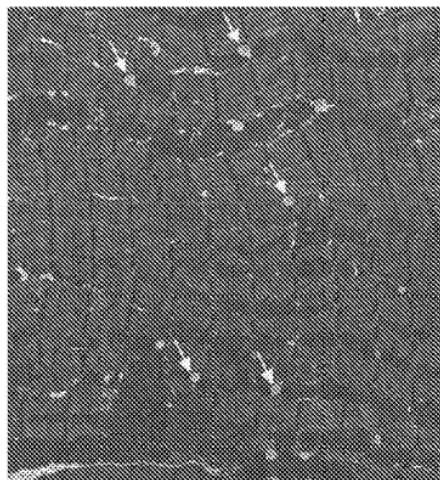


Figura 11A'

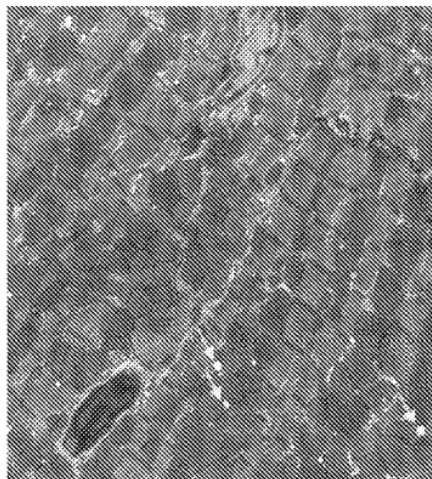


Figura 11B'

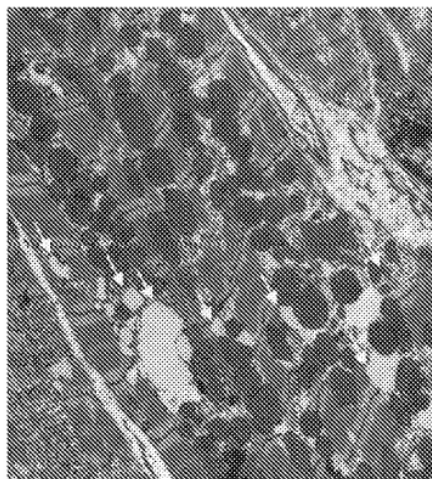


Figura 11C'

