

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 913**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/26**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04704039 .9**

96 Fecha de presentación: **21.01.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1587923**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

54 Título: **CONSTRUCTOS MEJORADOS PARA EXPRESAR POLIPÉPTIDOS LISOSOMALES.**

30 Prioridad:  
**22.01.2003 US 441789 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.01.2012**

73 Titular/es:  
**DUKE UNIVERSITY  
230 NORTH BUILDING, RESEARCH DRIVE, BOX  
90083  
DURHAM, NORTH CAROLINA 27708-0083, US**

72 Inventor/es:  
**KOEBERL, Dwight, D. y  
SUN, Baodong**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 371 913 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

Constructos mejorados para expresar polipéptidos lisosomales

**Campo de la Invención**

5 La presente descripción se refiere a constructos de ácido nucleico novedosos que codifican polipéptidos lisosomales, en particular  $\alpha$ -glucosidasa ácida lisosomal, así como métodos de uso de los mismos para producir polipéptidos lisosomales recombinantes y para tratar déficits de los polipéptidos lisosomales.

**Antecedentes de la Invención**

10 La enfermedad de almacenamiento de glicógeno de tipo II (GSD II) es un trastorno clásico de almacenamiento lisosomal, caracterizado por la acumulación lisosomal de glicógeno y lesión tisular, principalmente en el músculo y el corazón (Hirschhorn, R. y Reuser, A.J. (2001) en *The Metabolic and Molecular Basis for inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. Eds.), págs. 3389-3419. McGraw-Hill, Nueva York). El déficit de enzima subyacente es de  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA). En la cardiomiopatía progresiva y la miopatía asociadas a GSD II infantil grave conduce a insuficiencia cardiorrespiratoria y muerte a la edad de 1 año. En la GSD II de comienzo juvenil y adulto, más suave, la debilidad progresiva y la insuficiencia respiratoria son incapacitantes y se produce la muerte por insuficiencia respiratoria.

15 Los modelos animales para el déficit de  $\alpha$ -glucosidasa ácida lisosomal humana (hGAA) imitan con exactitud la GSD II, y en esto sistemas se puede evaluar la eficacia de los enfoques para la terapia génica para la GSD II. El modelo de ratón con el gen GAA desactivado (GAA-KO) acumuló glicógeno en el músculo esquelético y cardíaco, y desarrolló debilidad y reducción de la movilidad (Raben, N., et al. (1988) *J. Biol. Chem.* **273**:19086-19092, Bjoet, A.G. et al., (1998) *Hum. Mol. Genet.* **7**:53-62). La administración de GAA recombinante a un ratón GAA-KO demostró absorción de GAA por el músculo esquelético, presumiblemente a través de la absorción mediada por el receptor y liberación de GAA en los lisosomas (Bjoet, A.G. et al. (1998) *Hum. Mol. Genet.* **7**:1815-1824). El modelo de codorniz Japonesa es similar para la GSD II de comienzo juvenil, y ha sido tratada con éxito con sustitución con enzima recombinante (Kikuchi, T., et al. (1998) *J. Clin. Invest.* **101**:827-833). La terapia con enzima ha demostrado ser eficaz para la GSD II infantil, grave; sin embargo la ventaja de la terapia enzimática está limitada por la necesidad de frecuentes infusiones y el desarrollo de anticuerpos inhibidores contra la hGAA recombinante (Amalfitano, A., et al. (2001) *Genet. In Med.* **3**:132-138). Como alternativa o complemento para la terapia génica, se ha investigado la viabilidad de los enfoques de terapia génica para tratar la GSD-II (Amalfitano, A., et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:8861-8866, Ding, E., et al. (2002) *Mol. Ther.* **5**:436-446, Fraités, T.J., et al. (2002) *Mol. Ther.* **5**:571-578, Tsujino, S., et al. (1998) *Hum. Gene Ther.* **9**:1609-1616).

20 La administración de un vector de adenovirus (Ad) que codifica hGAA que estaba dirigido a hígado de ratón en el modelo de ratón GAA-KO revirtió la acumulación de glicógeno en músculo esquelético y cardíaco en 12 días por medio de la secreción de hGAA desde el hígado y la absorción de otros tejidos (Amalfitano, A., et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:8861-8866). Los anticuerpos contra hGAA acortaron la duración de la secreción de hGAA con un vector de Ad en el hígado, aunque el ADN del vector y la hGAA permanecieron en los tejidos a niveles reducidos durante muchas semanas (Ding, E., et al. (2002) *Mol. Ther.* **5**:436-446). La introducción de vectores de virus adenoasociado 2 (AAV2) que codificaban GAA normalizó la actividad de GAA en el músculo esquelético en el que se había inyectado y el músculo cardíaco en el que se había inyectado, y el contenido de glicógeno se normalizó en el músculo cuando se administró el vector de pseudotipo AAV1 con una mejora de la transducción en el músculo (Fraités, T.J., et al. (2002) *Mol. Ther.* **5**:571-578). Se intentó la terapia génica con vector de Ad dirigido al músculo en el modelo de codorniz Japonesa, aunque solamente se logró una reversión localizada de acumulación de glicógeno en el sitio de la inyección del vector (Tsujino, S., et al. (1998) *Hum. Gene Ther.* **9**:1609-1616).

25 La terapia génica neonatal puede tener una mayor eficacia que la administración más adelante en la vida, como evidenciaron los experimentos con numerosos modelos de enfermedad de roedores. Un vector de AAV administrado intravenosamente el segundo día de vida en ratones con déficit de  $\beta$ -glucuronidasa (enfermedad de Sly) produjo niveles terapéuticamente relevantes de  $\beta$ -glucuronidasa y corrigió el almacenamiento lisosomal en múltiples tejidos, incluyendo hígado y riñón (Daly, T.M., et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:2296-2300). De un modo similar, la inyección intramuscular del vector de AAV produjo niveles terapéuticos, sostenidos de expresión de  $\beta$ -glucuronidasa y eliminó el almacenamiento lisosomal en músculo e hígado (Daly, T.M., et al. (1991) *Hum. Gene Ther.* **10**:85-94). El ADN del vector de AAV permaneció en el músculo y en las zonas transducidas del hígado después de la inyección intramuscular neonatal en ratones con enfermedad de Sly (Daly, T.M., et al. (1999) *Hum. Gene Ther.* **10**:85-94). El número de partículas de vector de AAV administrado a ratones Sly neonatos fue aproximadamente 100 veces menor que el necesario para producir niveles terapéuticamente relevantes de proteína en ratones adultos (Kessler, P.D., et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14082-14087, Herzog, R.W., et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:5804-5809, Nakai, H., et al. (1998) *Blood* **91**:4600-4607, Snyder, R.O., et al. (1997) *Nat. Genet.* **16**:270-276, Koeberl, D.D., et al. (1999) *Hum. Gene Ther.* **10**:2133-2140, Snyder, R.O., et al. (1999) *Nat. Med.* **5**:64-70, Herzog, R.W. et al. (1999) *Nat. Med.* **5**:56-63).

Existe la necesidad en la técnica de métodos mejorados de producción de polipéptidos lisosomales tales como GAA

*in vitro* e *in vivo*, por ejemplo, para tratar los déficits de polipéptidos lisosomales. Además, existe la necesidad de métodos que den como resultado la liberación generalizada de GAA y otros polipéptidos lisosomales en tejidos y órganos afectados.

### Compendio de la Invención

5 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de constructos de ácido nucleico mejorados para expresar polipéptidos lisosomales tales como GAA.

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico que comprende una secuencia señal secretora de  $\alpha$ 1-antitripsina representada por el SEQ ID NO: 8 conectada operablemente a un polipéptido de  $\alpha$ -glucosidasa ácida lisosomal (GAA) donde dicha secuencia señal secretora sustituye los primeros 27 aminoácidos del SEQ ID NO: 2 del polipéptido de GAA lisosomal nativo.

Preferiblemente, el ácido nucleico está conectado operativamente a un elemento de control transcripcional operable en células de hígado.

15 Preferiblemente, se proporciona una célula que comprende el vector de la invención o una formulación farmacéutica que comprende el vector de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un polipéptido quimérico que comprende una secuencia señal secretora de  $\alpha$ 1-antitripsina representada por el SEQ ID NO: 8 conectada operablemente a un polipéptido de GAA lisosomal, donde dicha secuencia señal secretora sustituye los primeros 27 aminoácidos del SEQ ID NO: 2 del polipéptido de GAA lisosomal nativo.

20 De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un método *in vitro* de liberación de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de GAA lisosomal en una célula, que comprende poner en contacto una célula *in vitro* con el vector como se ha descrito antes en la presente memoria en condiciones suficientes para que el vector sea introducido en la célula y para que el ácido nucleico sea expresado para producir el polipéptido quimérico que comprende la secuencia señal secretora de  $\alpha$ 1-antitripsina representada por el SEQ ID NO: 8 conectada operablemente al polipéptido de GAA lisosomal donde dicha secuencia señal secretora sustituye los 27 primeros aminoácidos del SEQ ID NO: 2 del polipéptido de GAA lisosomal nativo.

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un método para producir un polipéptido de  $\alpha$ -glucosidasa lisosomal (GAA) en una célula cultivada, que comprende:

30 poner en contacto una célula cultivada con un vector como se ha descrito antes en la presente memoria en condiciones suficientes para que el vector sea introducido en la célula cultivada y para que el ácido nucleico sea expresado para producir el polipéptido quimérico que comprende la secuencia señal secretora de la  $\alpha$ 1-antitripsina representada por el SEQ ID NO: 8 conectada operablemente al polipéptido de GAA donde dicha secuencia señal secretora sustituye los 27 primeros aminoácidos del SEQ ID NO: 2 del polipéptido de GAA lisosomal nativo y el polipéptido de GAA secretado de la célula cultivada, y el polipéptido de GAA es secretado de la célula cultivada.

35 De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona el vector o la célula que contiene el vector como se ha descrito antes en la presente memoria para su uso en el tratamiento del déficit de un polipéptido de GAA lisosomal en un sujeto que padece la Enfermedad de Pompe.

40 De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona el uso de un vector o de una célula que contiene el vector como se ha descrito antes en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para tratar un déficit de un polipéptido de GAA lisosomal en un sujeto que padece la Enfermedad de Pompe.

Preferiblemente, el vector se libera en el hígado.

En otras realizaciones concretas, el polipéptido lisosomal es un polipéptido humano y/o el ácido nucleico aislado está asociado operativamente con un elemento de control de la transcripción que es operable en células del hígado (opcionalmente, con un elemento de control de la transcripción específico del hígado).

45 La presente invención proporciona además vectores (incluyendo vectores no virales y virales, incluyendo los últimos adenovirus, AAV y vectores híbridos de adenovirus-AAV), células y composiciones farmacéuticas que comprenden los vectores de esta invención.

Como aspectos adicionales, la presente invención proporciona los métodos de liberación de vectores (p. ej., vectores virales) que comprenden los ácidos nucleicos aislados descritos en la presente memoria.

50 También se proporcionan los métodos de utilización de vectores, células, y formulaciones farmacéuticas que comprenden los vectores de la invención para tratar déficits de polipéptidos lisosomales (p. ej., GAA) y para producir polipéptidos lisosomales recombinantes (p. ej., *in vitro* en células cultivadas o *in vivo* en un sistema de expresión de proteínas recombinantes basado en un animal o planta o con fines terapéuticos).

En realizaciones ilustrativas, la presente invención se pone en práctica para administrar vectores que codifican polipéptidos quiméricos tales como GAA a un sujeto (por ejemplo, un sujeto al que se ha diagnosticado o del que se sospecha que tiene un déficit del polipéptido lisosomal). En realizaciones representativas concretas, se puede administrar un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico a un tejido u órgano de depósito (p. ej., hígado, músculo esquelético, pulmón y similar) y el polipéptido se puede expresar en él a niveles suficientes para dar como resultado la secreción a la circulación general, a partir de la cual es absorbido el polipéptido secretado por los tejidos diana distales (p. ej., músculo esquelético, cardíaco y/o del diafragma).

En otra realización concreta, se administra un vector de virus adenoasociado (AAV) recombinante que expresa un ácido nucleico aislado que codifica un GAA quimérico en el hígado de un sujeto que tiene un déficit de GAA, lo que da como resultado la producción del polipéptido GAA a niveles suficientemente elevados de manera que el polipéptido GAA es secretado a partir del hígado y absorbido por el músculo esquelético y/u otros tejidos, lo que ventajosamente conduce a una reducción en el contenido de glicógeno y/o a una mejora en otros indicios clínicos de déficit de GAA en los tejidos afectados.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de los vectores, células y formulaciones farmacéuticas de la invención en la fabricación de medicamentos para el tratamiento del déficit de polipéptidos lisosomales (p. ej., déficit de GAA).

Estos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle en la descripción de la invención expuesta más abajo.

### Breve Descripción de los Dibujos

**Figura 1.** Detección de hGAA después de la administración intramuscular neonatal de un vector de Ad-AAV en ratones GAA-KO. (**Panel A**) Análisis de transferencia western del músculo después de que se inyectara en el gastrocnemio de los ratones GAA-KO el vector de Ad-AAV ( $4 \times 10^{10}$  DRP) que codifica hGAA a los 3 días de edad. Todas las muestras se obtuvieron 24 semanas después de la administración del vector. La GAA humana recombinante (rhGAA) fue la convencional. Cada calle para los grupos de músculos indicados representa un ratón GAA-KO. Se detectaron especies de hGAA de ~67 kD, ~76 kD, y ~110 kD en el músculo transducido como se esperaba (Amalfitano, A., et al. (1999) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **96**:8861-8866, Ding, E., et al. (2002) *Mol. Ther.* **6**:436-446). (**Panel B**) Análisis de transferencia western del corazón, el hígado y el diafragma siguiente a la administración neonatal del vector de Ad-AAV. Cada calle representa un ratón GAA-KO analizado en el momento indicado siguiente a la administración del vector. Las muestras para los ratones individuales se cargaron en el mismo orden para la transferencia Western de cada tejido.

**Figura 2.** Actividad de GAA y contenido de glicógeno para el músculo esquelético y otros tejidos en ratones GAA-KO siguiente a la administración del vector de Ad-AAV neonatal. (**Panel A**) Actividad de hGAA para gastrocnemio y cuádriceps a las 6, 12, y 24 semanas siguientes a la administración del vector, y para isquiotibiales a las 24 semanas, en comparación con actividad hGAA en gastrocnemio, cuádriceps, e isquiotibiales para ratones GAA-KO no tratados. Se muestran la media y la desviación típica. Se indica el valor de p como sigue: \* < 0,05, \*\* < 0,01, y \*\*\* < 0,001. El número de ratones (n) se muestra para cada momento. (**Panel B**) Actividad de hGAA para corazón, hígado, y diafragma siguiente a la administración del vector de Ad-AAV, y para los controles. Los controles fueron ratones GAA-KO, no tratados: n = 4 para corazón e hígado, n = 5 para diafragma. Se muestran la media y la desviación típica para los controles.

**Figura 3.** Anticuerpos de plasma de ratón GAA-KO siguiente a administración neonatal de vector de Ad-AAV. (**Panel A**) Absorbancia para los anticuerpos anti-hGAA en un ELISA de plasma de ratón GAA-KO a las 6 semanas de la administración neonatal del vector de Ad-AAV (Ad-AAV Intramuscular Neonatal), y de plasma de ratón GAA-KO a las 6 semanas de la administración intravenosa del vector de Ad-AAV ( $4 \times 10^{10}$  partículas) en ratones adultos (Ad-AAV). Los controles consistieron en ratones GAA-KO, no tratados (Control). Cada columna representa la media y la desviación típica para un ratón individual. Cada dilución de plasma (1:100, 1:200, y 1:400) fue analizada por triplicado. (**Panel B**) Título para los anticuerpos anti-hGAA por medio de ELISA, representando los mismos ratones en el mismo orden que en el Panel B de la Figura 1. Cada muestra fue analizada por duplicado a cada dilución, (**Panel C**) Absorbancia para los anticuerpos anti-Ad en un ELISA de plasma de ratón GAA-KO para las mismas muestras descritas para el ELISA, para los anticuerpos anti-hGAA anteriores, excepto que solamente se analizaron 2 controles no tratados. Cada muestra se analizó por duplicado en cada dilución. El orden de carga fue el mismo que en el Panel B de la Figura 1.

**Figura 4.** Contenido de glicógeno para músculo esquelético y corazón. (**Panel A**) Gastrocnemio y cuádriceps a las 6, 12 y 24 semanas de la administración del vector, y para los isquiotibiales a las 24 semanas, en comparación con la actividad de hGAA en gastrocnemio, cuádriceps, e isquiotibiales para ratones GAA-KO no tratados. Se muestran la media y la desviación típica. El valor p se indica como sigue: \* < 0,05, \*\* < 0,01, y \*\*\* < 0,001. El número de ratones (n) se muestra para cada momento. (**Panel B**) Contenido de glicógeno para corazón y diafragma, y para los controles, Los controles fueron ratones GAA-KO no tratados (n=4). Se muestran la media y la desviación típica para los controles.

- Figura 5.** Tinción de glicógeno de músculo esquelético y corazón. La tinción PAS mostró acumulación de glicógeno en lisosomas, y agrupamiento de glicógeno en el exterior de los lisosomas, que fue corregido después de la administración de Ad-AAV en los momentos indicados.
- 5 **Figura 6.** Síntesis de hGAA (panel superior) y contenido de glicógeno (panel inferior) en músculo de ratones GAA-KO/SCID a los que se ha administrado un vector de AAV2/6 (AAV6) que expresa GAA intramuscularmente.
- Figura 7.** Secreción de hGAA desde el hígado al plasma en ratones GAA-KO/SCID a los que se ha administrado un vector de AAV2/2 (AAV2) o AAV2/6 (AAV6). Análisis de transferencia Western de plasma de ratones GAA-KO/SCID después de la administración del vector de AAV, y de ratones GAA-KO/SCID no tratados (controles).
- 10 **Figura 8.** Secuencia de ADNc de hGAA completa; Núm. de Acceso Genbank NM\_000152 (**SEQ ID NO: 1**). Se muestra la proteína codificada en el **SEQ ID NO: 2**. El ORF es nt 442...3300. La secuencia UTR 3' de GAA es del nt 3301 al 3846, 546 pb en total.
- 15 **Figura 9.** Secuencia de hGAA con una UTR 3' suprimida (**SEQ ID NO: 3**). Los 411 pb desde el nt 3397 al nt 3807 de la UTR 3' de la secuencia mostrada en la **Figura 8** (**SEQ ID NO: 1**) fueron suprimidos (en negrita, cursiva). Obsérvese que la señal de poliA (negrita, 3825...3830) y el sitio de poliA (3846) no están suprimidos. La secuencia UTR 5' del nt 1 al 409 también fue suprimida.
- Figura 10.** Actividad GAA en hígado y otros tejidos después de la inyección en la vena porta de un vector de AAV2/2. Los ratones GAA-KO/SCID recibieron el vector empaquetado como AAV2 (AAV2 (2) a los 3 meses de edad (n = 3), y fueron analizados 12 semanas después de la inyección. Los controles fueron ratones GAA-KO/SCID no tratados de 3 meses de edad (n = 3).
- 20 **Figura 11.** GAA humana en hígado y otros tejidos después de la inyección en la vena porta de vectores AAV en ratones GAA-KO/SCID. Análisis de transferencia Western de plasma de ratones GAA-KO/SCID en los momentos indicados después de la administración del vector de AAV, y de ratones GAA-KO/SCID no tratados (controles). La hGAA recombinante (rhGAA) se muestra como patrón.
- 25 **Figura 12.** Actividad de GAA en músculos gastrocnemios (inyectados y no inyectados) y otros tejidos después de la inyección intramuscular de un vector de AAV2/6. Los ratones GAA-KO/SCID recibieron el vector empaquetado en forma de AAV 6 (AAV2/6) a las 6 semanas de edad (n = 8), y se analizaron a las 6, 12 y 24 semanas de la inyección. Los controles fueron ratones GAA-KO/SCID no tratados de 3 meses de edad (n = 3).
- 30 **Figura 13.** Tinción de glicógeno de músculo esquelético en ratones GAA-KO/SCID. La tinción PAS mostró acumulación de glicógeno en los lisosomas, agrupamiento de glicógeno fuera de los lisosomas que fue corregido después de la administración de AAV2/6.
- Figura 14.** Localización (celular vs. secretado) de GAA con diferentes secuencias líder expresadas en células 293 transfectadas.
- 35 **Figura 15.** Análisis por transferencia Western de GAA con diferentes secuencias líder. GAA expresada en células 293 transfectadas con los constructos que contienen hGAA conectados a los péptidos señal indicados. Para las células 293 transfectadas, en las calles 3-14, la primera (números impares) de las 2 calles para cada constructo representa el producto lisado celular y la segunda calle (números pares) es el medio. El control representa células 293 no transfectadas, mostrando hGAA procesada endógena. La hGAA humana recombinante (rhGAA) se muestra como patrón.
- 40 **Figura 16.** Análisis de transferencia Western de plasma de ratones GAA-KO/SCID a las 2 semanas de la administración del vector, y de ratones GAA-KO/SCID no tratados (controles). Los ratones GAA-KO/SCID de tres meses de edad recibieron un vector de AAV que codificaba el péptido señal de la  $\alpha$ -1-antitripsina química conectada al ADNc de hGAA (Alfa-1-antitripsina, calles 2-7), o un vector de AAV que codifica hGAA con su péptido señal endógeno (hGAA, calles 8-13). Cada calle representa un ratón individual. Las calles 5-7 y 11-13 eran ratones hembra. La GAA humana recombinante (rhGAA) se muestra como patrón.
- 45 **Figura 17.** Actividad de GAA en el hígado y otros tejidos a las 2 semanas de la inyección intravenosa de un vector de AAV2/8 que codifica hGAA conectado a la secuencia líder de la alfa-1-antitripsina. Los ratones GAA-KO/SCID de 3 meses de edad macho (n = 3) recibieron un vector de AAV que codificaba el péptido señal de la alfa-1-antitripsina química conectada al ADNc de hGAA (menos el péptido señal de GAA de 27 aminoácidos). Los controles fueron ratones GAA-KO/SCID no tratados (n = 3).
- 50 **Figura 18.** GAA humana en hígado y otros tejidos después de la inyección intravenosa de un vector de AAV que contenía un promotor específico de hígado para conducir la expresión de GAA en ratones GAA-KO inmunocompetentes. Análisis de transferencia Western de plasma de ratones GAA-KO a las 3 semanas de la administración del vector de AAV, y de ratones GAA-KO no tratados (controles). Se muestra la rhGAA humana recombinante (rhGAA) como patrón.

**Descripción Detallada de las Realizaciones Preferidas**

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de constructos de ácido nucleico mejorados para expresar polipéptidos lisosomales tales como GAA. Los autores de la presente invención describen un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido lisosomal conectado operablemente a una secuencia señal secretora de manera que se intensifique el direccionamiento del polipéptido lisosomal a la ruta secretora (esto es, en lugar de al lisosoma). Asimismo se describen ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia codificante para GAA y una UTR 3' "abreviada".

Los ácidos nucleicos aislados son ventajosos para la liberación de polipéptidos lisosomales (p. ej., GAA) en células diana o para la producción de proteína recombinante en células cultivadas o tejidos o sistemas animales completos (p. ej., para terapia de sustitución enzimática). En realizaciones concretas, la presente invención se puede poner en práctica para liberar una secuencia codificante para un polipéptido lisosomal en un tejido u órgano de "depósito" (p. ej., hígado, músculo esquelético, pulmón), donde el polipéptido es expresado en el tejido u órgano de depósito, secretado a la circulación general, y absorbido por los tejidos diana (p. ej., músculo esquelético, músculo cardíaco y/o músculo del diafragma en individuos con un déficit de GAA). En realizaciones representativas, la absorción del polipéptido GAA secretado desde el hígado por el músculo esquelético y/u otros tejidos afectados por el déficit de GAA da como resultado una reducción de los almacenes de glicógeno o una mejora de otros indicios clínicos de déficit de GAA. De manera alternativa, el ácido nucleico aislado es liberado en las células (p. ej., neuronas y/o células gliales) en el cerebro, el polipéptido lisosomal es producido y secretado por las células transformadas o transducidas y absorbido por otras células del cerebro.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran las realizaciones preferidas de la invención. La terminología utilizada en la descripción de la invención en la presente memoria tiene el propósito de describir solamente realizaciones concretas y no está destinado a limitar la invención. Esta invención puede ser plasmada de diferentes formas y no se debe considerar limitada a las realizaciones mostradas en la presente memoria. En lugar de eso, estas realizaciones se proporcionan de manera que esta descripción sea rigurosa y completa, y transmita completamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica. Por ejemplo, los rasgos ilustrados con respecto a una realización pueden ser incorporados a otras realizaciones, y los rasgos ilustrados con respecto a una realización concreta pueden ser suprimidos de esa realización. Además, numerosas variaciones y adiciones para las realizaciones sugeridas en la presente memoria serán evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción, que no se aparta de la presente invención.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente comprendido por un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad.

Excepto cuando se indique de otro modo, se pueden utilizar los métodos convencionales para la producción de vectores virales y no virales, la manipulación de secuencias de ácido nucleico, la producción de células transformadas, la producción de proteína recombinante, y similares de acuerdo con la presente invención. Tales mecanismos son conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, p. ej., SAMBROOK et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2ª Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989); F. M. AUSUBEL et al. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

**Definiciones**

A menos que se indique de otro modo, explícitamente o por el contexto, los siguientes términos se utilizan en la presente memoria como se expone más abajo:

Según se utiliza en la descripción de la invención y en las reivindicaciones adjuntas, se pretende que las formas en singular "un", "una", "uno", "el", y "la" incluyan también las formas en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Según se utiliza en la presente memoria, un "vector" o "vector de liberación" puede ser un vector viral o no viral que se utilice para liberar un ácido nucleico en una célula, tejido o sujeto.

Un "vector recombinante" o vector de liberación hace referencia a un vector viral o no viral que comprende una o más secuencias de nucleótidos heterólogas (esto es, transgenes), p. ej., dos, tres, cuatro, cinco o más secuencias de nucleótidos heterólogas. Los vectores recombinantes de la invención comprenden secuencias de nucleótidos que codifican GAA, pero también pueden comprender una o más secuencias heterólogas adicionales.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "vector viral" o "vector de liberación viral" puede hacer referencia a una partícula de virus que funciona como vehículo de liberación de ácido nucleico, y que comprende el genoma del

vector recombinante empaquetado dentro de un virión. De manera alternativa, estos términos se pueden utilizar para hacer referencia al genoma del vector cuando se utiliza como vehículo de liberación de ácido nucleico en ausencia del virión.

5 Un "genoma de vector" viral hace referencia al ADN o ARN genómico viral, en su forma natural o modificada. Un "genoma de vector recombinante" es un genoma viral (*p. ej.*, ADNv) que comprende una o más secuencias de nucleótidos heterólogas.

10 Una "secuencia de nucleótidos heteróloga" será típicamente una secuencia no sea de origen natural en el vector. De manera alternativa, una secuencia de nucleótidos heteróloga puede hacer referencia a una secuencia que está situada en un entorno de origen no natural (*p. ej.*, mediante asociación con un promotor con el cual no se encuentra asociado naturalmente).

15 Por "infeccioso", según se utiliza en la presente memoria, se quiere significar que un virus puede entrar en una célula por medio de mecanismos de transducción naturales y expresar genes virales (incluyendo una o varias secuencias de nucleótidos heterólogas). De manera alternativa, un virus "infeccioso" es aquél que entra en la célula por medio de otros mecanismos y expresa los genes codificados por el genoma viral. Como ejemplo ilustrativo, el vector puede entrar en una célula diana expresando un ligando o una proteína de unión para un receptor de la superficie celular en el virión o utilizando uno o varios anticuerpos dirigidos contra moléculas sobre la superficie celular seguido de internalización del complejo.

20 Según se utiliza en la presente memoria, "transducción" de una célula por AAV significa que el AAV entra en la célula para establecer una infección latente. Véase, *p. ej.*, BERNARD N. FIELDS et al., VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (3ª ed., Lippincott-Raven Publishers).

El término "replicación" según se utiliza en la presente memoria en referencia a vectores virales se refiere específicamente a la replicación (esto es, elaboración de nuevas copias) del genoma del vector (esto es, ADN o ARN del virión).

25 El término "propagación" según se utiliza en la presente memoria en referencia a vectores virales se refiere a una infección viral productiva en la que el genoma viral es replicado y empaquetado para producir nuevos viriones, que típicamente se pueden "diseminar" por medio de la infección de células más allá de la célula infectada inicialmente. Un virus de "propagación defectuosa" está dañado en su capacidad para producir una infección viral productiva y en su diseminación más allá de la célula infectada inicialmente.

30 Según se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" incluye tanto péptidos como proteínas, a menos que se indique de otro modo.

35 Un "polipéptido quimérico" es un polipéptido producido cuando dos genes heterólogos o fragmentos de los mismos que codifican dos (o más) polipéptidos diferentes o fragmentos de los mismos, que no se encuentran fusionados entre sí en la naturaleza, se fusionan entre sí en el marco de lectura traduccional correcto. Los polipéptidos quiméricos ilustrativos incluyen fusiones de GAA u otros polipéptidos lisosomales con toda o una porción de la glutatión-S-transferasa, la proteína de unión a maltosa, o una proteína informadora (*p. ej.*, Proteína Fluorescente Verde,  $\beta$ -glucuronidasa, y  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa). En realizaciones concretas de la invención, el polipéptido quimérico comprende una secuencia señal secretora conectada operablemente a un polipéptido lisosomal (*p. ej.*, GAA).

40 Según se utiliza en la presente memoria, un polipéptido "funcional" es aquél que conserva al menos una actividad biológica asociada normalmente con ese polipéptido. Preferiblemente, un polipéptido "funcional" conserva todas las actividades poseídas por el polipéptido no modificado. Por "conserva" la actividad biológica, se quiere significar que el polipéptido conserva al menos aproximadamente 50%, 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, o más, de la actividad biológica del polipéptido nativo (y puede incluso tener un nivel de actividad superior al del polipéptido nativo). Un polipéptido "no funcional" es aquél que muestra una actividad biológica esencialmente no detectable asociada normalmente con el polipéptido (*p. ej.*, a lo sumo, solamente una cantidad insignificante, *p. ej.*, menos de aproximadamente 10% o incluso 5%).

50 Según se utiliza en la presente memoria, un ácido nucleico "aislado" (*p. ej.*, un "ADN aislado" o un "genoma de vector aislado") representa un ácido nucleico separado o esencialmente libre de al menos algunos de los otros componentes del organismo o virus de origen natural, por ejemplo, los componentes estructurales de la célula o virales u otros polipéptidos o ácidos nucleicos comúnmente encontrados asociados con el ácido nucleico.

Del mismo modo, un polipéptido "aislado" representa un polipéptido que está separado o esencialmente libre de al menos algunos de los otros componentes del organismo o virus de origen natural, por ejemplo, los componentes estructurales de la célula o virales u otros polipéptidos o ácido nucleicos comúnmente encontrados asociados con el polipéptido.

55 Una cantidad "terapéuticamente eficaz" según se utiliza en la presente memoria es una cantidad que es suficiente para proporcionar alguna mejora o beneficio en el sujeto. Establecido como alternativa, una cantidad

- "terapéuticamente eficaz" es una cantidad que proporciona cierto alivio, mitigación o disminución de al menos un síntoma clínico en el sujeto. Como ilustración, en el caso del déficit de GAA, es una cantidad que proporciona cierto alivio, mitigación o disminución de al menos un síntoma clínico del déficit de GAA (*p. ej.*, reducción de los almacenes de glicógeno en el músculo esquelético, del diafragma y/o cardíaco, mejora de la fuerza y función del músculo, mejora de la función pulmonar, mejora del desarrollo motor o logro de acontecimientos fundamentales del desarrollo motor, reducción de la necesidad o prevención de la necesidad de ventilación asistida, prevención de insuficiencia cardíaca o cardiorrespiratoria, reducción de la mortalidad de prematuros, y similares). Los expertos en la técnica apreciarán que no es necesario que los efectos terapéuticos sean completos o curativos, con tal que se proporcione cierto beneficio al sujeto.
- 5
- 10 Por medio de los términos "tratar" o "tratamiento de" se pretende que la gravedad de la afección del paciente se reduzca o al menos mejore parcialmente y que se logre cierto alivio, mitigación, retraso o disminución de al menos un síntoma clínico.
- Se pretende que una "reducción en los almacenes de glicógeno" en un tejido indique aproximadamente una reducción de 25%, 35%, 40%, 50%, 60%, 75%, 85%, 90% 95% o más en el glicógeno total en un tejido concreto, a menos que se indique de otro modo (*p. ej.*, una reducción en los almacenes de glicógeno lisosomal o en los tejidos reunidos).
- 15
- Por el término "expresar" o "expresión" de una secuencia codificante de ácido nucleico, en particular una secuencia codificante de GAA, se quiere significar que la secuencia es transcrita, y opcionalmente, traducida. Generalmente, sin embargo, de acuerdo con la presente invención, se pretende que el término "expresar" o "expresión" haga referencia a la transcripción y a la traducción de la secuencia codificante que da como resultado la producción del polipéptido codificado.
- 20
- Por "aumentado" o "aumento" (o sus variaciones gramaticales) con respecto a la expresión de un ácido nucleico o a la producción de un polipéptido, se quiere significar un incremento y/o prolongación de los niveles en estado estacionario del ácido nucleico o polipéptido indicados, *p. ej.*, al menos aproximadamente en 20%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces o más.
- 25
- A menos que se indique de otro modo, los términos "aumentado" o "aumento" (o sus variaciones gramaticales) con respecto a la secreción de polipéptido indican un incremento en la proporción relativa de polipéptido que es secretado de la célula, *p. ej.*, al menos aproximadamente en 20%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces o más.
- 30

## **II. Constructos Mejorados para Producir Polipéptidos Lisosomales.**

- Los autores de la presente invención describen con más detalle más abajo, constructos mejorados para producir polipéptidos lisosomales, *p. ej.*, polipéptidos que están dirigidos a los lisosomas. Como es sabido en la técnica, muchas proteínas lisosomales se caracterizan por la presencia de residuos de manosa-6-fosfato, y en las realizaciones de la invención el polipéptido lisosomal comprende la glicosilación de la manosa-6-fosfato. En otras realizaciones representativas, el polipéptido lisosomal es el que está asociado a una enfermedad de almacenamiento lisosomal (*p. ej.*, debido a un déficit o a un defecto en el polipéptido lisosomal). Por "asociado a una enfermedad de almacenamiento lisosomal" se quiere significar que es el polipéptido lisosomal el que es deficiente o defectuoso en un trastorno de almacenamiento lisosomal, o es un agente causante de otro modo del trastorno del almacenamiento lisosomal.
- 35
- 40
- Como es sabido en la técnica, existen multitud de enfermedades de almacenamiento lisosomal. Las enfermedades de almacenamiento lisosomal ilustrativas incluyen, pero no están limitadas a, enfermedad de almacenamiento de glicógeno de tipo II (GSD II o Enfermedad de Pompe), gangliosidosis GM1, enfermedad de Tay-Sachs, gangliosidosis GM2 (variante AB), enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Niemann-Pick (Tipos A-D), enfermedad de Farber, enfermedad de Wolman, Síndrome de Hurler (MPS III), Síndrome de Scheie (MPS IS), Síndrome de Hurler-Scheie (MPS IH/S), Síndrome de Hunter (MPS II), Síndrome de Sanfilippo A (MPS IIIA), Síndrome de Sanfilippo B (MPS IIIB), Síndrome de Sanfilippo C (MPS IIIC), Síndrome de Sanfilippo D (MPS IIID), enfermedad de Morquio A (MPS IVA), enfermedad de Morquio B (MPS IV B), enfermedad de Maroteaux-Lamy (MPS VI), Síndrome de Sly (MPS VII),  $\alpha$ -manosidosis,  $\beta$ -manosidosis, fucosidosis, aspartilglucosaminuria, sialidosis (mucopolipidosis I), mucopolipidosis II (Enfermedad de Células I), mucopolipidosis III (polidistrofia pseudo-Hurler), mucopolipidosis IV, galactosialidosis (Síndrome de Goldberg), enfermedad de Schindler, cistinosis, enfermedad de Salla, enfermedad de almacenamiento de ácido siálico infantil, enfermedad de Batten (lipofuscinosis ceroides neuronal juvenil), lipofuscinosis ceroides neuronal infantil, y prosaposina.
- 45
- 50
- 55 Los polipéptidos lisosomales que están asociados con las enfermedades de almacenamiento lisosomal de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no están limitadas a,  $\alpha$ -glucosidasa ácida lisosomal (GAA; también conocida como maltasa ácida),  $\alpha$ -galactosidasa A,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -hexosaminidasa A,  $\beta$ -hexosaminidasa B, proteína activadora GM<sub>2</sub>, glucocerebrosidasa, arilsulfatasa A, galactosilceramidasa, esfingomielinasa ácida,

ceramidasa ácida, lipasa ácida,  $\alpha$ -L-iduronidasa, iduronato sulfatasa, heparan N-sulfatasa,  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa, glucosaminido acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, arilsulfatasa B,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\alpha$ -manosidasa,  $\beta$ -manosidasa,  $\alpha$ -L-fucosidasa, N-aspartil- $\beta$ -glucosaminidasa, N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa,  $\alpha$ -neuraminidasa, proteína protectora lisosomal,  $\alpha$ -N-acetil-galactosaminidasa, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, proteína de transporte de cistina, proteína de transporte de ácido siálico, el producto del gen CLN3, palmitoil-proteína tioesterasa, saposina A, saposina B, saposina C, y saposina D.

La  $\alpha$ -glucosidasa ácida lisosomal o "GAA" (E.C. 3.2.1.20) (1,4- $\alpha$ -D-glucan glucohidrolasa), es una exo-1,4- $\alpha$ -D-glucosidasa que hidroliza enlaces tanto  $\alpha$ -1,4 como  $\alpha$ -1,6 de oligosacáridos para liberar glucosa. Un déficit en GAA da como resultado la enfermedad de almacenamiento de glicógeno de tipo II (GSDII), también referida como enfermedad de Pompe (aunque este término se refiere formalmente a la forma de comienzo infantil de la enfermedad). Cataliza la degradación completa del glicógeno con una ralentización en los puntos de ramificación. El gen de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana de 28 kb en el cromosoma 17 codifica un ARNm de 3,6 kb que produce un polipéptido de 951 aminoácidos (Hoefsloot et al., (1988) EMBO J. 7:1697; Martiniuk et al., (1990) DNA and Cell Biology 9:85). La enzima recibe una glicosilación ligada a N co-traducciona en el retículo endoplásmico. Es sintetizada como una forma precursora de 110 kDa, que madura con una importante modificación por glicosilación, fosforilación y procesamiento proteolítico a través de un intermedio endosomal de aproximadamente 90 kDa en las formas de 76 y 67 kDa lisosomales finales (Hoefsloot, (1988) EMBO J. 7:1697; Hoefsloot et al., (1990) Biochem. J. 272:485; Wisselaar et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2223; Hermans et al., (1993) Biochem. J. 289:681).

En pacientes con GSD II, un déficit de  $\alpha$ -glucosidasa ácida ocasiona la acumulación masiva de glicógeno en los lisosomas, interrumpiendo la función celular (Hirschhorn, R. y Reuser, A.J. (2001), en The Metabolic and Molecular Basis for Inherited Disease, (eds, Scriver, C. R. et al.) páginas 3389-3419 (McGraw-Hill, Nueva York). En la forma infantil más común, los pacientes muestran una degeneración muscular y una cardiomiopatía progresivas y mueren antes de los dos años de edad. Se encuentra presente una debilitación grave en las formas de comienzo juvenil y adulto.

El término "GAA" o polipéptido GAA", según se utiliza en la presente memoria, abarca la GAA madura (~76 o ~67 kDa) y precursora (*p. ej.*, ~110 kDa) así como las proteínas GAA modificadas (*p. ej.*, truncadas o mutadas por una o varias inserciones, deleciones y/o sustituciones) o sus fragmentos que conservan la función biológica (esto es, tienen al menos una actividad biológica de la proteína GAA nativa, *p. ej.*, puede hidrolizar glicógeno, como se ha definido más arriba) y variantes de GAA (*p. ej.*, GAA II como describen Kunita et al., (1997) Biochemica et Biophysica Acta 1362:269; polimorfismos de GAA y SNP descritos por Hirschhorn, R. y Reuser, A.J. (2001) En The Metabolic and Molecular Basis for Inherited Disease (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. Eds.), págs. 3389-3419. McGraw-Hill, Nueva York, véanse las páginas 3403-3405). Se puede utilizar cualquier secuencia codificante de GAA conocida en la técnica, por ejemplo, véanse las secuencias codificantes de las **Figuras 8 y 9**; número de Acceso GenBank NM\_00152 y Hoefsloot et al., (1988) EMBO J. 7:1697 y Van Hove et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:65 (humano), número de Acceso GenBank NM\_008064 (ratón), y Kunita et al., (1997) Biochemica et Biophysica Acta 1362:269 (codorniz).

Del mismo modo el término "polipéptido lisosomal", según se utiliza en la presente memoria, incluye los polipéptidos lisosomales maduro y precursor así como los polipéptidos lisosomales modificados (*p. ej.*, truncados o mutados por una o varias inserciones, deleciones y/o sustituciones o sus fragmentos que conservan la función biológica (esto es, tienen al menos una actividad biológica del polipéptido lisosomal nativo) y las variantes del polipéptido lisosomal.

La secuencia codificante del polipéptido lisosomal puede derivar de cualquier fuente, incluyendo especies de aves y mamífero. El término "ave" según se utiliza en la presente memoria incluye, pero no está limitado a, pollos, patos, gansos, codornices, pavos y faisanes. El término "de mamífero" según se utiliza en la presente memoria incluye, pero no está limitado a, seres humanos, simios y otros primates no humanos, bóvidos, óvidos, cápridos, équidos, félidos, cánidos, lagomorfos, etc. En las realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos de la invención codifican un polipéptido lisosomal humano, de ratón o de codorniz.

### **A. Constructos para Dirigir Polipéptidos Lisosomales a la Ruta Secretora.**

Las proteínas lisosomales tienen generalmente péptidos señal amino terminales que transfieren co-traduccionalmente las proteínas nacientes al lumen del retículo endoplásmico. Se cree que los polipéptidos lisosomales divergen de la ruta secretora y se dirigen al lisosoma al menos por tres rutas distintas (véase, *p. ej.*, Wisselaar et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2223-31). La mejor estudiada de estas implica la adición post-traducciona de residuos de manosa-6-fosfato que son reconocidos por el receptor de fosfomanosilo, que dirige el transporte del polipéptido al lisosoma.

Los primeros 27 aminoácidos del polipéptido GAA humano son típicos de los péptidos señal de las proteínas lisosomales y secretoras. La GAA puede ser dirigida a los lisosomas a través del receptor de fosfomanosilo y/o por medio de secuencias asociadas a la escisión retardada del péptido señal (Hirschhorn, R. y Reuser, A.J. (2001), en The Metabolic and Molecular Basis for Inherited Disease, (eds, Scriver, C. R. et al.) páginas 3359-3419 (McGraw-Hill, Nueva York). Una forma precursora unida a membrana de la enzima (esto es, anclada por el péptido señal no escindido) ha sido identificada en el lumen del retículo endoplásmico (véase, *p. ej.*, Wisselaar et al., (1993) J. Biol.

Chem. 268:2223-31).

Los autores de la presente invención describen vectores que comprenden ácidos nucleicos aislados que codifican polipéptidos lisosomales (*p. ej.*, GAA) que están fusionados a un péptido señal que aumenta el direccionamiento del polipéptido a la ruta secretora. La secreción de polipéptidos lisosomales desde la célula proporciona numerosas ventajas. Por ejemplo, en los sistemas de producción de proteína recombinante (células/tejidos cultivados o sistemas animales completos), generalmente es preferible purificar un polipéptido secretado del medio extracelular o los fluidos en lugar de cosechar las células y aislar la proteína intracelular. Con respecto a los métodos terapéuticos, se ha demostrado que la administración de un vector de Ad que codifica hGAA que estaba dirigido al hígado en un modelo de ratón con el gen GAA desactivado revertía la acumulación de glicógeno en el músculo esquelético y cardíaco mediante la secreción de hGAA desde el hígado y la absorción por los tejidos afectados (Amalfitano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8861-8866). Presumiblemente, la secreción de cantidades significativas de GAA (*esto es*, en lugar del direccionamiento lisosomal) era el resultado de la expresión en exceso del transgén GAA liberado por el vector de Ad y la saturación del sistema "captador" que normalmente redirige las proteínas lisosomales extracelulares al lisosoma.

La presente invención proporciona ventajosamente constructos mejorados que potencian la secreción de polipéptidos lisosomales desde la célula transducida o transfectada. Estos constructos facilitan el uso de sistemas de liberación alternativos (*p. ej.*, vectores AAV para la liberación en el hígado), aumentan la secreción de los polipéptidos lisosomales (*p. ej.*, para la liberación de genes *in vivo* o la producción de enzima *in vitro*), y pueden reducir o evitar la citotoxicidad o la toxicidad en los órganos (*p. ej.*, hepatotoxicidad que puede resultar de la acumulación excesiva de proteína recombinante en el órgano de depósito).

Por consiguiente, la invención incluye vectores que comprenden ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido quimérico que comprende una secuencia señal secretora conectada operablemente a un polipéptido lisosomal (*p. ej.*, GAA) así como los polipéptidos quiméricos. La secuencia señal secretora es ajena (*p. ej.*, exógena) al polipéptido lisosomal. Si bien los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias señal secretoras están típicamente en el extremo amino del polipéptido naciente, la secuencia señal secretora de acuerdo con la presente invención puede estar localizada en cualquier posición dentro del polipéptido quimérico (*p. ej.*, N-terminal, dentro del polipéptido maduro, o C-terminal) con tal que funcione como secuencia señal secretora (*p. ej.*, aumente la secreción del polipéptido lisosomal) y no vuelva no funcional el polipéptido lisosomal.

Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "secuencia señal secretora" o sus variaciones hagan referencia a secuencias de aminoácidos que funcionan aumentando (como se define más arriba) la secreción de un polipéptido lisosomal conectado operablemente desde la célula en comparación con el nivel de secreción observado con el polipéptido lisosomal nativo. Según se define más arriba, por secreción "aumentada", se quiere significar que la proporción relativa del polipéptido lisosomal sintetizado por la célula que es excretado de la célula aumenta; no es necesario que la cantidad absoluta de proteína secretada también aumente. En realizaciones concretas de la invención, esencialmente todo el polipéptido (*esto es*, al menos 95%, 97%, 98%, 99% o más) es secretado. No obstante, no es necesario que esencialmente todo o incluso la mayor parte del polipéptido lisosomal sea secretado, con tal que el nivel de secreción sea intensificado en comparación con el polipéptido lisosomal nativo.

En realizaciones concretas, al menos aproximadamente 50%, 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98% o más del polipéptido lisosomal es secretado desde la célula.

La proporción relativa de polipéptido lisosomal recién sintetizado que es secretado desde la célula puede ser determinada rutinariamente mediante métodos conocidos en la técnica y como se describe en los Ejemplos. Las proteínas secretadas pueden ser detectadas midiendo directamente la propia proteína (*p. ej.*, mediante transferencia Western) o por medio de análisis de actividad de proteínas (*p. ej.*, análisis enzimáticos) en el medio de cultivo celular, en suero, en leche, etc.

Generalmente, las secuencias señal secretoras son escindidas dentro del retículo endoplásmico y, en realizaciones concretas de la invención, la secuencia señal secretora es escindida antes de la secreción. No obstante, no es necesario que la secuencia señal secretora sea escindida con tal que la secreción del polipéptido lisosomal desde la célula sea aumentada y el polipéptido lisosomal sea funcional. De este modo, en las realizaciones de la invención, la secuencia señal secretora está parcialmente o completamente conservada.

De este modo, en realizaciones concretas de la invención, un vector de AAV que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido lisosomal conectado operablemente a una secuencia señal secretora es liberado en una célula, y el polipéptido quimérico es producido y el polipéptido lisosomal es secretado desde la célula. El polipéptido lisosomal puede ser secretado después de la escisión de toda o parte de la secuencia señal secretora. De manera alternativa, el polipéptido lisosomal puede conservar la secuencia señal secretora (*esto es*, la señal secretora no es escindida). De este modo, en este contexto, el "polipéptido lisosomal" puede ser un polipéptido quimérico.

Los expertos en la técnica comprenderán además que el polipéptido quimérico puede contener más aminoácidos, *p. ej.*, como resultado de manipulaciones del constructo de ácido nucleico tal como la adición de un sitio de restricción,

con tal que estos aminoácidos adicionales no vuelvan no funcional la secuencia señal secretora o el polipéptido lisosomal. Los aminoácidos adicionales pueden ser escindidos o pueden ser conservados por el polipéptido maduro con tal que la conservación no de como resultado un polipéptido no funcional.

5 En las realizaciones representativas, el péptido señal secretor sustituye la mayor parte, esencialmente toda o toda la secuencia líder encontrada en el polipéptido lisosomal nativo. En realizaciones concretas, la mayor parte o toda la secuencia líder nativa está conservada, con tal que la secreción del polipéptido lisosomal aumente y el polipéptido lisosomal maduro sea funcional.

10 La secuencia señal secretora puede derivar en su totalidad o en parte de la señal secretora de un polipéptido secretado (*esto es*, del precursor) y/o puede ser, en su totalidad o en parte, sintética. La secuencia señal secretora puede tener su origen en cualquier especie, incluyendo animales (*p. ej.*, aves y mamíferos tales como seres humanos, simios y otros primates no humanos, bóvidos, óvidos, cápridos, équidos, súidos, cánidos, félicos, ratas, ratones, lagomorfos), plantas, levaduras, bacterias, protozoos u hongos. La longitud de la secuencia señal secretora no es crítica; generalmente, las secuencias señal secretoras conocidas tienen aproximadamente de 10-15 a 50-60 aminoácidos de longitud. Además, las señales secretoras conocidas de los polipéptidos secretados pueden ser alteradas o modificadas (*p. ej.*, mediante sustitución, delección, truncamiento o inserción de aminoácidos) con tal que la secuencia señal secretora resultante funcione aumentando la secreción de un polipéptido lisosomal conectado operablemente.

20 Las secuencias señal secretoras de la invención pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en una secuencia señal secretora de origen natural o una de sus modificaciones (como se ha descrito más arriba). Se conocen en la técnica numerosas proteínas secretadas y secuencias que dirigen la secreción desde la célula. Las proteínas secretadas ilustrativas (y sus señales secretoras) incluyen, pero no están limitadas a: eritropoyetina, Factor de coagulación IX, cistatina, lactotransferrina, inhibidor de proteasa de plasma C1, apolipoproteínas (*p. ej.*, APO A, C, E), MCP-1,  $\alpha$ -2-HS-glicoproteína,  $\alpha$ -1-microglobulina, complemento (*p. ej.*, C1Q, C3), vitronectina, linfotoxina- $\alpha$ , azurocidina, VIP, inhibidor de metaloproteínasa 2, glipican-1, hormona pancreática, clusterina, factor de crecimiento de hepatocitos, insulina,  $\alpha$ -1-antitripsina, hormona de crecimiento, colagenasa de tipo IV, guanilina, properdina, proencefalina A, inhibina  $\beta$  (*p. ej.*, cadena A), prealbúmina, angiogenina, lutropina (*p. ej.*, cadena  $\beta$ ), proteína de unión 1 y 2 al factor de crecimiento insulínico, polipéptido proactivador, fibrinógeno (*p. ej.*, cadena  $\beta$ ), triacilglicerol lipasa gástrica, midquina, defensinas neutrofilicas 1, 2, y 3,  $\alpha$ -1-antitripsina, proteína gla de la matriz,  $\alpha$ -triptasa, lipasa activada por sales biliares, quimotripsinógeno B, elastina, región V de la cadena lambda de IG, variante 4 del factor plaquetario, cromogranina A, proteína proto-oncogénica WNT-1, oncostatina M,  $\beta$ -neuroendorfina-dinorfina, factor de von Willebrand, inhibidor de la serina proteasa del plasma, proteína amiloide A del suero, nidógeno, fibronectina, renina, osteonectina, histatina 3, fosfolipasa A2, proteína de la matriz del cartílago, GM-CSF, matrilisina, MIP-2- $\beta$ , proteína neuroendocrina 7B2, proteína placentaria 11, gelsolina, IGF 1 y 2, M-CSF, transcobalamina I, lactasa-floricin hidrolasa, elastasa 2B, pepsinógeno A, MIP 1- $\beta$ , prolactina, tripsinógeno II, péptido de liberación de gastrina II, factor naturéutico atrial, fosfatasa alcalina secretada,  $\alpha$ -amilasa pancreática, secretogranina I,  $\beta$ -caseína, serotransferrina, inhibidor de la ruta del factor tisular, cadena  $\beta$  de la folitropina, factor de coagulación XII, factor de liberación de hormona del crecimiento, proteína de plasma seminal de próstata, interleuquinas (*p. ej.*, 2, 3, 4, 5, 9, 11), inhibina (*p. ej.*, cadena alfa), angiotensinógeno, tiroglobulina, cadenas pesadas o ligeras de IG, inhibidor 1 del activador de plasminógeno, lisozima C, activador de plasminógeno, antileucoproteínasa 1, estaterina, fibulina-1, isoforma B, uromodulina, globulina de unión a tiroxina, axonina-1,  $\alpha$ -2 globulina endometrial, interferón (*p. ej.*, alfa, beta, gamma),  $\beta$ -2-microglobulina, procolecistoquinina, progastriquina, fosfatasa ácida prostática, sialoproteína II de hueso, colipasa, proteína amiloide A4 de Alzheimer, PDGF (*p. ej.*, cadena A o B), factor de coagulación V, triacilglicerol lipasa, haptoglobulina-2, globulina de unión a corticosteroide, triacilglicerol lipasa, prorraxina H2, folistatina 1 y 2, glicoproteína IX de plaquetas, GCSF, VEGF, cofactor II de heparina, antitrombina-III, factor inhibidor de leucemia, colagenasa intersticial, pleiotrofina, citoquina A1 inducible pequeña, hormona concentradora de melanina, enzima convertora de angiotensina, inhibidor de tripsina pancreática, factor de coagulación VIII,  $\alpha$ -fetoproteína,  $\alpha$ -lactoalbúmina, senogelina II, caseína kappa, glucagón, cadena beta de tirotropina, transcobalamina II, tromboespondina 1, hormona paratiroidea, vasopresina copeptina, factor tisular, motilina, MPIF-1, quinínógeno, convertasa 2 neuroendocrina, cadena  $\alpha$ 1 de procolágeno del factor de células pluripotenciales, calicreína de plasma, factor de crecimiento de queratinocitos, así como cualquier otra hormona secretada, factor de crecimiento, citoquina, enzima, factor de coagulación, proteína de la leche, cadena de inmunoglobulina, y similares.

En otras realizaciones concretas, la secuencia señal secretora deriva en parte o en su totalidad de un polipéptido secretado que es producido por las células del hígado.

55 La secuencia señal secretora de la invención puede ser además en su totalidad o en parte sintética o artificial. Los péptidos señal secretores sintéticos o artificiales son conocidos en la técnica, véase *p. ej.*, Barash et al., "Human secretory signal peptide description by hidden Markov model and generation of a strong artificial signal peptide for secreted protein expression," Biochem. Biophys. Res. Comm. 294:835-42 (2002). En realizaciones concretas, la secuencia señal secretora comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la secuencia secretora artificial: MWWRLWWLLLLLLLLLWPMVWA (**SEQ ID NO: 5**) o sus variaciones que tienen 1, 2, 3, 4, o 5 sustituciones de aminoácidos (opcionalmente, sustituciones de aminoácidos conservativas, las sustituciones de aminoácidos conservativas son conocidas en la técnica).

El ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido quimérico puede comprender además una UTR 3' "abreviada" como se describe con más detalle más abajo.

### **B. Constructos de GAA "Abreviados".**

5 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los constructos que expresan la  $\alpha$ -glucosidasa  
 10 ácida lisosomal (GAA) que han sufrido supresión o alteración (*p. ej.*, sustitución) en la región no traducida 3' (UTR),  
 pueden tener propiedades ventajosas en comparación con los constructos que no han sufrido supresión ni  
 alteración. Por ejemplo, se puede mejorar la eficacia de empaquetamiento de un constructo de GAA con una UTR 3'  
 suprimida o una UTR 3' "abreviada" de otro modo (como se comenta con más detalle más abajo) en vectores virales  
 (*p. ej.*, vectores AAV). Además, se puede intensificar el nivel de expresión del ARNm y/o el polipéptido GAA (*p. ej.*,  
 como resultado de un nivel superior de transcripción y/o traducción y/o una vida media más prolongada del transcrito  
 de ARNm y/o del polipéptido) en comparación con un constructo completo (*p. ej.*, **SEQ ID NO: 1; Figura 8**).

15 La presente invención proporciona vectores AAV que comprenden ácidos nucleicos aislados que codifican GAA, que  
 comprenden una secuencia codificante para GAA y una región no traducida 3' "abreviada" (UTR). Las UTR 3'  
 "abreviadas" están alteradas en comparación con la secuencia UTR 3' de GAA nativa (*p. ej.*, la UTR 3' del **SEQ ID**  
**NO: 1** es del nt 3301 al 3846; véase también la **Figura 8**). En realizaciones representativas, la UTR 3' abreviada  
 comprende, consiste esencialmente en o consiste en una UTR 3' de GAA suprimida. En otras realizaciones, la UTR  
 20 3' abreviada se acorta en comparación con la UTR 3' de GAA nativa y ha sido alterada para que contenga una  
 región de una UTR 3' heteróloga, que puede ser una secuencia UTR 3' parcialmente o totalmente sintética. Estas  
 realizaciones de la invención se comentan con más detalle más abajo. Los ácidos nucleicos aislados que codifican  
 GAA y que comprenden una UTR 3' abreviada pueden proporcionar niveles superiores de expresión del polipéptido  
 GAA. En realizaciones concretas, los constructos abreviados también pueden ser empaquetados más eficazmente  
 en vectores virales (*p. ej.*, vectores rAAV).

25 La UTR 3' abreviada codifica una UTR 3' funcional que, en presencia de todos los demás elementos reguladores  
 necesarios, permite la expresión de un polipéptido GAA funcional que codifica una secuencia asociada  
 operablemente con él. En realizaciones ilustrativas, el ácido nucleico aislado que comprende una secuencia  
 codificante para GAA y una UTR 3' abreviada comprende además una secuencia señal secretora conectada  
 operablemente a la secuencia codificante de GAA, como se describe más arriba.

30 Si bien no se desea estar ligado a ninguna teoría concreta de la invención, la mejora de las propiedades de los  
 ácidos nucleicos de UTR 3' "abreviadas" que codifican GAA puede ser resultado de su tamaño total más corto y/o de  
 la eliminación de una región inhibitoria, *p. ej.*, una región que reduce la transcripción, desestabiliza el transcrito de  
 ARNm y/o inhibe la traducción. Se han descrito ejemplos de pequeñas secuencias que desestabilizan el ARNm de  
 las citocinas (véanse, *p. ej.*, Shaw y Kamen, (1986) Cell 46:659-67; Reeves et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
 84:6531-35) y el gen gag del VIH (véanse, *p. ej.*, Schwartz et al., (1992) J. Virology 66:150-59; Schwartz et al.,  
 (1992) J. Virol. 66:7176-82).

35 En realizaciones concretas, el ácido nucleico aislado que comprende la secuencia codificante de GAA y la UTR 3'  
 abreviada tiene menos de aproximadamente 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4, 3,9 o 3,8 kb de longitud. Como ilustración, de  
 acuerdo con las realizaciones representativas, un constructo de expresión de GAA que incluye secuencias UTR 5' y  
 3' tiene menos de aproximadamente 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4, 3,9 o 3,8 kb de longitud.

40 El ácido nucleico aislado que codifica GAA puede comprender además una UTR 5', que puede incluir además toda o  
 una porción de la UTR 5' de un gen de GAA. Se han descrito secuencias de GAA humana con deleciones en la UTR  
 5', véase, *p. ej.*, Van Hove et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:65, en las que los nt 1-409 de la UTR 5' del  
 SEQ ID NO: 1 (Figura 8) han sido suprimidos (véase también el **SEQ ID NO: 3; Figura 9**). De manera alternativa, la  
 UTR 5' puede derivar en su totalidad o en parte de un gen heterólogo (*esto es*, un gen distinto del gen de GAA) y/o  
 puede comprender secuencias en su totalidad o en parte sintéticas.

45 También se describen ácidos nucleicos aislados que codifican GAA, en los que el ácido nucleico aislado comprende  
 (i) una secuencia codificante de GAA que codifica una GAA y (ii) una región UTR 3' de GAA que tiene una deleción  
 en ella.

50 Una "región codificante que codifica un polipéptido GAA" comprende secuencias de nucleótidos que pueden ser  
 transcritas y traducidas para dar un polipéptido GAA funcional o uno de sus fragmentos funcionales (véase más  
 arriba). Tales secuencias codificantes pueden incluir secuencias no traducidas (*p. ej.*, secuencias de intrones).

Una "región UTR 3' de GAA" hace referencia a las secuencias de ácido nucleico no traducidas de un gen de GAA  
 que están localizadas aguas abajo (*esto es*, 3') con respecto a las regiones del gen que codifican la proteína GAA.

55 Por UTR 3' de GAA "suprimida" se quiere significar que existe una omisión de al menos un nucleótido en la región  
 UTR 3' del constructo de expresión de GAA. Las deleciones pueden ser mayores de aproximadamente 25, 50, 100,  
 150, 200, 300, 400 nucleótidos consecutivos, o más. En realizaciones concretas, esencialmente toda la UTR 3' es  
 suprimida. Por "esencialmente toda" se quiere significar que solamente un fragmento insignificante la UTR 3'  
 permanece intacto, *esto es*, menos de 10, 20 o 30 nucleótidos). Por ejemplo, esencialmente toda, pero no

necesariamente toda, la UTR 3' puede ser eliminada convenientemente utilizando enzimas de restricción (esto es, pueden quedar algunos nucleótidos residuales después de la escisión con la enzima de restricción) o pueden quedar algunos nucleótidos no traducidos 3' de la secuencia codificante como artefacto de los procedimientos de clonación.

5 Establecido como alternativa, se puede suprimir al menos 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más de la UTR 3' de GAA. Como otra alternativa más, la UTR 3' de GAA "suprimida" tiene menos de aproximadamente 300, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 30, 20 o 10 nucleótidos de longitud o menos.

10 En realizaciones concretas de la invención, la UTR 3' suprimida comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una forma suprimida de la UTR 3' de la secuencia de GAA humana proporcionada en el **SEQ ID NO: 1** (esto es, la UTR 3' del **SEQ ID NO: 1** es del nt 3301 al 3846; véase también la **Figura 8**). Por ejemplo, la UTR 3' suprimida puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en la UTR 3' mostrada en el **SEQ ID NO: 3** (esto es, la UTR 3' del **SEQ ID NO: 3** es del nt 2878 al 3012; véase también la **Figura 9**).

15 Con respecto a la UTR 3' de la secuencia de GAA del **SEQ ID NO: 1** y la **Figura 8** (nt 3301 a 3846), la UTR 3' suprimida puede comprender una delección desde el nt 3301 al 3846 del **SEQ ID NO: 1**. La delección también puede incluir desde aproximadamente el nt 3400 al nt 3500, del nt 3500 al nt 3600, del nt 3600 al nt 3700, del nt 3700 al nt 3800, del nt 3800 al nt 3846, del nt 3301 al nt 3450, del nt 3450 al nt 3600, del nt 3600 al nt 3750, del nt 3750 al nt 3846, del nt 3301 al nt 3500, del nt 3400 al nt 3600, del nt 3500 al nt 3700, del nt 3600 al nt 3800, del nt 3700 al nt 3846, del nt 3301 al nt 3600, del nt 3400 al nt 3700, del nt 3500 al nt 3800, del nt 3600 al nt 3846, del nt 3301 al nt 3700, del nt 3400 al nt 3800, del nt 3500 al nt 3845, del nt 3300 al nt 3800, o del nt 3400 al nt 3486.

20 Las delecciones pueden ser intermitentes, esto es, más de una región de la secuencia de nucleótidos puede ser suprimida para conferir las mejoras funcionales descritas en la presente memoria. De manera alternativa, se pueden suprimir nucleótidos consecutivos. Además, la delección puede ser interna o comenzar en cualquier extremo de la UTR 3'. Por ejemplo, la secuencia de la UTR 3' puede ser truncada desde el extremo 5 o 3' de la UTR 3' en 50, 100, 200, 300 o 400 nt o más.

25 Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que las regiones UTR 3' de GAA (esto es, a partir de la cual deriva la UTR 3' suprimida) suprimidas e intactas se pueden apartar de las descritas específicamente en la presente memoria y que se puede emplear cualquier secuencia codificante de GAA adecuada o UTR 3' de GAA. Las secuencias codificantes de GAA y la UTR 3' pueden contener otras alteraciones tales como sustituciones o inserciones. Por ejemplo, se entenderá que la UTR 3' de GAA puede contener algunas secuencias heterólogas (*p. ej.*, la señal poli(A) puede ser de otro gen, tal como el gen de la hormona del crecimiento humano o bovino).

30 El ácido nucleico con la UTR 3' suprimida que codifica GAA hibridará con las secuencias de ácido nucleico con la UTR 3' suprimida descritas específicamente en la presente memoria (esto es, **SEQ ID NO: 3**) en condiciones convencionales conocidas por los expertos en la técnica y codificarán un polipéptido GAA funcional (como se ha definido más arriba).

35 La UTR 3' de GAA suprimida hibridará con las secuencias UTR 3' de GAA suprimidas descritas específicamente en la presente memoria (*p. ej.*, del nt 2878 al 3012 del **SEQ ID NO: 3**) en condiciones convencionales conocidas por los expertos en la técnica y permitirán la expresión de un polipéptido GAA funcional a partir de una secuencia codificante de GAA asociada operablemente con ella.

40 La secuencia codificante del ácido nucleico aislado que codifica GAA hibridará con las secuencias que codifican GAA) específicamente descritas en la presente memoria (*p. ej.*, del nt 442 al nt 3300 del **SEQ ID NO: 1**) en condiciones convencionales como es conocido por los expertos en la técnica y codificará un polipéptido GAA funcional.

45 Por ejemplo, la hibridación de tales secuencias se puede llevar a cabo en condiciones poco restrictivas, medianamente restrictivas o incluso condiciones restrictivas (*p. ej.*, condiciones representadas por un lavado restrictivo de formamida al 35-40% con 5x solución de Denhardt, SDS al 0,5% y 1x SSPE a 37°C; condiciones representadas por un lavado restrictivo de formamida al 40-45% con 5x solución de Denhardt, SDS al 0,5%, y 1x SSPE a 42°C; y condiciones representadas por un lavado restrictivo de formamida al 50% con 5x solución de Denhardt, SDS al 0,5% y 1x SSPE a 42°C, respectivamente) para las secuencias descritas específicamente en la presente memoria. Véase, *p. ej.*, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª Ed. 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory).

50 Establecido de manera alternativa, el ácido nucleico en el que se ha suprimido la UTR 3' que codifica GAA de la invención tiene una homología de la secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% o superior con las secuencias de ácido nucleico aisladas descritas específicamente en la presente memoria (o sus fragmentos) y codifica una proteína GAA funcional (formas madura o precursora).

55 Del mismo modo, la UTR 3' suprimida de acuerdo con la presente invención tiene una homología de la secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, o superior con las secuencias de ácido nucleico aisladas descritas específicamente en la presente memoria (o sus fragmentos) y permite la expresión de un polipéptido GAA funcional a partir de una secuencia codificante de GAA asociada operablemente con él.

Además, la región codificante de los ácidos nucleicos aislados que codifican GAA de la invención tienen una homología de la secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% o superior con las secuencias de ácido nucleico aisladas descritas específicamente en la presente memoria (o sus fragmentos) y codifica un polipéptido GAA funcional.

- 5 Los expertos en la técnica apreciarán que puede haber una variabilidad en los polinucleótidos que codifican las proteínas GAA de la presente invención debido a la degeneración del código genético. La degeneración del código genético, que permite que diferentes secuencias de ácido nucleico codifiquen el mismo polipéptido, es bien conocida en la literatura (véase la **Tabla 1**).

**TABLA 1**

Aminoácidos			Codones
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCT
Cisteína	Cys	C	TGC TGT
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAT
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	TTC TTT
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGT
Histidina	His	H	CAC CAT
Isoleucina	Ile	I	ATA ATC ATT
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	TTA TTG CTA CTC CTG CTT
Metionina	Met	M	ATG
Asparagina	Asn	N	AAC AAT
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCT
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg		R AGA AGG CGA CGC CGG CGT
Serina	Ser	S	AGC ACT TCA TCC TCG TCT
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACT
Valina	Val	V	GTA GTC GTG GTT
Triptófano	Trp	W	TGG
Tirosina	Tyr	Y	TAC TAT

Además, los ácidos nucleicos aislados incluyen aquellos ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos GAA que tienen una homología de la secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 95%,

97%, 98%, 99% o superior con las secuencias de polipéptidos específicamente descritas en la presente memoria (o sus fragmentos) y codifican un polipéptido GAA funcional.

5 Como es sabido en la técnica, se pueden utilizar numerosos programas diferentes para identificar si un ácido nucleico o un polipéptido tiene una identidad de secuencia o una similitud con una secuencia conocida. La identidad y/o la similitud de secuencia se pueden determinar utilizando mecanismos convencionales conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2, 482 (1981), el algoritmo de alineamiento de identidad de secuencias de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48,443 (1970), el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Programas Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), el programa de secuencias Best Fit descrito por Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12, 387-395 (1984), preferiblemente utilizando los ajustes por defecto, o mediante inspección.

15 Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP, que crea un alineamiento de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineamientos por pares, progresivos. También puede trazar un árbol que muestra las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear el alineamiento. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle, J. Mol. Evol 35, 351-360 (1987); el método es similar al descrito por Higgins y Sharp, CABIOS 5, 151-153 (1989).

20 Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito por Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410, (1990) y Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5873-5787 (1993). Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 que fue obtenido de Altschul et al., Methods in Enzymology, 266, 460-480 (1996); [http://blast.wustl.edu/blast/ README.html](http://blast.wustl.edu/blast/README.html). WU-BLAST-2 utiliza diversos parámetros de búsqueda, que se ajustan preferiblemente al valor por defecto. Los parámetros son valores dinámicos y son establecidos por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia concreta y de la composición de la base de datos concreta frente a la cual está siendo investigada la secuencia de interés; no obstante, los valores se pueden ajustar para incrementar la sensibilidad.

25 Un algoritmo útil adicional es Gapped BLAST como informan Altschul et al. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.

30 Se puede determinar el valor del porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos por medio del número de residuos idénticos coincidentes dividido por el número total de residuos de la secuencia "más larga" de la región alineada. La secuencia "más larga" es la que tiene la mayor parte de los residuos concretos en la región alineada (los espacios introducidos por WU-Blast-2 para maximizar la puntuación del alineamiento se ignoran).

35 El alineamiento puede incluir la introducción de espacios en las secuencias que se van a alinear. Además, para las secuencias que contienen más o menos aminoácidos que los polipéptidos descritos específicamente en la presente memoria, se entiende que en una realización, el porcentaje de identidad de la secuencia se determinará basándose en el número de aminoácidos idénticos con respecto al número total de aminoácidos. De éste modo, por ejemplo, la identidad de secuencia de secuencias más cortas que una secuencia específicamente descrita en la presente memoria, se determinará utilizando el número de aminoácidos de la secuencia más corta, en una realización. En los cálculos del porcentaje de identidad el peso relativo no es asignado a las diferentes manifestaciones de variación de secuencia, tales como inserciones, deleciones, sustituciones, etc.

40 En una realización, solamente las identidades se puntúan positivamente (+1) y a todas las formas de variación de secuencia que incluyen espacios se les asigna un valor de "0", lo que obvia la necesidad de una escala ponderada o parámetros como se describe más abajo para cálculos de similitud de secuencia. El porcentaje de identidad de secuencia se puede calcular, por ejemplo, dividiendo el número de residuos idénticos coincidentes por el número total de residuos de la secuencia "más corta" de la región alineada y multiplicando por 100. La secuencia "más larga" es la que tiene la mayor parte de los residuos concretos en la región alineada.

45 El ácido nucleico aislado que codifica GAA comprende una UTR 3' abreviada que es más corta que la UTR 3' encontrada en el gen nativo (*p. ej.*, del nt 3301 al nt 3846 del SEQ ID NO: 1), para ilustrar, tiene menos de aproximadamente 75%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, o menos, que el tamaño de la UTR 3' encontrada en el gen GAA nativo, y comprende una región heteróloga que está sustituida por toda o una porción de la UTR 3' nativa. De acuerdo con esta realización, toda o al menos una porción de la UTR 3' es heteróloga con respecto a la región codificante de GAA (esto es, no deriva de la UTR 3' de un gen de GAA). El segmento heterólogo puede incluir toda o una porción de una UTR 3' de otro gen y/o puede ser parcialmente o completamente sintético. En realizaciones concretas, la región heteróloga puede tener aproximadamente 300, 250, 200, 175, 125, 100, 75, 50, 30, 20 o 10 nucleótidos de longitud o menos. Para ilustrar, la UTR 3' sustituida puede incluir toda o una porción de la UTR 3' de la hormona de crecimiento bovina o humana.

55 Por ejemplo, el tamaño total de la UTR 3' abreviada es menor de aproximadamente 300, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 30, 20 o 10 nucleótidos.

Por "sustituido", "sustituida" o "sustitución" en referencia a la UTR 3' se quiere significar que una porción de la secuencia de nucleótidos de origen natural de la UTR 3' de GAA ha sido sustituida por una secuencia de nucleótidos

heteróloga, dando como resultado un ácido nucleico que codifica GAA que tiene las ventajas descritas en la presente memoria.

5 Una UTR 3' "abreviada" incluye tanto una UTR 3' de GAA suprimida (descrita con detalle más arriba) como una UTR 3' sustituida/acortada descrita en los párrafos anteriores. La UTR 3' abreviada de la invención puede ser ADN o ARN, o una quimera de los mismos.

En otros ejemplos, la UTR 3' "abreviada" tiene una longitud de menos de aproximadamente 300, 250, 200, 150 o 100 nucleótidos y deriva en su totalidad o en parte de una UTR 3' de GAA nativa y/o en su totalidad o en parte de una UTR 3' heteróloga. Además, las secuencias de la UTR 3' heteróloga pueden derivar de otro gen o pueden ser en su totalidad o en parte una secuencia sintética.

10 Como se describe con más detalle más abajo, los ácidos nucleicos de UTR 3' abreviadas pueden, tras la introducción en una célula diana (*p. ej.*, una célula del hígado), expresar polipéptidos de GAA a un mayor nivel (como se define más arriba) en comparación con una célula que expresa un polipéptido de GAA de un constructo comparable que contiene una UTR 3' de GAA completa (*p. ej.*, **SEQ ID NO: 1**).

### **III. Vectores de Liberación de Ácido Nucleico.**

15 Los métodos de la presente invención proporcionan un método para liberar y, opcionalmente, expresar polipéptidos lisosomales tales como GAA en una amplia gama de células anfitrionas, incluyendo tanto células en división como células que no están en división *in vitro* o *in vivo*. En las realizaciones de la invención, el ácido nucleico puede ser introducido establemente en la célula diana, por ejemplo, mediante integración en el genoma de la célula o mediante expresión persistente a partir de episomas mantenidos establemente (*p. ej.*, derivados del Virus de Epstein Barr). De manera alternativa, el ácido nucleico aislado puede ser expresado transitoriamente en la célula.

20 Los vectores, células, métodos y formulaciones farmacéuticas de la presente invención son útiles además en un método de administración de polipéptidos lisosomales tales como GAA a un sujeto que lo necesite. De esta manera, el polipéptido puede ser producido *in vivo* en el sujeto. El sujeto puede tener un déficit de polipéptido, o la producción de un péptido foráneo en el sujeto puede conferir algún efecto terapéutico. Las formulaciones farmacéuticas y los métodos de liberación de polipéptidos lisosomales tales como GAA para fines terapéuticos se describen con más detalle en la Sección V de más abajo.

25 De manera alternativa, un polinucleótido que codifica y expresa el polipéptido lisosomal (*p. ej.*, GAA) puede ser administrado a un sujeto de manera que el polipéptido sea expresado por el sujeto y purificado a partir de allí, *esto es*, como una fuente de polipéptido recombinante. De acuerdo con esta realización, se prefiere que el polipéptido sea secretado a la circulación general o a otro fluido corporal (*p. ej.*, leche, linfa, fluido cerebroespinal, orina) que sea fácilmente recogido y a partir del cual el polipéptido pueda ser purificado adicionalmente. De manera alternativa, el polipéptido puede ser expresado en especies aviares y depositado, y convenientemente aislado de, proteínas de huevo.

30 Del mismo modo, el polipéptido puede ser expresado transitoriamente o establemente en un sistema de cultivo celular. En realizaciones concretas, el polipéptido es secretado al medio y puede ser purificado a partir del mismo utilizando mecanismos rutinarios conocidos en la técnica. Además, o de manera alternativa, las células pueden ser lisadas y el polipéptido recombinante puede ser purificado a partir del producto lisado celular. La célula puede ser una célula bacteriana, de protozoo, vegetal, de levadura, fúngica, o animal. La célula puede ser una célula animal (*p. ej.*, de insecto, ave o de mamífero). Las células de mamífero representativas incluyen, pero no están limitadas a fibroblastos, células CHO, células 293, células HT1080, células HeLa y células C10.

35 En el caso de GAA, el polipéptido GAA recombinante puede ser aislado utilizando mecanismos convencionales y administrado a sujetos con un déficit de GAA utilizando protocolos de sustitución de enzimas (*véase, p. ej.*, Van der Ploeg et al., (1991) J. Clin. Invest. 87:513).

40 La transferencia de un ácido nucleico que codifica un polipéptido lisosomal (*p. ej.*, GAA) a una célula de un cultivo o a un sujeto también encuentra uso como modelo para comprender dolencias tales como GSD II y para investigar la biología de estos polipéptidos.

Aún más, la presente invención encuentra uso en métodos de escrutinio, por medio de los cuales el polipéptido es expresado transitoriamente o establemente en un sistema de cultivo celular o un modelo animal y utilizado como diana para el descubrimiento de fármacos.

45 Los métodos de producción de polipéptidos lisosomales tales como GAA en células cultivadas u organismos para los fines descritos más arriba se exponen con más detalle en la Sección IV de más abajo.

50 Resultará evidente para los expertos en la técnica que cualquier vector adecuado puede ser utilizado para liberar los ácidos nucleicos aislados de la invención en las células diana o el sujeto de interés. La elección del vector de liberación se puede realizar basándose en numerosos factores conocidos en la técnica, incluyendo la edad y la especie del anfitrión diana, la liberación *in vitro* vs. *in vivo*, el nivel y la persistencia de la expresión deseados, el

propósito pretendido (*p. ej.*, para terapia o para producción de enzima), la célula u órgano diana, la ruta de liberación, el tamaño del ácido nucleico aislado, cuestiones de seguridad, y similares.

Se puede utilizar cualquier vector adecuado conocido en la técnica para liberar, y opcionalmente expresar los ácidos nucleicos aislados de la invención, incluyendo, vectores víricos (*p. ej.*, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, o virus herpes simplex), vectores lipídicos, vectores de poli-lisina, vectores poliméricos poliamínicos sintéticos que se utilizan con moléculas de ácido nucleico, tales como plásmidos, y similares.

Se puede utilizar en la presente invención cualquier vector viral que sea conocido en la técnica. Los ejemplos de tales vectores virales incluyen, pero no están limitados a, vectores derivados de: Adenoviridae; Birnaviridae; Bunyaviridae; Caliciviridae, el grupo Capillovirus; el grupo Carlavirus; el grupo Carmovirus; el Grupo Caulimovirus; el Grupo Closterovirus; el grupo de virus de moteado amarillo de Commelina; Grupo de virus Comovirus; Coronaviridae; grupo del fago PM2; Corcovicoviridae; Grupo de virus Crípticos; grupo Cryptovirus; familia del grupo de virus Cucumovirus (grupo de fagos [PHgr]6; Cysioviridae; Grupo de las Manchas Anulares de Carnation; grupo de virus Dianthovirus; Grupo de la Marchitez de las habas; grupo de virus Fabavirus; Filoviridae; Flaviviridae; grupo Furovirus; Grupo Germinivirus; Grupo Giardiavirus; Hepadnaviridae; Herpesviridae; grupo de virus Hordeivirus; grupo de virus Illarvirus; Inoviridae; Iridoviridae; Leviviridae; Lipothrixviridae; grupo Luteovirus; grupo de virus Marafivirus; grupo de virus del enanismo clorótico del Maíz; Icroviridae; Myoviridae; grupo Necrovirus; grupo de virus Nepovirus; Nodaviridae; Orthomyxoviridae; Papovaviridae; Paramyxoviridae; grupo de virus de la mancha amarilla de Parsnip; Partitiviridae; Parvoviridae; grupo de virus del mosaico de deformación del guisante; Phycodnaviridae; Picomaviridae; Plasmaviridae; Prodoviridae; Polydnviridae; grupo Potexvirus; Potyvirus; Poxviridae; Reoviridae; Retroviridae; Rhabdoviridae; Grupo Rhizidiovirus; Siphoviridae; grupo Sobemovirus; Fagos de tipo SSV-1; Tectiviridae; Tenuivirus; Tetraviridae; Grupo Tobamovirus; Grupo Tobraviridae; Togaviridae; Grupo Tombusvirus; Grupo Torovirus; Totiviridae; Grupo Tymovirus; y virus satélites de plantas.

Los protocolos para producir vectores virales recombinantes y para utilizar vectores virales para la liberación de ácidos nucleicos se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989) y otros manuales de laboratorio convencionales (*p. ej.*, Vectors for Gene Therapy. En: Current Protocols in Human Genetics. John Wiley and Sons, Inc.: 1997).

Los vectores virales particularmente preferidos son aquellos empleados previamente para la liberación de transgenes incluyendo, por ejemplo, retrovirus, adenovirus, AAV, herpes virus, adenovirus-AAV híbridos, y vectores de poxvirus. En realizaciones concretas, el vector es un vector de adenovirus, un vector de AAV o un vector de Ad-AAV híbrido.

En ciertas realizaciones de la presente invención, el vector de liberación es un vector de adenovirus. Se pretende que el término "adenovirus" según se utiliza en la presente memoria incluya todos los adenovirus, incluyendo los géneros *Mastadenovirus* y *Aviadenovirus*. Hasta la fecha, se han identificado al menos cuarenta y siete serotipos humanos de adenovirus (*véase, p. ej.*, FIELDS et al., VIROLOGY, volumen 2, capítulo 67 (3ª ed., Lippincott-Raven Publishers)). Preferiblemente, el adenovirus es un adenovirus del serogrupo C, aún más preferiblemente, el adenovirus es del serotipo 2 (Ad2) o del serotipo 5 (Ad5).

Las diferentes regiones del genoma de adenovirus han sido cartografiadas y son comprendidas por los expertos en la técnica (*véase, p. ej.*, FIELDS et al., VIROLOGY, volumen 2, capítulos 67 y 68 (3ª ed., Lippincott-Raven Publishers)). Las secuencias genómicas de los diferentes serotipos de Ad, así como la secuencia de nucleótidos de las regiones codificantes concretas del genoma de Ad, son conocidas en la técnica y se puede acceder a ellas, *p. ej.*, en GenBank y NCBI (*véase, p. ej.*, los Núms. de Acceso GenBank J0917, M73260, X73487, AF108105, L19443, NC 003266 y los Núms. de Acceso NCBI NC 001405, NC 001460, NC 002067, NC 00454).

Los expertos en la técnica apreciarán que los vectores de adenovirus de la invención pueden ser modificados o "dirigidos" como describen Douglas et al., (1996) Nature Biotechnology 14:1574; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.922.315 de Roy et al.; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.770.442 de Wickham et al.; y/o Patente de los Estados Unidos Núm. 5.712.136 de Wickham et al.

Un genoma vector de adenovirus o un genoma vector de rAd comprenderán típicamente las secuencias de repeticiones terminales de Ad y la señal de empaquetamiento. Una "partícula de adenovirus", o una "partícula de adenovirus recombinante" comprenden un genoma vector de adenovirus o un genoma vector de adenovirus recombinante, respectivamente, empaquetado dentro de una cápsida de adenovirus. Generalmente, el genoma vector de adenovirus es muy estable a tamaños de aproximadamente 28 kb a 38 kb (aproximadamente 75% a 105% del tamaño del genoma nativo). En el caso de un vector de adenovirus que contiene delecciones grandes y un transgén relativamente pequeño, se puede utilizar un "ADN de la región central (stuffer)" para mantener el tamaño total del vector dentro del intervalo deseado mediante métodos conocidos en la técnica.

Normalmente los adenovirus se unen aun receptor de la superficie celular (CAR) de células susceptibles por medio del dominio nudo de la proteína de la fibra sobre la superficie del virus. El receptor del nudo de la fibra es una proteína de la superficie celular de 45 kDa que tiene sitios potenciales tanto para la glicosilación como para la fosforilación. (Bergelson, et al., (1997) Science 275:1320-1323). Un método secundario de entrada de adenovirus es

a través de las integrinas presentes en la superficie celular. Las secuencias de Arginina-Glicina-Ácido Aspártico (RGD) de la proteína de la base pentona adenoviral se unen a las integrinas sobre la superficie celular.

5 El genoma de un adenovirus puede ser manipulado de manera que codifique y exprese un producto génico de interés pero sea inactivado en términos de su capacidad para replicar en un ciclo de vida viral lítico normal. Véase, por ejemplo, Berkner et al. (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434; y Rosenfeld et al. (1992) *Cell* 68:143-155. Los vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus de tipo Ad 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (p. ej., Ad2, Ad3, Ad7, etc.) son conocidos por los expertos en la técnica. Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en ciertas circunstancias ya que no son capaces de infectar células que no están en división y se pueden utilizar para infectar una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo células epiteliales. Además, la partícula de virus es relativamente estable y susceptible de purificación y concentración, y como más arriba, puede ser modificada con el fin de afectar al espectro de infectividad. Además, el ADN adenoviral introducido (y el ADN foráneo contenido en él) no está integrado en el genoma de una célula anfitriona pero sigue siendo episómico, evitando de ese modo problemas potenciales que pueden ocurrir como resultado de la mutagénesis insercional en situaciones en las que el ADN introducido se integra en el genoma del anfitrión (p. ej., ADN retroviral). Por otra parte, la capacidad portadora de ADN foráneo del genoma antiviral es grande en relación con otros vectores de liberación de ácido nucleico (Haj-Ahmand y Graham (1986) *J. Virol.* 57:267).

10 En realizaciones concretas, el genoma de adenovirus contiene una delección, de manera que al menos una de las regiones del gen de adenovirus no codifica una proteína funcional. Por ejemplo, los vectores de adenovirus de primera generación tienen típicamente suprimidos los genes E1 y son empaquetados utilizando una célula que expresa las proteínas E1 (p. ej., células 293). La región E3 también está suprimida frecuentemente, ya que no hay necesidad de complementación de esta delección. Además, las delecciones en E4, E2a, la proteína IX, y la proteína de la fibra han sido descritas, p. ej., por Armentano et al. (1997) *J. Virology* 71:2408, Gao et al., (1996) *J. Virology* 70:8934, Dedieu et al., (1997) *J. Virology* 71: 4626, Wang et al., (1997) *Gene Therapy* 4:393, y en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.882.877 de Gregory et al.

15 Preferiblemente, las delecciones se seleccionan para evitar la toxicidad para la célula de empaquetamiento. Wang et al., (1997) *Gene Therapy* 4:393, han descrito la toxicidad de la co-expresión constitutiva de los genes E4 y E1 por una línea celular de empaquetamiento. La toxicidad puede ser evitada regulando la expresión de los productos de los genes E1 y/o E4 por medio de un promotor inducible, en lugar de constitutivo. Las combinaciones de delecciones que evitan la toxicidad u otros efectos deletéreos sobre la célula anfitriona pueden ser seleccionadas rutinariamente por los expertos en la técnica.

20 Como ejemplos adicionales, en realizaciones concretas, el adenovirus tiene suprimida la polimerasa (pol), la proteína preterminal (pTP), las regiones IVA2 y/o 100K (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.328.958; la Publicación PCT WO 00/12740; y la Publicación PCT WO 02/098466; Ding et al., (2002) *Mol. Ther.* 5:436; Hodges et al., *J. Virol.* 75:5913; Ding et al., (2001) *Hum Gene Ther* 12:955. En realizaciones representativas, el vector es un Ad[E1-, E3-, pol-], Ad[E1-, E3-, pTP-], Ad[E1-, E3-, pol1, pTP-], Ad[E1+, 100K-] o Ad[E1a+, E1b-, 100K].

25 El término "adenovirus con supresión" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a la omisión de al menos un nucleótido de la región indicada del genoma del adenovirus. Las delecciones pueden ser mayores de aproximadamente 1, 2, 3, 5, 10, 20, 50, 100, 200, o incluso 500 nucleótidos. Las delecciones de las diversas regiones del genoma del adenovirus pueden ser de aproximadamente al menos 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 90%, 95%, 99%, o más de la región indicada. De forma alternativa, se suprime la región completa del genoma de adenovirus. Preferiblemente, la delección evitará o esencialmente evitará la expresión de una proteína funcional de esa región. Por ejemplo, se prefiere que la delección en la región 100K de como resultado la pérdida de expresión de una proteína 100K funcional de esa región. En otras palabras, incluso si existe transcripción en la región 100K suprimida y traducción de los transcritos de ARN resultantes, la proteína resultante será esencialmente no funcional, más preferiblemente, completamente no funcional. Como alternativa, se expresa una cantidad insignificante de una proteína funcional. En general, se prefieren delecciones más grandes ya que estas tienen la ventaja adicional de que aumentarán la capacidad portadora de una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés del adenovirus con supresión. Las diversas regiones del genoma del adenovirus han sido cartografiadas y son conocidas por los expertos en la técnica (véase, p. ej., FIELDS et al., *VIROLOGY*, volumen 2, capítulos 67 y 68 (3ª ed., Lippincott-Raven Publishers)).

30 Los expertos en la técnica apreciarán que por lo general, con la excepción de los genes E3, cualquier delección necesitará ser complementada con el fin de propagar (replicar y empaquetar) más virus, p. ej., mediante transcomplementación con una célula de empaquetamiento.

35 En realizaciones concretas, la presente invención excluye los vectores de "adenovirus destripados" (como se entiende el término en la técnica, véase p. ej., Lieber, et al., (1996) *J. Virol.* 70:8944-60) en los que esencialmente todas las secuencias genómicas del adenovirus están suprimidas. En realizaciones alternativas, tales vectores de adenovirus destripados pueden ser un aspecto de la invención.

- Los virus adenoasociados (AAV) también han sido empleados como vectores de liberación de ácidos nucleicos. Para una revisión, véase Muzyczka et al. *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* (1992) 158:97-129). Los AAV son parvovirus y tienen viriones icosaédricos pequeños, de 18-26 nanómetros de diámetro y contienen una molécula de ADN de hebra sencilla de un tamaño de 4-5 kilobases. Los virus contienen la hebra efectora o antisentido de la molécula de ADN y cualquiera de las hebras es incorporada al virión. Dos marcos de lectura abiertos codifican una serie de polipéptidos Rep y Cap. Los polipéptidos Rep (Rep50, Rep52, Rep68 y Rep78) están implicados en la replicación, el rescate y la integración del genoma de AAV, aunque se puede observar una actividad significativa en ausencia de los cuatro polipéptidos Rep. Las proteínas Cap (VP1, VP2, VP3) forman la cápsida del virión. Flanqueando los marcos de lectura abiertos rep y cap en los extremos 5' y 3' del genoma se encuentran repeticiones terminales invertidas de 145 pares de bases (ITR), los primeros 125 pares de bases de las mismas son capaces de formar estructuras dúplex en forma de Y y de T. Se ha demostrado que las ITR representan las secuencias cis mínimas requeridas para la replicación, el rescate, el empaquetamiento y la integración del genoma de AAV. Típicamente, en los vectores de AAV recombinantes (rAAV), las regiones codificantes de rep y cap completas son escindidas y remplazadas por un transgén de interés.
- Los AAV están entre los pocos virus que pueden integrar su ADN en células que no están en división, y muestran una elevada frecuencia de integración estable en el cromosoma 19 humano (véanse, por ejemplo, Flotte et al. (1992) *Am. J. Respir. Cell. Mo/ Biol.* 7:349-356; Samulski et al., (1989) *J Virol.* 63:3822-3828; y McLaughlin et al., (1989) *J. Virol.* 62:1963-1973). Se han introducido una variedad de ácidos nucleicos en diferentes tipos celulares utilizando vectores de AAV (véanse, por ejemplo, Hermonat et al., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470; Tratschin et al., (1985) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Wondisford et al., (1988) *Mol. Endocrinol.* 2:32-39; Tratschin et al., (1984) *J. Virol.* 51:611-619; y Flotte et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790).
- Un genoma de un vector de rAAV comprenderá típicamente las secuencias de repetición terminal de AAV y la señal de empaquetamiento. Una "partícula de AAV" o una "partícula de rAAV" comprenden un genoma de un vector de AAV o un genoma de un vector de rAAV, respectivamente, empaquetado dentro de una cápsida de AAV. No es necesario que el propio vector de rAAV contenga genes de AAV que codifiquen las proteínas de la cápsida y Rep. En realizaciones concretas de la invención, los genes rep y/o cap son suprimidos del genoma de AAV. En una realización representativa, el vector de rAAV conserva solamente las secuencias de AAV terminales (ITR) necesarias para la integración, escisión, replicación.
- Las fuentes para los genes de la cápsida de AAV pueden incluir los serotipos AAV-1, AAV-2, AAV-3 (incluyendo 3a y 3b), AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, así como AAV bovino y AAV aviar, y cualquier otro virus clasificado por el International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) como AAV (véase, *p. ej.*, BERNARD N. FIELDS et al., *VIROLOGY*, volumen 2, capítulo 69 (4ª ed., Lippincott-Raven Publishers)).
- En realizaciones concretas, los genes de la cápsida de AAV derivan de los serotipos de AAV 1, 2, 5, 6 u 8.
- Debido a limitaciones de empaquetamiento, el tamaño total del genoma de rAAV será preferiblemente menor de aproximadamente 5,2, 5, 4,8, 4,6 o 4,5 kb.
- Se puede utilizar cualquier método adecuado conocido en la técnica para producir vectores de AAV (véanse, *p. ej.*, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.139.941; la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.858.775; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.146.874 para métodos ilustrativos). En una realización concreta, se pueden producir provisiones de partida de AAV mediante co-transfección de un vector rep/cap que codifica funciones de empaquetamiento de AAV y el molde que codifica ADNv de AAV en células humanas infectadas con el adenovirus coadyuvante (Samulski et al., (1989) *J. Virology* 63:3822).
- En otras realizaciones concretas, el virus coadyuvante de adenovirus es un virus coadyuvante híbrido que codifica proteínas Rep y/o de la cápsida de AAV. Los vectores Ad/AAV coadyuvantes híbridos que expresan los genes rep y/o cap de AAV y los métodos de producción de provisiones de partida de AAV que utilizan estos reactivos son conocidos en la técnica (véanse, *p. ej.*, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.589.377; y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.871.982, la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.251.677; y la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.387.368). Preferiblemente, el Ad híbrido de la invención expresa las proteínas de la cápsida de AAV (esto es, VP1, VP2, y VP3). Como alternativa, o además, el adenovirus híbrido puede expresar una o más proteínas Rep de AAV (esto es, Rep40, Rep52, Rep68 y/o Rep78). Las secuencias de AAV pueden estar asociadas operativamente con un promotor específico del tejido o inducible.
- Los genes rep y/o cap de AAV pueden ser suministrados de manera alternativa por una célula de empaquetamiento que expresa establemente los genes (véanse, *p. ej.*, Gao et al., (1998) *Human Gene Therapy* 9:2353; Inoue et al., (1998) *J. Virol.* 72:7024; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.837.484; documento WO 98/27207; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.658.785; documento WO 96/17947).
- En una realización representativa, la presente invención proporciona un método de producción de una partícula rAAV que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la invención, que comprende proporcionar a una célula: (a) un ácido nucleico que codifica un genoma de rAAV que comprende (i) secuencias ITR de AAV 5' y/o 3', (ii) un ácido nucleico aislado como se describe más arriba (*p. ej.*, un ácido nucleico que codifica GAA y que comprende

- una UTR 3' abreviada o un ácido nucleico que codifica un polipéptido lisosomal quimérico que comprende una secuencia señal secretora), y (iii) una señal de empaquetamiento de AAV; (b) secuencias codificantes de rep de AAV suficientes para la replicación del genoma de AAV recombinante; (c) secuencias codificantes de cap de AAV suficientes para producir una cápsida de AAV funcional; donde (a) a (c) son proporcionados a la célula en condiciones suficientes para la replicación y empaquetamiento del genoma de rAAV en la cápsida de AAV, por medio de lo cual se producen en la célula las partículas de AAV que comprenden la cápsida de AAV que empaqueta el genoma de rAAV. Por lo general, también se proporciona el adenovirus o las funciones coadyuvantes de HSV para la replicación y el empaquetamiento de AAV. El método puede incluir además la etapa de recoger las partículas de rAAV.
- En otras realizaciones más, el vector de liberación es un vector de liberación de Ad-AAV híbrido, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos de trabajo y en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos 60/376.397 (incorporada como referencia en la presente memoria en su totalidad por sus enseñanzas sobre cómo elaborar y utilizar vectores de liberación de Ad-AAV híbridos). En resumen, el vector de Ad-AAV híbrido comprende un genoma de un vector de adenovirus que comprende (i) elementos cis 5' y 3' de adenovirus para la replicación y la encapsidación viral y, además, (ii) un genoma de un vector de AAV recombinante que comprende las repeticiones terminales invertidas 5' y 3' de AAV (ITR), una secuencia de empaquetamiento de AAV, y una o varias secuencias heterólogas flanqueadas por las ITR de AAV, donde el genoma del vector de AAV recombinante está flanqueado por los elementos cis 5' y 3' del adenovirus. El genoma del vector de adenovirus puede ser suprimido además, como se describe más arriba.
- Otro vector es el Virus Herpes Simplex (HSV). Los viriones de Herpes simplex tienen un diámetro total de 150 a 200 nm y un genoma que consiste en una molécula de ADN de doble hebra que tiene de 120 a 200 kilobases de longitud. La glicoproteína D (gD) es un componente estructural de la envoltura de HSV que media la entrada del virus en las células anfitrionas. La interacción inicial del HSV con los proteoglicanos de sulfato de heparina de la superficie celular está mediada por otra glicoproteína, la glicoproteína C (gC) y/o la glicoproteína B (gB). Esto está seguido de la interacción con una o más de las glicoproteínas virales con los receptores celulares. Recientemente se ha demostrado que la glicoproteína D de HSV se une directamente al mediador de la entrada del virus del Herpes (HVEM) de las células anfitrionas. El HVEM es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (Whitbeck, J. C. et al., 1997, *J. Virol.*; 71:6083-6093). Finalmente, gD, gB y el complejo de gH y gL actúan individualmente o combinados para desencadenar la fusión independiente del pH de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula anfitriona. El propio virus es transmitido por contacto directo y replica en la piel o las membranas de las mucosas antes de infectar las células del sistema nervioso para las cuales el HSV tiene un tropismo concreto. Éste muestra una función tanto lítica como latente. El ciclo lítico da como resultado la replicación viral y la muerte de la célula. La función latente permite que el virus sea mantenido en el anfitrión durante un período de tiempo extremadamente largo.
- El HSV puede ser modificado para la liberación de transgenes en las células produciendo un vector que muestra solamente la función latente para el mantenimiento del gen a largo plazo. Los vectores de HSV son útiles para la liberación de ácidos nucleicos debido a que permiten un inserto de ADN grande de hasta 20 kilobases o más; pueden ser producidos con títulos extremadamente elevados; y se ha demostrado que expresan transgenes durante un largo periodo de tiempo en el sistema nervioso central siempre y cuando no se produzca el ciclo lítico.
- El vector de liberación podría ser un retrovirus. Los retrovirus normalmente se unen a un receptor de la superficie celular específico de la especie, *p. ej.*, CD4 (para HIV); CAT (para MLV-E; virus leucémico murino leucotrópico E); RAM1/GLVR2 (para el virus leucémico murino A; MLV-A); GLVR1 (para el virus de la leucemia del Gibón (GALV) y virus de la leucemia Felina B (FeLV-B)). El desarrollo de líneas celulares especializadas (denominadas "células de empaquetamiento") que producen solamente retrovirus de replicación defectuosa ha incrementado la utilidad de los retrovirus para la terapia génica, y los retrovirus defectuosos están caracterizados para su uso en la transferencia génica para la terapia génica (para una revisión, véase Miller, (1990) *Blood* 76:271). Un retrovirus de replicación defectuosa puede ser empaquetado en viriones que pueden ser utilizados para infectar una célula diana por medio del uso de un virus coadyuvante mediante técnicas convencionales.
- Otro vector adecuado más es un vector de poxvirus. Estos virus son muy complejos, contienen más de 100 proteínas, aunque la estructura detallada del virus es actualmente desconocida. Las formas extracelulares del virus tienen dos membranas mientras las partículas intracelulares solamente tienen una membrana interna. La superficie externa del virus está formada por lípidos y proteínas que rodean el núcleo bicóncavo. Los Poxvirus son muy complejos antigénicamente, induciendo tanto anticuerpos específicos como de reacción cruzada después de la infección, los receptores de Poxvirus no son conocidos actualmente, pero es probable que exista más de uno dada la capacidad de poxvirus para infectar una amplia gama de células. La expresión de genes de poxvirus está bien estudiada debido al interés en la utilización del virus vaccinia como vector para la expresión de transgenes.
- Además de métodos de transferencia viral, tales como los ilustrados más arriba, también se pueden emplear métodos no virales. Muchos métodos no virales de transferencia génica cuentan con mecanismos normales utilizados por células de mamífero para la absorción y el transporte intracelular de macromoléculas. En realizaciones concretas, los sistemas de liberación no viral cuentan con rutas endocíticas para la absorción de la molécula de ácido nucleico por la célula elegida como diana. Los sistemas de liberación de ácidos nucleicos ilustrativos de este tipo incluyen sistemas derivados de liposomas, productos conjugados con poli-lisina, y envolturas virales artificiales.

En realizaciones concretas, se utilizan vectores plasmídicos en la práctica de la presente invención. Los plásmidos desnudos pueden ser introducidos en células musculares mediante inyección en el tejido. La expresión se puede prolongar durante varios meses, aunque el número de células positivas es típicamente bajo (Wolff et al., (1989) Science 247:247). Se ha demostrado que los lípidos catiónicos ayudan a la introducción del ADN en algunas células en cultivo (Felgner y Ringold, (1989) Nature 337:387). Se ha demostrado que la inyección de complejos de ADN plasmídico con lípidos catiónicos en la circulación de ratones da como resultado la expresión del ADN en el pulmón (Brigham et al., (1989) Am. J. Med. Sci. 298:278). Una ventaja del ADN plasmídico es que puede ser introducido en células no replicantes.

En una realización representativa, una molécula de ácido nucleico (*p. ej.*, un plásmido) puede ser atrapada en una partícula lipídica que porta cargas positivas sobre su superficie y, opcionalmente, etiquetada con anticuerpos contra antígenos de la superficie celular del tejido diana (Mizuno et al., (1992) No Shinkei Geka 20:547; Publicación PCT WO 91/06309; Solicitud de Patente Japonesa 1047381; y Solicitud de Patente Europea EP-A-43075).

Los liposomas que consisten en moléculas catiónicas anfífilas son vectores no virales útiles para la liberación de ácidos nucleicos *in vitro* e *in vivo* (revisado en Crystal, Science 270: 404-410 (1995); Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2: 291-297 (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. 5: 382-389 (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. 5: 647-654 (1994); y Gao et al., Gene Therapy 2: 710-722 (1995)). Se cree que los liposomas cargados positivamente forman complejos con los ácidos nucleicos cargados negativamente por medio de interacciones electrostáticas para formar complejos de lípido:ácido nucleico. Los complejos de lípido:ácido nucleico tienen numerosas ventajas como vectores para la transferencia génica. A diferencia de los vectores virales, los complejos de lípido:ácido nucleico pueden ser utilizados para transferir casetes de expresión de un tamaño esencialmente ilimitado. Puesto que los complejos carecen de proteínas, pueden evocar menos respuestas inmunogénicas e inflamatorias. Por otra parte, no pueden replicar o recombinarse para formar un agente infeccioso y tienen una baja frecuencia de integración. Numerosas publicaciones han demostrado que los lípidos catiónicos anfífilos pueden mediar la liberación de ácidos nucleicos *in vivo* e *in vitro* (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-17 (1987); Loeffler et al., Methods in Enzymology 217: 599-618 (1993); Felgner et al., J. Biol. Chem. 269: 2550-2561 (1994)).

Varios grupos han informado del uso de complejos de lípido catiónico anfífilo:ácido nucleico para la transfección *in vivo* tanto en animales como en seres humanos (revisado por Gao et al., Gene Therapy 2: 710-722 (1995); Zhu et al., Science 261: 209-211 (1993); y Thierry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9742-9746 (1995)). En la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.410.049 se describe un método de preparación de complejos de lípido catiónico:ácido nucleico que tienen una vida útil prolongada.

#### **IV. Producción de Polipéptidos Lisosomales Recombinantes.**

Como se ha indicado más arriba, los polipéptidos lisosomales recombinantes tales como GAA pueden ser producidos en, y opcionalmente purificados de, células cultivadas u organismos para una variedad de propósitos. Los métodos de liberación de un vector que comprende un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido lisosomal para métodos terapéuticos se describen con más detalle más abajo. El ácido nucleico aislado puede ser portado por un vector de liberación como se ha descrito en la sección anterior.

Los expertos en la técnica apreciarán que el ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido lisosomal puede estar asociado operablemente con secuencias de control de la expresión apropiadas, *p. ej.*, señales de control de la transcripción/traducción, que pueden estar incluidas en el ácido nucleico aislado o una cadena principal del vector. Por ejemplo, generalmente se requieren señales de inicio específicas para una traducción eficaz de las secuencias codificantes de la proteína insertada. Estas secuencias de control de la traducción exógenas, que pueden incluir el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes, pueden tener una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos.

El ácido nucleico aislado puede comprender además una señal de poliadenilación (*p. ej.*, una señal para la polimerasa poliA para añadir la cola de poliA al extremo 3' del ARNm transcrito). Es normal, no obstante, que la señal de poliadenilación sea proporcionada por una cadena principal del vector en la cual está insertada la secuencia codificante (*p. ej.*, un plásmido de un genoma viral recombinante) y, por lo tanto, en realizaciones concretas puede no estar presente una señal de poliadenilación en la molécula de ácido nucleico aislada.

Se puede utilizar una variedad de elementos promotores/intensificadores dependiendo del nivel y de la expresión específica del tejido deseado. El promotor puede ser constitutivo o inducible (*p. ej.*, el promotor de la metalotioneína o un promotor inducible por hormonas), dependiendo del patrón de expresión deseado. El promotor puede ser nativo o foráneo y puede ser una secuencia natural o sintética. Por foráneo, se quiere significar que la región de inicio de la transcripción no se encuentra en el anfitrión de tipo salvaje en el cual se introduce la región de inicio de la transcripción. El promotor se selecciona de manera que funcione en las células diana de interés. Se prefieren los promotores que funcionan en el hígado (por ejemplo, en el parénquima del hígado, *p. ej.*, el promotor de la alfa-1 antitripsina), el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el músculo liso, el músculo del diafragma, las células endoteliales, las células intestinales, las células pulmonares (*p. ej.*, la musculatura lisa o el epitelio), las células epiteliales peritoneales y los fibroblastos. El promotor puede además ser "específico" para estas células y tejidos, ya que puede mostrar solamente actividad significativa en el tipo de célula o tejido específico.

5 El ácido nucleico aislado puede estar asociado operativamente con un promotor temprano inmediato principal de citomegalovirus (CMV), un promotor de albúmina, un promotor del Factor de Elongación 1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ), un promotor de PyK, un promotor de MFG, o un promotor del virus del sarcoma de Rous. También es adecuado un promotor híbrido que contiene el intensificador temprano inmediato principal de CMV y el promotor de la beta-actina de pollo (CB). Se ha especulado que conduciendo la transcripción de nucleótidos heterólogos con el promotor de CMV se produce una regulación a la baja de la expresión en animales inmunocompetentes (véase, *p. ej.*, Guo et al., (1996) Gene Therapy 3:802). Por consiguiente, puede ser ventajoso asociar operablemente el ácido nucleico aislado con un promotor de CMV modificado que no de como resultado esta regulación a la baja de la expresión del transgén.

10 Los ácidos nucleicos aislados pueden comprender dos o más secuencias codificantes. En realizaciones en las que existe más de una secuencia codificante, las secuencias codificantes pueden estar asociadas operativamente con promotores separados o, de manera alternativa, con un único promotor aguas arriba y una o más secuencias del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) (*p. ej.*, la secuencia IRES de EMC de picornavirus) aguas abajo.

15 En realizaciones concretas de la invención, el tamaño total del ácido nucleico aislado es menor de aproximadamente 5, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,3, 4,2, 4, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,2, 3 o 2,8 kb o menos de longitud. Las casetes de expresión relativamente pequeñas pueden resultar particularmente ventajosas para la liberación por vectores de AAV.

Se puede introducir un ácido nucleico aislado en una célula anfitriona, *p. ej.*, una célula de una línea celular primaria o inmortalizada. Las células recombinantes pueden ser utilizadas para producir el polipéptido codificado. En general, el ácido nucleico aislado se incorpora a un vector de expresión (viral o no viral como se ha descrito más arriba).

20 Los vectores de expresión pueden ser diseñados para la expresión de polipéptidos en células procarióticas o eucarióticas. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ser expresados en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (*p. ej.*, en el sistema de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero. Algunas células anfitrionas adecuadas son comentadas además por Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSecl (Baldari et al., (1987) EMBO J. 6:229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) Gene 54:113-123), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.). Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (*p. ej.*, células Sf 9) incluyen la serie pAc (Smith et al., (1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow, V.A., y Summers, M.D. (1989) Virology 170:31-39).

30 Los ejemplos de los vectores de expresión en mamífero incluyen pCDM8 (Seed, (1987) Nature 329:840) y pMT2PC (Kaufman et al. (1987), EMBO J. 6:187-195). Cuando se utilizan en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión son proporcionadas a menudo por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores utilizados comúnmente derivan del polioma, de Adenovirus 2, de citomegalovirus y del Virus de Simios 40.

35 Además de las secuencias de control regulador comentadas más arriba, el vector de expresión recombinante puede contener secuencias de nucleótidos adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión recombinante puede codificar un gen marcador seleccionable para identificar las células anfitrionas que han incorporado el vector.

40 El ADN del vector puede ser introducido en células procarióticas o eucarióticas por medio de técnicas convencionales incluyendo, pero no limitadas a, precipitación simultánea con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación, microinyección y transfección y transducción mediadas por virus. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células anfitrionas se pueden encontrar en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)), y otros manuales de laboratorio.

45 A menudo solamente una pequeña fracción de células (en particular, células de mamífero) integra el ADN foráneo en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, se puede introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable (*p. ej.*, resistencia a antibióticos) en las células anfitrionas junto con el gen que codifica la proteína de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Los ácido nucleicos que codifican un marcador seleccionable pueden ser introducidos en una célula anfitriona en el mismo vector que codifica la proteína de interés o pueden ser introducidos en un vector separado. Las células transfectadas establemente con el ácido nucleico introducido pueden ser identificadas mediante selección con fármacos (*p. ej.*, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las células otras morirán).

#### 50 **A. Animales Transgénicos.**

55 El polipéptido lisosomal puede ser producido en un animal transgénico no humano (*esto es*, que contiene un ácido nucleico introducido por intervención humana utilizando técnicas de ácidos nucleicos recombinantes). Los métodos para generar animales transgénicos no humanos son conocidas en la técnica. Los constructos de ADN pueden ser introducidos en la línea germinal de un ave o un mamífero para elaborar un animal transgénico. Por ejemplo, se pueden incorporar una o varias copias del constructo al genoma de un embrión mediante técnicas transgénicas convencionales.

A menudo es deseable expresar el polipéptido transgénico en la leche de un animal transgénico. Se prefieren los mamíferos que producen grandes volúmenes de leche y tienen largos períodos de lactancia. Los mamíferos preferidos son los rumiantes, *p. ej.*, vacas, ovejas, camellos o cabras (incluyendo cabras de origen suizo, tales como las cabras de cría Alpinas, Saanen y Toggenburg). Otros mamíferos preferidos incluyen los bueyes, los conejos, y los cerdos.

En una realización ilustrativa, se produce un animal no humano transgénico introduciendo un transgén en la línea germinal del animal no humano. Los transgenes pueden ser introducidos en células diana embrionarias en diferentes fases de desarrollo. Se utilizan diferentes métodos dependiendo de la fase de desarrollo de la célula diana embrionaria. Las líneas específicas de cualquier animal utilizado deben ser seleccionadas, si fuera posible, por su buena salud general, los buenos rendimientos de embriones, la buena visibilidad pronuclear en el embrión, y el buen estado reproductivo.

La introducción del transgén en el embrión se puede lograr por medio de cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica tales como microinyección, electroporación, lipofección o un vector viral. Por ejemplo, el transgén puede ser introducido en un mamífero mediante microinyección del constructo en los pronúcleos de los huevos de mamífero fertilizados para hacer que una o más copias del constructo sean conservadas en las células de los mamíferos en desarrollo. Después de la introducción del constructo transgénico en el huevo fertilizado, el huevo puede ser incubado *in vitro* durante cantidades de tiempo variables, o reimplantado en el anfitrión de alquiler, o ambos. Un método común consiste en incubar los embriones *in vitro* durante aproximadamente 1-7 días, dependiendo de la especie, y después reimplantarlos en el anfitrión sustituto.

Se puede someter a ensayo la presencia del constructo en la progenie de los embriones manipulados transgénicamente, *p. ej.*, mediante análisis de transferencia Southern de un segmento de tejido. Se puede utilizar un embrión que tiene una o más copias del constructo clonado exógeno integrado establemente en el genoma para establecer una línea animal transgénica permanente que porte el constructo transgénico.

Se pueden analizar las camadas de mamíferos alterados transgénicamente después del nacimiento para determinar la incorporación del constructo en el genoma de los vástagos. Esto se puede realizar hibridando una sonda correspondiente a la secuencia transgénica con material cromosómico de la progenie. Aquellas progenies de mamíferos que se encuentra que contienen al menos una copia del constructo en su genoma se hacen crecer hasta la madurez. Las especies hembra de estas progenies producirán el polipéptido deseado en o con su leche. Los mamíferos transgénicos pueden ser alimentados para producir otra progenie útil en la producción de los polipéptidos deseados en su leche.

Se pueden someter a ensayo las hembras transgénicas para determinar la secreción de polipéptidos en la leche, utilizando cualquier mecanismo de análisis conocido en la técnica, *p. ej.*, una transferencia Western o un análisis enzimático. Los promotores transcripcionales útiles para expresar el polipéptido en la leche de un animal transgénico son aquellos promotores que son activados preferentemente en células epiteliales mamarias, incluyendo los promotores que controlan los genes que codifican los polipéptidos de la leche tales como las caseínas, la beta-lactoglobulina (Clark et al., (1989) *Bio/Technology* 7:487-492), la proteína ácida del suero (Gorton et al. (1987) *BiolTechnology* 5: 1183-1187), y la lactoalbúmina (Soulier et al., (1992) *FEBS Letts.* 297:13). Se pueden utilizar los promotores de los genes de la alfa-, beta-, gamma- o kappa-caseína de cualquier especie de mamífero para proporcionar la expresión mamaria; un promotor preferido es el promotor del gen de la beta-caseína de cabra (DiTullio, (1992) *BiolTechnology* 10:74-77). Otro promotor polipeptídico específico de la leche o promotores que son específicamente activados en tejido mamario pueden ser aislados del ADNc o de secuencias genómicas.

La información de la secuencia de ADN es asequible para los genes específicos de la glándula mamaria enumerados más arriba, en al menos uno, y a menudo en varios organismos. Véanse, *p. ej.*, Richards et al., *J Biol. Chem.* 256, 526-532 (1981) (alfa-lactoalbúmina de rata); Campbell et al., *Nucleic Acids Res.* 12, 8685-8697 (1984.) (WAP de rata); Jones et al., *J. Biol. Chem.* 260: 7042-7050 (1985) (beta-caseína de rata); Yu-Lee & Rosen, *J. Biol. Chem.* 258,10794-10804 (1983) (gamma-caseína de rata); Hall, *BioGhem. J.* 242, 735-742 (1987) (alfa-lactoalbúmina humana); Stewart, *Nucleic Acids Res.* 12, 389 (1984) (ADNc de alfa S1 y kappa caseína bovinas); Gorodetsky et al., *Gene* 66, 87-96 (1988) (beta-caseína bovina); Alexander et al., *Eur. J. Biochem.* 178, 395-401 (1988) (kappa-caseína bovina); Brignon et al., *FEBS Lett.* 188, 48-55 (1977) (alfa S2 caseína bovina); Jamieson et al., *Gene* 61, 85-90 (1987), Ivanov et al., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 425-429 (1988), Alexander et al., *Nucleic Acids Res.* 17, 6739 (1989) (beta lactoglobulina bovina); Vilotte et al., *Biochimie* 69, 609-620 (1987) (alfa-lactoalbúmina bovina). La estructura y función de diferentes genes de proteínas de la leche han sido revisadas por Mercier & Vilotte, *J. Dairy Sci.* 76, 3079-3098 (1993). Si las secuencias colindantes adicionales son útiles en la optimización de la expresión, tales secuencias pueden ser clonadas utilizando las secuencias existentes, como sondas. Las secuencias reguladoras específicas de la glándula mamaria de diferentes organismos pueden ser obtenidas escrutando genotecas de tales organismos utilizando secuencias de nucleótidos cognadas conocidas, o anticuerpos para polipéptidos cognados, como sondas.

De acuerdo con esta realización, el ácido nucleico aislado puede estar asociado operativamente con una secuencia señal específica de la leche, *p. ej.*, de un gen que codifica un producto secretado en la leche. Por ejemplo, las secuencias señal de genes que codifican caseínas (*p. ej.*, alfa-, beta-, gamma- o kappa-caseínas), beta-

lactoglobulina, proteína ácida de suero, y lactoalbúmina son útiles en la presente invención.

5 El polipéptido puede ser expresado a partir de un constructo de expresión ilustrativo que incluye un promotor específico para células epiteliales mamarias, *p. ej.*, un promotor de caseína (por ejemplo, un promotor de beta-caseína de cabra), una secuencia señal específica de la leche, *p. ej.*, una secuencia señal de caseína (por ejemplo, secuencia señal de beta-caseína), y una secuencia que codifica el polipéptido.

El polipéptido transgénico puede ser producido en la leche a concentraciones relativamente elevadas y grandes volúmenes, proporcionando un elevado nivel de producción continuo del polipéptido procesado normalmente que es fácilmente cosechado de un recurso renovable. Existen numerosos métodos diferentes conocidos en la técnica para aislar polipéptidos de la leche.

10 Los polipéptidos de la leche se aíslan normalmente por medio de una combinación de procesos. Primero se fracciona la leche cruda para separar las grasas, por ejemplo, mediante desnatado, centrifugación, sedimentación (H.E. Swaisgood, *Developments in Dairy Chemistry, I: Chemistry of Milk Protein*, Applied Science Publishers, NY, 1982), precipitación ácida (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.644.056) o coagulación enzimática con renina o quimotripsina (Swaisgood, *ídem*). A continuación, se pueden fraccionar las principales proteínas de la leche en una disolución clara o un producto precipitado en masa a partir del cual se puede purificar fácilmente la proteína específica de interés.

15 En la Patente de los Estados Unidos Núm. de Ser. 08/648.235 se describe un método de aislamiento de un componente soluble de la leche, tal como una proteína, en su forma biológicamente activa de la leche completa o de una fracción de leche mediante filtración tangencial de flujo. A diferencia de los métodos de aislamiento anteriores, éste elimina la necesidad de un primer fraccionamiento de la leche completa para separar la grasa y las micelas de caseína, simplificando de ese modo el proceso y evitando pérdidas de recuperación y bioactividad. Este método se puede utilizar combinado con etapas de purificación adicionales para separar además los contaminantes y purificar el componente de interés.

**B. Producción de Polipéptidos Transgénicos en los Huevos de un Ave Transgénica.**

25 El polipéptido recombinante también puede ser producido en los huevos de un ave transgénica, *p. ej.*, un pollo, un pavo, un pato, un ganso, un avestruz, una pintada, un pavo real, una perdiz, un faisán, una paloma, una codorniz transgénicos utilizando métodos conocidos en la técnica (Sang et al., *Trends Biotechnology*, 12:415-20, 1994). Los genes que codifican polipéptidos expresados específicamente en el huevo, tales como los genes de la proteína de la yema del huevo y los genes de la proteína albúmina, pueden ser modificados para dirigir la expresión de los polipéptidos lisosomales de la invención.

30 Los promotores útiles para producir polipéptidos en huevos de aves son aquellos promotores que son activados preferentemente en el huevo, incluyendo los promotores que controlan los genes que codifican los polipéptidos del huevo, *p. ej.*, ovalbúmina, lisozima y avidina. Se prefieren los promotores de los genes de ovalbúmina, lisozima o avidina de pollo. Los promotores específicos de huevo o los promotores que están específicamente activados en el tejido del huevo pueden ser de ADNc o de secuencias genómicas.

35 Las secuencias de ADN de genes específicos de huevo son conocidas en la técnica (véase, *p. ej.*, Burley et al., "The Avian Egg", John Wiley and Sons, pág. 472, 1989). Las secuencias reguladoras específicas de huevo de diferentes organismos pueden ser obtenidas escrutando genotecas de tales organismos utilizando secuencias de nucleótidos cognadas conocidas, o anticuerpos para polipéptidos cognados, como sondas.

40 **C. Plantas Transgénicas.**

Se pueden expresar polipéptidos recombinantes en una planta transgénica en la cual el transgén es insertado en el genoma nuclear o plastídico. La transformación en plantas es conocida en la técnica. Véase, *en general*, *Methods in Enzymology* Vol. 153 ("Recombinant DNA Part D") 1987, Wu y Grossman Eds., Academic Press y Solicitud de Patente Europea EP 693 554.

45 Se pueden introducir ácidos nucleicos foráneos en células vegetales o protoplastos mediante varios métodos. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser transferido mecánicamente mediante microinyección directamente en las células vegetales por medio del uso de micropipetas. El ácido nucleico foráneo también puede ser transferido a una célula vegetal utilizando polietilenglicol que forma un complejo de precipitación con el material genético que es absorbido por la célula (Paszkowski et al. (1984) *EMBO J.* 3:2712-22). El ácido nucleico foráneo también puede ser introducido en una célula vegetal mediante electroporación (Fromm et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5824). En esta técnica, los protoplastos vegetales son sometidos a electroporación en presencia de plásmidos o ácidos nucleicos que contienen el constructo genético relevante. Los impulsos eléctricos de alta intensidad de campo permeabilizan de forma reversible las biomembranas permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos vegetales sometidos a electroporación vuelven a formar la pared celular, se dividen, y forman un callo vegetal. La selección de las células vegetales transformadas con el gen transformado se puede completar utilizando marcadores fenotípicos.

- 5 Se puede utilizar el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) como vector para introducir ácidos nucleicos foráneos en las células vegetales (Hohn et al. (1982) "Molecular Biology of Plant Tumors," Academic Press, Nueva York, págs. 549-560; Howell, Patente de los Estados Unidos Núm. 4.407.956). El genoma del ADN viral de CaMV es insertado en un plásmido bacteriano parental creando una molécula de ADN recombinante que puede ser propagada en bacterias. El plásmido recombinante puede ser modificado además mediante la introducción de la secuencia de ADN deseada. La porción viral modificada del plásmido recombinante es separada después mediante corte del plásmido bacteriano parental, y se utiliza para inocular las células vegetales o las plantas.
- 10 Se puede utilizar la penetración balística a alta velocidad mediante partículas pequeñas para introducir ácido nucleico foráneo en células vegetales. El ácido nucleico se dispone dentro de la matriz de pequeñas cuentas o partículas, o sobre la superficie (Klein et al. (1987) Nature 327:70-73). Aunque típicamente solamente se requiere una única introducción en un segmento de ácido nucleico nuevo, este método también proporciona múltiples introducciones.
- 15 Se puede introducir un ácido nucleico en una célula vegetal mediante infección de una célula vegetal, un explante, un meristemo o una semilla con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* transformado con el ácido nucleico. En condiciones apropiadas, las células vegetales transformadas se desarrollan para formar brotes, raíces, y se desarrollan más para dar plantas. Los ácidos nucleicos pueden ser introducidos en células vegetales, por ejemplo, por medio del plásmido Ti de *Agrobacteria*. El plásmido Ti es transmitido a las células vegetales tras la infección por *Agrobacteria*, y es integrado de manera estable en el genoma de la planta (Horsch et al. (1984) "Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants," Science 233:496498; Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803).
- 20 Las plantas a partir de las cuales se pueden aislar y cultivar los protoplastos para dar plantas regeneradas completas se pueden transformar de manera que se recuperen plantas completas que contengan el gen foráneo transferido. Algunas plantas adecuadas incluyen, por ejemplo, especies de los géneros *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hererocallis*, *Nemesia*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browaalia*, *Glycine*, *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum*, y *Datura*.
- 25 La regeneración vegetal a partir de protoplastos cultivados es descrita por Evans et al., "Protoplasts Isolation and Culture", Handbook of Plant Cell Cultures 1:124-176 (MacMillan Publishing Co. Nueva York 1983); M. R. Davey, "Recent Developments in the Culture and Regeneration of Plant Protoplasts", Protoplasts (1983)-Lecture Proceedings, págs. 12-29, (Birkhauser, Basal 1983); P. J. Dale, "Protoplast Culture and Plant Regeneration of Cereals and Other Recalcitrant Crops", Protoplasts (1983)-Lecture Proceedings, págs. 31-41, (Birkhauser, Basel 1983); y H. Binding, "Regeneration of Plants", Plant Protoplasts, págs. 21-73, (CRC Press, Boca Raton 1985).
- 30 La regeneración a partir de protoplastos varía de especie a especie de planta, pero generalmente se genera primero una suspensión de protoplastos transformados que contienen copias de la secuencia exógena. En ciertas especies, se puede inducir después la formación de embriones a partir de la suspensión de protoplastos, hasta la fase de maduración y germinación en forma de embriones naturales. El medio de cultivo puede contener diferentes aminoácidos y hormonas, tales como auxina y citoquininas. También puede resultar ventajoso añadir ácido glutámico y prolina al medio, especialmente para especies tales como maíz y alfalfa. Los brotes y raíces normalmente se desarrollan de manera simultánea. La regeneración eficaz dependerá del medio, del genotipo, y de la historia del cultivo. Si se controlan estas tres variables, la regeneración es totalmente reproducible y repetible.
- 35 En los cultivos propagados vegetativamente, las plantas transgénicas maduras pueden ser propagadas recogiendo esquejes o por medio de técnicas de cultivo de tejidos para producir múltiples plantas idénticas para la valoración, por ejemplo para someter a ensayo las características de producción. Se realiza la selección de una planta transgénica deseable y se obtienen de ese modo nuevas variedades, y se propagan vegetativamente para su venta comercial. En los cultivos propagados por semillas, las plantas transgénicas maduras pueden ser autocruzadas para producir una planta endogámica homocigota. La planta endogámica produce semillas que contienen el transgén. Estas semillas se pueden desarrollar para producir plantas que tienen el fenotipo seleccionado. Las plantas endogámicas de acuerdo con esta invención se pueden utilizar para desarrollar nuevos híbridos. En este método se cruza una línea endogámica seleccionada con otra línea endogámica para producir el híbrido.
- 40 Las partes obtenidas a partir de una planta transgénica, tales como flores, semillas, hojas, ramas, frutos, y similares están incluidas en la invención, siempre que estas partes incluyan células que hayan sido transformadas de este modo. La progenie y las variantes, y los mutantes de las plantas regeneradas también están incluidos dentro del alcance de esta invención, siempre que estas partes comprendan las secuencias de ácido nucleico introducidas. La progenie y las variantes, y los mutantes de las plantas regeneradas también están incluidos dentro del alcance de esta invención.
- 45 La selección de plantas transgénicas o células vegetales se puede basar en un análisis visual, tal como la observación de los cambios de color (*p. ej.*, una flor de color blanco, una producción variable de pigmento, y un
- 50
- 55

patrón de color uniforme sobre flores o patrones irregulares), pero también puede implicar análisis bioquímicos de cualquier actividad enzimática o cuantificación de producto. Las plantas o células vegetales transgénicas se hacen crecer en plantas que portan la parte vegetal de interés y se controlan las actividades génicas, tales como análisis bioquímicos (transferencias Northern); transferencias Western; y análisis enzimáticos. Las plantas apropiadas se seleccionan y después se evalúan. Los métodos para la generación de plantas diseñadas genéticamente se describen adicionalmente en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.283.184, 5.482.852, y en la Solicitud de Patente Europea EP 693 554.

#### **V. Sujetos, Formulaciones Farmacéuticas, Vacuna y Modos de Administración.**

La presente invención encuentra uso en aplicaciones veterinarias y médicas. Los sujetos adecuados incluyen tanto aves como mamíferos, prefiriéndose los mamíferos. El término "ave" según se utiliza en la presente memoria incluye, pero no está limitado a, pollos, patos, gansos, codornices, pavos y faisanes. El término "mamífero" según se utiliza en la presente memoria incluye, pero no está limitado a, seres humanos, primates no humanos, bóvidos, cápridos, équidos, félicos, cánidos, lagomorfos, ratas, ratones etc. Se prefieren los sujetos humanos. Los sujetos humanos incluyen neonatos, niños, jóvenes, y adultos. En realizaciones representativas, el sujeto es un sujeto humano que tiene o se cree que tiene un déficit de un polipéptido lisosomal (*p. ej.*, GAA).

En realizaciones concretas, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el vector de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, coadyuvantes, agentes dispersantes, diluyentes, y similares. Para inyectables, el portador será típicamente un líquido, tal como agua libre de pirógeno, estéril, solución salina tamponada con fosfato libre de pirógeno, agua bacteriostática, o Cremophor EL[R] (BASF, Parsippany, N.J.). Para otros métodos de administración, el portador puede ser sólido o líquido.

Por "farmacéuticamente aceptable" se quiere significar que no es biológicamente no deseable o no es de otro modo no deseable, esto es, el material puede ser administrado a un sujeto junto con el ácido nucleico o vector aislado sin causar ningún efecto biológico no deseable tal como toxicidad. De este modo, dicha composición farmacéutica se puede utilizar, por ejemplo, en una transfección de una célula *ex vivo* o en la administración de un vector directamente a un sujeto.

En el caso de un vector viral, las partículas de virus se pueden poner en contacto con las células a una multiplicidad de infección apropiada de acuerdo con los métodos de transducción convencionales apropiados para las células diana concretas. Los títulos de virus a administrar pueden variar, dependiendo del tipo de célula diana y del vector de virus concreto, y pueden ser determinados por los expertos en la técnica sin una experimentación indebida. Típicamente, se administran al menos aproximadamente  $10^3$  partículas de virus, al menos aproximadamente  $10^5$  partículas, al menos aproximadamente  $10^7$  partículas, al menos aproximadamente  $10^9$  partículas, al menos aproximadamente  $10^{11}$  partículas, o al menos aproximadamente  $10^{12}$  partículas a la célula. En realizaciones ilustrativas, se administran de aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{15}$  partículas, de aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{13}$  partículas, de aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^{12}$  partículas, de aproximadamente  $10^{10}$  a aproximadamente  $10^{15}$  partículas, de aproximadamente  $10^{11}$  a aproximadamente  $10^{15}$  partículas, de aproximadamente  $10^{12}$  a aproximadamente  $10^{14}$  partículas, o de aproximadamente  $10^{12}$  a aproximadamente  $10^{13}$  partículas.

La célula a la que se van a administrar los vectores de la invención puede ser de cualquier tipo, incluyendo, pero no limitado a, células neuronales (incluyendo células de los sistemas nerviosos periférico y central), células retinianas, células epiteliales (incluyendo epitelio de tejido dérmico, intestinal, respiratorio, de la vejiga, pulmonar, peritoneal y de mama), músculo (incluyendo cardíaco, de la musculatura lisa, incluyendo células de la musculatura lisa pulmonar, músculo esquelético, y músculo del diafragma), células pancreáticas (incluyendo células de los islotes), células hepáticas (incluyendo el parénquima), células del intestino, fibroblastos (*p. ej.*, fibroblastos de la piel tales como los fibroblastos de la piel humana), células derivadas de fibroblastos, células endoteliales, células intestinales, células germinales, células del pulmón (incluyendo células bronquiales y células alveolares), células de próstata, células pluripotenciales, células progenitoras, células dendríticas, y similares. De manera alternativa, la célula es una célula cancerosa (incluyendo células tumorales). Por otra parte, las células pueden ser de cualquier especie de origen, como se ha indicado más arriba.

Las células de mamífero incluyen, pero no están limitadas a, células CHO, células 293, células HT1080, células HeLa o células C10.

En realizaciones concretas de la invención, la célula se separa de un sujeto, el vector se introduce en ella, y se vuelve a reponer la célula en el sujeto. Los métodos para separar células de sujetos para el tratamiento *ex vivo*, seguido de la introducción de nuevo en el sujeto, son conocidos en la técnica (véase, *p. ej.*, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.399.346 para la ilustración de la administración de vectores de virus *ex vivo*). Como una alternativa más, las células que son manipuladas y después introducidas en el sujeto se proporcionan a partir de otro sujeto o línea celular como una forma de terapia basada en células.

También se describe un método para el tratamiento de sujetos *in vivo* con los ácidos nucleicos o los vectores de

liberación de la invención. La administración del ácido nucleico o los vectores de liberación de la presente invención a un sujeto humano o un animal puede ser por medio de cualquier método conocido en la técnica. El sujeto puede ser un sujeto mamífero, más concretamente un sujeto humano. En otras realizaciones, el sujeto necesita tratamiento, por ejemplo, se le ha diagnosticado o se sospecha que tiene un déficit de un polipéptido lisosomal (*p. ej.*, GAA).

Las dosificaciones dependerán del modo de administración, de la gravedad de la enfermedad o afección que se vaya a tratar, del estado del sujeto individual, del vector concreto, y del gen que se vaya a liberar, y se puede determinar de una manera rutinaria (véase, *p. ej.*, Remington, The Science And Practice of Pharmacy (9ª Ed. 1995)). En realizaciones concretas, el ácido nucleico o vector aislado se administra al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz, como se ha definido ese término más arriba.

Por lo general, con respecto a los vectores virales, se administran al menos aproximadamente  $10^3$ , al menos aproximadamente  $10^5$ , al menos aproximadamente  $10^7$ , al menos aproximadamente  $10^9$ , al menos aproximadamente  $10^{11}$  partículas de virus, o al menos aproximadamente  $10^{12}$  partículas de virus al sujeto por tratamiento. Las dosis ilustrativas son títulos de virus de aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{15}$  partículas, aproximadamente de  $10^7$  a aproximadamente  $10^{14}$  partículas, aproximadamente de  $10^8$  a aproximadamente  $10^{13}$  partículas, aproximadamente de  $10^{10}$  a aproximadamente  $10^{15}$  partículas, aproximadamente de  $10^{11}$  a aproximadamente  $10^{15}$  partículas, aproximadamente de  $10^{12}$  a aproximadamente  $10^{14}$  partículas, o de aproximadamente  $10^{12}$  a aproximadamente  $10^{13}$  partículas.

En realizaciones concretas de la invención, se puede emplear más de una administración (*p. ej.*, dos, tres, cuatro, o más administraciones) para lograr niveles terapéuticos de expresión del ácido nucleico.

Los modos de administración ilustrativos incluyen la administración oral, rectal, transmucosal, tópica, transdérmica, por inhalación, parenteral, *p. ej.*, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular (esto es, administración a músculo cardíaco, esquelético, del diafragma y/o músculo liso), y administración intraarticular, y similares, así como inyección directa en tejidos (*p. ej.*, músculo) u órganos (*p. ej.*, en el hígado, en el cerebro para la liberación en el sistema nervioso central), de manera alternativa, inyecciones intratecales, intramusculares directas (*p. ej.*, en el músculo cardíaco, esquelético, o del diafragma), intraventriculares, intravenosas, intraperitoneales, intranasales, o intraoculares. La administración en el hígado (comentada más abajo) es otro modo de administración representativo.

Los inyectables se pueden preparar de maneras convencionales, ya sea en forma de soluciones o suspensiones líquidas, en forma sólida adecuada para su disolución o suspensión en un líquido antes de la inyección, o en forma de emulsiones. El medio para el inyectable será por lo general un líquido acuoso que contenga los aditivos habituales para las soluciones inyectables, tales como agentes estabilizantes, sales o solución salina, y/o tampones.

Para la administración oral, el vector puede ser administrado en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, comprimidos, y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes, y suspensiones. Los componentes activos se pueden encapsular en cápsulas de gelatina junto con los ingredientes inactivos y los portadores en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnesio y similares. Los ejemplos de los ingredientes inactivos adicionales que se pueden añadir para proporcionar el color, sabor, estabilidad, capacidad tamponadora, dispersión deseables u otros rasgos deseables conocidos son óxido de hierro rojo, gel de sílice, laurilsulfato de sodio, dióxido de titanio, tinta blanca comestible y similares. Se pueden utilizar diluyentes similares para elaborar comprimidos. Tanto los comprimidos como las cápsulas se pueden fabricar en forma de productos de liberación sostenida para proporcionar una liberación continua de la medicación a lo largo de un período de horas. Los comprimidos pueden estar recubiertos de azúcar o recubiertos de película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger el comprimido de la atmósfera, o puede tener un recubrimiento entérico para una disgregación selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas de dosificación líquidas para la administración oral pueden contener colorantes y aromatizantes para incrementar la aceptación por parte del paciente.

La administración oral de vectores de AAV ha sido descrita en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.110.456.

El vector puede ser formulado de manera alternativa para la administración nasal o la administración de otro modo en los pulmones de un sujeto mediante cualquier método adecuado, pero se administra preferiblemente por medio de una suspensión en aerosol de partículas respirables que comprenden el vector, que el sujeto inhala. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. El término "aerosol" incluye cualquier fase suspendida portada por un gas, que es susceptible de ser inhalada en los bronquiolos o los conductos nasales. Específicamente, el aerosol incluye una suspensión de gotitas portadas por un gas, que puede ser producida en un inhalador o nebulizador de dosis medida, o en un pulverizador de consola. El aerosol también incluye una composición en polvo seco suspendida en aire u otro gas portador, que puede ser liberada mediante insuflación desde un dispositivo inhalador, por ejemplo. Véanse Ganderton & Jones, Drug Delivery to the Respiratory Tract, Ellis Horwood (1987); Gonda (1990) Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 6:273-313; y Raeburn et al. (1992) J. Pharmacol. Toxicol. Methods 27:143-159. Los aerosoles de partículas líquidas que comprenden el ácido nucleico o vector aislado pueden ser producidos mediante cualquier método adecuado, por ejemplo con un nebulizador de aerosol a presión o un nebulizador ultrasónico, como es sabido por los expertos en la técnica. Véase, *p. ej.*, la

Patente de los Estados Unidos Núm. 4.501.729. Los aerosoles de partículas sólidas que comprenden el ácido nucleico o vector aislado pueden ser producidos del mismo modo con cualquier generador de aerosol de medicamento particulado, mediante mecanismos conocidos en la técnica farmacéutica.

5 De manera alternativa, se puede administrar el vector de una manera local en lugar de generalizada, por ejemplo, en una formulación de depósito o de liberación sostenida.

En realizaciones concretas de la invención, el vector es liberado en el hígado del sujeto. La administración en el hígado se puede lograr por medio de cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a administración intravenosa, administración intraportal, administración intrabiliar, administración intra-arterial, inyección en el parénquima del hígado, e inyección intraesplénica.

10 También se prefieren la liberación intramuscular y la liberación intracardiaca en el músculo esquelético o el músculo cardíaco, respectivamente, o la inyección directa en el músculo del diafragma. En otras realizaciones concretas, se utiliza la administración intraperitoneal para liberar el vector en el músculo del diafragma.

15 En realizaciones concretas, el ácido nucleico aislado (*p. ej.*, portado por un vector de Ad, AAV o Ad/AAV híbrido) que codifica un polipéptido lisosomal es introducido en un órgano o tejido de depósito (*p. ej.*, hígado, músculo esquelético, pulmón) y el polipéptido es expresado allí y secretado al sistema circulatorio, donde es liberado opcionalmente en los tejidos diana, preferiblemente, en una cantidad terapéuticamente eficaz. La liberación intramuscular en el músculo esquelético o la liberación en el hígado son ilustrativas de la práctica de esta realización de la invención. De manera alternativa, el vector puede ser administrado en el cerebro (*p. ej.*, para tratar trastornos de MPS tales como la enfermedad de Sly), donde el polipéptido puede ser expresado y secretado por las células transformadas o transducidas (*p. ej.*, neuronas, células gliales) y absorbido por otras células del cerebro.

20 Habiendo descrito ahora la invención; se ilustrará la misma con referencia a ciertos ejemplos, que se incluyen en la presente memoria con fines ilustrativos solamente, y que no se pretende que sean limitantes de la invención.

#### Ejemplo 1

#### MATERIALES Y MÉTODOS

25 **Cultivo Celular.** Se mantuvieron células 293 y células CS-7 (Amalfitano and Chamberlain. (1997) Gene Ther. 4:258-263) en medio de Eagle modificado de Dulbecco con un suplemento de suero bovino fetal al 10%, 100 U de penicilina por mililitro, y 100 µg de estreptomina por mililitro a 37°C en una atmósfera de aire con el 5% de CO<sub>2</sub>. Se hicieron crecer células C-7 en presencia de higromicina, 50 µg/ml. Se mantuvieron células HeLa en medio esencial mínimo de Eagle con un suplemento de suero bovino fetal al 10%, medio esencial mínimo con piruvato de sodio 1 mM, medio esencial mínimo con aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 100 U de penicilina por mililitro, y 100 µg de estreptomina por mililitro a 37°C en una atmósfera de aire con CO<sub>2</sub> al 5%.

30 **Construcción de un Plásmido Vector de AAV que Codifica hGAA.** Se subclonó ADNc de hGAA con el promotor de CMV de pcDNA3-hGAA (Van Hove et al. (1996). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:65-70) en un plásmido vector de AAV, en forma de un fragmento *NruI-EcoRV*, aguas arriba del intrón 4 de la hormona de crecimiento humana y la secuencia de poliadenilación (Brinster et al. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 836-840). La unidad transcripcional resultante estaba flanqueada por las secuencias de repeticiones terminales (TR) de AAV2 en pAAV-ChGAAGH. Una delección de 530 pb que abarcaba el intrón 4 de la hormona de crecimiento humana fue generada por medio de digestión con *EcoRV* y con *PvuII* parcial seguido de formación de extremos romos con ADN polimerasa de T4 y ligación con ADN ligasa de T4 para generar pAAV-ChGAAG(-). El intensificador de CMV/promotor de la β-actina de pollo (CB) híbrido se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa a partir de pTriEx1 (Novagen, Madison, WI) con cebadores que introdujeron sitios de restricción *XbaI* aguas arriba y *KpnI* aguas abajo únicos, y el promotor CB fue subclonado en forma de un fragmento *KpnI-XbaI* para reemplazar el promotor de CMV en pAAV-ChGAAG(-), para generar pAAV-CBhGAAG(-). A continuación, con el fin de reducir más el tamaño de empaquetamiento, se linealizó el plásmido pAAV-CBhGAAG(-) en un sitio *AflIII* único en la secuencia no traducida 3' del ADNc de hGAA y se digirió parcialmente con *NspI* para introducir una delección de 411 pb en la secuencia 3' no traducida del ADNc de hGAA, seguido de formación de extremos romos con la ADN polimerasa de T4 y ligación con ADN ligasa de T4 para generar pAAV-CBGAAPa. Finalmente, las secuencias vectoras de pAAV-CBGAAPa fueron aisladas en forma de un fragmento de 4,4 kpb a partir de un producto digerido con *BglIII* parcial, y ligadas con el sitio *BglIII* desfosforilado con fosfatasa alcalina intestinal de ternera de pShuttle (He et al. (1998). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2509-2514).

35 **Construcción de un vector de Ad-AAV híbrido [E1-, polimerasa-, proteína preterminal-] que codifica hGAA.** Se construyeron plásmidos lanzadera resistentes a kanamicina para que contuvieran dentro de la región E1 de Ad la casete transgénica promotor CB + ADNc de hGAA + poliA flanqueada por las secuencias TR de AAV2. El plásmido lanzadera fue digerido con *PmeI*, y sometido a electroporación en la cepa recombinogénica BJ5183 de E.Coli con el plásmido pAd[E1-, polimerasa-, proteína preterminal-] (Hodges et al. (2000). J. Gene Med. 2:250-259). Los clones resistentes a kanamicina se escrutaron por medio de digestión con enzimas de restricción (*BsfXI*) para confirmar la generación satisfactoria de genomas vectores de Ad recombinantes completos. Estos clones fueron digeridos con *PacI* y transfectados como se ha descrito previamente en la línea celular que expresa E1, y E2b, C-7 (Hodges et al.

(2000). J. Gene Med. 2:250-259). Los vectores fueron amplificados y se confirmó que tenían la construcción correcta mediante cartografiado con enzimas de restricción de los genomas los vectores, y posteriores análisis funcionales *in vitro* e *in vivo*. Una vez aislados, los respectivos vectores Ad se propagaron seriadamente en números crecientes de células C-7 (Amalfitano et al. (1998) J. Virol. 72:926-933). Cuarenta y ocho horas después de la infección, los sedimentos de células infectadas se recogieron mediante centrifugación a baja velocidad, se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM pH 8,0, el vector se liberó de las células mediante congelación - descongelación repetida (x3) del producto lisado, se liberó mediante ultrasonificación, y el sobrenadante que contenía el vector se sometió a dos rondas de centrifugación con CsCl de densidad de equilibrio (Amalfitano et al. (1998) J. Virol. 72:926-933). Se hicieron visibles dos bandas de virus. Las bandas de virus fueron separadas después, sometidas a diálisis exhaustivamente frente a Tris-HCl 10 mM pH 8,0 (o PBS), se añadió sacarosa al 1%, y se almacenaron alícuotas a -80°C. El número de partículas de vector se cuantificó basándose en la DO<sub>260</sub> de vector contenido en el tampón de diálisis desorganizado con dodecilsulfato de sodio (SDS), y por medio de digestión con ADNasa I, extracción del ADN, y análisis de transferencia Southern.

El análisis del ADN del vector dAAV híbrido consistió en el aislamiento del ADN del vector y digestión con enzimas de restricción seguido de transferencia Southern para verificar la presencia de secuencias del vector de AAV intactas en la banda inferior del gradiente de cloruro de cesio, incluyendo enzimas de restricción que demostraron la presencia de secuencias de repeticiones terminales de AAV flanqueando el transgén (*Ahd* y *Bss*HII).

Todas las provisiones de partida de vector viral se manipularon de acuerdo con las pautas de Biohazard Safety Level 2 publicadas por el NIH.

**Administración *in vivo* de provisiones de partida de vector de Ad-AAV híbrido o AAV.** Se administró el vector intramuscularmente en ambos músculos gastrocnemios de ratones GAA-KO de 3 días de edad (Raben et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:19086-19092). Se administraron un total de  $4 \times 10^{10}$  partículas de vector de Ad-AAV resistente a ADNasa I, se dividieron en dos inyecciones iguales por animal. De manera alternativa, se administraron intramuscularmente un total de  $10^{11}$  partículas de vector de AAV resistente a ADNasa I en el músculo gastrocnemio derecho de ratones GAA-KO/SCID de 6 semanas de edad. Para la administración dirigida al hígado, se administraron intravenosamente un total de  $10^{11}$  partículas de vector de AAV resistente a ADNasa a través del seno retro-orbital o a través de la vena porta a ratones GAA-KO/SCID o GAA-KO de 3 meses de edad según se indicó. En los respectivos momentos después de la inyección, se obtuvieron muestras de plasma o tejido y se trataron como se describe más abajo. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las pautas aprobadas del Duke University Institutional Animal Care and Use Committee.

**Determinación de la actividad de hGAA y contenido de glicógeno.** Se midió la actividad de hGAA tisular después de la separación del tejido del ratón de control o tratado, congelación instantánea sobre hielo seco, homogeneización y sonicación en agua destilada, y sedimentación de membranas/proteínas insolubles mediante centrifugación. Las concentraciones de proteína de las suspensiones aclaradas se cuantificaron por medio del análisis de Bradford. La actividad de hGAA en el músculo se determinó como se ha descrito (Amalfitano et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8861-8866). El contenido de glicógeno de los tejidos se midió utilizando el sistema de análisis de *Aspergillus niger*, como se ha descrito (Kikuchi et al. (1998) J. Clin. Invest. 101:827-833). Se utilizó un test de la *t* de Student homoscedástico de dos colas para determinar las diferencias significativas en los niveles de hGAA y el contenido de glicógeno entre ratones GAA-KO con o sin administración del vector que codifica hGAA.

**Análisis de transferencia Western de hGAA.** Para la detección directa de hGAA en tejidos, se sometieron las muestras (100 µg de proteína) a electroforesis durante la noche en un gel de poliacrilamida al 6% para separar las proteínas, y se transfirieron a una membrana de nailon. Las transferencias se bloquearon con una solución de leche desnatada al 5%, se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios y se visualizaron por medio de un sistema de detección de quimioluminiscencia (ECL) mejorado (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ).

**Detección mediante ELISA de anticuerpos anti-hGAA y anti-Ad en plasma.** Se recubrió con hGAA recombinante (5 µg) en tampón carbonato cada pocillo de una placa de 96 pocillos a 4°C durante la noche. De manera alternativa, los pocillos fueron recubiertos con  $5 \times 10^8$  partículas de vector de Ad por pocillo a 4°C durante la noche para la detección de anticuerpo anti-Ad. Después de lavar con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Tween 20 al 0,05%, se añadieron diluciones seriadas del plasma a los pocillos, y se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con Tween 20 al 0,05% + PBS, se incubaron con una dilución 1:2.500 de IgG anti-ratón de oveja conjugada con fosfatasa alcalina (H + L) a la temperatura ambiente durante 1 hora, se lavaron, y se añadió sustrato para la fosfatasa alcalina (fosfato de p-nitrofenilo). Los valores de absorbancia de las placas se leyeron a 405 nm con un lector de microplacas Bio-Rad ELISA (todas las muestras dieron valores de absorbancia que estuvieron dentro del intervalo lineal del análisis a esta dilución) (Ding et al. (2002) Mol. Ther. 5:436-446). Se determinó el título de anticuerpo a la dilución más alta donde el valor para la absorbancia excedía de 0,1.

**Ejemplo 2****Ad-AAV Dirigido al Músculo Neonatal****Administración y producción de hGAA en Ratones GAA-KO**

Se evaluó la expresión de hGAA dirigido al músculo con un vector híbrido Ad-AAV en ratones GAA-KO neonatos. Si bien el vector de Ad-AAV liberaba hGAA dirigido al músculo en estos experimentos, se desarrolló el vector de Ad-AAV híbrido en cuestión para proporcionar una mayor eficacia de empaquetado del vector de AAV. La administración del vector de Ad-AAV a ratones de 3 días de edad revirtió los efectos de GSD II en el músculo gastrocnemio inyectado, y la expresión de hGAA sostenida proporcionó resultados terapéuticos a largo plazo evidenciados por la reducción del almacenamiento de glicógeno en los músculos de la pata trasera.

El vector de Ad-AAV que codificaba hGAA fue dirigido a ambos músculos gastrocnemios, mediante inyección intramuscular el día 3 de vida en ratones GAA-KO, y se analizaron los niveles de hGAA a las 6, 12, y 24 semanas de edad. El análisis mediante transferencia Western de hGAA en los grupos musculares del gastrocnemio, el isquiotibial y el cuádriceps a las 24 semanas de edad mostró hGAA de las isoformas de ~110 kD, 76 kD y 67 kD después de la administración del vector de Ad-AAV, y la hGAA estaba ausente del músculo esquelético de los ratones GAA-KO no tratados (**Figura 1 Panel A**). Aparentemente debido a la transducción del músculo adyacente al gastrocnemio, se observó la mayor cantidad de hGAA en los isquiotibiales, con algo menos de hGAA en el gastrocnemio y la mínima hGAA en el cuádriceps. Se detectó un patrón similar de hGAA introducida por medio del análisis de transferencia Western de los grupos de los músculos gastrocnemio y cuádriceps después de la administración del vector de Ad-AAV a las 6 y 12 semanas de edad (no mostrado).

El análisis de transferencia Western de hGAA en corazón, diafragma, e hígado a las 6, 12, y 24 semanas de edad después de la administración neonatal del vector de Ad-AAV demostró, niveles bajos, detectables de hGAA para la isoforma de ~76 kD de la hGAA en 2 de 4 ratones GAA-KO a las 6 semanas (**Figura 1 Panel B**; m1 y m4). Se encontró menos hGAA en el corazón en 1 de 4 ratones GAA-KO a las 24 semanas (**Figura 1 Panel B**; m12), y no se detectó en el corazón de 5 ratones GAA-KO a las 12 semanas de edad (**Figura 1 Panel B**). Finalmente, no se detectó hGAA en plasma mediante transferencia Western a las 3 semanas de la administración del vector (no mostrado).

La función de la hGAA introducida por el vector de Ad-AAV fue analizada mediante análisis de enzima GAA, y actividad de GAA correlacionada con las cantidades relativas de proteína hGAA detectada por medio del análisis de transferencia Western (**Figura 2 Panel A**). A las 24 semanas, la mayor actividad de GAA estuvo presente en los isquiotibiales (1180 +/- 620 nmoles/mg/hr), seguido del gastrocnemio (717 +/- 275 nmoles/mg/hr), y la mínima en el cuádriceps (44 +/- 28 nmoles/mg/hr). La actividad de GAA fue elevada en todos los grupos de músculos a las 6, 12, y 24 semanas, en comparación con los mismos grupos de músculos en ratones GAA-KO no tratados (**Fig 2 Panel B**). La actividad de hGAA para los isquiotibiales fue aproximadamente 50 veces más elevada en comparación con la actividad de GAA en músculo esquelético del ratón de tipo salvaje (Ding, E., et al. (2002) Mol. Ther. 5:436-446).

La actividad de GAA fue elevada en corazón, diafragma e hígado a las 6 semanas de edad después de la administración del vector de Ad-AAV en 2 de 4 ratones GAA-KO (**Figura 2 Panel B**; m1 y m4). No obstante, la actividad de GAA en estos tejidos fue mucho menor que en los músculos esqueléticos de la pata posterior más próxima al sitio de la inyección del vector de Ad-AAV (**Figura 2 Panel B**).

**Ejemplo 3****Anticuerpos Anti-hGAA Después de la Administración de Ad-AAV Neonatal**

La formación de anticuerpos anti-hGAA se produjo durante la sustitución de la enzima hGAA en GSD II durante una prueba clínica (Amalfitano et al. (2001) Genet. In Med. 3:132-138) y en el uso preclínico de vectores adenovirales en ratones GAA-KO (Ding et al. (2002) Mol. Ther. 5:436-446). Se detectaron anticuerpos anti-hGAA en ratones GAA-KO a las 6, 12, y 24 semanas de la administración neonatal del vector de Ad-AAV (**Figura 3 Panel A**, Ad-AAV Neonatal Intramuscular), con 3 excepciones, mientras los anticuerpos anti-hGAA estuvieron ausentes en ratones GAA-KO no tratados (**Figura 3 Panel A, Control**). Se utilizaron ratones GAA-KO adultos que recibieron el vector de Ad-AAV intravenosamente como controles positivos (**Figura 3 Panel A**, Ad-AAV). Estos ratones desarrollaron anticuerpos anti-hGAA de título elevado como se ha informado previamente (Ding, E., et al. (2002) Mol. Ther. 5:436-446). Se demostró una presencia de anticuerpos hGAA a un título de > 1:4.000 para 10 de 13 ratones después de la administración neonatal del vector de Ad-AAV (**Figura 3 Panel B**, Ad-AAV Neonatal Intramuscular), y para 3 de 3 ratones GAA-KO adultos después de la administración intravenosa de vector de Ad-AAV (**Figura 3 Panel B**, Ad-AAV). Solamente los 3 ratones GAA-KO que no lograron generar anticuerpos anti-hGAA después de la administración neonatal del vector (m1, m4, y m12 en la **Figura 3 Panel B**) mostraron también hGAA significativa por medio de análisis de transferencia Western en corazón a las 6 y 24 semanas de edad (**Figura 1 Panel B**). La formación de anticuerpos anti-hGAA parecía estar relacionada con la expresión persistente del transgén foráneo (hGAA), debido a que los ratones GAA-KO no lograron generar anticuerpos anti-Ad después de la exposición neonatal, una vez al vector de Ad-AAV (**Figura 3 Panel C**).

**Ejemplo 4****Reducción del Contenido de Glicógeno en Músculos Esqueléticos de la Pata Trasera Después de la Inyección en el Gastrocnemio de Ratones GAA-KO Neonatos**

5 Se demostró la ventaja de introducir hGAA en GSD II mediante la cuantificación de glicógeno en músculo esquelético. El almacenamiento de glicógeno se redujo significativamente para grupos de músculos esqueléticos en todos los momentos excepto para el cuádriceps a las 24 semanas (**Figura 4 Panel A**), cuando la hGAA en el cuádriceps no era tan elevada como en otros momentos (**Figura 2 Panel A**). El contenido de glicógeno se redujo significativamente en los isquiotibiales, el gastrocnemio, y el cuádriceps en comparación con los ratones GAA-KO no tratados (**Figura 4 Panel A**). El contenido de glicógeno se redujo a 0,77 +/- 0,42 mmoles de glucosa/gm de proteína en el corazón de ratones GAA-KO (n = 4) 6 semanas después de la administración neonatal de vector de Ad-AAV, en comparación con 2,1 +/- 1,3 mmoles de glucosa/gm de proteína en ratones GAA-KO no tratados (n = 3). Solamente 2 de 4 ratones GAA-KO tuvieron hGAA detectable en corazón y diafragma a las 6 semanas mediante análisis de transferencia Western (**Figura 1 Panel B**; m1 y m4), y el contenido de glicógeno tanto de corazón como de diafragma se redujo algo en 1 de esos ratones (**Figura 4 Panel B**; m4).

15 La corrección del almacenamiento de glicógeno por la hGAA introducida se hizo evidente mediante tinción del glicógeno del gastrocnemio y el corazón. La tinción con ácido peryódico-Schiff (PAS) del gastrocnemio mostró una acumulación de glicógeno lisosomal mucho menor a las 24 semanas de la administración del vector de Ad-AAV en comparación con el ratón GAA-KO no tratado (**Figura 5**). En un ratón GAA-KO que tenía hGAA significativa en el corazón a las 6 semanas (**Figura 1 Panel B**; m4), la acumulación de glicógeno en el corazón fue menor para el ratón GAA-KO no tratado (**Figura 5**). En conjunto, estos datos proporcionan una evidencia del beneficio continuado de la hGAA introducida con un vector en el músculo.

**Ejemplo 5****Construcción de un Plásmido Vector AAV que Codifica hGAA**

25 Se subclonó el ADNc de hGAA con el promotor de CMV de pcDNA3-hGAA (Van Hove et al. (1996). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:65-70) en un plásmido vector de AAV, en forma de un fragmento *Nrul-EcoRV*, aguas arriba del intrón 4 y el sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana (Brinster et al. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 836-840). La unidad transcripcional resultante estaba flanqueada por las secuencias TR de AAV2 en pAAV-ChGAAGH. Se generó una delección de 530 pb que abarcaba el intrón 4 de la hormona de crecimiento humana mediante digestión con *EcoRV* y *PvuII* parcial seguido de formación de extremos romos con ADN polimerasa de T4 y ligación con ADN ligasa de T4 para generar pAAV-ChGAAG(-). Se amplificó el intensificador de CMV/promotor de la  $\beta$ -actina de pollo (CB) híbrido mediante reacción en cadena de la polimerasa a partir de pTriEx1 (Novagen, Madison, WI) con cebadores que introdujeron sitios de restricción *XbaI* aguas arriba y *KpnI* aguas abajo únicos, y se subclonó el promotor CB en forma de un fragmento *KpnI-XbaI* para reemplazar el promotor de CMV en pAAV-ChGAAG(-), para generar pAAV-CBhGAAG(-). Con el fin de reducir más el tamaño de empaquetamiento, se linealizó el plásmido pAAV-CBhGAAG(-) en un sitio *AflII* único en la secuencia no traducida 3' del ADNc de hGAA y se digirió parcialmente con *NspI* para introducir una delección de 411 pb en la secuencia no traducida 3' del ADNc de hGAA, seguido de formación de extremos romos con la ADN polimerasa de T4 y ligación con la ADN ligasa de T4 para generar pAAV-CBGAAPa. Finalmente, se aislaron las secuencias del vector de pAAV-CBGAAPa en forma de un fragmento de 4,4 kpb a partir de un producto digerido parcial con *BglII*, y se ligaron con el sitio de *BglII* desfosforilado con fosfatasa alcalina intestinal de ternera de pShuttle (He, T.-C., et al. (1998). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2509-2514).

**Ejemplo 6****Construcción de un Vector Ad-AAV Híbrido [E1-, polimerasa-, proteína preterminal-] que Codifica hGAA**

45 Se construyeron plásmidos lanzadera resistentes a kanamicina para que contuvieran en la región E1 de Ad la casete con el transgén del promotor CB + ADNc de hGAA + poliA flanqueada por las secuencias TR de AAV2. El plásmido lanzadera se digirió con *PmeI*, y se sometió a electroporación en la cepa recombinogénica BJ5183 de E.Coli con el plásmido pAd [E1-, polimerasa-, proteína preterminal -] (Hodges et al. (2000). J. Gene Med. 2:250-259). Los clones resistentes a kanamicina recombinantes se escrutaron por medio de digestión con enzimas de restricción (*BstXI*) para confirmar la generación satisfactoria de los genomas del vector de Ad recombinantes completos. Estos clones fueron digeridos con *Pacl* y transfectados como se ha descrito previamente en la línea celular que expresaba E1, y E2b, C-7 (Amalfitano et al. (1998). J. Virol. 72:926-933).

55 Los vectores se amplificaron y se confirmó que tenían la construcción correcta mediante cartografiado con enzimas de restricción de los genomas del vector, y posteriores análisis funcionales *in vitro* e *in vivo*. Una vez aislados, los respectivos vectores Ad se propagaron seriadamente en un número creciente de células C-7 (Amalfitano et al. (1998). J. Virol. 72:926-933). Cuarenta y ocho horas después de la infección, los sedimentos de células infectadas se cosecharon mediante centrifugación a baja velocidad, se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM pH 8,0, el vector se liberó de las células mediante congelación-descongelación repetida (x3) del producto lisado, se liberaron mediante ultrasonificación, y el sobrenadante que contenía el vector se sometió a dos rondas de centrifugación con CsCl de

densidad de equilibrio (Amalfitano et al. (1998). J. Virol. 72:926-933). Se hicieron visibles dos bandas de virus. Las bandas de virus se separaron después, se sometieron a diálisis de manera exhaustiva frente a Tris-HCl 10 mM pH 8,0 (o PBS), se añadió sacarosa al 1%, y se almacenaron las alícuotas a -80°C. El número de partículas de vector se cuantificó basándose en la  $DO_{260}$  del vector contenido en el tampón de diálisis con alteración por dodecilsulfato de sodio [SDS], y mediante digestión con ADNasa I, extracción de ADN, y análisis de transferencia Southern.

El análisis del ADN del vector de Ad-AAV híbrido consistió en aislamiento del ADN del vector y digestión con enzimas de restricción seguido de transferencia Southern para verificar la presencia de secuencias de vector de AAV intactas en la banda inferior del gradiente de cloruro de cesio, incluyendo las enzimas de restricción que demostraron la presencia de secuencias de repeticiones terminales de AAV que flanquean el transgén (*AhdI* y *BssHII*) (Sun et al., (2003) Mol Ther 7:193-201).

### Ejemplo 7

#### Preparación de Vectores AAV

Los vectores AAV se prepararon como se describe en la presente memoria con las modificaciones descritas (Sun BD, Chen Y-T, Bird A, Xu F, Hou Y-X, Amalfitano A, y Koeberl DD. Packaging of an AAV vector encoding human acid  $\alpha$ -glucosidase for gene therapy in glycogen storage disease type II with a modified hybrid adenovirus-adenovirus-associated virus vector. Mol Ther 7:467-477, 2003; Halbert CL, Allen JM, Killer AD. Adeno-associated virus type 6 (AAV) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. (Halbert et al., (2001) J Virol 75:6615-6624). En resumen, se infectaron células 293 con el vector híbrido Ad-AAV (2000 partículas de vector resistentes a ADNasa I/célula cuantificadas mediante análisis de transferencia Southern) que contenía las secuencias del vector de AAV 15-30 minutos antes de la transfección con un plásmido de empaquetamiento de AAV que contenía Rep de AAV2 y AAV2 o AAV6 (para el vector de AAV6 [Halbert et al. (2001) J. Virol. 75:6615-6624]). Los genes Cap fueron dirigidos por promotores heterólogos que por lo general generan AAV de replicación competente no detectables (rcAAV) (Allen et al. (2000) Mol. Ther. 1:88-95; Allen et al. (1997) J. Virol. 71:6816-6822). El producto lisado celular se recogió 48 horas después de la infección y se congeló-descongeló 3 veces, se aisló mediante una etapa de centrifugación en gradiente de iodixanol antes de la purificación en una columna de afinidad con heparina (Zolotukhin et al. (1999) Gene Ther. 6:973-995; Halbert CL, Allen JM, Miller AD. Adeno-associated virus type 6 (AAV) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. J Virol 2001; 75:6615-6624.), y se almacenaron alícuotas a -80°C. Se determinó el número de partículas que contenían ADN del vector por medio de digestión con ADNasa I, extracción del ADN, y análisis de transferencia Southern. Se detectaron las partículas contaminantes de wt AAV en las preparaciones de vector de AAV recombinante mediante análisis de transferencia Southern del ADN extraído del vector, y mediante análisis por PCR sensible utilizando cebadores que abarcaban el empalme entre los genes rep y cap. El nivel de rcAAV fue menor de 1 partícula en  $10^5$  partículas de vector de AAV. Todas las provisiones de vector viral se manipularon de acuerdo con las pautas de Biohazard Safety Level 2 publicadas por el NIH.

### Ejemplo 8

#### Administración In vivo de Provisiones de Partida del Vector AAV

Se administró intramuscularmente vector de AAV en el músculo gastrocnemio de ratones GAA-KO de 6 semanas de edad (Raben et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:19086-19092)/ratones SCID. Se inyectaron 100  $\mu$ l que contenían  $1 \times 10^{11}$  partículas de vector de AAV resistentes a ADNasa I por gastrocnemio. Para la inyección en la vena porta, se administró un vector de AAV a través de inyección en la vena porta. En los respectivos momentos después de la inyección, se obtuvieron muestras de plasma o tejido y se trataron como se describe más abajo. Para la administración intravenosa, se administró un vector de AAV a través del seno retroorbital. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las pautas aprobadas por el Duke University Institutional Animal Care and Use Committee.

### Ejemplo 9

#### Determinación de la Actividad de hGAA y Contenido de Glicógeno

Se midió la actividad de hGAA tisular después de la separación del tejido de los ratones de control o tratados, congelación instantánea sobre hielo seco, homogeneización y sonicación en agua destilada, y sedimentación de membranas/proteínas insolubles mediante centrifugación. Los controles afectados, no tratados fueron ratones GAA-KO, de 12 semanas de edad en el momento del análisis excepto cuando se indique de otro modo. Las concentraciones de proteína de las suspensiones aclaradas se cuantificaron por medio del análisis de Bradford. Se determinó la actividad de hGAA en el músculo como se ha descrito (Kikuchi, T., et al. (1998) J. Clin. Invest. 101:827-833). Se midió el contenido de glicógeno de los tejidos utilizando el sistema de análisis de *Aspergillus niger*, como se ha descrito (Amalfitano et al. (1999) Pro. Natl. Acad. Sci. USA 96:8861-8866). Se utilizó un test de la t de Student homoscedástico de dos colas para determinar las diferencias significativas en los niveles de hGAA y el contenido de glicógeno entre los ratones GAA-KO con o sin administración del vector que codifica hGAA.

**Ejemplo 10****Análisis Mediante Transferencia Western de hGAA**

5 Para la detección directa de hGAA en tejidos, se sometieron a electroforesis muestras (100 µg de proteína) durante la noche en un gel de poliacrilamida al 6% para separar las proteínas, y se transfirieron a una membrana de nailon. Las transferencias se bloquearon con una solución de leche desnatada al 5%, se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios y se visualizaron por medio del sistema de detección de quimioluminiscencia (ECL) mejorado (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ).

**Ejemplo 11****Resultados con ADNc de hGAA Abreviado**

10 Se mostró un elevado nivel de producción de hGAA en músculo con un vector de AAV2/6 (AAV6) que contenía el ADN de hGAA acortado (Figura 6). El nivel de hGAA en músculo esquelético con el vector de AAV6 es aproximadamente 10 veces mayor que el nivel de GAA en ratones normales. El contenido de hGAA y glicógeno se analizó en ratones con el gen GAA desactivado (GAA-KO)/SCID que fueron tratados a las 6 semanas de edad, de manera que estos niveles reflejaban la liberación de hGAA en animales adultos. El análisis se realizó 6 semanas después de la inyección intramuscular de AAV6, y demostró una tendencia a la expresión a largo plazo. Además, el contenido de glicógeno se redujo significativamente ( $p < 0,002$ ), indicando un efecto terapéuticamente relevante de este nivel de producción de hGAA en el músculo en ese momento. Además, se observó una expresión de hGAA prolongada y una reducción completa del contenido de glicógeno hasta la normalidad en el músculo gastrocnemio inyectado a las 12 semanas de la administración del vector de AAV6 (no mostrado).

20 Estos datos indican que la inyección intramuscular de vector de AAV es eficaz en la enfermedad de almacenamiento de glicógeno II.

25 Los autores de la presente invención demostraron además la secreción desde el hígado con las versiones AAV2/6 (AAV6) y AAV2/2 (AAV2) del vector que contenía el ADNc de hGAA acortado en ratones GAA-KO/SCID después de la inyección en la vena porta (**Figura 7**). El vector GAA abreviado se empaquetó dentro de la cápsida de AAV2 o AAV6 para generar dos provisiones de partida de vector diferentes. Cada provisión de partida se administró a un ratón diferente mediante inyección en la vena porta. Se detectó hGAA en el plasma de ambos ratones mediante análisis de transferencia Western. Los datos demuestran además la absorción de hGAA por el músculo esquelético y el corazón con estos vectores.

30 Estos resultados indican que el hígado puede ser utilizado como órgano de depósito para la producción de hGAA, con liberación en el músculo esquelético y corazón que da como resultado una reducción en los almacenes de glicógeno en estos tejidos debido a la absorción de GAA secretada.

**Ejemplo 12****Liberación Intramuscular Versus Intraportal de Vectores AAV en Ratones GAA-KO**

35 Un vector de AAV2 empaquetado en forma de AAV1 (AAV2/1) corrigió el almacenamiento de glicógeno cuando se inyectó intramuscularmente; sin embargo, el efecto se observó solamente en el músculo inyectado (Fraitas et al. (2002) Mol. Ther. 5:571-578). Por otra parte, cuando los autores de la presente invención administraron un vector de AAV por medio de inyección en la vena porta en ratones GAA-KO inmunodeficientes (ratones GAA-KO/SCID), se liberó GAA en el hígado y en otros tejidos (Sun et al. (2003) Mol. Ther. 2003; 7:467-477). Por lo tanto, los autores de la presente invención investigaron la diferencia en las ventajas entre la inyección intramuscular y la intraportal del vector de AAV, puesto que el último enfoque liberaba GAA en múltiples tejidos diana incluyendo los músculos esqueléticos, el diafragma y el corazón.

40 Los autores de la presente invención seleccionaron la evaluación de los beneficios de un vector de AAV que codificaba la GAA acortada dirigida al músculo esquelético o al hígado en el modelo de ratón GAA-KO/SCID. Los autores de la presente invención administraron un vector de AAV que codificaba la GAA acortada por medio de una inyección intramuscular o en la vena porta en ratones GAA-KO/SCID, y analizaron la actividad GAA y el contenido de glicógeno en los tejidos. El vector derivado de AAV2 fue empaquetado como AAV2 (AAV2/2) o AAV6 (AAV2/6) para las inyecciones en la vena porta. Basándose en la homología entre las proteínas de la cápsida de AAV6 y AAV1, se consideró probable que AAV2/6 transdujera miofibras más eficazmente que AAV2/2 (Chao et al. (2000) Mol Ther. 2:619-623; Rabinowitz et al. (2002) J. Virol. 76:791-801; Rutledge et al. (1998) J. Virol. 72:309-319). El vector de AAV2/6 fue inyectado intramuscularmente. El contenido de glicógeno y la actividad de GAA fueron analizados en los tejidos a las 6, 12, y 24 semanas de la inyección del vector.

**Resultados.**

Después de la inyección en la vena porta de un vector de AAV2/2, la GAA secretada fue detectable mediante un análisis de transferencia Western del plasma que empezó a las 2 semanas y duró 12 semanas (Datos no

mostrados). La actividad de GAA fue enormemente elevada en múltiples tejidos en comparación con los niveles de la línea base en ratones GAA-KO/SCID no tratados, y aproximadamente 10 veces mayor que los niveles de tipo salvaje en el hígado a las 12 semanas de la administración del vector (**Figura 10**). La GAA humana fue detectada mediante análisis de transferencia Western de múltiples tejidos, incluyendo, los tejidos diana del corazón y el diafragma (**Figura 11**). El análisis de enzima reveló que la actividad de GAA era concordantemente elevada en estos tejidos (**Figura 10**). Estos resultados demostraron la secreción y la absorción de GAA después de la inyección en la vena porta del vector de AAV, en concordancia con el modelo del hígado como órgano de depósito para la producción de GAA en estados de déficit de GAA como se estableció con un vector de Ad.

Después de la inyección intramuscular con el vector de AAV2/6, la actividad de GAA en el músculo gastrocnemio excedió los niveles normales aproximadamente 20 veces a las 6, 12 y 24 semanas de la administración del vector (**Figura 12**). En estos ratones el contenido de glicógeno en el músculo inyectado disminuyó hasta niveles próximos a los normales hasta durante 24 semanas después de la administración del vector, e hizo descender la acumulación de glicógeno evidenciada por el descenso de la tinción de glicógeno (**Figura 13**). A pesar del logro de una producción de GAA de alto nivel en el músculo esquelético, la actividad de GAA en otros tejidos no se incrementó considerablemente (**Figura 12**).

**Ejemplo 13**

**Vectores AAV con hGAA con Péptidos Señal Líder Alterados**

La secuencia líder peptídica (SEQ ID NO: 4, correspondiente a los aminoácidos 1-27, **SEQ ID NO: 2**) de hGAA fue remplazada por la secuencia líder peptídica sintética SP38 (Barash et al., (2002) Biochem. Biophys. Res. Comm. 294:835-42), así como las secuencias líder peptídicas de eritropoyetina, albúmina, alfa-1-antitripsina y factor IX. Las secuencias de aminoácidos de estos péptidos líder se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Secuencias de aminoácidos para los péptidos líder**

Secuencia líder	Secuencia peptídica
hGAA	MGVRHPPCSHRLLAVALVSLATAALL ( <b>SEQ ID NO: 4</b> )
SP38	MWWRLWLLLLLLLLLWPMVWA ( <b>SEQ ID NO: 5</b> )
Eritropoyetina humana	MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLG (SEQ ID NO: 6)
Albúmina humana	MKWVTFISLLFLFSSAYS ( <b>SEQ ID NO: 7</b> )
Alfa-1-antitripsina humana	MPSSVSWGILLLAGLCCCLVPVSLA ( <b>SEQ ID NO: 8</b> )
Factor IX de coagulación humano	MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKR ( <b>SEQ ID NO: 9</b> )

Los vectores plasmídicos que expresan hGAA en los cuales la secuencia líder peptídica de hGAA de tipo salvaje (**SEQ ID NO: 4**) es remplazada por los diferentes péptidos líder enumerados en la Tabla 2 fueron construidos utilizando el plásmido AVCBhGAAG-delta como se describe brevemente más abajo. Los constructos resultantes codifican un péptido GAA en el que uno de los péptidos de los **SEQ ID NO: 5-9** sustituye los primeros 27 aminoácidos del **SEQ ID NO: 1**.

**Estrategia de preparación de AVCBSP38GAAG-delta.** Se amplificó un producto de PCR de 0,37 kb de AVCBhGAAG-delta utilizando los cebadores 5'-GCT GCA **AAGCTT** ggg cac atc cta ctc cat-3' (**SEQ ID NO: 10**) y 5'-cct gca gcc cct gct ttg cag gga tgt agc-3' (**SEQ ID NO: 11**). El producto de la PCR resultante comprende secuencias de nucleótidos que codifican la región de la proteína hGAA inmediatamente aguas abajo del péptido señal de hGAA nativo (nucleótidos 523-796, **SEQ ID NO: 1**) y añade un sitio de restricción *HindIII* en el sitio de escisión del péptido señal. Este producto de PCR fue digerido con *HindIII* y *SacII* y purificado en gel para producir el fragmento I de ADN.

Un segundo fragmento de ADN que codificaba la secuencia líder de SP38, *KpnI*-SP38-*HindIII*, 5'-AGC TGC TGA **GGTACC** TCA **GCC ACC** atg tgg tgg cgc ctg tgg tgg ctg ctg ctg ctg ctg ctg tgg ccc atg gtg tgg gcc**AAGCTT** CGA TGC TAC GTC-3', **SEQ ID NO: 12**, fue hibridado con un cebador inverso, 5'-GAC GTA GCA TCG AAG CTT-3', **SEQ ID NO: 13**. El híbrido resultante fue la ADN polimerasa de Klenow ampliada en presencia de los dNTP para

formar un fragmento de ADN de doble hebra. El fragmento de ADN resultante contiene un sitio *KpnI* cerca del extremo 5' seguido de una secuencia de Kozak óptima (GCCACC) y la secuencia codificante del péptido líder SP38, seguida de un sitio *HindIII* en el extremo 3' de la secuencia de SP38. Este ADN fue digerido con *KpnI* y *HindIII* y purificado en gel para producir el fragmento II de ADN.

5 Los fragmentos I y II de ADN descritos más arriba se ligaron después en el ADN del plásmido AVCBhGAAG-delta digerido con *NpnI* y *SacI*. La mezcla de ligación resultante se utilizó para transformar células STBL2 (Gibco-BRL), y los transformantes que contenían AVCBSP38GAAG-delta se seleccionaron en presencia de antibióticos y se confirmó su estructura mediante electroforesis en gel. El constructo resultante codifica un péptido GAA en el que la secuencia líder de hGAA (SEQ ID NO: 4) ha sido remplazada por la secuencia líder de SP38 (SEQ ID NO: 5).

10 **Estrategia de preparación de AVCBSP-hEpoGAAG-delta.** El plásmido AVCBSP-hEpoGAAG-delta se preparó de la misma manera que AVCBSP38GAAG-delta, donde el fragmento II se remplazó por el producto de la digestión con *KpnI-HindIII* del fragmento de ADN de doble hebra con la secuencia 5'-AGC TGC TGA **GGTACC TCA GCC ACC** atgggggtg cacgaatgct ctgctggct gtgcttctc ctgctcctgc tgtcgtccc tctgggctc ccagctctgg gc **AAGCTT** CGA TGC TAC GTC-3' (SEQ ID NO: 14). El constructo resultante codifica un péptido GAA en el que la secuencia líder de hGAA (SEQ ID NO: 4) ha sido sustituida por la secuencia líder de hEPO (SEQ ID NO: 6).

15 **Estrategia de preparación de AVCBSPantitripsinaGAAG-delta.** Se preparó el plásmido AVCBSPantitripsinaGAAG-delta de la misma manera que AVCBSP38GAAG-delta, utilizando el producto de la digestión con *KpnI-HindIII* del fragmento de ADN de doble hebra con la secuencia 5'-C TGAGGTACC T **GCA ACC-** at gccgtctct gtctctggg gcatcctct gctggcaggc ctgtgctgcc tggctcctgt ctccctggct-**AAGCTT** CGA T-3' (SEQ ID NO: 15) en lugar del fragmento II. El constructo resultante codifica un péptido GAA en el que la secuencia líder de hGAA (SEQ ID NO: 4) ha sido remplazada por la secuencia líder de la alfa-1-antitripsina humana (SEQ ID NO: 7).

20 **Estrategia de preparación de AVCBSPALBGAAG-delta.** Se preparó AVCBSPALBGAAG-delta de la misma manera que AVCBSP38GAAG-delta, utilizando el producto de la digestión con *KpnI-HindIII* del fragmento de ADN de doble hebra con la secuencia 5'-C TGA **GGTACC T GCC ACC-a** tgaagtgggt aacctttatt tccctctt **ttctcttag ctcggcttat** tcc-**AAGCTT** CGA T-3' (SEQ ID NO: 16) en lugar del fragmento II. El constructo resultante codifica un péptido GAA en el que la secuencia líder de hGAA (SEQ ID NO: 4) ha sido remplazada por la secuencia líder de la albúmina humana (SEQ ID NO: 8).

25 **Estrategia de preparación de AVCBSPFIXGAAG-delta.** Por último, se preparó AVCBSPFIXGAAG-delta de la misma manera que AVCBSP38GAAG-delta, utilizando el producto de la digestión con *KpnI-HindIII* del fragmento de ADN de doble hebra con la secuencia 5'-C TGA **GGTACC T GCC ACC** atgcagcgcg tgaacatgat catggca-3' (SEQ ID NO: 17) en lugar del fragmento II. El constructo resultante codifica un péptido GAA en el que la secuencia líder de hGAA (SEQ ID NO: 4) ha sido remplazada por la secuencia líder del factor IX humano (SEQ ID NO: 9).

Los plásmidos resultantes se utilizaron para examinar el efecto de diferentes secuencias líder sobre la localización de hGAA en células transfectadas con estos plásmidos.

35 **Ejemplo 14**

**Secreción Relativa de hGAA con las Secuencias Líder Alteradas en Células 293**

Se transfectaron células 293 con plásmidos con el vector de AAV descritos en el Ejemplo 13 y se recogieron 40 horas después de la transfección. Se analizó la actividad de hGAA total tanto en las células como en el medio. Estos resultados se representan en la **Figura 14** y la secreción de hGAA relativa se resume en la **Tabla 3**.

40

**Tabla 3. Secreción de hGAA con diferentes secuencias líder**

Secuencia líder	Proporción de hGAA secretada (hGAA del medio/hGAA de las células)	% de hGAA total secretada	Aumento de secreción de hGAA (veces)
HGAA	0,53	34	N/A
SP38.1	9,7	91	18
Epo	1,1	53	2,1
α-1-antitripsina	8,5	90	16

Secuencia líder	Proporción de hGAA secretada (hGAA del medio/hGAA de las células)	% de hGAA total secretada	Aumento de secreción de hGAA (veces)
Factor IX	14	93	26

El análisis de transferencia Western de la hGAA celular y secretada en las células 293 transfectadas con plásmidos vectores AAV descritos en el **Ejemplo 13** demostraron una migración normal, en concordancia con la glicosilación y el procesamiento no alterados de la hGAA química conectada con péptidos señal alternativos (**Figura 15**). Estos datos apoyaron la glicosilación normal de hGAA, a pesar del aumento de secreción y de la permanencia presumiblemente acortada en el aparato de Golgi (Wisselaar et al., (1993) J. Biol. Chem 268 (3): 2223-31). Para una nueva evidencia de la glicosilación normal de la hGAA producida con estos constructos, los autores de la presente invención inyectaron en ratones el vector de AAV2/8 que codificaba el péptido señal de la  $\alpha$ -1-antitripsina química conectado al ADNc de hGAA (menos el péptido señal de GAA de 27 aminoácidos), y se detectó la hGAA correspondiente al precursor de hGAA de ~110 kD (**Figura 16**). El nivel de hGAA fue menor para ratones hembra (calles 5-7 y 11-13), como se esperaba dada la transducción inferior con los vectores AAV2/8 en ratones hembra. De una manera significativa, la secreción de hGAA fue mayor para el vector que contenía el péptido señal de la  $\alpha$ -1-antitripsina (calles 2-7), que para el vector que contenía el péptido señal de hGAA (calles 8-13).

La actividad de GAA tisular se incrementó en los tejidos de 3 ratones GAA-KO/SCID macho que recibieron el vector de AAV que codificaba el péptido señal de la alfa-1-antitripsina unido a hGAA (correspondiente a las calles 2-5 de la **Figura 16**). De una manera significativa, la actividad de GAA en el hígado permaneció en niveles próximos a los normales, a pesar del aumento de actividad de GAA en los tejidos en comparación con los controles (**Figura 17**). Estos resultados se obtuvieron solamente 2 semanas después de la administración del vector, en oposición al momento de 6 semanas después utilizado en los otros experimentos, e indicaron la absorción temprana de la GAA secretada en los tejidos diana de corazón, diafragma, y a niveles más bajos, músculo esquelético. Se espera que la absorción de GAA en los tejidos diana aumente al cabo de 2 semanas, basándose en los resultados anteriores. Finalmente, una transferencia Western de los tejidos diana mostró un procesamiento apropiado de hGAA a ~76 kD y ~67 kD (datos no mostrados). Estos datos apoyan la hipótesis de que la hGAA química unida a péptidos señal alternativos será apropiadamente secretada, procesada y dirigida a los lisosomas de los tejidos diana, a pesar de conservar los niveles normales de GAA en el hígado. Este nuevo progreso reducirá cualquier toxicidad potencial de la expresión en exceso de hGAA en el órgano de depósito, el hígado, en contraste con todos los enfoques anteriores para la terapia génica dirigida al hígado en la enfermedad de Pompe que producían niveles supra-fisiológicos extremos de GAA en el hígado.

#### Ejemplo 15

#### 30 **Expresión de hGAA con un promotor específico del hígado en Ratones GAA-KO Inmunocompetentes**

Se administró intravenosamente un vector de AAV2/8 que codificaba hGAA dirigido por un promotor específico de hígado (Wang L et al., (1999) Proc Nat Acad Sci USA 96:3906-10) en ratones GAA-KO. Al contrario que en los experimentos anteriores, en los que la hGAA se eliminaba del plasma por medio de anticuerpos anti-GAA en ratones GAA-KO inmunocompetentes, la hGAA permaneció en el plasma según se detectó mediante análisis de transferencia Western (**Figura 18**). Por lo tanto, la limitación de la expresión de GAA en el hígado eliminó la respuesta de los anticuerpos y permitió una secreción duradera de GAA con implicaciones para la terapia génica en la enfermedad de Pompe.

Lo anterior es ilustrativo de la presente invención, y no se debe considerar limitante de la misma. La invención se define por medio de las siguientes reivindicaciones, incluyendo en ella los equivalentes de las reivindicaciones.

40

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Koeberl, Dwight D.  
 Sun, Baodong  
 <120> CONSTRUCTOS MEJORADOS PARA EXPRESAR POLIPÉPTIDOS LISOSOMALES  
 <130> 5405-280  
 <150> US 60/441,789  
 10 <151> 2003-01-22  
 <160> 17  
 <170> PatentIn versión 3.2  
 <210> 1  
 15 <211> 3846  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 20 <221> CDS  
 <222> (442)..(3300)  
 <400> 1  
 ggcgctgctg gggaggccgc gtcacgtgac ccaccgcggc cccgccccgc gacgagctcc 60  
 cgccgggtcac gtgaccgcgc tctgcgcgcc cccgggcacg accccggagt ctccgcgggc 120  
 ggccagggcg cgcgtgcgcg gaggtgagcc gggccggggc tgcggggctt ccctgagcgc 180  
 gggccgggtc ggtggggcgg tcggctgcc gcgccggcct ctcagttggg aaagctgagg 240  
 ttgtcgcggg ggccgcgggt ggaggtcggg gatgaggcag caggtaggac agtgacctcg 300  
 gtgacgcgaa ggaccccggc cacctctagg ttctcctcgt ccgcccgttg ttcagcgagg 360  
 gaggtctctg gcctgccgca gctgacgggg aaactgaggc acggagcggg cctgtaggag 420  
 ctgtccaggc catctccaac c atg gga gtg agg cac ccg ccc tgc tcc cac 471  
 Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His  
 1 5 10  
 cgg ctc ctg gcc gtc tgc gcc ctc gtg tcc ttg gca acc gct gca ctc 519  
 Arg Leu Leu Ala Val Cys Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu  
 15 20 25  
 ctg ggg cac atc cta ctc cat gat ttc ctg ctg gtt ccc cga gag ctg 567  
 Leu Gly His Ile Leu Leu His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu  
 30 35 40  
 agt ggc tcc tcc cca gtc ctg gag gag act cac cca gct cac cag cag 615  
 Ser Gly Ser Ser Pro Val Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln  
 45 50 55  
 gga gcc agc aga cca ggg ccc cgg gat gcc cag gca cac ccc ggc cgt 663  
 Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg  
 60 65 70

ES 2 371 913 T3

ccc aga gca gtg ccc aca cag tgc gac gtc ccc ccc aac agc cgc ttc Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe 75 80 85 90	711
gat tgc gcc cct gac aag gcc atc acc cag gaa cag tgc gag gcc cgc Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg 95 100 105	759
ggc tgc tgc tac atc cct gca aag cag ggg ctg cag gga gcc cag atg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met 110 115 120	807
ggg cag ccc tgg tgc ttc ttc cca ccc agc tac ccc agc tac aag ctg Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu 125 130 135	855
gag aac ctg agc tcc tct gaa atg ggc tac acg gcc acc ctg acc cgt Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg 140 145 150	903
acc acc ccc acc ttc ttc ccc aag gac atc ctg acc ctg cgg ctg gac Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp 155 160 165 170	951
gtg atg atg gag act gag aac cgc ctc cac ttc acg atc aaa gat cca Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro 175 180 185	999
gct aac agg cgc tac gag gtg ccc ttg gag acc ccg cgt gtc cac agc Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser 190 195 200	1047
cgg gca ccg tcc cca ctc tac agc gtg gag ttc tcc gag gag ccc ttc Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe 205 210 215	1095
ggg gtg atc gtg cac cgg cag ctg gac ggc cgc gtg ctg ctg aac acg Gly Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr 220 225 230	1143
acg gtg gcg ccc ctg ttc ttt gcg gac cag ttc ctt cag ctg tcc acc Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr 235 240 245 250	1191
tcg ctg ccc tcg cag tat atc aca ggc ctc gcc gag cac ctc agt ccc Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro 255 260 265	1239
ctg atg ctc agc acc agc tgg acc agg atc acc ctg tgg aac cgg gac Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp 270 275 280	1287
ctt gcg ccc acg ccc ggt gcg aac ctc tac ggg tct cac cct ttc tac Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr 285 290 295	1335
ctg gcg ctg gag gac ggc ggg tcg gca cac ggg gtg ttc ctg cta aac Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn 300 305 310	1383
agc aat gcc atg gat gtg gtc ctg cag ccg agc cct gcc ctt agc tgg	1431

ES 2 371 913 T3

Ser 315	Asn	Ala	Met	Asp	Val 320	Val	Leu	Gln	Pro	Ser 325	Pro	Ala	Leu	Ser	Trp 330	
agg	tcg	aca	ggg	ggg	atc	ctg	gat	gtc	tac	atc	ttc	ctg	ggc	cca	gag	1479
Arg	Ser	Thr	Gly	Gly 335	Ile	Leu	Asp	Val	Tyr 340	Ile	Phe	Leu	Gly	Pro 345	Glu	
ccc	aag	agc	gtg	gtg	cag	cag	tac	ctg	gac	gtt	gtg	gga	tac	ccg	ttc	1527
Pro	Lys	Ser	Val 350	Val	Gln	Gln	Tyr	Leu 355	Asp	Val	Val	Gly	Tyr 360	Pro	Phe	
atg	ccg	cca	tac	tgg	ggc	ctg	ggc	ttc	cac	ctg	tgc	cgc	tgg	ggc	tac	1575
Met	Pro	Pro	Tyr 365	Trp	Gly	Leu	Gly 370	Phe	His	Leu	Cys	Arg 375	Trp	Gly	Tyr	
tcc	tcc	acc	gct	atc	acc	cgc	cag	gtg	gtg	gag	aac	atg	acc	agg	gcc	1623
Ser	Ser	Thr	Ala	Ile	Thr	Arg 385	Gln	Val	Val	Glu	Asn 390	Met	Thr	Arg	Ala	
380																
cac	ttc	ccc	ctg	gac	gtc	caa	tgg	aac	gac	ctg	gac	tac	atg	gac	tcc	1671
His	Phe	Pro	Leu	Asp 400	Val	Gln	Trp	Asn	Asp 405	Leu	Asp	Tyr	Met	Asp 410	Ser	
395																
cgg	agg	gac	ttc	acg	ttc	aac	aag	gat	ggc	ttc	cgg	gac	ttc	ccg	gcc	1719
Arg	Arg	Asp	Phe 415	Thr	Phe	Asn	Lys	Asp 420	Gly	Phe	Arg	Asp	Phe 425	Pro	Ala	
atg	gtg	cag	gag	ctg	cac	cag	ggc	ggc	cgg	cgc	tac	atg	atg	atc	gtg	1767
Met	Val	Gln	Glu 430	Leu	His	Gln	Gly	Gly 435	Arg	Arg	Tyr	Met 440	Met	Ile	Val	
gat	cct	gcc	atc	agc	agc	tcg	ggc	cct	gcc	ggg	agc	tac	agg	ccc	tac	1815
Asp	Pro	Ala 445	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly 450	Pro	Ala	Gly	Ser 455	Tyr	Arg	Pro	Tyr	
gac	gag	ggg	ctg	cgg	agg	ggg	ggt	ttc	atc	acc	aac	gag	acc	ggc	cag	1863
Asp	Glu	Gly 460	Leu	Arg	Arg	Gly 465	Val	Phe	Ile	Thr 470	Asn	Glu	Thr	Gly	Gln	
ccg	ctg	att	ggg	aag	gta	tgg	ccc	ggg	tcc	act	gcc	ttc	ccc	gac	ttc	1911
Pro	Leu	Ile	Gly	Lys 480	Val	Trp	Pro	Gly	Ser 485	Thr	Ala	Phe	Pro	Asp	Phe 490	
acc	aac	ccc	aca	gcc	ctg	gcc	tgg	tgg	gag	gac	atg	gtg	gct	gag	ttc	1959
Thr	Asn	Pro	Thr 495	Ala	Leu	Ala	Trp	Trp	Glu 500	Asp	Met	Val	Ala	Glu 505	Phe	
cat	gac	cag	gtg	ccc	ttc	gac	ggc	atg	tgg	att	gac	atg	aac	gag	cct	2007
His	Asp	Gln	Val 510	Pro	Phe	Asp	Gly 515	Met	Trp	Ile	Asp	Met 520	Asn	Glu	Pro	
tcc	aac	ttc	atc	aga	ggc	tct	gag	gac	ggc	tgc	ccc	aac	aat	gag	ctg	2055
Ser	Asn	Phe 525	Ile	Arg	Gly	Ser	Glu 530	Asp	Gly	Cys	Pro	Asn 535	Asn	Glu	Leu	
gag	aac	cca	ccc	tac	gtg	cct	ggg	gtg	ggt	ggg	ggg	acc	ctc	cag	gcg	2103
Glu	Asn	Pro 540	Pro	Tyr	Val 545	Pro	Gly	Val	Val	Gly 550	Gly	Thr	Leu	Gln	Ala	
gcc	acc	atc	tgt	gcc	tcc	agc	cac	cag	ttt	ctc	tcc	aca	cac	tac	aac	2151
Ala	Thr	Ile	Cys	Ala	Ser	Ser	His	Gln	Phe	Leu	Ser	Thr	His	Tyr	Asn	

ES 2 371 913 T3

555	560	565	570	
ctg cac aac ctc tac ggc ctg acc gaa gcc atc gcc tcc cac agg gcg Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala 575 580 585				2199
ctg gtg aag gct cgg ggg aca cgc cca ttt gtg atc tcc cgc tcg acc Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr 590 595 600				2247
ttt gct ggc cac ggc cga tac gcc ggc cac tgg acg ggg gac gtg tgg Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp 605 610 615				2295
agc tcc tgg gag cag ctc gcc tcc tcc gtg cca gaa atc ctg cag ttt Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe 620 625 630				2343
aac ctg ctg ggg gtg cct ctg gtc ggg gcc gac gtc tgc ggc ttc ctg Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu 635 640 645 650				2391
ggc aac acc tca gag gag ctg tgt gtg cgc tgg acc cag ctg ggg gcc Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala 655 660 665				2439
ttc tac ccc ttc atg cgg aac cac aac agc ctg ctc agt ctg ccc cag Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln 670 675 680				2487
gag ccg tac agc ttc agc gag ccg gcc cag cag gcc atg agg aag gcc Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala 685 690 695				2535
ctc acc ctg cgc tac gca ctc ctc ccc cac ctc tac aca ctg ttc cac Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His 700 705 710				2583
cag gcc cac gtc gcg ggg gag acc gtg gcc cgg ccc ctc ttc ctg gag Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu 715 720 725 730				2631
ttc ccc aag gac tct agc acc tgg act gtg gac cac cag ctc ctg tgg Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp 735 740 745				2679
ggg gag gcc ctg ctc atc acc cca gtg ctc cag gcc ggg aag gcc gaa Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu 750 755 760				2727
gtg act ggc tac ttc ccc ttg ggc aca tgg tac gac ctg cag acg gtg Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val 765 770 775				2775
cca ata gag gcc ctt ggc agc ctc cca ccc cca cct gca gct ccc cgt Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg 780 785 790				2823
gag cca gcc atc cac agc gag ggg cag tgg gtg acg ctg ccg gcc ccc Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro 795 800 805 810				2871

ES 2 371 913 T3

ctg gac acc atc aac gtc cac ctc cgg gct ggg tac atc atc ccc ctg	2919
Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu	
815 820 825	
cag ggc cct ggc ctc aca acc aca gag tcc cgc cag cag ccc atg gcc	2967
Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala	
830 835 840	
ctg gct gtg gcc ctg acc aag ggt gga gag gcc cga ggg gag ctg ttc	3015
Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe	
845 850 855	
tgg gac gat gga gag agc ctg gaa gtg ctg gag cga ggg gcc tac aca	3063
Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr	
860 865 870	
cag gtc atc ttc ctg gcc agg aat aac acg atc gtg aat gag ctg gta	3111
Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val	
875 880 885 890	
cgt gtg acc agt gag gga gct ggc ctg cag ctg cag aag gtg act gtc	3159
Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val	
895 900 905	
ctg ggc gtg gcc acg gcg ccc cag cag gtc ctc tcc aac ggt gtc cct	3207
Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro	
910 915 920	
gtc tcc aac ttc acc tac agc ccc gac acc aag gtc ctg gac atc tgt	3255
Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys	
925 930 935	
gtc tcg ctg ttg atg gga gag cag ttt ctc gtc agc tgg tgt tag	3300
Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys	
940 945 950	
ccgggcccagag tgtgttagtc tctccagagg gaggctgggt ccccagggaa gcagagcctg	3360
tgtgcccggca gcagctgtgt gcgggcctgg gggttgcatg tgtcacctgg agctgggcac	3420
taaccattcc aagccgccgc atcgcttggt tccacctcct gggccggggc tctggccccc	3480
aacgtgtcta ggagagcttt ctccctagat cgcactgtgg gccggggcct ggagggctgc	3540
tctgtgtaa taagattgta aggtttgccc tcctcacctg ttgccggcat gcgggtagta	3600
ttagccaccc cctccatct gttcccagca ccggagaagg ggggtgctcag gtggaggtgt	3660
ggggtatgca cctgagctcc tgcttcgcgc ctgctgctct gcccacacgc gaccgcttcc	3720
cggtgcccga gagggtgga tgcttgccgg tcccagagca agcctgggaa ctcaggaaaa	3780
ttcacaggac ttgggagatt ctaaattotta agtgcaatta ttttaataaa aggggcattt	3840
ggaatc	3846

<210> 2  
 <211> 952  
 <212> PRT

ES 2 371 913 T3

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys  
1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu  
20 25 30

His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val  
35 40 45

Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly  
50 55 60

Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr  
65 70 75 80

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys  
85 90 95

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro  
100 105 110

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe  
115 120 125

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser  
130 135 140

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe  
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu  
165 170 175

Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu  
180 185 190

Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu  
195 200 205

Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg  
210 215 220

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe

ES 2 371 913 T3

225					230						235					240
Phe	Ala	Asp	Gln	Phe	Leu	Gln	Leu	Ser	Thr	Ser	Leu	Pro	Ser	Gln	Tyr	
				245					250					255		
Ile	Thr	Gly	Leu	Ala	Glu	His	Leu	Ser	Pro	Leu	Met	Leu	Ser	Thr	Ser	
			260					265					270			
Trp	Thr	Arg	Ile	Thr	Leu	Trp	Asn	Arg	Asp	Leu	Ala	Pro	Thr	Pro	Gly	
		275					280					285				
Ala	Asn	Leu	Tyr	Gly	Ser	His	Pro	Phe	Tyr	Leu	Ala	Leu	Glu	Asp	Gly	
	290					295					300					
Gly	Ser	Ala	His	Gly	Val	Phe	Leu	Leu	Asn	Ser	Asn	Ala	Met	Asp	Val	
305					310					315					320	
Val	Leu	Gln	Pro	Ser	Pro	Ala	Leu	Ser	Trp	Arg	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	
				325					330					335		
Leu	Asp	Val	Tyr	Ile	Phe	Leu	Gly	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Val	Val	Gln	
			340					345					350			
Gln	Tyr	Leu	Asp	Val	Val	Gly	Tyr	Pro	Phe	Met	Pro	Pro	Tyr	Trp	Gly	
		355					360					365				
Leu	Gly	Phe	His	Leu	Cys	Arg	Trp	Gly	Tyr	Ser	Ser	Thr	Ala	Ile	Thr	
	370					375					380					
Arg	Gln	Val	Val	Glu	Asn	Met	Thr	Arg	Ala	His	Phe	Pro	Leu	Asp	Val	
385					390					395					400	
Gln	Trp	Asn	Asp	Leu	Asp	Tyr	Met	Asp	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Thr	Phe	
				405					410					415		
Asn	Lys	Asp	Gly	Phe	Arg	Asp	Phe	Pro	Ala	Met	Val	Gln	Glu	Leu	His	
			420					425					430			
Gln	Gly	Gly	Arg	Arg	Tyr	Met	Met	Ile	Val	Asp	Pro	Ala	Ile	Ser	Ser	
		435					440					445				
Ser	Gly	Pro	Ala	Gly	Ser	Tyr	Arg	Pro	Tyr	Asp	Glu	Gly	Leu	Arg	Arg	
	450					455					460					
Gly	Val	Phe	Ile	Thr	Asn	Glu	Thr	Gly	Gln	Pro	Leu	Ile	Gly	Lys	Val	
465					470					475					480	

ES 2 371 913 T3

Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu  
485 490 495

Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe  
500 505 510

Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly  
515 520 525

Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val  
530 535 540

Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser  
545 550 555 560

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly  
565 570 575

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly  
580 585 590

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg  
595 600 605

Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu  
610 615 620

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro  
625 630 635 640

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu  
645 650 655

Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg  
660 665 670

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser  
675 680 685

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala  
690 695 700

Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly  
705 710 715 720

ES 2 371 913 T3

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser  
 725 730 735  
 Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile  
 740 745 750  
 Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro  
 755 760 765  
 Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly  
 770 775 780  
 Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser  
 785 790 795 800  
 Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val  
 805 810 815  
 His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr  
 820 825 830  
 Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr  
 835 840 845  
 Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser  
 850 855 860  
 Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala  
 865 870 875 880  
 Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly  
 885 890 895  
 Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala  
 900 905 910  
 Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr  
 915 920 925  
 Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly  
 930 935 940  
 Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys  
 945 950

ES 2 371 913 T3

<210> 3  
 <211> 3026  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3  
 gcctgtagga gctgtccagg ccatctccaa ccatgggagt gaggcacccg ccctgctccc 60  
 accggtcctt ggccgtctgc gccctcgtgt ccttggcaac cgctgcactc ctggggcaca 120  
 tcctactcca tgatttctct ctggttcccc gagagctgag tggctcctcc ccagtctctg 180  
 aggagactca cccagctcac cagcagggag ccagcagacc agggccccgg gatgccagg 240  
 cacaccccgg ccgtcccaga gcagtgccca cacagtgcga cgtccccccc aacagccgct 300  
 tcgattgctc ccctgacaag gccatcacc aggaacagtg cgaggcccgc ggctgctgct 360  
 acatccctgc aaagcagggg ctgcagggag cccagatggg gcagccctgg tgcttcttcc 420  
 caccagctta ccccagctac aagctggaga acctgagctc ctctgaaatg ggctacacgg 480  
 ccaccctgac ccgtaccacc cccaccttct tcccgaagga catcctgacc ctgaggctgg 540  
 acgtgatgat ggagactgag aaccgcctcc acttcacgat caaagatcca gctaacaggc 600  
 gctacgaggt gcccttggag accccgcgtg tccacagccg ggcaccgtcc cactctaca 660  
 gcgtggagtt ctccgaggag cccttcgggg tgatcgtgca ccggcagctg gacggccgct 720  
 tgctgctgaa cagcagcgtg gcgcccctgt tctttgcgga ccagttcctt cagctgtcca 780  
 cctcgtgccc ctgcagctat atcacaggcc tcgccgagca cctcagtccc ctgatgctca 840  
 gcaccagctg gaccaggatc accctgtgga accgggacct tgcgccacg cccgggtgca 900  
 acctctacgg gtctcacctt ttctacctgg cgtcggagga cggcgggtcg gcacacgggg 960  
 tgcttctgct aaacagcaat gccatggatg tggctcctgca gccgagccct gcccttagct 1020  
 ggaggtcgac aggtgggatc ctggatgtct acatcttctt gggcccagag cccaagagcg 1080  
 tgggtgcagca gtacctggac gttgtgggat acccgttcat gccgccatac tggggcctgg 1140  
 gcttccacct gtgcgctggg ggctactcct ccaccgctat caccgccag gtggtggaga 1200  
 acatgaccag ggcccacttc cccctggacg tccaatgaa cgacctggac tacatggact 1260  
 cccggagggg cttcacgttc aacaaggatg gcttccggga cttcccggcc atggtgcagg 1320  
 agctgcacca gggcggccgg cgctacatga tgatcgtgga tcctgccatc agcagctcgg 1380  
 gccctgccgg gagctacagg ccctacgacg aggtctctgc gaggggggtt tcatcacca 1440  
 acgagaccgg ccagccgctg attgggaagg tatggcccgg gtccactgcc tccccgact 1500  
 tcaccaaccc cacagccctg gcctgggtgg aggacatggt ggctgagttc catgaccagg 1560  
 tgcctctcga cggcatgtgg attgacatga acgagccttc caacttcac agaggctctg 1620  
 aggacggctg cccaacaat gagctggaga acccacccta cgtgcctggg gtggttgggg 1680

ES 2 371 913 T3

ggaccctcca ggcggccacc atctgtgcct ccagccacca gtttctctcc acacactaca 1740  
 acctgcacaa cctctacggc ctgaccgaag ccatcgcctc ccacagggcg ctggtgaagg 1800  
 ctcgggggac acgcccattt gtgatctccc gctcgacctt tgctggccac ggccgatacg 1860  
 ccggccactg gacgggggac gtgtggagct cctgggagca gctcgcctcc tccgtgccag 1920  
 aaatcctgca gtttaacctg ctgggggtgc ctctggtcgg ggccgacgtc tgcggcttcc 1980  
 tgggcaacac ctcagaggag ctgtgtgtgc gctggaccca gctggggggc ttctaccct 2040  
 tcatgcggaa ccacaacagc ctgctcagtc tgccccagga gccgtacagc ttcagcgagc 2100  
 cggcccagca ggccatgagg aaggccctca ccctgcgcta cgcactcctc cccacctct 2160  
 acacactggt ccaccaggcc cacgtcggcg gggagaccgt ggcccggccc ctcttctctg 2220  
 agttccccaa ggactctagc acctggactg tggaccacca gctcctgtgg ggggaggccc 2280  
 tgctcatcac ccagtgctc caggccggga aggccgaagt gactggctac ttccccttgg 2340  
 gcacatggta cgacctgcag acggtgcca tagaggccct tggcagcctc ccacccccac 2400  
 ctgcagctcc ccgtgagcca gccatccaca gcgaggggca gtgggtgacg ctgccggccc 2460  
 ccctggacac catcaacgtc cacctccggg ctgggtacat catccccctg cagggccctg 2520  
 gcctcacaac cacagagtcc cgccagcagc ccatggccct ggctgtggcc ctgaccaagg 2580  
 gtggagaggc ccgaggggag ctgttctggg acgatggaga gagcctggaa gtgctggagc 2640  
 gaggggccta cacacaggtc atcttctctg ccaggaataa cacgatcgtg aatgagctgg 2700  
 tacgtgtgac cagtgagga gctggcctgc agctgcagaa ggtgactgtc ctgggcgtgg 2760  
 ccacggcgcc ccagcaggtc ctctccaacg gtgtccctgt ctccaacttc acctacagcc 2820  
 ccgacaccaa ggtcctggac atctgtgtct cgctgttgat gggagagcag tttctcgtca 2880  
 gctggtgta gccgggcgga gtgtgttagt ctctccagag ggaggctggt tccccaggga 2940  
 agcagagcct gtgtgcgggc agcagctgtg tgccggcctg ggggttgta agtgcaatta 3000  
 ttttaataaa aggggcattt ggaatc 3026

<210> 4  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu  
 20 25

10 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Señal secretora artificial  
 15 <400> 5

ES 2 371 913 T3

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp  
1 5 10 15

Pro Met Val Trp Ala  
20

<210> 6

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu  
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly  
20 25

<210> 7

10 <211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
1 5 10 15

Tyr Ser

15

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 8

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys  
1 5 10 15

Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala  
20

25

<210> 9

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 9

ES 2 371 913 T3

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr  
 1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu  
 20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg  
 35 40 45

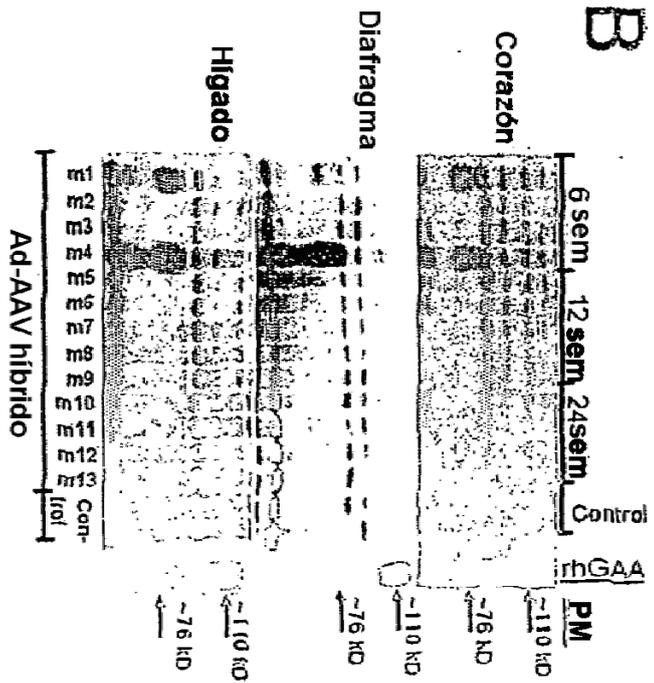
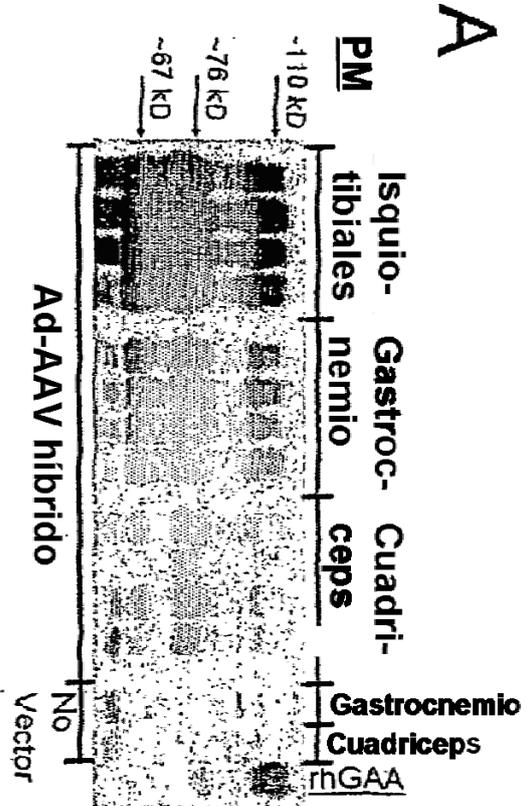
- 5 <210> 10
- <211> 30
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Cebador del oligonucleotido sintético
  
- 10 <400> 10
- gctgcaaagc ttggcacat cctactccat 30
  
- <210> 11
- <211> 30
- 15 <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Cebador del oligonucleotido sintético
  
- 20 <400> 11
- cctgcagccc ctgcttgca gggatgtagc 30
  
- <210> 12
- <211> 105
- 25 <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Oligonucleotido sintético
  
- 30 <400> 12
- agctgctgag gtacctcagc caccatgtgg tggcgcctgt ggtggctgct gctgctgctg 60
- ctgctgctgt ggcccatggt gtgggccaag cttcagatgct acgtc 105
  
- <210> 13
- <211> 18
- 35 <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Cebador del oligonucleotido sintético
  
- 40 <400> 13
- gacgtagcat cgaagctt 18
- <210> 14
- 45 <211> 123
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Oligonucleotido sintético
  
- 50 <400> 14

ES 2 371 913 T3

	agctgctgag gtacctcagc caccatgggg gtgcacgaat gtcctgcctg gctgtggctt	60
	ctcctgtccc tgctgtogct cctctctgggc ctcccagtc tgggcaagct tcgatgctac	120
	gtc	123
5	<210> 15 <211> 99 <212> DNA <213> Secuencia Artificial <220> <223> Oligonucleotido sintético	
10	<400> 15 ctgaggtacc tgccaccatg ccgtcttctg tctcgtgggg catcctcctg ctggcaggcc	60
	tgtgctgcct ggtccctgtc tccctggcta agcttcgat	99
15	<210> 16 <211> 81 <212> DNA <213> Secuencia Artificial <220> <223> Oligonucleotido sintético	
20	<400> 16 ctgaggtacc tgccaccatg aagtgggtaa cctttatttc ccttcttttt ctcttttagct	60
	cggttatttc caagcttcga t	81
25	<210> 17 <211> 44 <212> DNA <213> Secuencia Artificial <220> <223> Oligonucleotido sintético	
30	<400> 17 ctgaggtacc tgccaccatg cagcgcgtga acatgatcat ggca	44

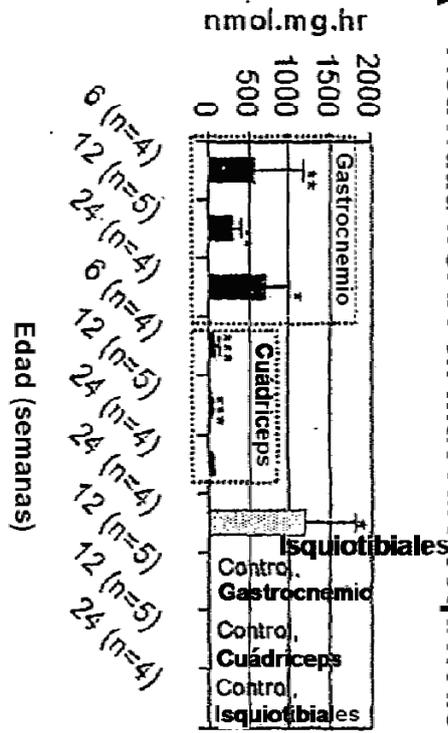
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico que comprende una secuencia señal secretora de  $\alpha$ 1-antitripsina representada por el SEQ ID NO: 8 unida operablemente a un polipéptido de  $\alpha$ -glucosidasa ácida lisosomal (GAA) donde dicha secuencia señal secretora sustituye los primeros 27 aminoácidos del SEQ ID NO: 2 del polipéptido de GAA lisosomal nativo.
2. El vector de la Reivindicación 1, donde dicho ácido nucleico está unido operablemente a un elemento de control de la transcripción operable en células del hígado.
3. Una formulación farmacéutica que comprende el vector de cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2 en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 4. Una célula que comprende el vector de cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2.
5. Un polipéptido quimérico que comprende una secuencia señal secretora de la  $\alpha$ 1-antitripsina representada por el SEQ ID NO: 8 unida operablemente a un polipéptido de GAA lisosomal, donde dicha secuencia señal secretora sustituye los primeros 27 aminoácidos del SEQ ID NO: 2 del polipéptido de GAA lisosomal nativo.
- 15 6. Un método de liberación *in-vitro* de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de GAA lisosomal en una célula, que comprende poner en contacto una célula *in-vitro* con un vector de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2 en condiciones suficientes para que el vector sea introducido en la célula y para que el ácido nucleico sea expresado para producir el polipéptido quimérico que comprende la secuencia señal secretora de la  $\alpha$ 1-antitripsina representada por el SEQ ID NO: 8 unida operablemente al polipéptido de GAA lisosomal donde dicha secuencia señal secretora sustituye los primeros 27 aminoácidos del SEQ ID NO: 2 del polipéptido de GAA lisosomal nativo.
- 20 7. Un método de producción de un polipéptido de  $\alpha$ -glucosidasa lisosomal (GAA) en una célula cultivada, que comprende:
  - 25 poner en contacto una célula cultivada con un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en condiciones suficientes para que el vector sea introducido en la célula cultivada y para que el ácido nucleico sea expresado para producir el polipéptido quimérico que comprende la secuencia señal secretora de la  $\alpha$ 1-antitripsina representada por el SEQ ID NO: 8 unida operablemente al polipéptido de GAA donde dicha secuencia señal secretora sustituye los primeros 27 aminoácidos del SEQ ID NO: 2 del polipéptido de GAA lisosomal nativo y el polipéptido de GAA es secretado desde la célula de cultivo, y
  - recoger el polipéptido de GAA secretado al medio de cultivo celular.
- 30 8. Un vector de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 3 o una célula de acuerdo con la Reivindicación 4, para su uso en el tratamiento del déficit de un polipéptido de GAA lisosomal en un sujeto que padece la Enfermedad de Pompe.
- 35 9. El uso de un vector de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2 o una célula de acuerdo con la Reivindicación 4, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un déficit de un polipéptido de GAA lisosomal en un sujeto que padece la Enfermedad de Pompe.
10. El uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 8 o 9, donde el vector es liberado en el hígado.

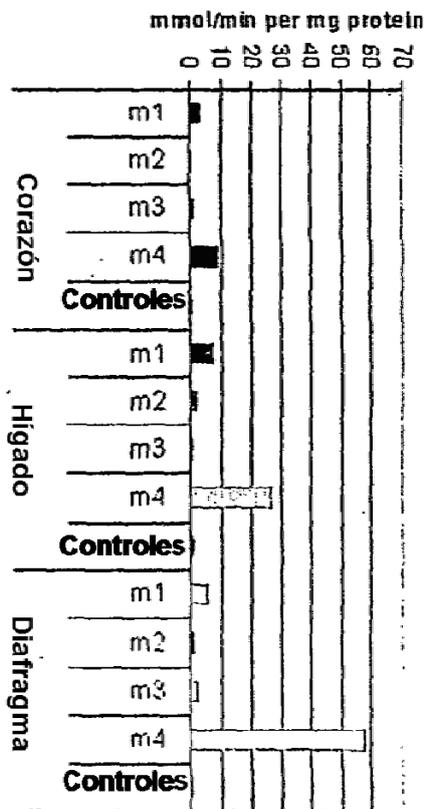


**FIG. 1**

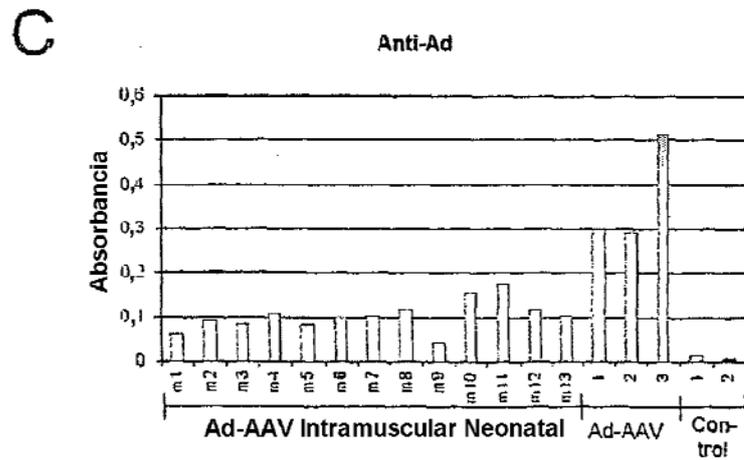
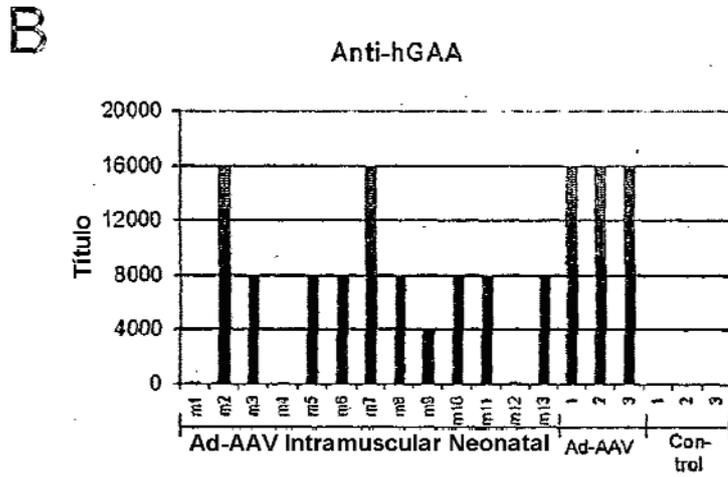
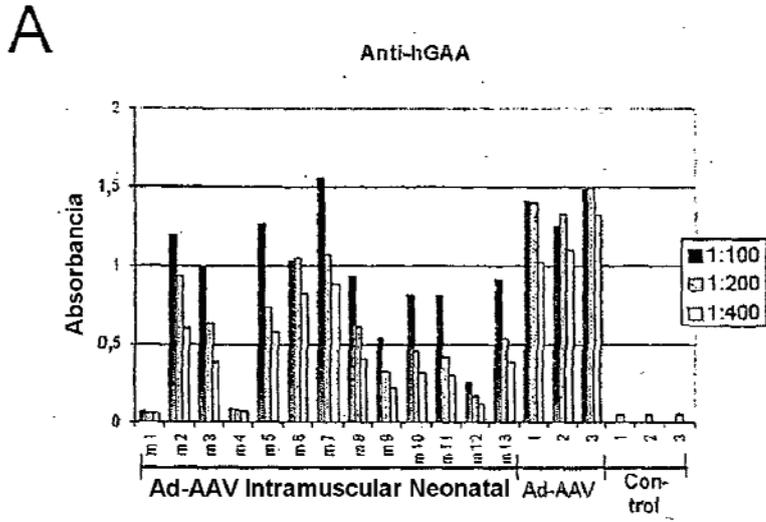
**A** Actividad hGAA en músculo esquelético



**B** Actividad hGAA a las 6 semanas



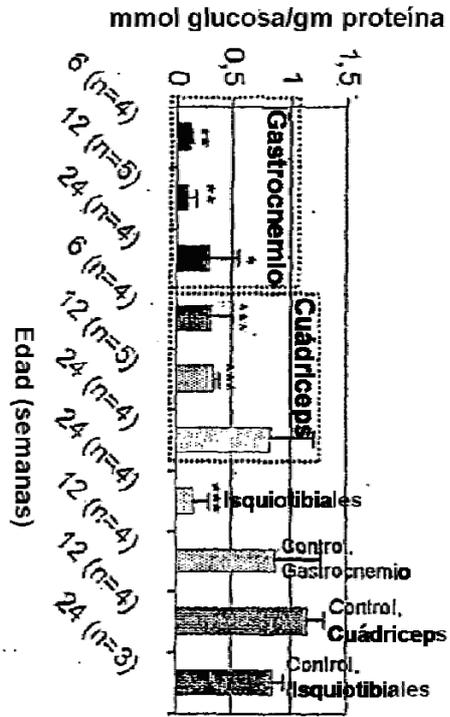
**FIG. 2**



**FIG. 3**

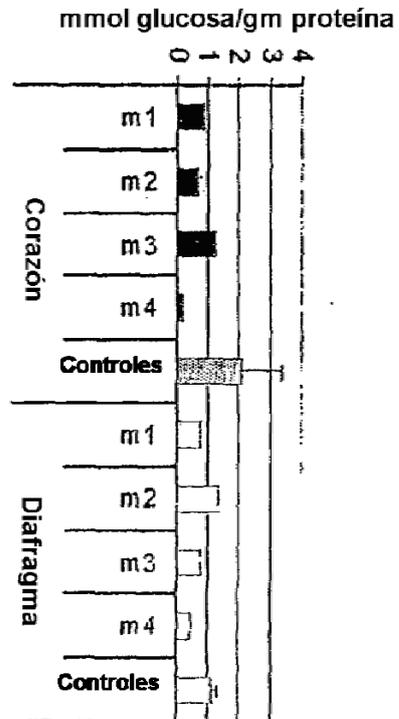
**A**

Contenido de glicógeno en músculo esquelético



**B**

Contenido de glicógeno a las 6 semanas



**FIG. 4**

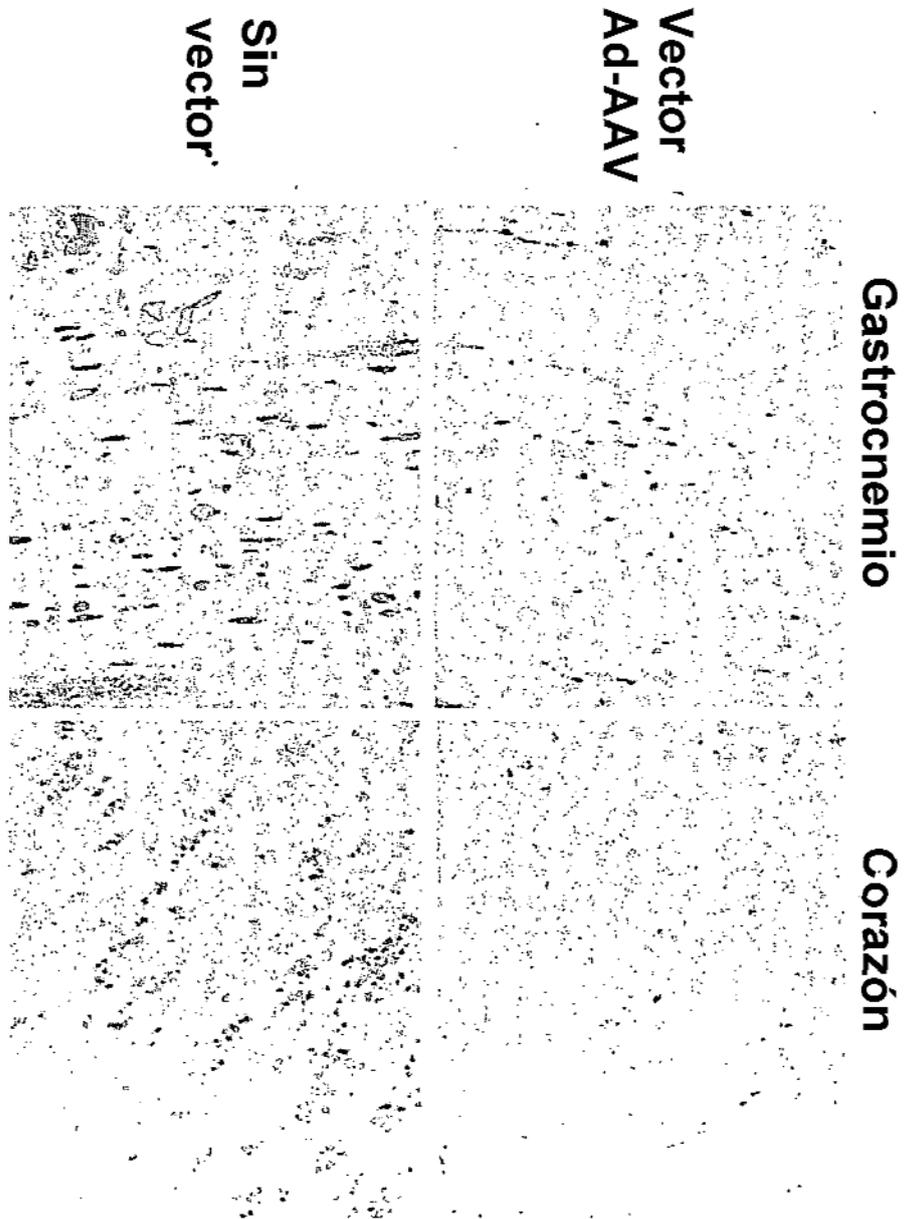
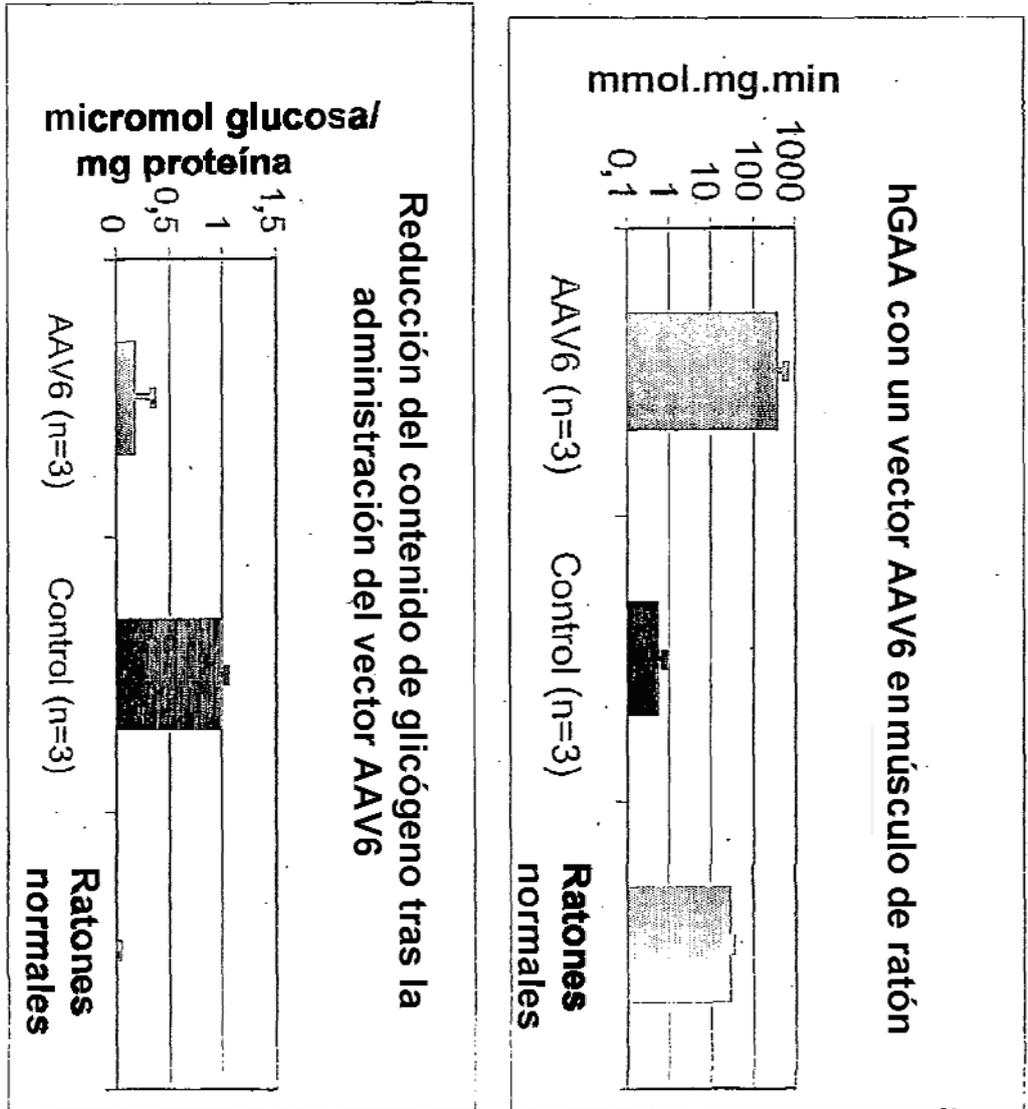
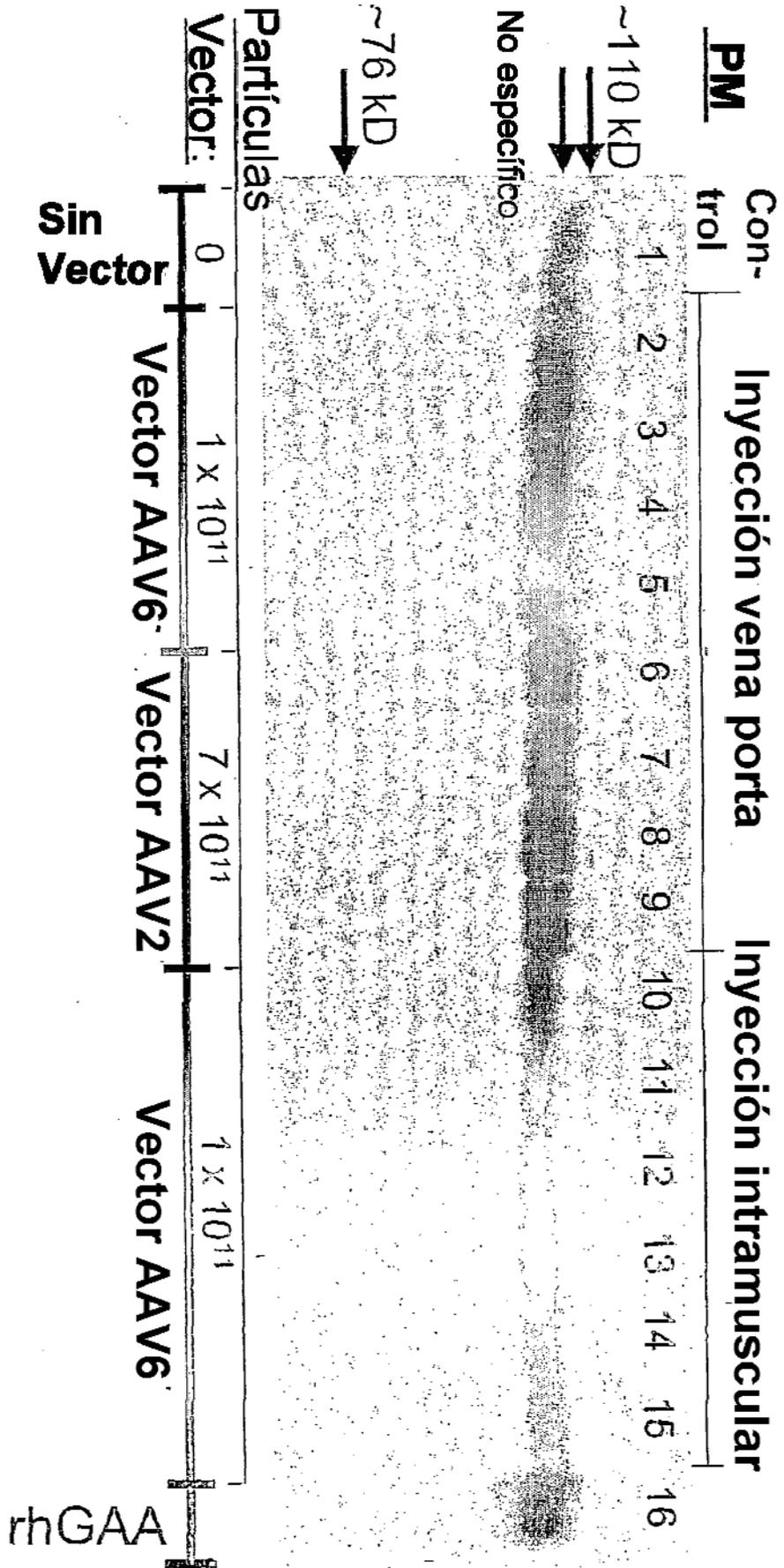


FIG. 5



**FIG. 6**



**FIG. 7**

Figura 8

Secuencia del ADNc de GAA humana completa (3846 pb, Número Genbank: NM\_000152).

1 *gcgcctgcgc gggaggccgc gtcacgtgac ccaccgcggc cccgccccgc gacgagctcc*  
 61 *cgccggctcac gtgacccgcc tctgcgegcc cccggggcacg accccggagt ctccgcgggc*  
 121 *ggccagggcg cgcgtgcgcg gaggtagacc gggccggggc tgcggggctt cctgagcgc*  
 181 *gggcccgggtc ggtggggcgg tggctgccc gcgccggcct ctacgtggg anagctgagg*  
 241 *ttgtgccgg ggccgcgggt ggaggcggg gatgaggcag caggtaggac agtgacctg*  
 301 *gtgacgcgaa ggacccccgc cacctctagg ttctctctgt ccgcccttg ttcagcgagg*  
 361 *gaggctctgg gcctgccga gctgacgggg anactgaggc acggagcggg cctgtaggag*  
 421 *ctg tcaggc catctcaac catgggagtg aggcaccgc cctgctcca cggctcctg*  
 481 *gccgtctgcg ccctctgtc' cttggcaacc gctgactcc tggggcacat cctactccat*  
 541 *gatttctgc tggttcccc agagctgagt ggctctccc cagtctgga ggagactcac*  
 601 *ccagctacc agcagggagc cagcagacca gggccccggg atgccaggc acacccccgc*  
 661 *cgtccagag cagtgccac acagtgcgac gtcccccca acagccgtt cgattgcgcc*  
 721 *cctgacaagg ccatcacca ggaacagtgc gaggcccgcg gctgctgta catcctgca*  
 781 *aagcaggggc tgcagggagc ccagatgggg cagccctggt gcttctccc acccagctac*  
 841 *cccagctaca agctggagaa cctgagctcc tctgaaatgg gctacacggc caccctgacc*  
 901 *cgtaccacc ccaccttct cccaaggac atcctgacc tgcggctgga cgtgatgat*  
 961 *gagactgaga accgctcca ctacagatc aaagatccag ctaacaggcg ctacgagtg*  
 1021 *cccttgaga ccccgcgtg ccacagccgg gcaccgtccc cactctacag cgtggagtc*  
 1081 *tccgaggagc cctcgggggt gatcgtgac cggcagctgg acggcccgct gctgctgaac*  
 1141 *acgacggtgg cggccctgtt cttgcccagc cagttctc agctgtccac ctgctgccc*  
 1201 *tgcagata tcacaggcct cggcagcac ctacgtccc tgatgctcag caccagctgg*  
 1261 *accaggatca cctgtggaa ccgggacct gcgccacgc ccggtgcgaa cctctacggg*  
 1321 *tctaccctt tctacctggc gctggaggac ggcgggtcgg cacacgggtt gttctgcta*  
 1381 *aacagcaatg ccatggatgt ggtcctgcag ccgagccctg' cccttagctg gaggtcgaca*  
 1441 *ggtgggatcc tggatgcta catctctg ggcccagagc ccaagagcgt ggtgcagcag*  
 1501 *tacctggacg ttgtgggata cccgttcag ccgccatact ggggcctggg ctccacctg*  
 1561 *tcccgtggg gctactctc caccgtatc acccggcagg tggaggagaa catgaccagg*  
 1621 *gcccacttc cctggacgt ccaatggaac gacctggact acatggactc ccggagggac*  
 1681 *ttacgttca acaaggatgg ctccgggac tccccggcea tggcagga gctgcaccag*  
 1741 *ggcggccggc gctacatgat gatcgtggat cctgcatca gcagctcggg cctgcccggg*  
 1801 *agctacaggc cctacgacga gggctcgcgg aggggggttt tcatcacaa cgagaccggc*  
 1861 *cagccgctga ttgggaagg atggcccggg tccaatgct tccccactt caccaacccc*  
 1921 *acagccctgg cctggtggga ggacatggtg gctgagttcc atgaccaggt gcccttcgac*  
 1981 *ggcatgtgga ttgacalga cgagccctcc aacttcata gaggctcga gacggctgc*  
 2041 *cccaacaatg agctggagaa cccaccctac gtgcctgggg tgggtggggg gacctccag*  
 2101 *gcggccacca tctgtcctc cagccaccag ttctctcca cactacaa cctgcacaac*  
 2161 *ctctacggcc tgaccgaagc catgcctcc cacagggcgc tggtaaggc tggggggaca*  
 2221 *cgccatttg tgatctccc ctgacctt gctggccacg gccgatacg cggccactgg*  
 2281 *acgggggacg tgtggagctc ctgggagcag ctgcctct cctgcccaga aatcctgcag*

Figura 8 (página 2 de 2)

2341 tttaacctgc tgggggtgcc tctggtcggg gccgacgtct ggggttctt gggcaacacc  
 2401 tcagaggagc tgtgtgtgcg ctggaccag ctgggggcct tctaccctt catcggaac  
 2461 cacaacagcc tgctcagct gccccaggag ccgtacagct tcagcgagcc ggcccagcag  
 2521 gccatgagga aggccctcac cctgcgtac gcaactctcc cccacctca cacactgttc  
 2581 caccaggccc acgtcgcggg ggagaccgtg gcccggcccc tcttctgga gttcccaag  
 2641 gactctagca cctggactgt ggaccaccag ctctgtggg gggaggccct gctcatcacc  
 2701 ccagtgtcc aggccgggaa ggccgaagt actggctact tcccctggg cacatggtac  
 2761 gacctgcaga cggtgccaat agaggccctt ggcagcctcc caccaccacc tgcagctccc  
 2821 cgtgagccag ccatccacag cgaggggcag tgggtgacgc tccggcccc cctggacacc  
 2881 atcaactgcc acctccgggc tgggtacatc atccccctgc agggccctgg cctacaacc  
 2941 acagagtccc gccagcagcc catggcctg gctgtggccc tgaccaaggg tggagaggcc  
 3001 cgaggggagc tgttctggga cgtggagag agcctggaag tgctggagcg aggggcctac  
 3061 acacaggtca tcttctggc caggaataac acgatcgtga atgagctggt acgtgtgacc  
 3121 agtgagggag ctggcctgca gctgcagaag gtgactgtcc tgggcgtggc cacggcgccc  
 3181 cagcaggtcc tctcaacgg tgcctctc tccaactca cctacagccc cgacaccaag  
 3241 gtctggaca tctgtgtctc gctgtgatg ggagagcagt ttctctcag ctggtgtag  
 3301 ccggcgggag tgtgttagtc tcaccagagg gaggtggtt ccccaggaa gcagagcctg  
 3361 tgtcgggca gcagctgtgt gcgggcctgg gggttg **catg tgcacctgg agctgggca**  
 3421 **taaccattec aagccgccgc atccttgtt tccacctct gggccggggc tctggcccc**  
 3481 **aactgtctca ggagagctt ctcctagat cgcactgtg gccggggcct ggagggctg**  
 3541 **tctgtttaa taagattgta aggttggcc tctcacctg ttgccggcat ggggtagta**  
 3601 **ttagccacc cctccatct gtcccagca ccggagaagg ggggtctcag gtggaggtg**  
 3661 **gggtatgca cctgagctc tcttcgcgc ctgtgtctt gcccacgc gacccttc**  
 3721 **cggctgcca gagggctgga tgcctgccg tccccagca agcctggaa ctcagaaaa**  
 3781 **ttcacaggac ttggagatt ctaaatc tta agtgaatta ttttaataaa aggggcattt**  
 3841 ggaatc

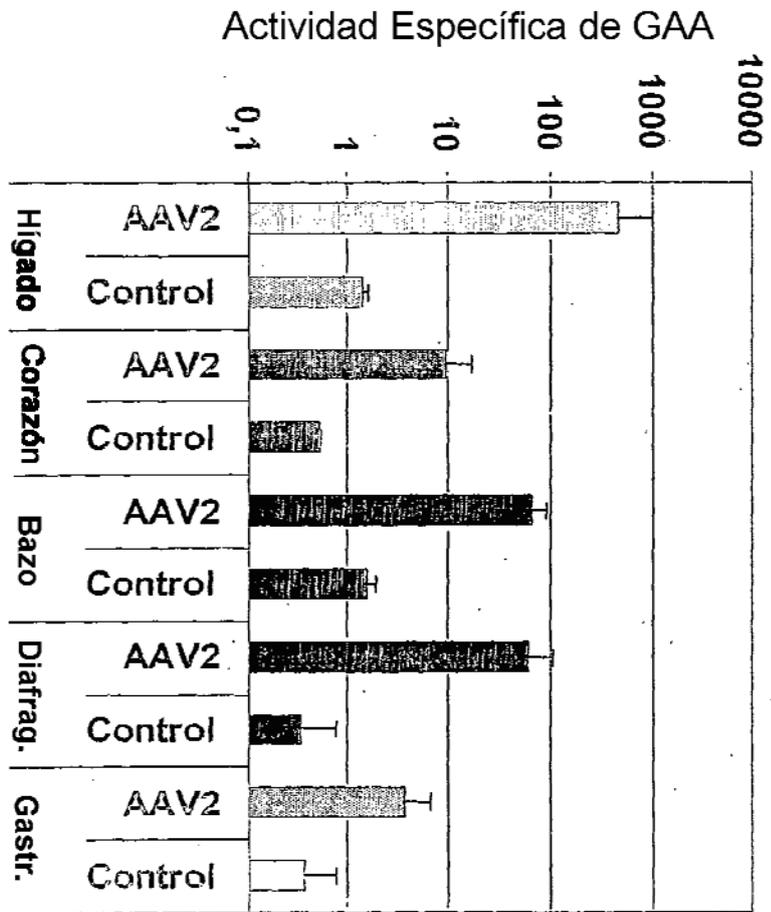
Figura 9

GAA con 5' y 3' suprimidos

1 ..... 409 410 g cctgtaggag  
 421 ctg tccaggc catctccaac catgggagtg aggcacccgc cctgctcca cggctcctg  
 481 gccgtctgcg ccctcgtgtc cttggcaacc gctgcaactc tggggacat cctactccat  
 541 gatttctgctc tggttccccg agagctgagt ggctcctccc cagtctgga ggagactcac  
 601 ccagctcacc agcagggagc cagcagacca gggccccggg atgccaggc acacccggg  
 661 cgtcccagag cagtgccac acagtgcgac gtccccca acagccgtt cgattgccc  
 721 cctgacaagg ccatcacca ggaacagtgc gaggcccgcg gctgctgta catccctgca  
 781 aagcaggggc tgcagggagc ccagatgggg cagccctggt gcttcttccc acccagctac  
 841 cccagctaca agctggagaa cctgagctcc tctgaaatgg gctacacggc caccctgacc  
 901 cgtaccaccc ccacctctt ccccaaggac atcctgacce tgcggctgga cgtgatgat  
 961 gagactgaga accgcctcca cttcacgatc aaagatccag ctaacaggcg ctacgaggtg  
 1021 cccttgagaa ccccgcgtgt ccacagccgg gcaccgtccc cactctacag cgtggagttc  
 1081 tccgaggagc ccttcggggg gatcgtgac cggcagctgg acggccgcgt gctgctgaa  
 1141 acgacgggtg cggccctgtt ctttggggac cagttcctc agctgtccc ctcgctgccc  
 1201 tgcagctata tcacaggcct cggcagcac ctcagtcccc tgatgctcag caccagctgg  
 1261 accaggatca cctgtggaa cggggacct gcgcccacgc ccggtgcga cctctacggg  
 1321 tctcacctt tctacctggc gctggaggac ggcgggtcgg cacacggggg gttcctgta  
 1381 aacagcaatg ccatggatgt ggtcctgcag ccgagccctg cccttagctg gaggtcgaca  
 1441 ggtgggatcc tggatgcta catctcctg ggcccagagc ccaagagcgt ggtgcagcag  
 1501 tacctggacg ttgtgggata ccgctcatg ccgccatact ggggcctggg ctccacctg  
 1561 tggcctggtg gctactcctc caccgctatc acccgccagg tgggtggagaa catgaccagg  
 1621 gccacttcc cctggacgt ccaatggaac gacctggact acatggactc ccggagggac  
 1681 ttacgttca acaaggatgg ctccgggac ttcccggcca tgggtcagga gctgcaccag  
 1741 ggcggccggc gctacatgat gatcgtggat cctgccatca gcagctcggg cctgccggg  
 1801 agctacaggc cctacgacga gggctcgcgg agggggggtt tcatcacia cgagaccggc  
 1861 cagccgctga ttgggaagg atggcccggg tccactgcct tcccgactt caccaacccc  
 1921 acagccctgg cctggtggga ggacatggtg gctgagttcc atgaccaggg gcccttcgac  
 1981 ggcatgtgga ttgacatgaa cgagccttc aactcatca gaggctctga ggacggctgc  
 2041 cccaacaatg agctggagaa cccaccctac gtgcctgggg tgggtggggg gaccctcag  
 2101 gcggccacca tctgtcctc cagccaccag tttctctcca cactacaa cctgcacaac  
 2161 ctctacggcc tgaccgaagc catcgcctcc cacagggcgc tggtaaggc tggggggaca  
 2221 cgccatttg tgatccccg ctgaccttt gctggccacg gccgatacgc cggccactgg  
 2281 acgggggacg tgtggagctc ctgggagcag ctgacctct ccgtgccaga aatcctgcag  
 2341 ttaacctgc tgggggtgcc tctggtcggg gccgacgtct gcggcttctt gggcaacacc  
 2401 tcagaggagc tgtgtgtgcg ctggaccag ctgggggct tctaccctt catcgggaa  
 2461 cacaacagcc tgctcagtct gcccaggag ccgtacagct tcagcgagcc ggcccagcag

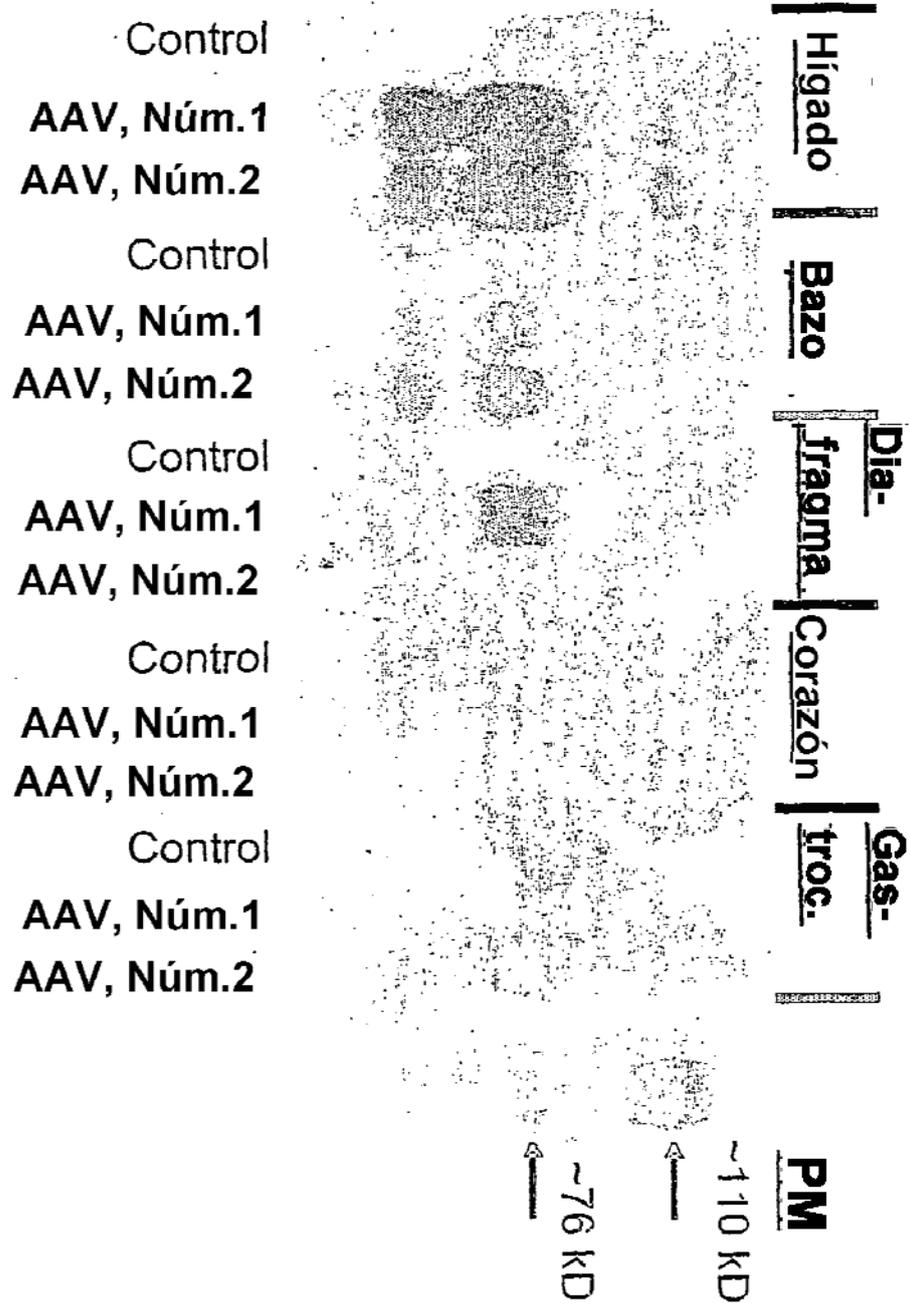
Figura 9 (página 2 de 2)

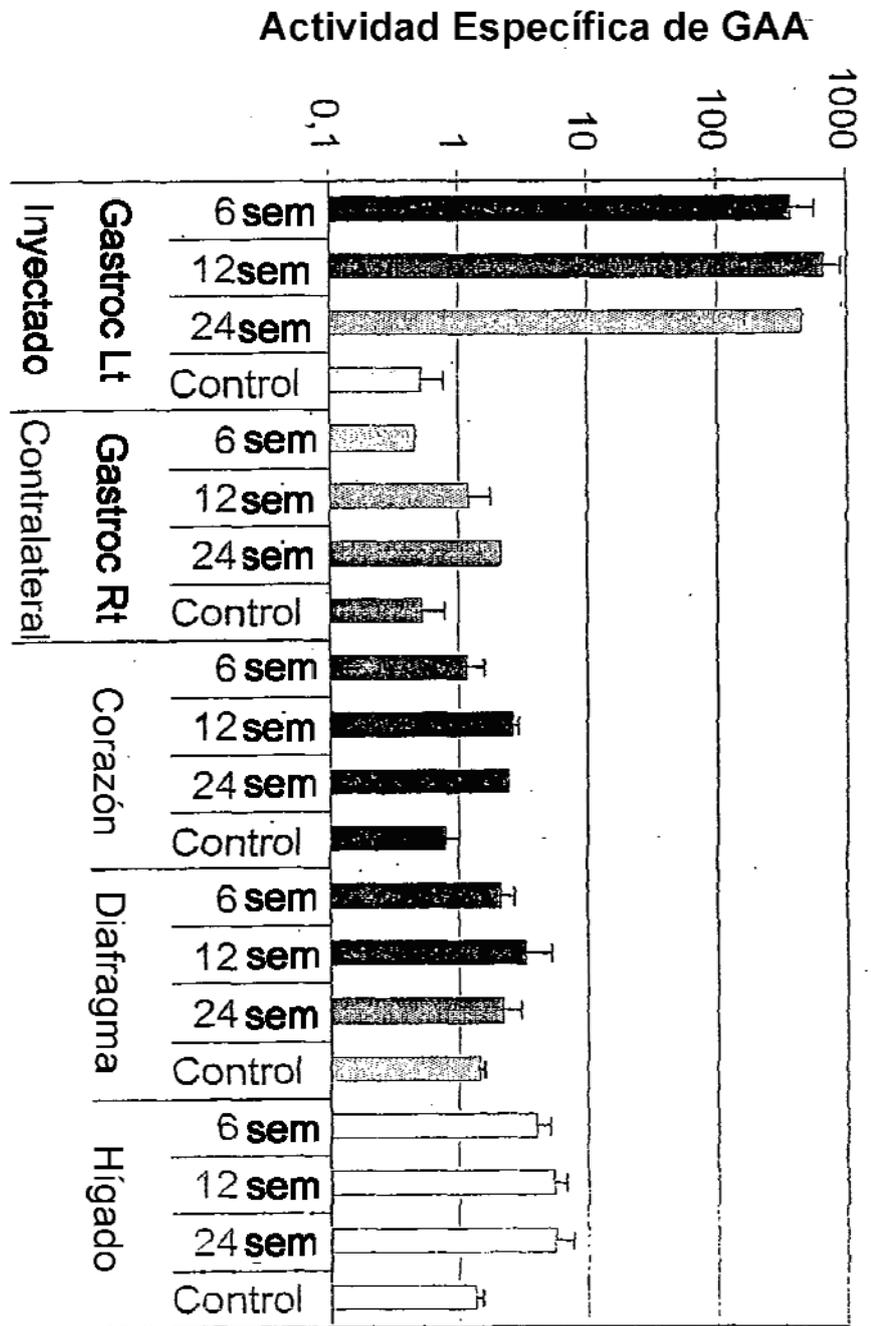
2521 gccatgagga aggccctcac cctgcgtac gcactcctcc occacctcta cacactgttc  
2581 caccaggccc acgtcgcggg ggagaccgtg gcccgcccc tcttctgga gttcccaag  
2641 gactctagca cctggactgt ggaccaccag ctctgtggg gggaggccct gctcatcacc  
2701 ccagtgtcc aggccgggaa ggccgaagtg actggctact tcccctggg cacatgttac  
2761 gacctgcaga cggtgccaat agaggccctt ggcagcctcc caccaccacc tgcagctccc  
2821 cgtgagccag ccatccacag cgaggggcag tgggtgacgc tgccggcccc cctggacacc  
2881 atcaacgtcc acctccgggc tgggtacac atcccctgc agggccctgg ctcacaacc  
2941 acagagtccc gccagcagcc catggccctg gctgtggccc tgaccaaggg tggagaggcc  
3001 cgaggggagc tgtctggga cgatggagag agcctggaag tgctggagcg aggggcctac  
3061 acacaggtca tcttctggc caggaataac acgatcgtga atgagctggt acgtgtgacc  
3121 agtgagggag ctggcctgca gctgcagaag gtgactgtcc tgggcgtggc cacggcggcc  
3181 cagcaggcc tctccaacgg tgtccctgc tccaactca cctacagccc cgacaccaag  
3241 gtctggaca tctgtgtc gctgtgatg ggagagcagt tctcgtcag ctggtgttag  
3301 ccgggcggag tgtgttagtc tctccagagg gaggctggt cccagggaa gcagagcctg  
3361 tgtcgggca gcagctgtgt gcgggcctgg gggttg 3397.....3807  
3808 tta agtgaatta ttttaataaa agggcattggaac



**FIG. 10**

**FIG. 11**

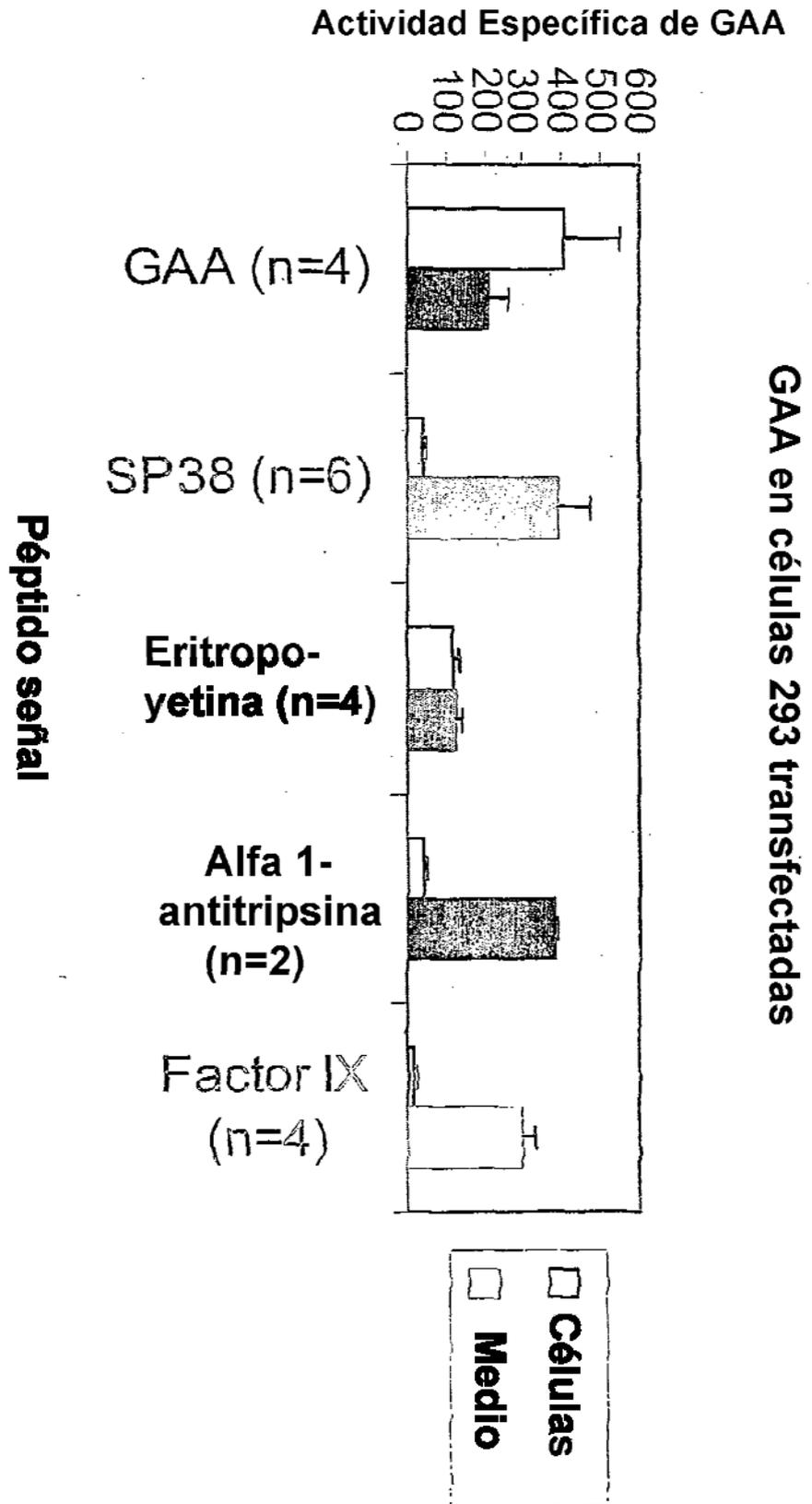




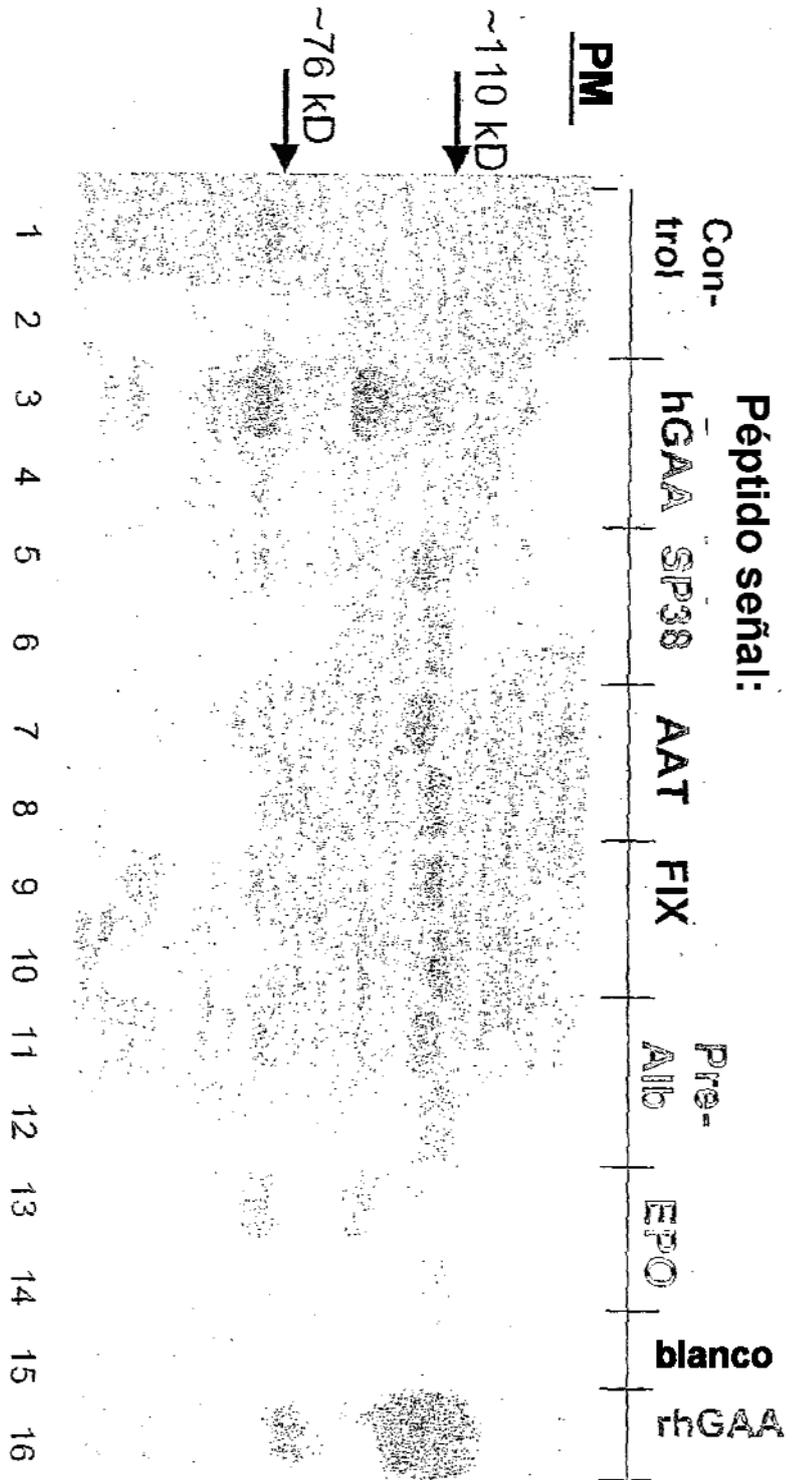
**FIG. 12**



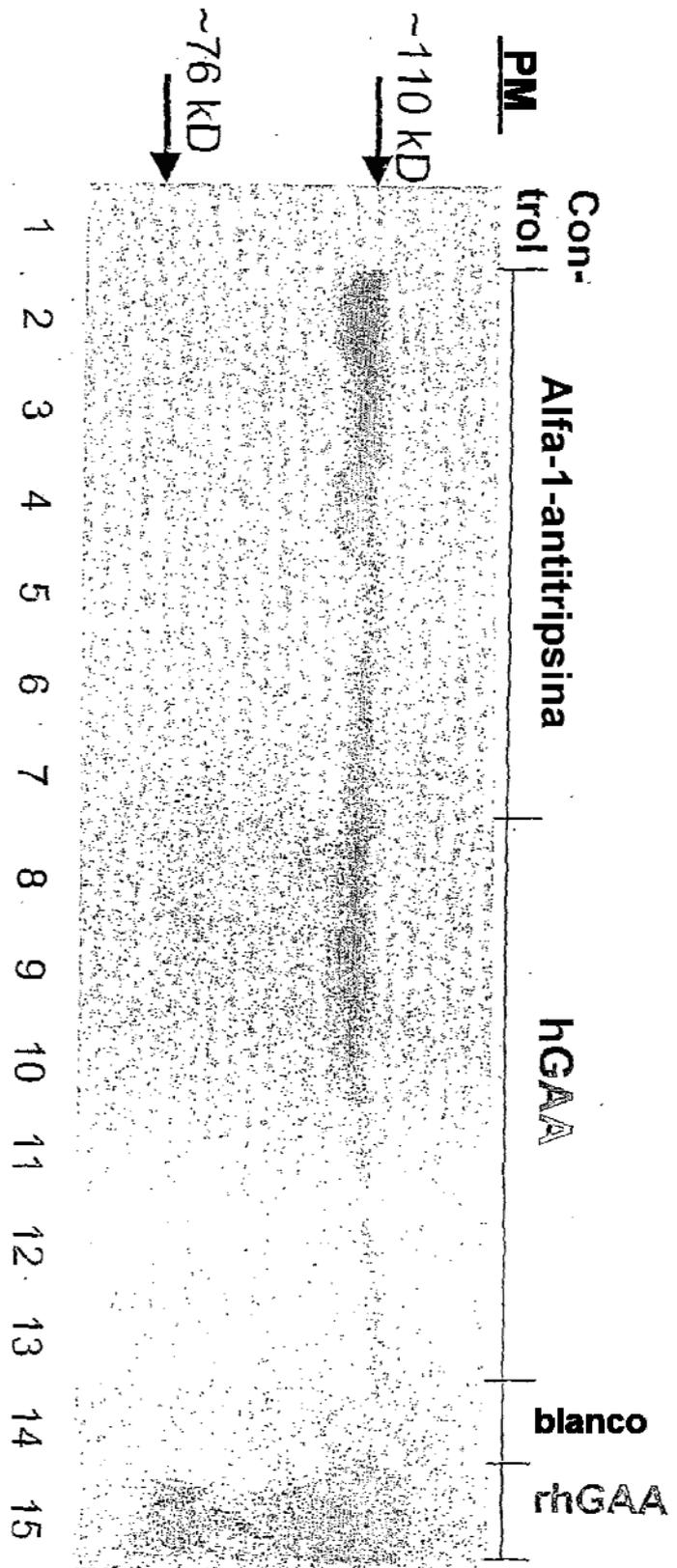
**FIG. 13**



**FIG. 14**



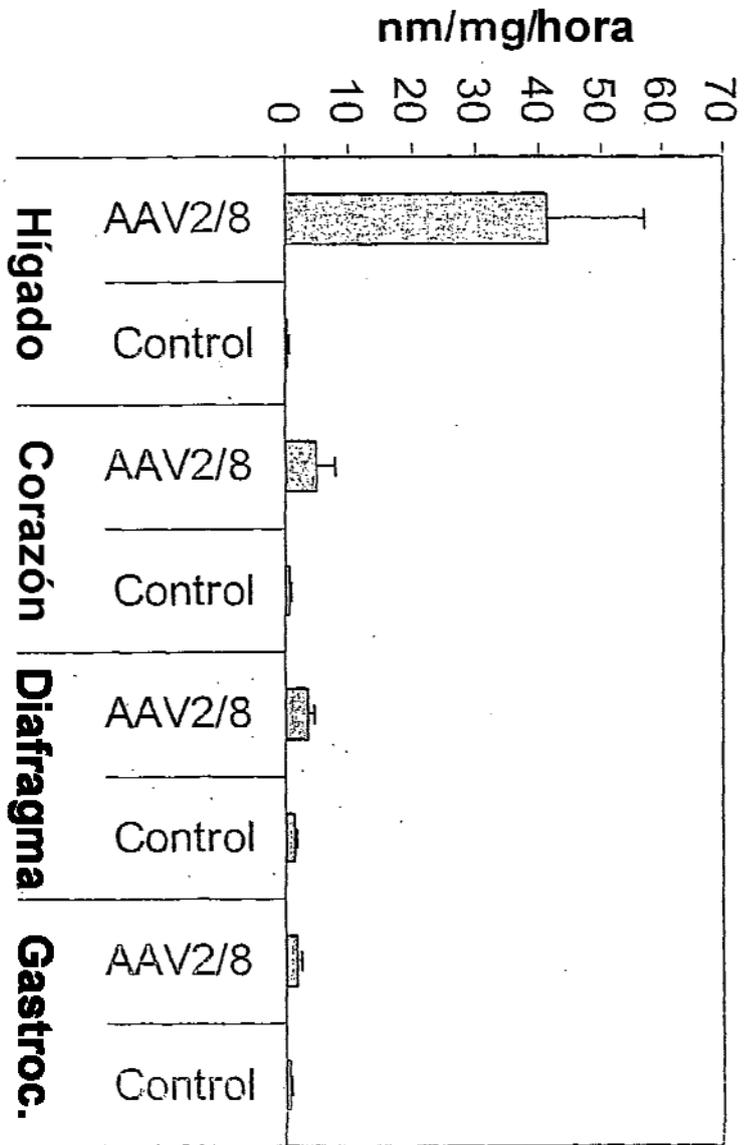
**FIG. 15**



**FIG. 16**

FIG. 17

GAA Humana con péptido señal de Alfa-1-antitripsina



**FIG. 18**

