(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 790 834**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2016** **PCT/EP2016/062655**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016** **WO16193431**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2016** **E 16730716 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** **EP 3303576**

(54) Título: **Vectores virales adenoasociados para el tratamiento de mucopolisacaridosis**

(30) Prioridad:

05.06.2015 EP 15382297

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2020

(73) Titular/es:

ESTEVE PHARMACEUTICALS, S.A. (50.0%)
Passeig de la Zona Franca, 109, 4ª Planta
08038 Barcelona, ES y
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA (50.0%)

(72) Inventor/es:

BOSCH TUBERT, MARIA FÁTIMA;
AREBA HAURIGOT, VIRGINIA y
MOTAS MALLOL, SANDRA

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 790 834 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

Vectores virales adenoasociados para el tratamiento de mucopolisacaridosis

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a vectores útiles para la expresión de proteínas de interés y su utilización en terapia génica. La presente invención también se refiere a vectores y secuencias de ácidos nucleicos útiles para el tratamiento de mucopolisacaridosis (MPS), y en particular, para el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II o síndrome de Hunter.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El lisosoma es un orgánulo encontrado en el citoplasma de células de animales que contiene más de 50 hidrolasas que rompen biomoléculas durante el reciclaje de componentes celulares desgastados o después de la engullición de virus y bacterias. Este orgánulo contiene varios tipos de enzimas hidrolíticas, que incluyen proteasas, nucleasas, glucosidasas, lipasas, fosfolipasas, fosfatasas y sulfatasas. Todas las enzimas son hidrolasas ácidas.

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico (EAL) se producen por defectos genéticos que afectan a una o más enzimas lisosómicas. Estas enfermedades genéticas resultan generalmente de una deficiencia en una actividad enzimática particular presente en el lisosoma. En un menor grado, estas enfermedades pueden ser debidas a deficiencias en proteínas que participan en la biogénesis lisosómica.

Las EAL son individualmente raras, aunque como grupo estos trastornos son relativamente comunes en la población general. La prevalencia combinada de EAL es aproximadamente 1 por 5.000 recién nacidos vivos. Véase Meikle P, *y col.*, JAMA 1999;281:249-254. Sin embargo, algunos grupos dentro de la población general están particularmente afectados por una alta manifestación de EAL. Por ejemplo, la prevalencia de las enfermedades de Gaucher y Tay-Sachs en descendientes de individuos judíos de Europa central y del este (Ashkenazi) es 1 por 600 y 1 por 3.900 nacimientos, respectivamente.

La mucopolisacaridosis de tipo II (MPSII), también conocida como síndrome de Hunter y descrita por primera vez por el Dr. Charles Hunter, es una EAL crónica, progresiva y multisistémica producida por deficiencia o ausencia de actividad de la enzima iduronato-2-sulfatasa (IDS), codificada por el gen *IDS* y que participa en la degradación escalonada lisosómica de los glucosaminoglicanos (GAG) heparán sulfato (HS) y dermatán sulfato (DS), conduciendo a su acumulación patológica. Véase Hunter, Proc R Soc Med. 1917;10(Sect Study Dis Child):104-16. Debido a la herencia recesiva ligada a X, casi todos los pacientes con Hunter son masculinos, aunque se ha informado de algunas mujeres con síndrome de Hunter en la bibliografía. Véanse Mossman *y col.*, Arch Dis Child. 1983;58:911-915, Gullén-Navarro *y col.*, Orphanet J Rare Dis. 2013;25(8):92, Valstar *y col.*, J. Inherit. Metab. Dis. 2008;31(2):240-52.

La MPSII se caracteriza clínicamente como una neuropatía progresiva del sistema nervioso central (SNC) que aparece en la infancia. Los niños con Hunter son normalmente normales al nacer y desarrollan síntomas antes de los 2 años de edad. Véase Schwartz *y col.*, Acta Paediatr Suppl. 2007;96:63-70. La evolución clínica generalmente empieza con deterioro cognitivo progresivo lento, seguido de problemas del comportamiento y deterioro intelectual progresivo. La pérdida de locomoción se produce después. Además de los síntomas neurológicos, los pacientes con MPSII padecen alteraciones no neurológicas, que incluyen infecciones recurrentes del oído, nariz, garganta y pecho, diarrea y estreñimiento frecuentes, insuficiencia cardíaca, rasgos faciales toscos, talla baja, rigidez y degeneración articular progresiva, anomalías esqueléticas que afectan la movilidad, además de hepato y esplenomegalia. Véanse Neufeld y Muenzer, “The Mucopolysaccharidoses” en Scriver C, et al., Eds., “The metabolic and molecular basis of inherited disease”, McGraw-Hill Publishing Co., New York, NY, US, 2001, pp. 3421-3452. El espectro de manifestaciones clínicas de la enfermedad varía considerablemente dependiendo de los niveles residuales de actividad de IDS que el paciente tiene, que a su vez se determina por la mutación subyacente del gen *IDS*, con >300 mutaciones del gen *IDS* descritas hasta la fecha (http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=IDS). En general, se han descrito dos formas clínicas de la MPSII. La forma más grave, con una aparición entre los 18 meses y los 4 años de edad, es tres veces más común que la forma leve, y, se caracteriza por rasgos faciales toscos, deformidades esqueléticas, hepatoesplenomegalia y participación neurológica que conduce a retraso mental. Véase Wraith *y col.*, Eur J Pediatr. 2008;167(3):267-277. Los pacientes normalmente mueren durante la segunda década de vida debido a enfermedad obstructiva de las vías respiratorias e insuficiencia cardíaca. Véanse Wraith *y col.*, Eur J Pediatr. 2008;167(3):267-277, Neufeld y Muenzer, arriba. Una forma más lentamente progresiva de la enfermedad, con

aparición posterior, supervivencia más larga y disfunción neurológica mínima, conocida como el fenotipo atenuado, también se ha informado en un subconjunto de pacientes con MPSII. Véanse Wraith *y col.*, Eur J Pediatr. 2008;167(3):267-277, Neufeld y Muenzer, arriba.

Hasta hace poco no ha habido terapias aprobadas específicas para el síndrome de MPSII y el único tratamiento disponible era sintomático usando una amplia gama de fármacos inespecíficos para la prevención y tratamiento de complicaciones de la enfermedad. En los últimos años han estado disponibles dos opciones terapéuticas principales: terapia de reemplazo enzimático (ERT) y trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT). El diseño de ambas estrategias terapéuticas se basa en la posibilidad de corrección cruzada, basada en el hecho de que las células normales secretan cantidades significativas de enzimas lisosómicas solubles marcadas con manosa-6-fosfato (M6P), tales como IDS, que pueden ser posteriormente captadas del compartimento extracelular por otras células mediante receptores de M6P sobre la membrana plasmática y dirigirse a los lisosomas. Véase Enns *y col.*, Neurosurg Focus. 2008;24(3-4):E12. Además, hay un umbral de actividad enzimática residual, generalmente muy bajo, por encima del cual la célula puede hacer frente a la entrada de sustrato y los sujetos no son afectados por la enfermedad, sugiriendo que la restauración de la actividad normal no es un requisito para modificar la evolución clínica. Véase Neufeld, Annu Rev Biochem. 1991;60:257-80.

Desde su autorización por la Agencia Estadounidense del Medicamento (FDA) en 2006 y por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en 2007, la iduronato-2-sulfatasa humana recombinante (idursulfasa, ELAPRASE®, Shire Pharmaceuticals) se ha indicado para el tratamiento de pacientes con MPSII. El tratamiento se administra semanalmente a una dosis de 0,5 mg/kg por infusión intravenosa, con un tiempo de infusión promedio de 1-3 horas. Véase Giugliani *y col.*, Genet Mol Biol. 2010;33(4):589-604. ELAPRASE® fue autorizado después de un estudio aleatorizado, de doble ciego y controlado por placebo de 96 pacientes con Hunter sin deterioro cognitivo en el nivel inicial y con enfermedad moderadamente avanzada. Véanse Muenzer y col., Genet Med. 2006;8(8):465-73, Muenzer y col., Genet Med. 2011;13(2):95-101. Después de un año de tratamiento, los pacientes tratados con ELAPRASE® mostraron un aumento en la distancia recorrida en seis minutos (prueba de caminata de seis minutos) en comparación con pacientes en placebo. Véase Muenzer *y col.,* Genet Med. 2011;13(2):95-101. También se ha mostrado que la ERT con ELAPRASE® mejora la amplitud de movimiento (ROM) de las articulaciones y reduce los volúmenes del hígado y el bazo. Véase Muenzer *y col.,* Genet Med. 2011;13(2):95-101. Además, hay evidencia de función pulmonar mejorada cuando no están presentes anticuerpos neutralizantes contra idursulfasa; se informó del desarrollo de anticuerpos anti-IDS en el 50 % de los pacientes tratados a largo plazo. Véase Muenzer *y col.,* Genet Med. 2011;13(2):95-101.

Un estudio de fase I/II en 31 pacientes con MPSII comparó la eficacia de ELAPRASE® con la de un segundo producto basado en la isoforma beta de la idursulfasa con un nombre comercial propuesto de Hunterase® (NCT01301898, http://clinicaltrials.gov). Ambas proteínas se administraron intravenosamente a una dosis de 0,5 mg/kg/semana para ELAPRASE® y 0,5 y 1,0 mg/kg/semana para Hunterase® durante 24 semanas. Los resultados del tratamiento con Hunterase® mostraron eliminación reducida de GAG en la orina y rendimiento mejorado en la prueba de caminata de 6 minutos, pero ninguna de las dosis fue capaz de mediar una la eficacia terapéutica en la función pulmonar, función cardíaca o movilidad de las articulaciones. Véase Sohn *et al.*, Orphanet J Rare Dis. 2013;8:42. Las infusiones de Hunterase® fueron generalmente seguras y bien toleradas, aunque se informaron algunos acontecimientos adversos, tales como urticaria y erupción cutánea. Véase Sohn *y col.*, Orphanet J Rare Dis. 2013;8:42. Recientemente se ha completado un estudio esencial PIII (http://clinicaltrials.gov, NCT01645189), pero los resultados no están todavía disponibles.

Debido a la hipersensibilidad a ELAPRASE®, tiene que estar disponible apoyo médico durante la administración del producto. Durante el ensayo, los acontecimientos adversos más graves descritos fueron reacciones anafilácticas que podrían aparecer en cualquier momento durante la infusión de ELAPRASE® o hasta 24 horas después de la administración del producto. Véanse Muenzer *y col.*, Genet Med. 2006;8(8):465-73, Muenzer *y col.,* Genet Med. 2011;13(2):95-101. Estas reacciones anafilácticas, que pueden comprometer la vida del paciente, incluyen disnea, hipoxia, hipotensión, urticaria y/o angioedema de garganta o lengua (http://elaprase.com/) y pueden requerir intervenciones tales como resucitación o traqueotomía de urgencia, y tratamiento con agonistas beta-adrenérgicos inhalados, epinefrina o corticosteroides intravenosos. Véase Burton *y col.,* Mol Genet Metab. 2011;103(2):113-20. Otras desventajas de ERT incluyen: 1) la dificultad de realizar infusiones intravenosas largas de 1-3 horas en pacientes pediátricos, muchos de los cuales padecen enfermedad mental (http://elaprase.com/), 2) el hecho de que el 50 % de los pacientes tratados con ELAPRASE® en estudios clínicos dieran positivo para anticuerpos a la idursulfasa de significancia clínica todavía desconocida, pero que podría limitar la eficacia del producto a largo plazo, como se sugiere por pruebas de función pulmonar. Véanse Muenzer *y col.*, Mol Genet Metab. 2007;90(3):329-37, Muenzer *y col.*, Genet Med. 2006;8(8):465-73, Muenzer *y col.,* Genet Med. 2011;13(2):95-101, y 3) el alto coste de la

terapia, que incluye también los costes del cuidado a domicilio. Véase Wyatt *y col.*, Health Technol Asses. 2012¸16(39):1-543.
Independientemente de las cuestiones de seguridad o el coste de administración de ELAPRASE®, la incapacidad de la IDS recombinante intravenosamente administrada para alcanzar el SNC, al menos a la dosis actualmente recomendada de 0,5 mg/kg por semana, probablemente limita la posible aplicabilidad de ERT al tratamiento de la grave neurodegeneración observada en pacientes con Hunter. Solo se logró un rescate parcial de la actividad cerebral de IDS por la administración intravenosa semanal de 1,2 ó 10 mg de ELAPRASE®/kg a ratones con MPSII de 2 ó 7 meses de edad, respectivamente. Véase Polito *y col.*, Hum Mol Genet. 2010;19(24):4871-85. Además, incluso a estas altas dosis, la actividad de IDS en circulación volvió a niveles previos al tratamiento 72 horas después de la administración de la proteína. Véase Polito *y col.*, Hum Mol Genet. 2010;19(24):4871-85. De hecho, la ERT intravenosa dejó de corregir la acumulación de GAG en los cerebros de un modelo murino de MPSII. Véase Garcia *y col.*, Mol Genet Metab. 2007;91(2):183-90. Por tanto, la indicación de ELAPRASE® está limitada al tratamiento de síntomas no neurológicos de la enfermedad.

Una alternativa a la administración intravenosa de ERT es la provisión de la enzima exógena directamente al SNC. La administración de 20 µg de IDS humana recombinante al ventrículo lateral de ratones con MPSII de 5 meses de edad cada 3 semanas aumentó la actividad de IDS en el cerebro, cerebelo y órganos somáticos, tales como el hígado, corazón, riñón y testículo. Véase Higuchi *y col.,* Mol Genet Metab. 2012;107(1-2):122-8. La restauración de la actividad de IDS condujo a la recuperación de la memoria a corto plazo y actividad locomotora y a una reducción en la vacuolación celular y distensión lisosómica en el cerebelo, hígado y testículo. Sin embargo, la eficacia terapéutica fue parcial, el contenido de GAG no se normalizó completamente y algunas alteraciones del comportamiento siguieron siendo resistentes al tratamiento. Véase Higuchi *y col.,* Mol Genet Metab. 2012;107(1-2):122-8. Un estudio reciente de seguridad y de búsqueda de dosis de administración de idursulfasa al líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante un dispositivo de liberación de fármaco intratecal para tratar directamente la patología del SNC en pacientes con Hunter ha demostrado reducciones de aproximadamente el 80-90% en los niveles de GAG en LCR después de 6 meses de tratamiento. Véanse Muenzer *y col.*, Genet. Med. 2015; doi:10.1038/gim.2015.36 y www.clincialtrials.gov (NCT00920647). Sin embargo, la implantación del dispositivo de liberación intratecal permanente que requiere la terapia está asociada a riesgos sustanciales e inconvenientes y la propia terapia tiene un coste económico muy alto por paciente/año.

Otra forma de llegar al SNC por administración sistémica es usando un caballo troyano molecular. Un ejemplo de ese enfoque es la proteína de fusión de anticuerpo para receptor de insulina-iduronato 2-sulfatasa (HIRMAb-IDS), que puede cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) mediante transporte mediado por receptor. La administración intravenosa de 3, 10 y 30 mg/kg de HIRMAb-IDS a monos Rhesus juveniles masculinos semanalmente, durante 26 semanas, produjo una captación por el cerebro de HIRMAb-IDS del 1% de la dosis total inyectada. Véase Boado *y col.,* Biotechnol Bioeng. 2014;111(11):2317-25. El estudio también demostró seguridad de la proteína de fusión, ya que no se observó reacción relacionada con la infusión o respuesta inmunitaria.

El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) usando células madre derivadas de la médula ósea (trasplante de médula ósea, TMO) ha demostrado ser eficaz en el tratamiento tanto de la patología somática como de la neurológica en pacientes con otras MPS. Véanse Peters *y col.*, Blood. 1996;87(11):4894-902, Peters y Steward, Bone Marrow Transplant. 2003;31(4):229-39 y Yamada *y col.*, Bone Marrow Transplant. 1998;21(6):629-34. El principio subyacente a la corrección por HSCT es que monocitos de donante pueden cruzar la pared capilar, incluso en la barrera hematoencefálica, después de diferenciarse en macrófagos de tejido, microglía en el caso del SNC, y secretar la enzima deficiente para la administración a las diversas células. Véase Krivit *y col.*, Cell Transplant. 1995;4(4):385-92. El TMO realizado en ratones con MPSII redujo la acumulación de GAG en una variedad de tejidos somáticos, que incluyen hígado, bazo y pulmón, pero no en el SNC. Véase Akiyama *y col.*, Mol Genet Metab. 2014;111(2):139-46. Si se combina TMO con ERT (0,5 mg de idursulfasa/kg/semanalmente), se observó un efecto aditivo sobre los niveles de GAG en el corazón, riñón y pulmón 7 meses después del tratamiento de ratones con MPSII, pero las acumulaciones de GAG en el SNC siguieron a niveles patológicos. Véase Akiyama *y col.*, Mol Genet Metab. 2014;111(2):139-46. Sin embargo, la evidencia de eficacia clínica no es muy fuerte en pacientes con MPSII. El seguimiento de 10 pacientes con Hunter que recibieron TMO entre 1982 y 1991 mostró grados altamente variables de éxito. Véase Vellodi *y col.*, J Inherit Metab Dis. 1999;22(5):638-48. Cuatro de aquellos pacientes murieron antes de 100 días después del TMO, y 3 más antes de 7 años después del procedimiento. De los 3 pacientes que sobrevivieron durante más de 7 años después del TMO, uno de ellos no informó beneficio clínico; un segundo mostró un aumento mínimo de la actividad de IDS en plasma y el tercero dejó de normalizar el contenido de GAG a pesar de tener un ligero aumento en la actividad de IDS en plasma. Véase Vellodi *y col.*, J Inherit Metab Dis. 1999;22(5):638-48. La imagen por resonancia magnética (IRM) del cerebro mostró una ligera disminución en el número de lesiones quísticas 2,5 años después del TMO en un paciente con fenotipo de MPSII

leve. Véase Seto *y col.*, Ann Neurol. 2001;50(1):79-92. Sin embargo, el mismo estudio proporcionó datos sobre otro paciente con fenotipo leve que no mostró ninguna mejora bajo IRM. Véase Seto *y col.*, Ann Neurol. 2001;50(1):79-92. Los resultados clínicos parecen ser altamente variables entre pacientes con Hunter, supuestamente debido a diversos factores; genotipo, edad en HSCT, estado clínico del paciente en HSCT, tal como grado de alteración neurológica, estado del donante, quimerismo del donante, fuente de células madre y actividad enzimática han sugerido todos que influyen en el resultado a largo plazo. Véanse Giugliani *y col.*, Genet Mol Biol. 2010;33(4):589-604, Valayannopoulos *y col.*, Rheumatology. 2011;5:v49-59.

Cuando es satisfactorio, el HSCT puede contribuir a algún grado de beneficio clínico a nivel somático, disminución de los problemas de comportamiento y mejores patrones de sueño, pero sigue sin estar claro si el tratamiento puede mediar en cualquier mejora significativa del deterioro cognitivo. Véase Giugliani *y col.*, Genet Mol Biol. 2010;33(4):589-604, Valayannopoulos *y col.*, Rheumatology. 2011;5:v49-59. En general, este enfoque no se recomienda para pacientes con Hunter, debido a la alta tasa de morbilidad y mortalidad y los beneficios neurocognitivos variables. Véase Giugliani *y col.*, Genet Mol Biol. 2010;33(4):589-604.

Una explicación plausible al fracaso de la HSCT es la limitada expresión de IDS en células injertadas, que conduce a una corrección cruzada de IDS insuficiente en el SNC. Se usaron vectores lentivirales que codifican el gen IDS humano para transducir células de médula ósea antes de su trasplante en ratones con MPSII. Los ratones con MPSII tratados mostraron rendimiento mejorado en la prueba de memoria del laberinto en T 14 semanas después del trasplante. Véase Podetz-Pedersen y col., Mol Ther. 2013;21:s1-s285.

Dadas las limitaciones de las actuales opciones terapéuticas para MPSII, se necesitan enfoques alternativos. La terapia génica *in vivo* ofrece la posibilidad de un tratamiento de una vez para MPSII y otras enfermedades hereditarias, con la perspectiva de efectos beneficiosos para toda la vida. Se han probado varios enfoques de terapia génica basados en el uso de diferentes vectores virales combinados con diferentes vías de administración en modelos animales de enfermedad de MPSII.

La transferencia génica mediada por vectores virales adenoasociados (AAV), en particular, ha emergido rápidamente como el enfoque de elección para muchas aplicaciones de terapia génica *in vivo*, debido a la alta eficiencia de transducción y la ausencia de patogenicidad de estos vectores. Los vectores de AAV pueden transducir células post-mitóticas y varios estudios pre-clínicos y clínicos han demostrado el potencial de la transferencia génica mediada por vector de AAV para conducir eficientemente la expresión sostenida de transgenes terapéuticos para una variedad de enfermedades. Véanse Bainbridge *y col.*, N Engl J Med. 2008;358(21):2231-9, Hauswirth *y col.*, Hum Gene Ther. 2008;19(10):979-90, Maguire *y col.*, N Engl J Med. 2008;358(21):2240-8, Niemeyer *y col.*, Blood 2009;113(4):797-806, Rivera *y col.*, Blood 2005;105(4):1424-30, Nathawani *y col.*, N Engl J Med. 2011;365(25):2357-65 y Buchlis *y col.*, Blood 2012;119(13):3038-41.

La administración sistémica de vectores de AAV5-CMV-IDS humana en la vena temporal de crías de ratón con MPSII (p2) produjo un aumento en la actividad de IDS en corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo y bazo, y un aumento moderado en la actividad de IDS en el cerebro, que condujo a una reducción en tejido somático y contenido de GAG urinario hasta 18 meses después de la administración de un único vector. Véase Polito *y col.*, Am J Hum Genet. 2009;85(2):296-301. Además, este tratamiento previno el desarrollo de la patología del SNC previniendo la neurodegeneración, y corrigiendo la astrogliosis e inflamación. La evaluación de ratones en la prueba de campo abierto 18 meses después de la inyección de AAV demostró la mejora con el tratamiento en el fenotipo motor macroscópico de ratones con MPSII. Véase Polito *y col.*, Am J Hum Genet. 2009;85(2):296-301.

También se han usado AAVs de serotipo 8 que codifican el gen IDS humano bajo el control del promotor de TBG específico del hígado para tratar MPSII. Hasta 7 meses tras la administración intravenosa de vectores a ratones con MPSII de 2 meses de edad se observó un aumento en la actividad de IDS en suero, hígado, bazo, pulmón, corazón, riñón y músculo, produciendo corrección completa del almacenamiento de GAG en estos tejidos somáticos. Véase Cardone *y col.*, Hum Mol Genet. 2006;15(7):1225-36. Sin embargo, se requirieron dosis muy altas (4×10^{12} genomas virales/ratón) para lograr un ligero aumento en la actividad de IDS y eliminación parcial de la acumulación de GAG en el cerebro cuando los vectores se administraron intravenosamente. Véase Cardone *y col.*, Hum Mol Genet. 2006;15(7):1225-36. Similarmente, la administración intravenosa de vectores de AAV8 en los que el gen IDS humano está bajo el control del promotor del factor 1-a de elongación (EF) ubicuo a ratones adultos con MPSII demostró un aumento en la actividad de IDS en hígado, corazón, bazo y riñón hasta 24 semanas después de la administración, con corrección completa de la acumulación de GAG en aquellos órganos. Véase Jung *y col.*, Mol Cells. 2010;30(1):13-8. La actividad de IDS en el cerebro solo se aumentó en el grupo de animales sacrificados a corto plazo (6 semanas después de la inyección); sin embargo, esto no fue suficiente para normalizar el contenido

de GAG en el SNC. *Véase* Jung *y col.*, Mol Cells. 2010;30(1):13-8.

El documento US2014004593 describe métodos y composiciones para la producción de una proteína iduronato-2-sulfatasa humana recombinante utilizando células que coexpresan la proteína iduronato-2-sulfatasa humana y la proteína enzimática generadora de formilglicina, y en donde la proteína iduronato-2-sulfatasa humana se expresa de una secuencia de nucleótidos optimizada por codón.

El documento WO2011108451 describe un método para producir enzimas lisosomales recombinantes y células transformadas por un vector de expresión que incorpora genes que codifican enzimas lisosomales humanas. Dentro de las enzimas lisosómicas descritas en este documento, se describe la proteína iduronato-2-sulfatasa humana.

El documento KR20040084881 describe la proteína iduronato-2-sulfatasa humana y un proceso de expresión en el que se construye un vector de transformación que contiene el ADNc que codifica esta proteína y se transforma con él una línea celular CHO.

Muenzer J., *et al.* divulgan la expresión de iduronato sulfatasa en el cerebro tres meses después del suministro intravenoso de vectores ssAV monocatenarios de los serotipos 2 y 8 que expresan el ADNc de iduronato sulfatasa humano dirigido por el promotor CMV (Muenzer J. *et al.,* 2013, Molecular Genetics and Metabolism, vol. 108, no. 2, pág. S163).

Aronovich *et al.* es una revisión de las estrategias de terapia génica sistémica para la corrección de anomalías somáticas y neurológicas en los trastornos de almacenamiento lisosómico. En particular, se describe en este documento que la infusión directa de vectores AAV9 en el LCR de ratones MPS IIIA condujo a una reducción significativa de GAG en el cerebro (Aronovich *et al.,* 2014, Molecular Genetics and Metabolism, vol. 114, no 2, pág. 83-93).

Sin embargo, ninguno de los enfoques anteriormente mencionados ha restaurado completamente la actividad de la iduronato-2-sulfatasa, logrado la erradicación completa de las inclusiones intracitoplásmicas en el SNC y tejidos somáticos, o corregido todos los signos clínicos de MPSII. Así, existe la necesidad de enfoques novedosos para el tratamiento de MPSII que tengan mejor eficacia y perfiles de seguridad.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona nuevas secuencias nucleotídicas para el tratamiento de mucopolisacaridosis, en particular mucopolisacaridosis tipo II (MPSII), o síndrome de Hunter.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1, en donde dicha secuencia nucleotídica aislada se selecciona de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8.

En un segundo aspecto, se refiere a un plásmido que contiene dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1.

En un tercer aspecto, la invención proporciona vectores recombinantes para el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II. Dichos vectores recombinantes son en particular vectores de virus adenoasociados (AAV) de serotipo 9 (AAV9) que contiene la secuencia nucleotídica de la invención que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1. Los vectores AAV9 de la presente invención como se definen en las reivindicaciones, pueden contener adicionalmente un promotor unido a la secuencia nucleotídica codificante con el fin de controlar la expresión de IDS. Un promotor adecuado es el promotor CAG, SEQ ID NO: 14.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica como se define en las reivindicaciones que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la secuencia nucleotídica o del plásmido o del vector recombinante de la invención.

Todavía otro aspecto de la invención se refiere a las secuencias nucleotídicas de la invención o un plásmido de la invención, o un vector recombinante de la invención, para su uso como un medicamento como se define en las reivindicaciones, en particular para el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II.

La presente invención también proporciona un método para la producción de los plásmidos según la invención,

además de un método para la producción de los vectores recombinantes según la invención como se define en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la invención se refiere a células aisladas que comprenden la secuencia nucleotídica de la invención que codifica para IDS como se define en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Generación de pAAV-CAG-hIDS y AAV-CAG-hIDS. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-CAG-hIDS y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector adenoasociado que contiene la secuencia codificante de hIDS.

Figura 2. Generación de pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y AAV-CAG-ohIDS-versión1. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector adenoasociado que contiene la secuencia codificante de ohIDS-versión1.

Figura 3. Generación de pAAV-CAG-ohIDS-versión2 y AAV-CAG-ohIDS-versión2. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-CAG-ohIDS-versión2 y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector adenoasociado que contiene la secuencia codificante de ohIDS-versión2.

Figura 4. Generación de pAAV-CAG-omIDS y AAV-CAG-omIDS. (A) Representación esquemática del plásmido pAAV-CAG-omIDS y sus componentes. (B) Representación esquemática del genoma de un vector adenoasociado que contiene la secuencia codificante de omIDS

Figura 5. Administración hidrodinámica de pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 a ratones sanos. Los histogramas representan la actividad de la iduronato-2-sulfatasa (IDS) en hígado (A) y suero (B) medida 48 horas después de la administración de 30 µg de los plásmidos que codifican la IDS humana pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2. La actividad de IDS de ratones WT inyectados con solución salina se fijó al 100 %. Los valores son medias ± EEM de 5 ratones por grupo. * $P<0,05$.

Figura 6. Administración hidrodinámica de pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 a ratones con MPSII. (A, B) Los histogramas representan la actividad de la iduronato-2-sulfatasa (IDS) en hígado (A) y suero (B) medida 1 semana después de la administración de los plásmidos que codifican la IDS humana pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2. Se usaron ratones no mutantes (sanos, wild-*type*-*WT*) y con MPSII inyectados con solución salina como controles. La actividad de IDS de ratones WT se fijó al 100 %. (C) Cuantificación del contenido de glucosaminoglicano (GAG) en hígado, bazo, corazón, vejiga urinaria y testículo 1 semana después de la administración de los diferentes plásmidos que codifican la IDS humana. Los valores son medias ± EEM de 5 ratones por grupo. * $P<0,05$, *** $P<0,001$, **** $P<0,0001$.

Figura 7. Administración intravascular de AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2 a ratones con MPSII. Los ratones con MPSII se inyectaron intravenosamente con $1x10^{10}$ gv de vectores AAV9 que codifican la IDS humana WT (AAV9-CAG-hIDS) o dos versiones diferentes de IDS humana optimizada (AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2). Se usaron ratones WT y con MPSII sin tratar como controles. (A, B) Los histogramas representan la actividad de la iduronato-2-sulfatasa (IDS) en hígado (A) y suero (B). La actividad de IDS de ratones WT se fijó al 100 %. (C) Cuantificación del contenido de glucosaminoglicano (GAG) en hígado en animales administrados con los diferentes vectores que codifican la IDS humana. Los valores son medias ± EEM de 5 ratones por grupo. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ y *** $P<0,001$.

Figura 8. Administración intra-LCR de AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2 a ratones con MPSII. Se inyectaron ratones con MPSII de 2 meses de edad en la cisterna magna con $5x10^{10}$ gv de vectores AAV9 que codifican la IDS humana no mutante (wild-type) (AAV9-CAG-hIDS) o dos versiones diferentes de IDS humana optimizada (AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2). Se usaron ratones no mutados (WT), con MPSII no tratados (MPSII) y con MPSII administrados con vectores AAV9 no codificantes (Nulo) (MPSII-Nulo) como controles. (A) Se analizó la actividad de la iduronato-2-sulfatasa 1,5 meses después de la administración del vector en diferentes partes del cerebro (Secciones I-V, en la que la Sección I representa la parte más rostral del cerebro y la Sección V representa la porción más caudal). La actividad de IDS de ratones WT se estableció al 100 %. (B) Cuantificación del contenido de glucosaminoglicano (GAG) en las mismas regiones del cerebro que en (A). Los resultados se muestran como media ± EEM de 5 ratones por grupo. *$P<0,05$, **$P<0,01$, ***$P<0,001$ y ****$P<0,0001$.

Figura 9. Administración intra-LCR de AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2 a ratones con MPSII. Se inyectaron ratones con MPSII de 2 meses de edad en la cisterna magna con $5x10^{10}$ gv de vectores AAV9 que codifican la IDS humana no mutante (wild-type) (AAV-CAG-hIDS) o dos versiones diferentes de IDS humana optimizada (AAV-CAG-ohIDS-versión1 y AAV-CAG-ohIDS-versión2). Se usaron ratones no mutados (WT), con MPSII no tratados (MPSII) y con MPSII que recibieron vectores AAV9 no codificantes (Nulo) (MPSII-Nulo) como controles. (A, B) Actividad de la iduronato-2-sulfatasa, expresada como % de actividad de WT, en hígado (A) y suero (B), medida 1,5 meses después del tratamiento. (C) Cuantificación del contenido de glucosaminoglicano (GAG) en órganos somáticos. Los resultados se muestran como media ± EEM de 5 ratones por grupo. **P*<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001 y *****P*<0,0001.

Figura 10. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A) Actividad de la iduronato-2-sulfatasa en diferentes partes del cerebro (secciones I-V) de ratones WT (sanos), ratones con MPSII sin tratamiento y ratones con MPSII administrados en el LCR, mediante inyección intracisternal (IC), con $5x10^{10}$ gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o AAV9-CAG-omIDS. La actividad de IDS WT se fijó al 100 %. Los análisis se realizaron 4 meses después de la administración del vector. (B) Cuantificación de glucosaminoglicanos (GAGs) en las mismas partes del cerebro que en (A). Los resultados se muestran como medias ± EEM de 4-5 ratones por grupo. *** *P*<0,001, **** *P*<0,0001 frente a MPSII-Nulo.

Figura 11. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A) Cuantificación de la intensidad de señal obtenida en diferentes áreas del cerebro tras la tinción para el marcador lisosómico LAMP-2, en ratones WT (sanos) y ratones con MPSII administrados en la cisterna magna con $5x10^{10}$ gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o $5x10^{10}$ gv de AAV9-CAG-omIDS. Los análisis se realizaron 4 meses después de la administración del vector. (B) Actividad de otras enzimas lisosómicas en extractos de cerebro. IDUA, *iduronidasa, alfa-L-*, SGSH, *N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa*, NAGLU, *N-acetilglucosaminidasa, alfa*, HGSNAT, *heparan-alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa*, GALNS, *galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa*, GUSB, *glucuronidasa, beta*, HEXB, *hexosaminidasa B*. Los valores son medias ± EEM de 4-5 ratones por grupo. ** P<0,01, *** P<0,001, **** P<0,0001 frente a MPSII-Nulo.

Figura 12. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). Cuantificación de la intensidad de señal obtenida en diferentes áreas tras la tinción de secciones de cerebro para el marcador lisosómico LAMP2. El análisis se realizó en ratones no mutados (WT) y compañeros de camada con MPSII 8 meses después de que los últimos recibieran una administración intra-LCR de ya sea $5x10^{10}$ gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o $5x10^{10}$ gv de AAV9-CAG-omIDS. Los resultados se muestran como media ± EEM de 2-6 ratones por grupo. **P*<0,05 y ***P*<0,01 frente a MPSII-Nulo.

Figura 13. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A, B) Los histogramas representan la intensidad de señal medida tras la inmunotinción para el marcador de astrocitos GFAP (A) y para el marcador de la microglía BSI-B4 (B) en secciones de la corteza frontal, parietal y occipital, colículo superior y tálamo de ratones WT (sanos), y ratones con MPSII administrados 4 meses antes en la cisterna magna con $5x10^{10}$ gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o $5x10^{10}$ gv de AAV9-CAG-omIDS. Los resultados se muestran como medias ± EEM de 5 ratones por grupo. ** P<0,01, *** P<0,001, **** P<0,0001 frente a MPSII-Nulo.

Figura 14. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A, B) Los histogramas representan la intensidad de señal medida tras la inmunotinción para el marcador de astrocitos GFAP (A) y para el marcador de la microglía BSI-B4 (B) en secciones del encéfalo de ratones no mutados (WT) sanos y compañeros de camada con MPSII que recibieron la administración intra-LCR de ya sea $5x10^{10}$ gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o $5x10^{10}$ gv de AAV9-CAG-omIDS. El análisis se realizó 8 meses después de la administración del vector. Los resultados se muestran como media ± EEM de 2-6 ratones por grupo. **P*<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001 y *****P*<0,0001 frente a MPSII-Nulo.

Figura 15. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A, B) Actividad de la iduronato-2-sulfatasa, expresada como % de actividad WT, en hígado (A) y suero (B) de ratones WT (sanos), ratones con MPSII sin tratamiento y ratones con MPSII administrados en el LCR con $5x10^{10}$ gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o $5x10^{10}$ gv de vector AAV9-CAG-omIDS a los 2 meses de edad y analizados 4 meses después. La actividad de IDS del WT se fijó al 100 %. (C) Cuantificación de glucosaminoglicanos (GAGs) en órganos somáticos. Los resultados se muestran como medias ± EEM de 4-5 ratones por grupo. ** P<0,01, *** P<0,001, **** P<0,0001 frente a MPSII-Nulo.

Figura 16. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A, B) Actividad de la iduronato-2-sulfatasa, expresada como el % de actividad de WT, en pulmón (A) y corazón (B) de ratones no mutados (WT) sanos, ratones con MPSII no tratados (MPSII) y ratones con MPSII administrados en el LCR con $5x10^{10}$ gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o $5x10^{10}$ gv de vector AAV9-CAG-omIDS a los 2 meses de edad y analizados 4 meses después. (C) Cuantificación del número de copias de genomas de vector/genoma diploide (gv/gd) en hígado, pulmón y corazón en ratones con MPSII administrados intra-LCR con AAV9-CAG-omIDS. Se usaron los tejidos obtenidos de un ratón con MPSII no tratado como controles. Los resultados se muestran como media ± EEM de 4-5 ratones por grupo en (A y B). *P<0,05, **P<0,01 y ***P<0,001 MPSII-Nulo.

Figura 17. Administración intra-LCR de vectores de AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). (A) Peso húmedo del hígado con respecto al peso corporal completo de ratones WT (sanos), ratones con MPSII sin tratamiento y ratones con MPSII administrados en el LCR con $5x10^{10}$ gv de vector de control (AAV9-Nulo) o $5x10^{10}$ gv de vector AAV9-CAG-omIDS a los dos meses de edad y analizados 4 meses después. (B) Actividad de otras enzimas lisosómicas en extractos de hígado obtenidos de las mismas cohortes de animales que en (A). (C) Actividad de β-hexosaminidasa (β-HEXO), expresada como el % de actividad de WT, en suero de las mismas cohortes de animales que en (A). IDUA, *iduronidasa, alfa-L-*, SGSH, *N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa*, NAGLU, *N-acetilglucosaminidasa, alfa*, HGSNAT, *heparan-alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa*, GALNS *galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa*, GUSB, *glucuronidasa, beta*, HEXB, *hexosaminidasa B*. Las actividades de enzima WT se fijaron al 100 %. Los valores son medias ± EEM de 4-5 ratones por grupo. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, **** P<0,0001 frente a MPSII-Nulo.

Figura 18. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). Evaluación de la actividad locomotora y exploratoria mediante la prueba del campo abierto en ratones WT (sanos) sin tratamiento previo, ratones con MPSII sin tratamiento y ratones con MPSII administrados en el LCR con $5x10^{10}$ gv de vector de control (AAV9-Nulo) o $5x10^{10}$ gv de vector AAV9-CAG-omIDS a los dos meses de edad y analizados 4 meses después. (A) Tiempo en el centro, (B) Tiempo en la periferia, (C) Entradas en el centro, (D) Latencia al centro, (E) Movimientos totales, (F) Líneas cruzadas. Los valores son medias ± EEM de 17-22 ratones por grupo. * P<0,05, ** P<0,01 frente a MPSII-Nulo.

Figura 19. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS). Análisis de Kaplan-Meier de supervivencia en ratones no mutados (WT) sanos, ratones con MPSII no tratados (MPSII) y ratones con MPSII administrados en el LCR con $5x10^{10}$ gv de vector no codificante de control (AAV9-Nulo) o $5x10^{10}$ gv de vector AAV9-CAG-omIDS. N=24 para WT, N=22 para MPSII no tratados, N=27 para MPSII inyectados con Nulo y N=91 para ratones que recibieron vector terapéutico.

Figura 20. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS) a diferentes dosis ($1,58x10^9$, $5x10^9$, $1,58x10^{10}$ y $5x10^{10}$ gv/ratón). (A) Actividad de la iduronato-2-sulfatasa en diferentes partes del cerebro (secciones I-V) de ratones WT (sanos), ratones con MPSII sin tratamiento y ratones con MPSII administrados en el LCR mediante inyección intracisternal (IC) con diferentes dosis de AAV9-CAG-omIDS a los 2 meses de edad y analizados 1,5 meses después. La actividad de IDS del WT se fijó al 100 %. (B) Cuantificación de glucosaminoglicanos (GAGs) en las mismas partes del cerebro que en (A). Los resultados se muestran como medias ± EEM de 5 ratones por grupo. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, **** P<0,0001 frente a MPSII sin tratar.

Figura 21. Administración intra-LCR de vectores AAV9 que codifican la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (AAV9-CAG-omIDS) a diferentes dosis ($1,58x10^9$, $5x10^9$, $1,58x10^{10}$ y $5x10^{10}$ gv/ratón). (A, B) Actividad de la iduronato-2-sulfatasa, expresada como % de actividad WT, en hígado (A) y suero (B) de ratones WT (sanos), ratones con MPSII sin tratamiento y ratones con MPSII administrados en el LCR con diferentes dosis de vector AAV9-CAG-omIDS a los 2 meses de edad y analizados 1,5 meses después. La actividad de IDS del WT se fijó al 100 %. (C) Cuantificación de glucosaminoglicanos (GAGs) en órganos somáticos. Los resultados se muestran como medias ± EEM de 5 ratones por grupo. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, **** P<0,0001 frente a MPSII sin tratar.

DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

Los plásmidos pAAV-CAG-hIDS (SEQ ID NO: 3), pAAV-CAG-ohIDS-versión1 (SEQ ID NO: 6) y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 (SEQ ID NO: 9) se depositaron el 18 de diciembre de 2014, bajo el número de acceso DSM 29866, DSM 29867 y DSM 29868 en la DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Inhoffenstraße 7 B, D-38124 Braunschweig, República Federal de Alemania.

DEFINICIONES

El término “secuencia nucleotídica” o “secuencia de nucleótidos aislada” se refiere a una molécula de ácido nucleico, tanto ADN como ARN, que contiene desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, respectivamente. El ácido nucleico puede ser bicatenario, monocatenario, o contener porciones tanto de secuencia bicatenaria como monocatenaria.

El término “% de identidad de secuencias” o “% de identidad” se refiere al porcentaje de nucleótidos de una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de referencia, después de alinear las secuencias para lograr el máximo % de identidad de secuencias. El % de identidad de secuencias puede determinarse por cualquier método o algoritmo establecido en el arte, tal como los algoritmos ALIGN, BLAST y BLAST 2.0. Véase Altschul S, *y col.*, Nuc Acids Res. 1977;25:3389-3402 y Altschul S, *y col.*, J Mol Biol. 1990;215:403-410.

En el presente documento, el % de identidad de secuencias o “% de identidad” se calcula dividiendo el número de nucleótidos que son idénticos después de alinear la secuencia de referencia y la secuencia candidata entre el número total de nucleótidos en la secuencia de referencia y multiplicando el resultado por 100.

Los términos “codificar” o “codificante” se refieren al código genético que determina cómo una secuencia de nucleótidos se traduce en un polipéptido o una proteína. El orden de los nucleótidos en una secuencia determina el orden de los aminoácidos a lo largo de un polipéptido o una proteína.

El término “proteína” se refiere a una macromolécula compuesta de una o más cadenas lineales de aminoácidos o polipéptidos. Las proteínas pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, como la conversión de un residuo de cisteína en 3-oxoalanina, glucosilación o unión a metal. La glucosilación de una proteína es la adición de diferentes hidratos de carbono que están enlazados covalentemente a la cadena de aminoácidos.

El término “cantidad efectiva” se refiere a una cantidad de una sustancia suficiente para lograr el fin previsto. Por ejemplo, una cantidad efectiva de un vector AAV9 para aumentar la actividad de la iduronato-2-sulfatasa (IDS) es una cantidad suficiente para reducir la acumulación de glucosaminoglicanos. Una “cantidad terapéuticamente efectiva” de un vector de expresión para tratar una enfermedad o trastorno es una cantidad del vector de expresión suficiente para reducir o erradicar los signos y síntomas de la enfermedad o trastorno. La cantidad efectiva de una sustancia dada variará con factores tales como la naturaleza de la sustancia, la vía de administración, el tamaño y especie del animal que va a recibir la sustancia y el fin de administrar la sustancia. La cantidad efectiva en cada caso individual puede determinarse empíricamente por un experto según métodos establecidos en el arte.

El término “individuo” se refiere a un mamífero, preferiblemente mamífero humano o no humano, más preferentemente ratón, rata, otros roedores, conejo, perro, gato, cerdo, vaca, caballo o primate, adicionalmente más preferiblemente un ser humano.

El término “operativamente unido” se refiere a la relación funcional y la localización de la secuencia promotora con respecto al gen de interés (por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia). Generalmente, un promotor operativamente unido está contiguo a la secuencia de interés. Sin embargo, un potenciador no tiene que ser contiguo a la secuencia de interés para controlar su expresión.

El término “tropismo” se refiere a la forma en la que diferentes virus se han desarrollado para dirigirse preferencialmente a especies de huésped específicas, o tipos específicos de células dentro de aquellas especies.

El término “terapia génica” se refiere a la transferencia de material genético (por ejemplo, ADN o ARN) de interés en una célula para tratar o prevenir una enfermedad o afección genética o adquirida. El material genético de interés codifica un producto (por ejemplo, un polipéptido de proteína, péptido o ARN funcional) cuya producción *in vivo* se desea. Por ejemplo, el material genético de interés puede codificar una enzima, hormona, receptor o polipéptido de valor terapéutico.

El término “vector viral recombinante” o “vector viral” se refiere a un agente obtenido de un virus que se produce naturalmente mediante técnicas de ingeniería genética que puede transferir material genético (por ejemplo, ADN o ARN) de interés a una célula, lo que resulta en la producción del producto codificado por dicho material genético (por ejemplo, un polipéptido de proteína, péptido o ARN funcional) en la célula diana.

El término “plásmido recombinante” o “plásmido” se refiere a una molécula de ADN pequeña, circular, bicatenaria, auto-replicante obtenida mediante técnicas de ingeniería genética que puede transferir material genético de interés a una célula, lo que resulta en la producción del producto codificado por dicho material genético (por ejemplo un polipéptido de proteína, péptido o ARN funcional) en la célula diana. Además, el término “plásmido recombinante” o “plásmido” también se refiere a una molécula de ADN pequeña, circular, bicatenaria, auto-replicante obtenida mediante técnicas de ingeniería genética usada durante la fabricación de vectores virales como vehículos del genoma del vector recombinante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona secuencias nucleotídicas para el tratamiento de mucopolisacaridosis, en particular mucopolisacaridosis tipo II (MPSII), o síndrome de Hunter.

Las secuencias nucleotídicas según la presente invención, como se definen en las reivindicaciones, codifican para la proteína iduronato-2-sulfatasa (denominada IDS) según la SEQ ID NO: 1, enzima que participa en la degradación escalonada de los glucosaminoglicanos heparán sulfato y dermatán sulfato. Los términos “IDS natural” o “IDS *wild-type* (*WT*)” se refieren a una secuencia de nucleótidos obtenida o producida a partir de células huésped usando métodos conocidos para aquellos expertos en la materia, o alternativamente sintetizada químicamente usando como material de partida la secuencia codificante (CDS) para IDS de cada especie. Preferiblemente, “IDS natural” o “IDS WT” se sintetizan químicamente a partir de la CDS murina (denominada mIDS) o de la CDS de seres humanos (denominada hIDS). Más preferiblemente, la secuencia nucleotídica de hIDS se sintetiza químicamente a partir de CDS humana y se corresponde con la SEQ ID NO: 2.

Según la presente invención, la evidencia establece que las secuencias nucleotídicas modificadas, también denominadas secuencias nucleotídicas optimizadas, median en la producción de mayores cantidades de proteína de interés, probablemente debido a la eficaz transcripción de ARNm o la transcripción de un ARNm más estable, o el uso más eficiente de codones. Estas secuencias también se denominan en el presente documento “secuencias optimizadas”; omIDS y ohIDS, cuando se obtienen de CDS murinas y humanas, respectivamente. Ventajosamente, las secuencias optimizadas según la presente invención son secuencias de codones optimizados.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1 donde dicha secuencia nucleotídica aislada se selecciona de ohIDS-versión1 según la SEQ ID NO: 5 y ohIDS-versión2 según la SEQ ID NO: 8.

Según la presente invención, las secuencias aisladas como se definen en las reivindicaciones pueden insertarse en un sitio de clonación múltiple (MCS) de un plásmido de esqueleto. En particular, el plásmido de esqueleto es un plásmido que contiene las ITR del virus adenoasociado (AAV), denominado pAAV en el presente documento.

Un segundo aspecto de la invención proporciona un plásmido que contiene una secuencia nucleotídica que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1 donde dicha secuencia nucleotídica se selecciona de ohIDS-versión1 según la SEQ ID NO: 5 y ohIDS-versión2 según la SEQ ID NO: 8.

Además de las secuencias aisladas mencionadas anteriormente, los plásmidos según la presente invención también incluyen elementos de control convencionales que pueden estar operativamente unidos a la secuencia de nucleótidos de una forma que permite su transcripción, traducción y/o expresión en una célula transfectada con los plásmidos. En particular, los plásmidos según la presente invención contienen un promotor como elemento de control operativamente unido a la secuencia de nucleótidos de interés. Se conocen en la técnica un gran número de promotores, que son nativos o quiméricos, constitutivos o inducibles, ubicuos y/o específicos de tejido. Ventajosamente, el promotor usado en el contexto de la presente invención es el promotor CAG como se define en las reivindicaciones, que se refiere a la combinación que comprende el elemento potenciador temprano del citomegalovirus y el promotor de B-actina de pollo. Adicionalmente incluye porciones de los intrones de B-actina de pollo y de B-globina de conejo que confieren estabilidad al ARNm derivado de la secuencia de nucleótidos de interés, Véase Alexopoulou A, *y col.*, BMC Cell Biology 2008; 9(2): 1-11. El promotor CAG incluido en los plásmidos pAAV de la presente invención tiene una secuencia SEQ ID NO: 14. Este promotor CAG específico permite una expresión de larga duración de la enzima que falta en todas las áreas del cerebro y en el hígado. Como consecuencia, la acumulación lisosómica de glucosaminoglicano (GAG) se corrige, previniendo de esta forma las alteraciones neurológicas y somáticas características de la MPSII.

En un aspecto de la descripción particularmente ventajoso, el plásmido según la invención es el plásmido pAAV-CAG-hIDS, según la SEQ ID NO: 3 con número de acceso DSM 29866.

En otra realización particularmente ventajosa, el plásmido según la invención es el plásmido pAAV-CAG-ohIDS-versión1, según la SEQ ID NO: 6 con número de acceso DSM 29867.

En otra realización particularmente ventajosa, el plásmido según la invención es el plásmido pAAV-CAG-ohIDS-versión2, según la SEQ ID NO: 9 con número de acceso DSM 29868.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a vectores recombinantes para su uso en el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II. Debe entenderse que un vector de la presente invención es una proteína de la cápside, además de un genoma de vector contenido dentro, usado para la transferencia de un material genético de interés en una célula. Aparte de dicho material genético de interés, el genoma del vector también puede contener diferentes elementos funcionales que incluyen elementos de control para la transcripción tales como promotores u operadores, regiones de unión de factores de transcripción o potenciadores y elementos de control para la iniciación o terminación de la traducción.

Los vectores según la invención se derivan de virus adenoasociados (AAV) como se define en las reivindicaciones, y se usan para la transferencia de la secuencia de nucleótidos de interés en una célula diana. Han demostrado tener una alta eficiencia en la transducción de células post-mitóticas en una amplia variedad de tejidos. En el contexto de la presente invención, los vectores se usan para administrar una versión optimizada de la secuencia codificante de la iduronato-2-sulfatasa humana (ohIDS-versión1 de SEQ ID NO: 5 o ohIDS-versión2 de SEQ ID NO: 8). Un vector adenoasociado es un vector derivado de un virus adenoasociado de la familia de *parvoviridae*. El genoma del virus adenoasociado está construido de ácido desoxirribonucleico monocatenario (ADNmc). Estos virus infectan mamíferos, pero son no patógenos (es decir, no producen enfermedad). Pueden infectar células que se dividen o que no se dividen, y su tropismo cambia dependiendo del serotipo. El serotipo es la clasificación de los grupos de virus, dependiendo de sus antígenos de la cápside. El serotipo de los virus adenoasociados, determinado por su proteína de la cápside, define el tropismo del virus y permite su entrada en un tipo de célula específica. En el contexto de la presente invención, el AAV tiene un serotipo 9 (AAV9), ya que muestra la mejor capacidad para administrar el material genético al cerebro, además de a órganos periféricos tras una única administración al LCR. Los vectores AAV9 de la presente invención como se define en las reivindicaciones, están compuestos de la cápside viral de serotipo 9 de virus adenoasociados humanos y un genoma modificado, que contiene las repeticiones terminales invertidas (ITRs) del serotipo 2 de virus adenoasociados humanos, el promotor CAG, una versión optimizada de la secuencia codificante de la iduronato-2-sulfatasa humana (también denominada secuencia de nucleótidos según la presente invención), y el poliA del gen de beta-globina de conejo.

Así, en este aspecto la invención se refiere a un vector AAV de serotipo 9 recombinante, vector AAV9, que contiene una secuencia nucleotídica que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1, donde dicha secuencia nucleotídica se selecciona de ohIDS-versión1 según la SEQ ID NO: 5 y ohIDS-versión2 según la SEQ ID NO: 8.

En un aspecto ventajoso de esta descripción, la presente divulgación se refiere a un AAV9 recombinante que contiene una secuencia nucleotídica que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa IDS según la SEQ ID NO: 1 y que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, el AAV9 recombinante de esta divulgación contiene una secuencia nucleotídica que tiene entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En particular, el AAV9 recombinante de la divulgación contiene una secuencia nucleotídica que tiene un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 82%, 85%, 87% o un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En un aspecto preferido de la divulgación, el AAV9 recombinante contiene las secuencias nucleotídicas seleccionadas de hIDS según la SEQ ID NO: 2, ohIDS-versión1 según la SEQ ID NO: 5 y ohIDS-versión2 según la SEQ ID NO: 8.

Adicionalmente, se ha encontrado sorprendentemente que la asociación, en la misma entidad, de la cápside de AAV9 con una secuencia de nucleótidos que codifica la iduronato-2-sulfatasa (IDS), junto con un promotor elegido, especialmente el promotor CAG, permite una expresión de larga duración de la enzima que falta en todas las áreas del cerebro, en particular cuando la entidad se administra al líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante inyección intracisternal. Como consecuencia, la acumulación lisosómica de glucosaminoglicano (GAG) se corrige, previniendo de esta forma las alteraciones neurológicas características de la enfermedad de MSPII. Este efecto se ha observado incluso en el bulbo olfativo, que está alejado del punto de administración de los vectores (cisterna magna). Adicionalmente, los vectores AAV9 según la invención administrados en el LCR fueron capaces de llegar a la circulación sistémica para transducirse en el hígado. La producción y secreción de la enzima por células del hígado

produjeron un aumento de la actividad de la iduronato-2-sulfatasa (IDS) en suero, conduciendo por último a la reducción de la patología lisosómica en muchos tejidos somáticos. Esto representa una clara ventaja de los vectores según la invención con respecto a los enfoques existentes que solo corrigieron parcialmente los signos clínicos de la enfermedad y normalmente ejercen su efecto en el cerebro o en la circulación sistémica, pero no en ambos.

Por consiguiente, la presente descripción se refiere a vectores AAV9 que contienen un promotor CAG unido a una secuencia nucleotídica que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1.

En particular, los vectores AAV9 de la presente descripción contienen un promotor CAG unido a una secuencia nucleotídica que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1 y que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 2. Ventajosamente, los vectores AAV9 de esta divulgación contienen un promotor CAG unido a una secuencia nucleotídica que codifica la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1 y que tiene entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En particular, la secuencia de nucleótidos contenida en el vector AAV9 según esta divulgación tiene un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 82%, 85%, 87% o un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

En un aspecto preferido de esta descripción, el vector recombinante de la presente divulgación es AAV9-CAG-hIDS (SEQ ID NO: 4) que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 operativamente unida al promotor CAG de SEQ ID NO: 14.

En otra realización preferida, el vector recombinante de la presente invención es AAV9-CAG-ohIDS-versión1 (SEQ ID NO: 7) que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 operativamente unida al promotor CAG de SEQ ID NO: 14.

En otra realización preferida, el vector recombinante de la presente invención es AAV9-CAG-ohIDS-versión2 (SEQ ID NO: 10) que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 operativamente unida al promotor CAG de SEQ ID NO: 14.

Los vectores recombinantes de la invención como se definen anteriormente en este documento pueden obtenerse a partir de los plásmidos correspondientes también descritos anteriormente en este documento por transfección de células HEK293 usando métodos conocidos en el estado del arte.

Así, la presente invención proporciona además un método para la producción de los vectores virales adenoasociados AAV9 según la invención. El proceso comprende las etapas de:

i) proporcionar un primer vector que comprende la secuencia que codifica la proteína de interés interpuesta entre una primera repetición terminal de AAV y una segunda repetición terminal de AAV, un promotor CAG operativamente unido a la secuencia que codifica la proteína de interés; un segundo vector que comprende un gen *rep* de AAV y un gen *cap* de AAV del serotipo 9, y un tercer vector que comprende los genes de función auxiliar del adenovirus;

ii) co-transfección de células competentes con los vectores de la etapa i);

iii) cultivo de las células transfectadas de la etapa ii) durante un periodo de tiempo suficiente para producir partículas virales; y

iv) purificación de los vectores de expresión del cultivo de la etapa iii).

En una realización preferida, la primera y segunda repeticiones terminales del AAV del primer vector son ITRs del serotipo 2 de AAV. En otra realización preferida, las células competentes son células HEK293.

La invención también proporciona un método para la preparación del plásmido según la invención, que comprende las etapas de:

i) cortar la secuencia que codifica la proteína de interés del plásmido de partida, por digestión, en particular usando MluI/EcoRI,

ii) clonar la secuencia que codifica la proteína de interés entre dos sitios de restricción del plásmido de esqueleto de AAV pAAV-CAG, obteniéndose de esta forma el plásmido correspondiente que incluye la secuencia que codifica la proteína de interés.

La presente invención contempla, en un aspecto adicional, composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de las secuencias nucleotídicas aisladas de la invención, de los plásmidos de la invención, o de los vectores AAV9 de la invención.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden las secuencias nucleotídicas aisladas de la invención, los plásmidos de la invención, o los vectores AAV9 de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición también puede comprender al menos una sustancia auxiliar. Las sustancias auxiliares pueden seleccionarse de entre vehículos, excipientes, disolventes, diluyentes o adyuvantes. Vehículos, diluyentes o adyuvantes aceptables son no tóxicos y son preferiblemente inertes a la dosificación y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes; polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos; aminoácidos; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol, contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como copolímero de bloque de polietileno-polioxipropileno (Pluronic F68®) y polietilenglicol (PEG).

En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas según la invención son adecuadas para administración parenteral. Ejemplos de administración parenteral son inyecciones intravenosas, subcutánea, intracisternal e intramuscular. Preferiblemente, la composición farmacéutica según la invención es adecuada para administración intravenosa o intracisternal. Composiciones adecuadas para tal administración parenteral incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles, polvos estériles para preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones estériles. Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas según la invención se preservan de la acción contaminante de bacterias y hongos.

La dosificación para seres humanos y animales puede variar dependiendo de factores que tienen su base en las especies respectivas u otros factores, tales como edad, sexo, peso o grado de enfermedad, etc.

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere al uso terapéutico de las secuencias nucleotídicas aisladas de la invención, los plásmidos de la invención, o los vectores AAV9 de la invención. Como se ha mencionado anteriormente, las secuencias aisladas de nucleótidos, los plásmidos, o los vectores AAV9 según la invención median en la expresión de la enzima IDS que falta, corrigiendo así la acumulación lisosómica de GAGs. Esto permite corregir todos los signos clínicos de la mucopolisacaridosis tipo II (MPSII). A este respecto, la presente invención también se refiere a las secuencias nucleotídicas aisladas descritas en el presente documento, los plásmidos como se describen en el presente documento, o los vectores AAV, especialmente vectores AAV9, descritos en el presente documento para su uso como un medicamento.

En particular, esta descripción se refiere a las secuencias nucleotídicas aisladas descritas en el presente documento, los plásmidos como se describen en el presente documento, o los vectores AAV, especialmente vectores AAV9, descritos en el presente documento para aumentar la actividad de la iduronato-2-sulfatasa (IDS) en el cuerpo.

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere a las secuencias nucleotídicas aisladas de la invención, los plásmidos de la invención, o los vectores AAV9 de la invención para su uso en el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II (MPSII).

En un aspecto todavía adicional, la presente descripción se refiere al uso de las secuencias nucleotídicas aisladas descritas en el presente documento, los plásmidos como se describen en el presente documento, o los vectores AAV, especialmente vectores AAV9, descritos en el presente documento para la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II (MPSII).

Otro aspecto de la presente descripción se refiere al método de tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II (MPSII), que comprende la etapa de administrar al menos una secuencia de nucleótidos aislada descrita en el presente documento, un plásmido como se describe en el presente documento, o un vector AAV, especialmente vectores AAV9, descrito en el presente documento a un sujeto en necesidad del mismo.

La presente descripción proporciona además una célula aislada que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para la iduronato-2-sulfatasa de SEQ ID NO: 1. En particular, la célula según la descripción comprende una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1 y que tiene

al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 2., y ventajosamente entre un 75% y un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En particular, la secuencia nucleotídica contenida en la célula aislada según esta descripción tiene un 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 82%, 85%, 87% o un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

En un aspecto preferido, las células de la divulgación comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 que codifica para la iduronato-2-sulfatasa (IDS) de SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la invención se refiere a células aisladas que comprenden la secuencia de nucleótidos de la invención seleccionada de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8 que codifican para la iduronato-2-sulfatasa (IDS) de SEQ ID NO: 1.

PROCEDIMIENTOS GENERALES

1. Vectores de AAV recombinantes

Los vectores de AAV descritos en el presente documento se obtuvieron por transfección triple. Los materiales requeridos para preparar los vectores fueron: células HEK293 (que expresan genes E1 adenovirales), plásmido auxiliar que proporciona función de adenovirus, plásmido que proporciona genes ***rep*** de AAV del serotipo 2 y genes ***cap*** del serotipo 9 (AAV9) y, finalmente, el plásmido de esqueleto con ITRs de AAV2 y la construcción de interés.

Para generar vectores de AAV que expresan iduronato-2-sulfatasa, las secuencias codificantes optimizadas o no optimizadas de iduronato-2-sulfatasa humana o murina se clonaron en un plásmido de esqueleto de AAV bajo el control del promotor CAG híbrido ubicuo. La producción a gran escala de los plásmidos se hizo usando un kit EndoFree Plasmid Megaprep (Qiagen).

Se generaron vectores por transfección libre de virus auxiliares de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones. Véanse Matsushita T, *y col.*, Gene Ther. 1998;5:938-945 y Wright J, *y col.*, Mol. Ther. 2005;12:171-178. Las células se cultivaron al 70% de confluencia en botellas rotatorias (RB) (Corning, Corning, NY, EE.UU.) en DMEM suplementado con 10% de FBS y luego se co-transfectaron con: 1) un plásmido que lleva el casete de expresión flanqueado por las ITRs virales del AAV de serotipo 2 (descritos anteriormente); 2) un plásmido que lleva los genes *rep2* y *cap9* de AAV; y 3) un plásmido que lleva las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes consecutivos de cloruro de cesio usando un protocolo optimizado como se ha descrito previamente. Véase Ayuso E, *y col.*, Gene Ther. 2010;17:503-510. Los vectores se dializaron contra PBS + 0,001% de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron por qPCR y se guardaron a -80ºC hasta uso.

Los vectores de la presente invención se construyeron según técnicas de biología molecular muy conocidas en la técnica.

2. Animales

Se compró un modelo de ratón deficiente en iduronato-2-sulfatasa (MPSII) de Taconic (Germantown, NY 12526 USA, Suministro TF1838). Ratones afectados con MPSII y ratones control sanos (WT) se cruzaron endogámicamente a partir de fundadores machos hemicigóticos y hembras heterocigóticas. El genotipo se determinó en ADN genómico de muestras de cola cortada mediante un análisis por PCR que amplifica una secuencia que engloba la mutación elegida como diana. Las secuencias de los cebadores de sentido directo y de sentido inverso respectivas son: Cebador directo: 5'- TTT TGT GTA CTC CAA CCC CG -3' (SEQ ID NO: 15), Cebador inverso: 5'- TGT CTC CAT AAC AGC CCA GG -3' (SEQ ID NO: 16), Mutación del cebador inverso: 5'- GCC CTC ACA TTG CCA AAG GA -3' (SEQ ID NO: 17). Los ratones se alimentaron a voluntad con una dieta estándar (Harlan, Tekland) y se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (las luces se encienden a las 9:00 A.M.).

3. Administración hidrodinámica de plásmidos que codifican IDS a ratones

Para la administración hidrodinámica de los plásmidos pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2, animales con MPSII y WT (sanos) de 3 meses de edad recibieron mediante inyección en la vena de la cola en <5 segundos una dosis total de 30 µg de plásmido en un volumen igual al 10% del peso corporal del animal. Esta técnica resulta en la expresión de transgenes codificados por plásmido principalmente en el hígado. Véase Liu *y col.,* Gene Ther. 1990;6(7):1258-66. Como control, una cohorte de ratones recibió un volumen igual de solución salina. Los ratones se dividieron en dos cohortes, y se sacrificaron a las 48 horas o 1 semana después de la inyección hidrodinámica de los plásmidos. Se recogieron los órganos como se describe en la siguiente sección.

4. Administración de vector a ratones

Para la administración intra-LCR de vectores AAV9-CAG-omIDS a ratones, se inyectó una dosis total de $5x10^{10}$ gv a la cisterna magna de animales con MPSII de 2 meses de edad. Una cohorte similar de animales se inyectó con $5x10^{10}$ gv de vector control no codificante (AAV9-Nulo). A los 6 y 10 meses de edad, es decir, 4 y 8 meses después de la administración del vector, los ratones se anestesiaron y se recogieron los tejidos.

Para la administración intravenosa a los ratones de los vectores AAV9 que contienen la hIDS WT o cualquiera de las versiones optimizadas de la secuencia codificante de IDS, se inyectó una dosis total de $1x10^{10}$ gv de vector en la vena de la cola de animales con MPSII de 3,5 meses de edad. Animales WT y con MPSII sin tratar sirvieron de controles. Tres semanas después de la administración con el vector, los ratones se anestesiaron y se recogieron los tejidos.

5. Recogida de muestras

En el momento del sacrificio, los animales se anestesiaron profundamente y a continuación se perfundieron transcardíacamente con 12 ml de PBS para limpiar completamente la sangre de los tejidos. Se recogieron el cerebro entero y múltiples tejidos somáticos (incluyendo hígado, bazo, páncreas, riñón, pulmón, corazón, músculo esquelético, testículos, vejiga urinaria, intestino y tejido adiposo) y o se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80ºC o se sumergieron en formalina para los posteriores análisis histológicos.

6. Actividad de la iduronato-2-sulfatasa y cuantificación de glucosaminoglicanos

Se sonicaron muestras de cerebro, hígado, pulmón y corazón en agua Mili-Q. Se analizó suero sin procesar. La actividad de la iduronato-2-sulfatasa se determinó con un sustrato fluorogénico derivado de 4-metilumbeliferona (Moscerdam Substrates, Oegstgeest, NL), como se ha descrito previamente. Véase Voznyi *y col.*, J Inher Metab Diss 2001;24:675-680. Los niveles de actividad del cerebro, hígado, pulmón y corazón se normalizaron contra la cantidad total de proteína, se cuantificaron usando el ensayo de proteína de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). La actividad en suero se normalizó frente al volumen.

Para la cuantificación de glucosaminoglicanos (GAG), se pesaron muestras de tejido y a continuación se digirieron con proteinasa K y los extractos se clarificaron por centrifugación y filtración. Los niveles de GAG se determinaron en extractos de tejido con el kit de glucosaminoglicanos sulfatados Blyscan (Biocolor, Carrickfergus, County Antrim, GB), usando 4-sulfato de condroitina como patrón. Los niveles de GAG se normalizaron respecto al peso de tejido húmedo.

7. Actividad de otras enzimas lisosómicas

Se sonicaron muestras de cerebro y de hígado en 500 µl de agua Mili-Q y se determinaron las actividades enzimáticas en sobrenadantes usando sustratos fluorogénicos derivados de 4-metilumbeliferona. Se analizó el suero sin procesar. La actividad de IDUA se ensayó en 15 µg de proteína incubada durante 1 h a 37 ºC con α-L-iduronida de 4-metilumbeliferilo (Glycosynth). Véase Bacter *y col.,* Blood 2002;99(5)1857-9. Se midió la actividad de SGSH como se ha descrito previamente. Véanse Karpova *y col.*, J Inherit Metab Dis. 1996;19(3):278–285, Haurigot *y col.*, arriba. Brevemente, se incubaron primero 30 µg de proteína con 4-MU-αGlcNS durante 17 horas a 47 ºC. La segunda incubación se llevó a cabo en presencia de 10 U/ml de α-glucosidasa (Sigma-Aldrich) en 0,2% de BSA durante 24 horas a 37 ºC. Para la actividad de NAGLU, se incubaron 30 µg de extracto de proteína de tejido con 4-metilumbeliferil-α-N-acetil-D-glucosaminida (Moscerdam Substrates) durante 3 h a 37 ºC, como se ha descrito previamente. Véanse Marsh *y col.*, Clin Genet. 1985;27(3):258-62, Ribera *y col.*, arriba. Se determinó la actividad de HGSNAT a partir de 30 µg de extracto de proteína incubada con acetilcoenzima A y 4-metilumbeliferil-β-D-glucosamina (MU-βGlcNH$_2$, Moscerdam Substrates) durante 17 h a 37 ºC. Véase Voznyi *y col.*, J Inh Metab Dis 1993;16:465-72. Se ensayó la actividad de GALNS por un protocolo de 2 etapas usando 10 µg de extracto de proteína y *sal sódica de β-D-galactopiranósido-6-sulfato de 4-metilumbeliferilo* (MU-βGal-6S) durante la primera incubación durante 17 h a 37 ºC. La segunda etapa se llevó a cabo añadiendo *tampón P_i* (tampón Na_2HPO_4 0,9 M / NaH_2PO_4 0,9 M, pH 4,3 + 0,02 % (peso/volumen) de azida de Na) y β-galactosidasa (β-Gal-Ao, Sigma) e incubando la mezcla durante 2 h a 37 ºC. Véase van Diggelen *y col.,* Clin Chim Acta 1990;187:131-40. La actividad de la enzima GUSB se determinó a partir de 10 µg de extracto de proteína incubada con 4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido (Sigma) a 37 ºC durante 1 h. Se ensayó la actividad de HEXB por incubación de 0,1 µg de extracto de proteína con N-acetil-β-D-glucosaminida de 4-metilumbeliferilo (Sigma) durante 1 h a 37 ºC. Después de detener las

reacciones aumentando el pH, la fluorescencia liberada se midió con el fluorímetro FLx800 (BioTek Instruments). Todos los niveles de actividades del cerebro y del hígado se normalizaron contra la cantidad total de proteína, se cuantificaron usando el ensayo de proteínas Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

8. Análisis histológico

Se fijaron tejidos durante 12-24 h en formalina, se embebieron en parafina y se seccionaron. Para la detección inmunohistoquímica de LAMP2 en cerebro, secciones de parafina se sometieron a recuperación de epítopos inducida por calor en tampón citrato, pH 6, y a continuación se incubaron durante la noche a 4 ºC con anticuerpo de rata anti-LAMP2 (Ab13524; Abcam, Cambridge, RU) diluido a 1:500 y posteriormente se incubaron con anticuerpo de conejo anti-rata biotinilado (Dako, Glostrup, DK) a 1:300. Para la inmunotinción de GFAP en muestras de cerebro, secciones de parafina se incubaron durante la noche a 4 ºC con anticuerpo de conejo anti-GFAP (Ab6673; Abcam, Cambridge, RU) diluido a 1:1000 y posteriormente se incubaron con anticuerpo de cabra anti-conejo biotinilado (31820; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) a 1:300. Se amplificaron las señales de LAMP2 y GFAP incubando secciones con el kit de tinción ABC-Peroxidase (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) a dilución 1:100 y se visualizaron usando 3,3-diaminobencidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) como cromógeno.

Para teñir células de la microglía en muestras de cerebro, secciones de parafina se incubaron durante la noche a 4 ºC con lectina BSI-B4 (L5391; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) diluida a 1:100. Se visualizó la señal de BSI-B4 usando 3,3-diaminobencidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) como cromógeno. Se obtuvieron imágenes de campo brillante con un microscopio óptico (Eclipse 90i; Nikon, Tokio, JP).

Se usó el software NIS Elements Advanced Research 2.20 para cuantificar señales de LAMP2, GFAP y BSI-B4 en 3-4 imágenes de cada región del cerebro (aumentos originales, ×20) por animal, usando los mismos parámetros de umbral de señales para todos los animales. Entonces se calculó el porcentaje de área positiva, es decir, el área, en píxeles, con una señal positiva con respecto al área de tejido total en la imagen.

9. Cuantificación del número de copias de genoma de vector en tejidos

Después de una digestión de tejido durante la noche en proteinasa K (0,2 mg/ml), se aisló el ADN total con el kit de purificación MasterPureDNA (Epicenter). Se usó PCR cuantitativa con cebadores y sonda específica para la secuencia de HBB2 (contenida en el segmento de poliA) para cuantificar los números de copias de genoma de vector en 20 ng de ADN total. Cebador directo: 5'-CTT GAG CAT CTG ACT TCT GGC TAA T-3' (SEQ ID NO: 18); cebador inverso: 5'-GAT TTG CCC TCC CAT ATG TCC-3' (SEQ ID NO: 19); sonda: 5'-CCG AGT GAG AGA CAC AAA AAA TTC CAA CAC-3' (SEQ ID NO: 20). Se usó la curva patrón de referencia construida por diluciones sucesivas del plásmido linealizado que contiene la secuencia de poliA para interpolar los valores finales de gv/muestra.

10. Prueba de campo abierto

Se analizó el comportamiento de ratones de 6 meses de edad por la prueba de campo abierto realizada entre las 9:00 am y 1:00 pm. Los animales se colocaron en la esquina izquierda inferior de una cámara brillantemente iluminada (41 x 41 x 30 cm) cruzada por 2 haces de rayos de luz (SedaCom32; Panlab) que detectaron movimientos horizontales y verticales de los ratones. La superficie del área se dividió en tres regiones concéntricas cuadradas: centro (14 x 14 cm), periferia (27 x 27 cm) y límite (41 x 41 cm). Se registraron las actividades exploratorias y motoras durante los 3 primeros minutos de la prueba usando un sistema de seguimiento por vídeo (SmartJunior, Panlab).

11. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como media ± EEM. Se hicieron comparaciones estadísticas usando ANOVA de una vía. Para las comparaciones múltiples entre grupos de control y de tratamiento se usa la prueba posterior de Dunnett, y entre todos los grupos usando la prueba posterior de Tukey. Se consideró significación estadística si $P < 0,05$. Se usaron curvas de Kaplan-Meier para estimar la supervivencia y se usó la prueba del orden logarítmico para las comparaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 de referencia: Construcción de pAAV-CAG-hIDS

Se utilizó el CDS de la iduronato-2-sulfatasa humana como material de partida (secuencia de referencia de NCBI: NM_000202.6) y se sintetizó químicamente para este fin (GenScript Inc). La CDS se recibió clonada dentro del plásmido pUC57 (AmpR) flanqueada por sitios de restricción SwaI.

El fragmento SwaI-SwaI de la CDS de la iduronato-2-sulfatasa humana se escindió del plásmido pUC57 y posteriormente se clonó entre los sitios de restricción MluI y EcoRI del plásmido de esqueleto de AAV pAAV-CAG después de convertir los nucleótidos protuberantes de 5' y 3' en romos con fragmento de Klenow (Fermentas). El plásmido resultante se llamó pAAV-CAG-hIDS (número de acceso DSM 29866). Véase la Figura 1A y SEQ ID NO: 3.

El plásmido pAAV-CAG se había generado previamente y contenía las ITRs del genoma de AAV2, el promotor CAG y la señal de poliA de β-globina de conejo, además de un sitio de multiclonación para la clonación de las CDSs de interés. El promotor CAG es un promotor híbrido compuesto por el potenciador temprano/intermedio del CMV y el promotor de β-actina de pollo. Este promotor puede conducir a una potente expresión ubicuamente. Véanse Sawicki J *y col.*, Exper Cell Res. 1998;244:367–369, Huang J *y col.*, J Gene Med. 2003;5:900–908, Liu Y *y col.*, Exp Mol Med. 2007; 39(2):170-175.

Ejemplo 2: Construcción de pAAV-CAG-ohIDS-versión1

Se diseñaron y obtuvieron casetes de expresión que incluyen una versión optimizada de la secuencia de ADNc de la iduronato-2-sulfatasa humana (ohIDS). La optimización de la secuencia se realizó para maximizar la eficiencia de la producción de la proteína iduronato-2-sulfatasa en seres humanos mediante la eliminación de sitios de corte y empalme crípticos y elementos de secuencia desestabilizante de ARN para elevada estabilidad de ARN, adición de elementos de secuencia estabilizante de ARN, optimización de codones y adaptación del contenido de G/C, evitando estructuras de ARN secundario estable, entre otros cambios. Se usó la región CDS de la iduronato-2-sulfatasa humana (secuencia de referencia NCBI: NM_000202.6) como punto de partida para la optimización de secuencias (DNA 2.0 Inc). La CDS optimizada se recibió clonada dentro del plásmido pJ204:191476 (AmpR) flanqueada por sitios de restricción MluI y EcoRI en 5' y 3', respectivamente.

El fragmento MluI/EcoRI de la CDS de la iduronato-2-sulfatasa humana optimizada se escindió del plásmido pJ204:191476 y posteriormente se clonó entre los sitios de restricción MluI y EcoRI del plásmido de esqueleto de AAV pAAV-CAG. El plásmido resultante se llamó pAAV-CAG-ohIDS-versión1 (número de acceso DSM 29867). Véase la Figura 2A y SEQ ID NO: 6.

Ejemplo 3: Construcción de pAAV-CAG-ohIDS-versión2

La región CDS de la iduronato-2-sulfatasa humana (secuencia de referencia de NCBI: NM_000202.6) se sometió a optimización de secuencias (GeneScript Inc). La CDS optimizada se recibió clonada dentro del plásmido pUC57 (AmpR) flanqueada por sitios de restricción MluI y EcoRI en 5' y 3', respectivamente.

El plásmido pUC57-ohIDS se digirió con MluI y EcoRI para cortar la región CDS de la iduronato-2-sulfatasa optimizada. Posteriormente, este fragmento se clonó entre los mismos sitios de restricción del esqueleto del plásmido de pAAV-CAG para generar el plásmido pAAV-CAG-ohIDS-versión2 (número de acceso DSM 29868). Véase la Figura 3A y SEQ ID NO: 9.

Ejemplo 4 de referencia: Construcción de pAAV-CAG-omIDS

La región CDS de la iduronato-2-sulfatasa murina (secuencia de referencia de NCBI: NM_010498.3) se sometió a optimización de secuencias (GeneArt; Life Technologies). La región CDS optimizada se recibió clonada dentro del plásmido pMA-RQ (AmpR) flanqueada por sitios de restricción MluI y EcoRI en 5' y 3', respectivamente.

El fragmento MluI/EcoRI de la CDS de la iduronato-2-sulfatasa murina optimizada (SEQ ID NO: 11) se escindió del plásmido pMA-RQ y posteriormente se clonó entre los sitios de restricción MluI y EcoRI del plásmido de esqueleto de AAV pAAV-CAG. El plásmido resultante se llamó pAAV-CAG-omIDS. Véase la Figura 4A y SEQ ID NO: 12.

Ejemplo 5 de referencia: Producción de AAV9-CAG-hIDS

Se generaron vectores AAV9-CAG-hIDS (SEQ ID NO: 4) por transfección libre de virus auxiliares de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones. Véanse Matsushita *y col.*, Gene Ther. 1998;5(7):938-45, Wright *y col.,* Mol Ther. 2005;12(1)171-8. Las células se cultivaron al 70% de confluencia en botellas rotatorias (RB) (Corning,

Corning, NY, EE.UU.) en DMEM suplementado con 10% de FBS y luego se co-transfectaron con: 1) un plásmido que lleva el casete de expresión flanqueado por las ITRs de AAV2 (pAAV-CAG-hIDS); 2) un plásmido que lleva los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV9 (pREP2CAP9); y 3) un plásmido que lleva las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes consecutivos de cloruro de cesio usando un protocolo optimizado como se ha descrito previamente. Véase Ayuso *y col.*, Gene Ther. 2010;17(4):503-10. Los vectores se dializaron contra PBS + 0,001% de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron por qPCR y se guardaron a -80ºC hasta su uso. Véase la Figura 1B.

Ejemplo 6: Producción de AAV9-CAG-ohIDS-versión1

Se generaron vectores AAV9-CAG-ohIDS-versión1 (SEQ ID NO: 7) por transfección libre de virus auxiliares de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones. Véase Matsushita *y col.*, y Wright *y col.,* arriba. Las células se cultivaron al 70% de confluencia en botellas rotatorias (RB) (Corning, Corning, NY, EE.UU.) en DMEM suplementado con 10% de FBS y luego se co-transfectaron con: 1) un plásmido que lleva el casete de expresión flanqueado por ITRs de AAV2 (pAAV-CAG-ohIDS-versión1); 2) un plásmido que lleva los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV9 (pREP2CAP9); y 3) un plásmido que lleva las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes consecutivos de cloruro de cesio usando un protocolo optimizado como se ha descrito previamente. Véase Ayuso *y col.*, *supra*. Los vectores se dializaron contra PBS + 0,001% de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron por qPCR y se guardaron a -80ºC hasta su uso. Véase la Figura 2B.

Ejemplo 7: Producción de AAV9-CAG-ohIDS-versión2

Se generaron vectores AAV9-CAG-ohIDS-versión2 (SEQ ID NO: 10) por transfección libre de virus auxiliares de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones. Véase Matsushita *y col.*, y Wright *y col.,* arriba. Las células se cultivaron al 70% de confluencia en botellas rotatorias (RB) (Corning, Corning, NY, EE.UU.) en DMEM suplementado con 10% de FBS y luego se co-transfectaron con: 1) un plásmido que lleva el casete de expresión flanqueado por ITRs de AAV2 (pAAV-CAG-ohIDS-versión2); 2) un plásmido que lleva los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV9 (pREP2CAP9); y 3) un plásmido que lleva las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes consecutivos de cloruro de cesio usando un protocolo optimizado como se ha descrito previamente. Véase Ayuso *y col.*, arriba. Los vectores se dializaron contra PBS + 0,001% de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron por qPCR y se guardaron a -80ºC hasta su uso. Véase la Figura 3B.

Ejemplo 8 de referencia: Producción de AAV9-CAG-omIDS

Se generaron vectores AAV9-CAG-omIDS (SEQ ID NO: 13) por transfección libre de virus auxiliares de células HEK293 usando tres plásmidos con modificaciones. Véase Matsushita *y col.*, y Wright *y col.,* arriba. Las células se cultivaron al 70% de confluencia en botellas rotatorias (RB) (Corning, Corning, NY, EE.UU.) en DMEM suplementado con 10% de FBS y luego se co-transfectaron con: 1) un plásmido que lleva el casete de expresión flanqueado por ITRs de AAV2 (pAAV-CAG-omIDS); 2) un plásmido que lleva los genes *rep* de AAV2 y *cap* de AAV9 (pREP2CAP9); y 3) un plásmido que lleva las funciones auxiliares de adenovirus. Los vectores se purificaron por dos gradientes consecutivos de cloruro de cesio usando un protocolo optimizado como se ha descrito previamente. Véase Ayuso *y col.*, arriba. Los vectores se dializaron contra PBS + 0,001% de Pluronic® F68, se filtraron, se valoraron por qPCR y se guardaron a -80ºC hasta su uso. Véase la Figura 4B.

Ejemplo 9: Inyección hidrodinámica de pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 a ratones sanos

Se administró una dosis total de 30 μg de los plásmidos pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 que contenían diferentes versiones del casete que expresa la iduronato-2-sulfatasa a ratones WT de 2 meses de edad mediante inyección hidrodinámica en la vena de la cola. Esta técnica dirige la expresión del plásmido administrado al hígado. Véase Liu *y col.,* Gene Ther. 1990;6(7):1258-66.

Cuarenta y ocho horas después de la administración del plásmido, se documentó un aumento considerable por encima de los niveles basales en la actividad de la iduronato-2-sulfatasa en los hígados y sueros de todos los animales administrados con plásmidos que codifican la iduronato-2-sulfatasa. Tanto en hígado como en suero, los niveles de actividad alcanzados con los casetes de expresión que contienen versiones optimizadas del gen iduronato-2-sulfatasa fueron superiores a aquellos obtenidos con el gen no mutante. Además, en suero, los animales que recibieron el plásmido pAAV-CAG-ohIDS-versión2 mostraron niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa que fueron estadísticamente superiores a aquellos documentados con los otros 2 plásmidos. Véanse las Figuras 5A

y 5B.

Ejemplo 10: Inyección hidrodinámica de pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 a ratones con MPSII

Se administró una dosis total de 30 μg de los plásmidos pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 que contenían diferentes versiones del casete que expresa la iduronato-2-sulfatasa a ratones afectados por MPSII de 3 meses de edad mediante inyección hidrodinámica en la vena de la cola.

Se recogieron los tejidos 1 semana después de la administración del plásmido. Los tres plásmidos que contenían la iduronato-2-sulfatasa dieron lugar a un aumento sustancial en la actividad de la iduronato-2-sulfatasa con respecto a animales con MPSII que recibieron inyección de solución salina; las actividades oscilaron del 1200% al 2200% de los niveles de WT en hígado y del 2000% al 5700% de WT en suero. Los niveles de actividad logrados con los casetes de expresión que contenían versiones de codones optimizados del gen iduronato-2-sulfatasa fueron estadísticamente superiores a aquellos mediados por el plásmido que contiene el gen WT. Véanse las Figuras 6A y 6B.

De acuerdo con los altos niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa documentados en hígado y suero, el contenido de GAG se normalizó completamente en todos los tejidos analizados con todas las construcciones de plásmido. Véanse las Figuras 6C.

Ejemplo 11: Administración intravenosa de AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2 a ratones con MPSII

Ratones con MPSII (3,5 meses de edad) recibieron una inyección intravenosa a través de la vena de la cola de $1x10^{10}$ gv de vectores AAV9 que contenían las secuencias de iduronato-2-sulfatasa humana WT u optimizada. Cohortes separadas de ratones WT y con MPSII sin tratamiento de la misma edad sirvieron de control. Tres semanas después del tratamiento, los animales se sacrificaron y se recogieron muestras de sangre y de hígado y se analizaron.

La administración intravenosa de vectores AAV9 a una dosis de $1x10^{10}$ gv/ratón dirige la expresión transgénica principalmente al hígado. Véanse Wu *y col.*, Mol. Ther. 2006; 14(3):316-27, Inagaki *y col.*, Mol. Ther. 2006; 14(1):45-33. Cuando la actividad de la iduronato-2-sulfatasa se midió en extractos de hígado 3 semanas después de la administración del vector, se documentó un claro aumento en la actividad enzimática en machos con MPSII que recibieron cualquiera de los vectores codificantes de IDS humana. Véase la Figura 7A. El aumento fue, sin embargo, significativamente mayor en el caso de los animales con MPSII que recibieron los vectores AAV9 que contienen secuencias de iduronato-2-sulfatasa humana optimizadas (AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2). Los niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa alcanzados en los animales que recibieron vectores con la secuencia WT fueron aproximadamente el doble de aquellos observados en animales WT sanos. Véase la Figura 7A. Con los vectores que contienen las secuencias de IDS humana optimizadas, los niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa fueron varias veces superiores a aquellos observados en animales sanos o en animales con MPSII tratados con vectores que contienen la secuencia de IDS WT. Véase la Figura 7A.

La iduronato-2-sulfatasa es una enzima lisosómica secretable, y como tal su expresión en el hígado es una fuente de enzima circulante. Véase Haurigot *y col.*, arriba. Similar a las observaciones hechas en extractos de hígado, los niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa alcanzados en circulación de animales con MPSII tratados con los vectores AAV9 que contienen las secuencias de IDS humana optimizadas fueron varias veces superiores a aquellos observados en animales sanos o en animales con MPSII tratados con vectores que contienen la secuencia de IDS WT humana. Véase la Figura 7B.

De acuerdo con los altos niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa documentados en hígado y suero, el contenido de GAG se normalizó completamente en el hígado de los ratones con MPSII tratados con AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2. Sin embargo, los niveles de GAG solo se redujeron parcialmente en el hígado de animales tratados con una dosis igual de vectores AAV9 que llevan la secuencia codificante de IDS WT. Véase la Figura 7C.

Ejemplo 12: Administración intracisternal de AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión 2 a ratones con MPSII

Ratones con MPSII de dos meses de edad recibieron una inyección intracisternal de $5x10^{10}$ gv de vectores AAV9 que contenían o bien la secuencia de iduronato-2-sulfatasa humana no mutada (WT) o bien la optimizada en un volumen total de 5 µl. Cohortes separadas de ratones de la misma edad WT, con MPSII no tratados y con MPSII que recibieron $5x10^{10}$ gv de un vector no codificante (AAV9-CAG-Nulo) sirvieron de controles. A los 3,5 meses de edad, es decir, 1,5 meses después del tratamiento, los animales se sacrificaron y se recogieron y analizaron las muestras.

Cuando se midió la actividad de la iduronato-2-sulfatasa en extractos de cerebro, se documentó un claro aumento en la actividad enzimática en machos con MPSII que recibieron cualquiera de los vectores codificantes de IDS humana. Véase la Figura 8A. El aumento fue, sin embargo, varias veces mayor en el caso de los animales con MPSII que recibieron los vectores AAV9 que contenían secuencias de iduronato-2-sulfatasa humana optimizadas (AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2) que en aquellos animales con MPSII tratados con vectores que contenían la secuencia de IDS no mutada (WT). Véase la Figura 8A. Los niveles de actividad de la iduronato-2-sulfatasa alcanzados en los animales que recibieron vectores con secuencias de iduronato-2-sulfatasa humana optimizadas fueron casi tan altos como aquellos de los WT, o incluso mayores; en la parte más rostral del cerebro (Sección I) la actividad de IDS derivada de vectores que contenían secuencias de iduronato-2-sulfatasa humana optimizadas casi duplicó los niveles del WT. Véase la Figura 8A.

De acuerdo con el aumento en la actividad de IDS en todo el cerebro, se corrigió la acumulación de sustrato que caracteriza la enfermedad en los cerebros de ratones con MPSII tratados, como se indica por la reducción significativa en el contenido de GAG. Véase la Figura 8B. Se observó una normalización completa de los niveles de GAG con todas las construcciones en todas las regiones analizadas, excepto en la Sección V en la que el efecto de la expresión de IDS derivada de vectores que contienen la secuencia de IDS no mutada (WT) no fue evidente. Véase la Figura 8B.

Vectores AAV9 administrados al LCR se fugan a la periferia y transducen en el hígado. Véanse Haurigot et al., Clin Invest. 2013;123(8):3254-3271, Ribera et al., Hum Mol Genet. 2014;24(7):2078-2095. Por consiguiente, se documentó un aumento en la actividad de la iduronato-2-sulfatasa en el hígado y suero de ratones con MPSII tratados con cualquiera de los vectores codificantes de IDS humana. Véanse las Figuras 9A y 9B. El aumento fue, nuevamente, significativamente más alto en el caso de los animales con MPSII que recibieron los vectores AAV9 que contenían secuencias de iduronato-2-sulfatasa humana optimizadas (AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2) que en aquellos animales con MPSII tratados con vectores que contenían la secuencia de IDS no mutada (WT). Véanse las Figuras 9A y 9B. Cuando la eficacia de la terapia se evaluó mediante cuantificación del contenido de GAG en diferentes órganos somáticos, se observó una normalización completa de los niveles de GAG en todos los tejidos de ratones con MPSII tratados con cualquiera de los vectores codificantes de IDS humana optimizada. Véase la Figura 9C. Los ratones con MPSII que recibieron la secuencia de IDS humana no mutada (WT) mostraron, sin embargo, una normalización completa del contenido de GAG en hígado, corazón, pulmón y bazo, pero solo una corrección parcial en testículo, riñón, vejiga urinaria y tejido adiposo. Véase la Figura 9C.

Ejemplo 13 de referencia: Administración intracisternal de AAV9-CAG-omIDS

Se inyectó una dosis total de $5x10^{10}$ genomas de vector del vector AAV9-CAG-omIDS en la cisterna magna de animales con MPSII de 2 meses de edad en un volumen total de 5 µl. Primero, los ratones se analizaron a los 6 meses de edad, es decir, 4 meses después de la administración del vector. La administración intra-LCR de vectores AAV9-CAG-omIDS condujo a la restauración de la actividad de la iduronato-2-sulfatasa en todas las áreas del cerebro analizadas, alcanzando niveles que promediaron el 40% de aquellos observados en animales sanos en las diferentes regiones. Véase la Figura 10A. Cuatro meses después de la administración del vector, la acumulación de sustrato característica de la enfermedad revirtió completamente en los cerebros de ratones con MPSII tratados, como se indica por la normalización del contenido de GAG en todas las áreas de cerebro analizadas. Véase la Figura 10B. Asimismo, el tamaño del compartimento lisosómico se normalizó completamente, como se indica por la cuantificación de la intensidad de señal para la detección inmunitaria del marcador lisosómico LAMP2. La señal de LAMP2 es proporcional al tamaño del compartimento lisosómico, que a su vez depende de la cantidad de heparán y dermatán sulfato sin degradar acumulado. Véase la Figura 11A. Además, el efecto del tratamiento sobre la distensión lisosómica siguió siendo estable 8 meses después de la administración de AAV9-CAG-omIDS, lo que indica eficacia a largo plazo de la terapia. Véase la Figura 12.

La rotura de la homeostasis lisosómica normal debido a la acumulación de sustrato no degradado puede alterar la actividad de otras enzimas lisosómicas diferentes de la directamente afectada por la mutación. Véase Ribera *y col.,* Hum Mol Genet. 2014;*doi: 10.1093/hmg/ddu727*. En los cerebros de ratones con MPSII sin tratamiento o ratones con MPSII tratados con el vector “Nulo” de control, las actividades de IDUA (iduronidasa, alfa-L-), SGSH (N-

sulfoglucosamina sulfohidrolasa), NAGLU (N-acetilglucosaminidasa, alfa), HGSNAT (heparan-alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa), GALNS (galactosamina (N-acetil)-6-sulfatasa), GUSB (glucuronidasa, beta), HEXB (hexosaminidasa B) se alteraron, pero el tratamiento con AAV9-CAG-omIDS devolvió aquellas actividades a los niveles observados en animales WT sanos indicando que el vector era capaz de restaurar la homeostasis lisosómica. Véase la Figura 11B.

De acuerdo con la corrección de la patología lisosómica, todos los signos de inflamación desaparecieron de los cerebros de ratones con MPSII tratados. Cuatro meses después del tratamiento, las intensidades de señal para las tinciones usadas para detectar astrocitosis (GFAP) y microgliosis (BSI-B4) fueron similares en ratones con MPSII tratados y en animales sanos en diferentes regiones del cerebro, a diferencia de la señal documentada en ratones con MPSII administrados con el vector control AAV9 “Nulo” que mostró una clara regulación por incremento de estos marcadores de neuroinflamación. Véanse las Figuras 13A y 13B. Además, a los 10 meses de edad, es decir, 8 meses después de la transferencia génica, persistió el beneficioso impacto del tratamiento con AAV9-CAG-omIDS sobre la neuroinflamación -evaluada mediante la tinción tanto para GFAP como para BSI-B4-, lo que indica la erradicación a largo plazo de la neuroinflamación. Véanse las Figuras 14A y 14B.

Los vectores AAV9 administrados al LCR se fugan a la periferia y transducen el hígado. Véanse Haurigot *y col.*, Clin Invest. 2013;123(8):3254-3271, Ribera *y col.,* Hum Mol Genet. 2014;*doi: 10.1093/hmg/ddu727*. Por consiguiente, se documentó un aumento en la actividad de la iduronato-2-sulfatasa 4 meses después de la transferencia génica en el hígado y suero de ratones con MPSII tratados con AAV9-CAG-omIDS, alcanzando niveles de aproximadamente el 1700% y el 700% de los niveles observados en animales sanos, respectivamente. Véanse las Figuras 15A y 15B. Cuando la eficacia somática de la terapia se evaluó mediante cuantificación del contenido de GAG en diferentes órganos, se observó una normalización completa en la mayoría de los tejidos, incluyendo hígado, corazón, pulmón, testículo, bazo y tejido adiposo, con la excepción de riñón y vejiga urinaria, donde se observó >50% de reducción de GAGs. Véase la Figura 15C.

Cuatro meses después del tratamiento, también aumentó la actividad de IDS en pulmón y fue particularmente alta en corazón. Véanse la Figura 16A y 16B. Estos dos órganos, pulmón y corazón, presentaron valores muy bajos del número de copias de genoma de vector/genoma diploide, indicando la falta de una transducción eficiente de estos órganos tras la administración intra-LCR de AAV9-CAG-omIDS a la dosis de $5X10^{10}$ gv. Véase la Figura 16C. Este hallazgo sugirió corrección cruzada de la deficiencia de IDS por captación de IDS de la circulación.

De acuerdo con los datos de contenido de GAG, el peso del hígado se normalizó en ratones con MPSII de 6 meses de edad tratados con AAV9-CAG-omIDS a la edad de 2 meses. Véase la Figura 17A. Se proporcionó demostración adicional del potencial del tratamiento intra-LCR con AAV9-CAG-omIDS para contrarrestar la patología lisosómica en ratones con MPSII por la medición de actividad de otras enzimas lisosómicas en extractos de hígado. IDUA, SGSH, NAGLU, HGSNAT, GALNS, GUSB, HEXB se alteraron considerablemente con respecto a los niveles del WT en ratones con MPSII sin tratamiento o en ratones con MPSII tratados con el vector “Nulo” de control. El tratamiento con AAV9-CAG-omIDS normalizó completamente las actividades de todas estas enzimas. Véase la Figura 17B. Además, la actividad de HEXB en suero también aumenta como consecuencia de la patología lisosómica, y se normalizó completamente tras el tratamiento con aAV9-CAG-omIDS, Véase la Figura 17C, que proporciona evidencia de una corrección en el cuerpo entero de la funcionalidad lisosómica.

Se evaluó el impacto de la administración intra-LCR de AAV9-CAG-omIDS sobre el comportamiento a los 6 meses de edad con la prueba de campo abierto, que evalúa la actividad locomotora y exploratoria general de ratones en entornos desconocidos. Ratones con MPSII sin tratar y tratados con AAV9-nulo mostraron actividad exploratoria reducida en comparación con ratones sanos en términos del tiempo gastado en el centro y en la periferia, el número de entradas en el centro y en la periferia y el número total de movimientos rápidos. La administración intracisternal de AAV9-CAG-omIDS corrigió completamente los déficits de comportamiento en ratones con MPSII. Véanse las Figuras 18A-F.

Finalmente, se evaluó la eficacia terapéutica del tratamiento intra-LCR con AAV9-CAG-omIDS comparando la supervivencia de ratones con MPSII no tratados y tratados. La terapia génica con AAV9-CAG-omIDS prolongó considerablemente la esperanza de vida de los ratones con MPSII. Véase la Figura 19. Mientras que a los 17 meses de edad todos los ratones con MPSII no tratados o tratados con AAV9-CAG-Nulo estaban muertos, el 76% de los ratones con MPSII que recibieron tratamiento con AAV9-CAG-omIDS estaban vivos. Además, el 65% de los animales tratados estaban todavía vivos a los 22 meses de edad. El % de animales no mutados (WT) vivos a esta edad fue del 79%. Véase la Figura 19.

Ejemplo 14 de referencia: Administración intracisternal de diferentes dosis de AAV9-CAG-omIDS: estudio de dosis-respuesta

Se administraron cuatro dosis diferentes ($1{,}58x10^9$, $5x10^9$, $1{,}58x10^{10}$ y $5x10^{10}$ gv/ratón) de vectores AAV9-CAG-omIDS a animales con MPSII de 2 meses de edad mediante inyección intracisternal en un volumen total de 5 µl.

Un mes y medio meses después de la administración del vector, los animales se sacrificaron y se recogieron los tejidos. Se midió la actividad de la iduronato-2-sulfatasa en diferentes partes del cerebro (secciones I-V). La actividad aumentó con la dosis y osciló entre el 0,8 y el 53% de la actividad del WT en las diferentes regiones. Véanse las Figuras 20A. Se observó una dosis-respuesta similar cuando se analizó el efecto del tratamiento sobre el almacenamiento de GAG. Sin embargo, se documentó una corrección completa de la acumulación de GAG solo a las dos dosis mayores $1{,}58x10^{10}$ y $5x10^{10}$ gv/ratón. Véase la Figura 20B.

En el hígado y suero, la actividad también aumentó con la dosis, oscilando entre el 20% y el 4300% en el hígado y entre el 0,4% y el 1100% en suero. No fue detectable actividad de IDS en suero con las 2 dosis más bajas ($1{,}58x10^9$, $5x10^9$ gv/ratón). Véanse las Figuras 21A y 21B. De acuerdo con los datos de actividad, la medición del contenido de GAG en tejidos periféricos demostró una disminución de la dosis-respuesta en el contenido de GAG en hígado, corazón, pulmón, testículo, bazo, riñón, vejiga urinaria y tejido adiposo. Se logró normalización completa o casi completa de los niveles de GAG en la mayoría de los tejidos con las 2 dosis mayores ($1{,}58x10^{10}$ y $5x10^{10}$ gv/ratón), con las excepciones de pulmón y vejiga urinaria, donde se documentaron >70% de reducciones, y riñón, donde se observó una disminución de aproximadamente el 50%. Véase la Figura 21C.

LISTADO DE SECUENCIAS

```
<110>  Laboratorios del Dr. ESTEVE S. A.
       Universitat Autònoma de Barcelona

<120> VECTORES VIRALES ADENOASOCIADOS PARA EL TRATAMIENTO DE MUCOPOLISACARIDOSIS

<130>  PCT2212.6

<150>  EP15382297
<151>  2015-06-05

<160>  17

<170>  PatentIn version 3.5

<210>  1
<211>  550
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  1

Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
1               5                   10                  15


Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser
            20                  25                  30


Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg
        35                  40                  45


Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile
    50                  55                  60
```

Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln
65 70 75 80

Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg
85 90 95

Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe Asn Ser Tyr Trp Arg Val His
100 105 110

Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr
115 120 125

Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser Asn
130 135 140

His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro
145 150 155 160

Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly
165 170 175

Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro Val Asp Val Leu Asp Val Pro
180 185 190

Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu
195 200 205

Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly
210 215 220

Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys
225 230 235 240

Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro
245 250 255

Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln
260 265 270

Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile
275 280 285

Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val
290 295 300

Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp
305 310 315 320

Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly
325 330 335

Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp
340 345 350

Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala
355 360 365

Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe
370 375 380

Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu
385 390 395 400

Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu
405 410 415

Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro Ser Phe His Val Glu Leu Cys
420 425 430

Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu
435 440 445

Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser
450 455 460

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

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

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

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

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

Phe Gln Leu Leu Met Pro
545 550

<210> 2
<211> 1653
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2

atgccgccac cccggaccgg ccgaggcctt ctctggctgg gtctggttct gagctccgtc 60

tgcgtcgccc tcggatccga aacgcaggcc aactcgacca cagatgctct gaacgttctt 120

ctcatcatcg tggatgacct gcgcccctcc ctgggctgtt atggggataa gctggtgagg 180

tccccaaata ttgaccaact ggcatcccac agcctcctct tccagaatgc ctttgcgcag 240

caagcagtgt gcgccccgag ccgcgtttct ttcctcactg gcaggagacc tgacaccacc 300

cgcctgtacg acttcaactc ctactggagg gtgcacgctg gaaacttctc caccatcccc 360

cagtacttca aggagaatgg ctatgtgacc atgtcggtgg gaaaagtctt tcaccctggg 420

atatcttcta accataccga tgattctccg tatagctggt cttttccacc ttatcatcct 480

tcctctgaga agtatgaaaa cactaagaca tgtcgagggc cagatggaga actccatgcc 540

aacctgcttt gccctgtgga tgtgctggat gttcccgagg gcaccttgcc tgacaaacag 600

agcactgagc aagccataca gttgttggaa aagatgaaaa cgtcagccag tcctttcttc 660

ctggccgttg ggtatcataa gccacacatc cccttcagat accccaagga atttcagaag 720

ttgtatccct tggagaacat caccctggcc cccgatcccg aggtccctga tggcctaccc 780

cctgtggcct acaacccctg gatggacatc aggcaacggg aagacgtcca agccttaaac 840

atcagtgtgc cgtatggtcc aattcctgtg gactttcagc ggaaaatccg ccagagctac 900

tttgcctctg tgtcatattt ggatacacag gtcggccgcc tcttgagtgc tttggacgat 960

cttcagctgg ccaacagcac catcattgca tttacctcgg atcatgggtg ggctctaggt 1020

gaacatggag aatgggccaa atacagcaat tttgatgttg ctacccatgt tcccctgata 1080

ttctatgttc ctggaaggac ggcttcactt ccggaggcag gcgagaagct tttcccttac 1140

ctcgaccctt ttgattccgc ctcacagttg atggagccag gcaggcaatc catggacctt 1200

gtggaacttg tgtctctttt tcccacgctg gctggacttg caggactgca ggttccacct 1260

cgctgccccg ttccttcatt tcacgttgag ctgtgcagag aaggcaagaa ccttctgaag 1320

cattttcgat tccgtgactt ggaagaggat ccgtacctcc ctggtaatcc ccgtgaactg 1380

attgcctata gccagtatcc ccggccttca gacatccctc agtggaattc tgacaagccg 1440

agtttaaaag atataaagat catgggctat tccatacgca ccatagacta taggtatact 1500

gtgtgggttg gcttcaatcc tgatgaattt ctagctaact tttctgacat ccatgcaggg 1560

gaactgtatt ttgtggattc tgacccattg caggatcaca atatgtataa tgattcccaa 1620

ggtggagatc ttttccagtt gttgatgcct tga 1653

<210> 3
<211> 7900
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAAV-CAG-hIDS

<400> 3

aaatacgcgt atgccgccac cccggaccgg ccgaggcctt ctctggctgg gtctggttct 60

gagctccgtc tgcgtcgccc tcggatccga aacgcaggcc aactcgacca cagatgctct 120

gaacgttctt ctcatcatcg tggatgacct gcgcccctcc ctgggctgtt atggggataa 180

gctggtgagg tccccaaata ttgaccaact ggcatcccac agcctcctct tccagaatgc 240

ctttgcgcag caagcagtgt gcgccccgag ccgcgtttct ttcctcactg gcaggagacc 300

tgacaccacc cgcctgtacg acttcaactc ctactggagg gtgcacgctg gaaacttctc 360

caccatcccc cagtacttca aggagaatgg ctatgtgacc atgtcggtgg gaaaagtctt 420

tcaccctggg atatcttcta accataccga tgattctccg tatagctggt cttttccacc 480

ttatcatcct tcctctgaga agtatgaaaa cactaagaca tgtcgagggc cagatggaga 540

actccatgcc aacctgcttt gccctgtgga tgtgctggat gttcccgagg gcaccttgcc 600

tgacaaacag agcactgagc aagccataca gttgttggaa aagatgaaaa cgtcagccag 660

tcctttcttc ctggccgttg ggtatcataa gccacacatc cccttcagat accccaagga 720

atttcagaag ttgtatccct tggagaacat caccctggcc cccgatcccg aggtccctga 780

tggcctaccc cctgtggcct acaacccctg gatggacatc aggcaacggg aagacgtcca 840

agccttaaac atcagtgtgc cgtatggtcc aattcctgtg gactttcagc ggaaaatccg 900

ccagagctac tttgcctctg tgtcatattt ggatacacag gtcggccgcc tcttgagtgc 960

tttggacgat cttcagctgg ccaacagcac catcattgca tttacctcgg atcatgggtg 1020

ggctctaggt gaacatggag aatgggccaa atacagcaat tttgatgttg ctacccatgt 1080

tcccctgata ttctatgttc ctggaaggac ggcttcactt ccggaggcag gcgagaagct 1140

tttcccttac ctcgaccctt ttgattccgc ctcacagttg atggagccag gcaggcaatc 1200

catggacctt gtggaacttg tgtctctttt tcccacgctg gctggacttg caggactgca 1260

ggttccacct cgctgccccg ttccttcatt tcacgttgag ctgtgcagag aaggcaagaa 1320
ccttctgaag cattttcgat tccgtgactt ggaagaggat ccgtacctcc ctggtaatcc 1380
ccgtgaactg attgcctata gccagtatcc ccggccttca gacatccctc agtggaattc 1440
tgacaagccg agtttaaaag atataaagat catgggctat tccatacgca ccatagacta 1500
taggtatact gtgtgggttg gcttcaatcc tgatgaattt ctagctaact tttctgacat 1560
ccatgcaggg gaactgtatt ttgtggattc tgacccattg caggatcaca atatgtataa 1620
tgattcccaa ggtggagatc ttttccagtt gttgatgcct tgagaattca tttaattcga 1680
gctcggtacc cgggaatcaa ttcactcctc aggtgcaggc tgcctatcag aaggtggtgg 1740
ctggtgtggc caatgccctg gctcacaaat accactgaga tctttttccc tctgccaaaa 1800
attatgggga catcatgaag ccccttgagc atctgacttc tggctaataa aggaaattta 1860
ttttcattgc aatagtgtgt tggaattttt tgtgtctctc actcggaagg acatatggga 1920
gggcaaatca tttaaaacat cagaatgagt atttggttta gagtttggca acatatgccc 1980
atatgctggc tgccatgaac aaaggttggc tataaagagg tcatcagtat atgaaacagc 2040
cccctgctgt ccattcctta ttccatagaa aagccttgac ttgaggttag atttttttta 2100
tattttgttt tgtgttattt ttttctttaa catccctaaa attttcctta catgttttac 2160
tagccagatt tttcctcctc tcctgactac tcccagtcat agctgtccct cttctcttat 2220
ggagatccct cgacctgcag cccaagctgt agataagtag catggcgggt taatcattaa 2280
ctacaaggaa cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac 2340
tgaggccgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagctgcatt 2400
aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct 2460
cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa 2520
aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa 2580
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc 2640
tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga 2700
caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc 2760
cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt 2820
ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct 2880
gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg 2940
agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta 3000
gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct 3060

acactagaag aacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa 3120
gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt 3180
gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta 3240
cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat 3300
caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa 3360
gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct 3420
cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgtcgtg tagataacta 3480
cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgct 3540
caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg 3600
gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa 3660
gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt 3720
cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta 3780
catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca 3840
gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta 3900
ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct 3960
gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg 4020
cgccacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac 4080
tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact 4140
gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa 4200
atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt 4260
ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat 4320
gtatttagaa aaataaacaa ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg 4380
acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc 4440
cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg 4500
agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt 4560
cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac 4620
tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca 4680
tcaggcgatt ccaacatcca ataaatcata caggcaaggc aaagaattag caaaattaag 4740
caataaagcc tcagagcata aagctaaatc ggttgtacca aaaacattat gaccctgtaa 4800
tacttttgcg ggagaagcct ttatttcaac gcaaggataa aaatttttag aaccctcata 4860

tattttaaat gcaatgcctg agtaatgtgt aggtaaagat tcaaacgggt gagaaaggcc 4920
ggagacagtc aaatcaccat caatatgata ttcaaccgtt ctagctgata aattcatgcc 4980
ggagagggta gctatttttg agaggtctct acaaaggcta tcaggtcatt gcctgagagt 5040
ctggagcaaa caagagaatc gatgaacggt aatcgtaaaa ctagcatgtc aatcatatgt 5100
accccggttg ataatcagaa aagccccaaa aacaggaaga ttgtataagc aaatatttaa 5160
attgtaagcg ttaatatttt gttaaaattc gcgttaaatt tttgttaaat cagctcattt 5220
tttaaccaat aggccgaaat cggcaaaatc ccttataaat caaaagaata gaccgagata 5280
gggttgagtg ttgttccagt ttggaacaag agtccactat taaagaacgt ggactccaac 5340
gtcaaagggc gaaaaaccgt ctatcagggc gatggcccac tacgtgaacc atcaccctaa 5400
tcaagttttt tggggtcgag gtgccgtaaa gcactaaatc ggaaccctaa agggagcccc 5460
cgatttagag cttgacgggg aaagccggcg aacgtggcga gaaaggaagg gaagaaagcg 5520
aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt gtagcggtca cgctgcgcgt aaccaccaca 5580
cccgccgcgc ttaatgcgcc gctacagggc gcgtactatg gttgctttga cgagcacgta 5640
taacgtgctt tcctcgttag aatcagagcg ggagctaaac aggaggccga ttaaagggat 5700
tttagacagg aacggtacgc cagaatcctg agaagtgttt ttataatcag tgaggccacc 5760
gagtaaaaga gtctgtccat cacgcaaatt aaccgttgtc gcaatacttc tttgattagt 5820
aataacatca cttgcctgag tagaagaact caaactatcg gccttgctgg taatatccag 5880
aacaatatta ccgccagcca ttgcaacgga atcgccattc gccattcagg ctgcgcaact 5940
gttgggaagg gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg ccagctgcgc gctcgctcgc 6000
tcactgaggc cgcccgggca aagcccgggc gtcgggcgac ctttggtcgc ccggcctcag 6060
tgagcgagcg agcgcgcaga gagggagtgg ccaactccat cactaggggt tccttgtagt 6120
taatgattaa cccgccatgc tacttatcta ctcgacattg attattgact agttattaat 6180
agtaatcaat tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac 6240
ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa 6300
tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt 6360
atttacggta aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc 6420
ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat 6480
gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg 6540
tgagccccac gttctgcttc actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt 6600
atttatttat tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg gggggcgcgg 6660

cgccaggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg 6720

cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cggcggcggc 6780

ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgttgcct tcgccccgtg 6840

ccccgctccg ccgccgcctc gcgccgcccg ccccggctct gactgaccgc gttactccca 6900

caggtgagcg ggcgggacgg cccttctcct ccgggctgta attagcgctt ggtttaatga 6960

cggcttgttt cttttctgtg gctgcgtgaa agccttgagg ggctccggga gggccctttg 7020

tgcgggggga gcggctcggg gggtgcgtgc gtgtgtgtgt gcgtggggag cgccgcgtgc 7080

ggctccgcgc tgcccggcgg ctgtgagcgc tgcgggcgcg gcgcggggct ttgtgcgctc 7140

cgcagtgtgc gcgaggggag cgcggccggg ggcggtgccc cgcggtgcgg ggggggctgc 7200

gaggggaaca aaggctgcgt gcggggtgtg tgcgtggggg ggtgagcagg gggtgtgggc 7260

gcgtcggtcg ggctgcaacc ccccctgcac ccccctcccc gagttgctga gcacggcccg 7320

gcttcgggtg cggggctccg tacggggcgt ggcgcggggc tcgccgtgcc gggcgggggg 7380

tggcggcagg tgggggtgcc gggcggggcg gggccgcctc gggccgggga gggctcgggg 7440

gaggggcgcg gcggcccccg gagcgccggc ggctgtcgag gcgcggcgag ccgcagccat 7500

tgccttttat ggtaatcgtg cgagagggcg cagggacttc ctttgtccca aatctgtgcg 7560

gagccgaaat ctgggaggcg ccgccgcacc ccctctagcg ggcgcggggc gaagcggtgc 7620

ggcgccggca ggaaggaaat gggcggggag ggccttcgtg cgtcgccgcg ccgccgtccc 7680

cttctccctc tccagcctcg gggctgtccg cgggggggacg gctgccttcg gggggggacgg 7740

ggcagggcgg ggttcggctt ctggcgtgtg accggcggct ctagagcctc tgctaaccat 7800

gttcatgcct tcttcttttt cctacagctc ctgggcaacg tgctggttat tgtgctgtct 7860

catcattttg gcaaagaatt gattaattcg agcgaacgcg 7900

<210> 4
<211> 4319
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> AAV9-CAG-hIDS

<400> 4

attacgccag ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg 60

ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa 120

ctccatcact aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctactcg 180

acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 240
atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa 300
cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac 360
tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg cagtacatca 420
agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg 480
gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt 540
agtcatcgct attaccatgg tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tccccatctc 600
cccccccctcc ccacccccaa ttttgtattt atttattttt taattatttt gtgcagcgat 660
gggggcgggg gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg 720
cggggcgagg cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc 780
ttttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggg 840
agtcgctgcg ttgccttcgc cccgtgcccc gctccgccgc cgcctcgcgc cgcccgcccc 900
ggctctgact gaccgcgtta ctcccacagg tgagcgggcg ggacggccct tctcctccgg 960
gctgtaatta gcgcttggtt taatgacggc ttgtttcttt tctgtggctg cgtgaaagcc 1020
ttgaggggct ccgggagggc cctttgtgcg gggggagcgg ctcgggggt gcgtgcgtgt 1080
gtgtgtgcgt ggggagcgcc gcgtgcggct ccgcgctgcc cggcggctgt gagcgctgcg 1140
ggcgcggcgc ggggctttgt gcgctccgca gtgtgcgcga ggggagcgcg gccgggggcg 1200
gtgccccgcg gtgcgggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg 1260
tgggggggtg agcagggggt gtgggcgcgt cggtcgggct gcaacccccc ctgcaccccc 1320
ctccccgagt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtacg gggcgtggcg 1380
cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc ggggcggggc 1440
cgcctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg cccccggagc gccggcggct 1500
gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg 1560
gacttccttt gtcccaaatc tgtgcggagc cgaaatctgg gaggcgccgc cgcacccccct 1620
ctagcgggcg cggggcgaag cggtgcggcg ccggcaggaa ggaaatgggc ggggagggcc 1680
ttcgtgcgtc gccgcgccgc cgtccccttc tccctctcca gcctcggggc tgtccgcggg 1740
gggacggctg ccttcggggg ggacggggca gggcggggtt cggcttctgg cgtgtgaccg 1800
gcggctctag agcctctgct aaccatgttc atgccttctt ctttttccta cagctcctgg 1860
gcaacgtgct ggttattgtg ctgtctcatc attttggcaa agaattgatt aattcgagcg 1920
aacgcgaaat acgcgtatgc cgccaccccg gaccggccga ggccttctct ggctgggtct 1980

ggttctgagc tccgtctgcg tcgccctcgg atccgaaacg caggccaact cgaccacaga 2040
tgctctgaac gttcttctca tcatcgtgga tgacctgcgc ccctccctgg gctgttatgg 2100
ggataagctg gtgaggtccc caaatattga ccaactggca tcccacagcc tcctcttcca 2160
gaatgccttt gcgcagcaag cagtgtgcgc cccgagccgc gtttctttcc tcactggcag 2220
gagacctgac accacccgcc tgtacgactt caactcctac tggagggtgc acgctggaaa 2280
cttctccacc atcccccagt acttcaagga gaatggctat gtgaccatgt cggtgggaaa 2340
agtctttcac cctgggatat cttctaacca taccgatgat tctccgtata gctggtcttt 2400
tccaccttat catccttcct ctgagaagta tgaaaacact aagacatgtc gagggccaga 2460
tggagaactc catgccaacc tgctttgccc tgtggatgtg ctggatgttc ccgagggcac 2520
cttgcctgac aaacagagca ctgagcaagc catacagttg ttggaaaaga tgaaaacgtc 2580
agccagtcct ttcttcctgg ccgttgggta tcataagcca cacatcccct tcagataccc 2640
caaggaattt cagaagttgt atcccttgga gaacatcacc ctggcccccg atcccgaggt 2700
ccctgatggc ctaccccctg tggcctacaa cccctggatg gacatcaggc aacgggaaga 2760
cgtccaagcc ttaaacatca gtgtgccgta tggtccaatt cctgtggact ttcagcggaa 2820
aatccgccag agctactttg cctctgtgtc atatttggat acacaggtcg gccgcctctt 2880
gagtgctttg gacgatcttc agctggccaa cagcaccatc attgcattta cctcggatca 2940
tgggtgggct ctaggtgaac atggagaatg ggccaaatac agcaattttg atgttgctac 3000
ccatgttccc ctgatattct atgttcctgg aaggacggct tcacttccgg aggcaggcga 3060
gaagcttttc ccttacctcg accctttga ttccgcctca cagttgatgg agccaggcag 3120
gcaatccatg gaccttgtgg aacttgtgtc tctttttccc acgctggctg gacttgcagg 3180
actgcaggtt ccacctcgct gccccgttcc ttcatttcac gttgagctgt gcagagaagg 3240
caagaacctt ctgaagcatt ttcgattccg tgacttggaa gaggatccgt acctccctgg 3300
taatccccgt gaactgattg cctatagcca gtatccccgg ccttcagaca tccctcagtg 3360
gaattctgac aagccgagtt taaaagatat aaagatcatg ggctattcca tacgcaccat 3420
agactatagg tatactgtgt gggttggctt caatcctgat gaatttctag ctaacttttc 3480
tgacatccat gcaggggaac tgtattttgt ggattctgac ccattgcagg atcacaatat 3540
gtataatgat tcccaaggtg gagatctttt ccagttgttg atgccttgag aattcattta 3600
attcgagctc ggtacccggg aatcaattca ctcctcaggt gcaggctgcc tatcagaagg 3660
tggtggctgg tgtggccaat gccctggctc acaaatacca ctgagatctt tttccctctg 3720
ccaaaaatta tggggacatc atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc taataaagga 3780

aatttatttt cattgcaata gtgtgttgga atttttgtg tctctcactc ggaaggacat 3840

atgggagggc aaatcattta aaacatcaga atgagtattt ggtttagagt ttggcaacat 3900

atgcccatat gctggctgcc atgaacaaag gttggctata aagaggtcat cagtatatga 3960

aacagccccc tgctgtccat tccttattcc atagaaaagc cttgacttga ggttagattt 4020

tttttatatt ttgttttgtg ttatttttt ctttaacatc cctaaaattt tccttacatg 4080

ttttactagc cagatttttc ctcctctcct gactactccc agtcatagct gtccctcttc 4140

tcttatggag atccctcgac ctgcagccca agctgtagat aagtagcatg gcgggttaat 4200

cattaactac aaggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc 4260

gctcactgag gccgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcag 4319

<210> 5
<211> 1653
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ohIDS-version1

<400> 5

atgcccccac ctagaaccgg aagaggattg ctctggctcg gacttgtgct gtccagcgtg 60

tgtgtggccc tgggctcgga aacccaggcc aacagcacca ccgacgccct gaatgtgctg 120

ctgattatcg tggacgatct ccggccttcg ctgggctgct acggggataa gctggtccgc 180

tccccgaata tcgaccaact ggcttcacat agcctgcttt tccaaaacgc attcgcccaa 240

caagccgtgt gcgccccgag ccgcgtgtct ttcctcaccg gccggcgccc tgatactacc 300

cggctctacg acttcaacag ctactggaga gtgcacgcag gaaacttctc caccattcct 360

cagtacttta aggagaacgg ttacgtcacc atgagcgtgg ggaaggtgtt ccaccctgga 420

atttcctcca accacaccga cgactcgcca tactcctggt cctttccccc ttaccaccca 480

tcatccgaga agtacgagaa caccaagacg tgcaggggcc cagacgggga actgcacgcg 540

aacctcctct gcccggtcga tgtgctggat gtgcccgaag gcaccctccc tgacaaacag 600

agcaccgaac aggccatcca gctcctcgag aagatgaaaa cttcagcctc cccgttcttt 660

ctggccgtgg gataccacaa gccgcatatc cccttccggt acccaaagga gttccagaag 720

ctgtacccgc tggagaacat taccctggct cctgatcccg aagtgccgga cggcctgccg 780

cccgtggcat acaacccttg gatggacatc cgccagaggg aggatgtgca agccctgaac 840

atctccgtgc catacggtcc gatcccggtc gacttccagc ggaagattag gcagtcatat 900

ttcgcgtccg tgtcctactt ggacactcag gtcggacgcc tcctctccgc tctcgacgat 960

ctgcagctgg ccaactcgac cattatcgcg ttcacctcgg accatggttg ggctctgggc 1020

gaacacggag aatgggccaa gtacagcaat ttcgatgtcg cgactcacgt gcccctgatc 1080

ttctacgtgc ccggacgcac agccagcttg cctgaagcgg gggaaaagct gttcccttac 1140

ctggatccct tcgactccgc ctctcaactt atggagccag gcagacagtc gatggacctg 1200

gtggaactcg tgtcactgtt ccctaccctc gccggtctgg ccggacttca ggtcccgcct 1260

cggtgcccgg tgccgtcctt ccacgtggag ctgtgtcgcg agggaaagaa cctcctgaaa 1320

cacttccggt tccgcgacct ggaggaagat ccctacttgc cgggcaaccc gagagaactt 1380

atcgcatact cccagtaccc tcgcccctcc gacatcccgc agtggaactc cgacaagccg 1440

agcctgaagg acattaagat catggggtac tccatccgga ctattgacta tcggtacact 1500

gtgtgggtcg ggttcaaccc agatgagttt ctggccaact tctccgatat ccatgccgga 1560

gagctgtact tcgtggactc ggacccgctg caggaccaca acatgtacaa cgactcacag 1620

ggcggcgacc tgttccagtt gctgatgccc tga 1653

<210> 6
<211> 7888
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAAV-CAG-ohIDS-version1

<400> 6

cgcgtgccac catgccccca cctagaaccg gaagaggatt gctctggctc ggacttgtgc 60

tgtccagcgt gtgtgtggcc ctgggctcgg aaacccaggc caacagcacc accgacgccc 120

tgaatgtgct gctgattatc gtggacgatc tccggccttc gctgggctgc tacggggata 180

agctggtccg ctccccgaat atcgaccaac tggcttcaca tagcctgctt ttccaaaacg 240

cattcgccca acaagccgtg tgcgccccga gccgcgtgtc tttcctcacc ggccggcgcc 300

ctgatactac ccggctctac gacttcaaca gctactggag agtgcacgca ggaaacttct 360

ccaccattcc tcagtacttt aaggagaacg gttacgtcac catgagcgtg gggaaggtgt 420

tccaccctgg aatttcctcc aaccacaccg acgactcgcc atactcctgg tcctttcccc 480

cttaccaccc atcatccgag aagtacgaga acaccaagac gtgcaggggc ccagacgggg 540

aactgcacgc gaacctcctc tgcccggtcg atgtgctgga tgtgcccgaa ggcaccctcc 600

ctgacaaaca gagcaccgaa caggccatcc agctcctcga gaagatgaaa acttcagcct 660

ccccgttctt tctggccgtg ggataccaca agccgcatat ccccttccgg tacccaaagg 720

agttccagaa gctgtacccg ctggagaaca ttaccctggc tcctgatccc gaagtgccgg 780
acggcctgcc gcccgtggca tacaaccctt ggatggacat ccgccagagg gaggatgtgc 840
aagccctgaa catctccgtg ccatacggtc cgatcccggt cgacttccag cggaagatta 900
ggcagtcata tttcgcgtcc gtgtcctact tggacactca ggtcggacgc ctcctctccg 960
ctctcgacga tctgcagctg gccaactcga ccattatcgc gttcacctcg gaccatggtt 1020
gggctctggg cgaacacgga gaatgggcca agtacagcaa tttcgatgtc gcgactcacg 1080
tgcccctgat cttctacgtg cccggacgca cagccagctt gcctgaagcg ggggaaaagc 1140
tgttccctta cctggatccc ttcgactccg cctctcaact tatggagcca ggcagacagt 1200
cgatggacct ggtggaactc gtgtcactgt tccctaccct cgccggtctg gccggacttc 1260
aggtcccgcc tcggtgcccg gtgccgtcct tccacgtgga gctgtgtcgc gagggaaaga 1320
acctcctgaa acacttccgg ttccgcgacc tggaggaaga tccctacttg ccgggcaacc 1380
cgagagaact tatcgcatac tcccagtacc ctcgcccctc cgacatcccg cagtggaact 1440
ccgacaagcc gagcctgaag gacattaaga tcatggggta ctccatccgg actattgact 1500
atcggtacac tgtgtgggtc gggttcaacc cagatgagtt tctggccaac ttctccgata 1560
tccatgccgg agagctgtac ttcgtggact cggacccgct gcaggaccac aacatgtaca 1620
acgactcaca gggcggcgac ctgttccagt tgctgatgcc ctgagaattc gagctcggta 1680
cccgggaatc aattcactcc tcaggtgcag gctgcctatc agaaggtggt ggctggtgtg 1740
gccaatgccc tggctcacaa ataccactga gatctttttc cctctgccaa aaattatggg 1800
gacatcatga agccccttga gcatctgact tctggctaat aaaggaaatt tattttcatt 1860
gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc tcactcggaa ggacatatgg gagggcaaat 1920
catttaaaac atcagaatga gtatttggtt tagagtttgg caacatatgc ccatatgctg 1980
gctgccatga acaaaggttg gctataaaga ggtcatcagt atatgaaaca gccccctgct 2040
gtccattcct tattccatag aaaagccttg acttgaggtt agatttttt tatattttgt 2100
tttgtgttat ttttttcttt aacatcccta aaattttcct tacatgtttt actagccaga 2160
tttttcctcc tctcctgact actcccagtc atagctgtcc ctcttctctt atggagatcc 2220
ctcgacctgc agcccaagct gtagataagt agcatggcgg gttaatcatt aactacaagg 2280
aacccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc actgaggccg 2340
cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagctgca ttaatgaatc 2400
ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact 2460
gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta 2520

atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 2580
caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc 2640
cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta 2700
taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg 2760
ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc 2820
tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac 2880
gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac 2940
ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 3000
aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga 3060
agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt 3120
agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag 3180
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct 3240
gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg 3300
atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat 3360
gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc 3420
tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg 3480
gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccgc gagacccacg ctcaccggct 3540
ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca 3600
actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg 3660
ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg 3720
tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc 3780
cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag 3840
ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg 3900
ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag 3960
tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat 4020
agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg 4080
atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca 4140
gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca 4200
aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat 4260
tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag 4320

aaaaataaac aaatagggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa 4380
gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt 4440
ctcgcgcgtt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc 4500
acagcttgtc tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt 4560
gttggcgggt gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg 4620
caccatatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcga 4680
ttccaacatc caataaatca tacaggcaag gcaaagaatt agcaaaatta agcaataaag 4740
cctcagagca taaagctaaa tcggttgtac caaaaacatt atgaccctgt aatacttttg 4800
cgggagaagc ctttatttca acgcaaggat aaaaattttt agaaccctca tatattttaa 4860
atgcaatgcc tgagtaatgt gtaggtaaag attcaaacgg gtgagaaagg ccggagacag 4920
tcaaatcacc atcaatatga tattcaaccg ttctagctga taaattcatg ccggagaggg 4980
tagctatttt tgagaggtct ctacaaaggc tatcaggtca ttgcctgaga gtctggagca 5040
aacaagagaa tcgatgaacg gtaatcgtaa aactagcatg tcaatcatat gtaccccggt 5100
tgataatcag aaaagcccca aaaacaggaa gattgtataa gcaaatattt aaattgtaag 5160
cgttaatatt ttgttaaaat tcgcgttaaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca 5220
ataggccgaa atcggcaaaa tcccttataa atcaaaagaa tagaccgaga tagggttgag 5280
tgttgttcca gtttggaaca agagtccact attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg 5340
gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa ccatcaccct aatcaagttt 5400
tttggggtcg aggtgccgta aagcactaaa tcggaaccct aaagggagcc cccgatttag 5460
agcttgacgg ggaaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa gggaagaaag cgaaaggagc 5520
gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggt cacgctgcgc gtaaccacca cacccgccgc 5580
gcttaatgcg ccgctacagg gcgcgtacta tggttgcttt gacgagcacg tataacgtgc 5640
tttcctcgtt agaatcagag cgggagctaa acaggaggcc gattaaaggg attttagaca 5700
ggaacggtac gccagaatcc tgagaagtgt ttttataatc agtgaggcca ccgagtaaaa 5760
gagtctgtcc atcacgcaaa ttaaccgttg tcgcaatact tctttgatta gtaataacat 5820
cacttgcctg agtagaagaa ctcaaactat cggccttgct ggtaatatcc agaacaatat 5880
taccgccagc cattgcaacg gaatcgccat tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa 5940
gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgc gcgctcgctc gctcactgag 6000
gccgcccggg caaagcccgg gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc agtgagcgag 6060
cgagcgcgca gagagggagt ggccaactcc atcactaggg gttccttgta gttaatgatt 6120

aacccgccat gctacttatc tactcgacat tgattattga ctagttatta atagtaatca 6180
attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta 6240
aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat 6300
gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg 6360
taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac 6420
gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt 6480
cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtcga ggtgagcccc 6540
acgttctgct tcactctccc catctccccc ccctccccac ccccaatttt gtatttattt 6600
atttttaat tattttgtgc agcgatgggg gcgggggggg gggggggcg cgcgccaggc 6660
ggggcggggc ggggcgaggg gcggggcggg gcgaggcgga gaggtgcggc ggcagccaat 6720
cagagcggcg cgctccgaaa gtttcctttt atggcgaggc ggcggcggcg gcggccctat 6780
aaaaagcgaa gcgcgcggcg ggcgggagtc gctgcgttgc cttcgccccg tgccccgctc 6840
cgccgccgcc tcgcgccgcc cgccccggct ctgactgacc gcgttactcc cacaggtgag 6900
cgggcgggac ggcccttctc ctccgggctg taattagcgc ttggtttaat gacggcttgt 6960
ttcttttctg tggctgcgtg aaagccttga ggggctccgg gagggccctt tgtgcggggg 7020
gagcggctcg gggggtgcgt gcgtgtgtgt gtgcgtgggg agcgccgcgt gcggctccgc 7080
gctgcccggc ggctgtgagc gctgcgggcg cggcgcgggg ctttgtgcgc tccgcagtgt 7140
gcgcgagggg agcgcggccg ggggcggtgc cccgcggtgc gggggggct gcgaggggaa 7200
caaaggctgc gtgcggggtg tgtgcgtggg ggggtgagca gggggtgtgg gcgcgtcggt 7260
cgggctgcaa cccccccctgc acccccctcc ccgagttgct gagcacggcc cggcttcggg 7320
tgcggggctc cgtacggggc gtggcgcggg gctcgccgtg ccgggcgggg ggtggcggca 7380
ggtgggggtg ccgggcgggg cggggccgcc tcgggccggg gagggctcgg gggaggggcg 7440
cggcggcccc cggagcgccg gcggctgtcg aggcgcggcg agccgcagcc attgcctttt 7500
atggtaatcg tgcgagaggg cgcagggact tcctttgtcc caaatctgtg cggagccgaa 7560
atctgggagg cgccgccgca ccccctctag cgggcgcggg gcgaagcggt gcggcgccgg 7620
caggaaggaa atgggcgggg agggccttcg tgcgtcgccg cgccgccgtc cccttctccc 7680
tctccagcct cggggctgtc cgcgggggga cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc 7740
ggggttcggc ttctggcgtg tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc 7800
cttcttcttt ttcctacagc tcctgggcaa cgtgctggtt attgtgctgt ctcatcattt 7860
tggcaaagaa ttgattaatt cgagcgaa 7888

<210> 7
<211> 4307
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> AAV9-CAG-ohIDS-version1

<400> 7

attacgccag ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg 60

ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa 120

ctccatcact aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctactcg 180

acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 240

atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa 300

cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac 360

tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg cagtacatca 420

agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg 480

gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt 540

agtcatcgct attaccatgg tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tccccatctc 600

cccccccctcc ccacccccaa ttttgtattt atttattttt taattatttt gtgcagcgat 660

gggggcgggg gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg 720

cggggcgagg cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc 780

ttttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggg 840

agtcgctgcg ttgccttcgc cccgtgcccc gctccgccgc cgcctcgcgc cgcccgcccc 900

ggctctgact gaccgcgtta ctcccacagg tgagcgggcg ggacggccct tctcctccgg 960

gctgtaatta gcgcttggtt taatgacggc ttgtttcttt tctgtggctg cgtgaaagcc 1020

ttgaggggct ccgggagggc cctttgtgcg gggggagcgg ctcgggggt gcgtgcgtgt 1080

gtgtgtgcgt ggggagcgcc gcgtgcggct ccgcgctgcc cggcggctgt gagcgctgcg 1140

ggcgcggcgc ggggctttgt gcgctccgca gtgtgcgcga ggggagcgcg gccgggggcg 1200

gtgccccgcg gtgcgggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg 1260

tggggggtg agcagggggt gtgggcgcgt cggtcgggct gcaacccccc ctgcaccccc 1320

ctccccgagt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtacg gggcgtggcg 1380

cggggctcgc cgtgccgggc gggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc ggggcggggc 1440

cgcctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg cccccggagc gccggcggct 1500

gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg 1560
gacttccttt gtcccaaatc tgtgcggagc cgaaatctgg gaggcgccgc cgcacccccct 1620
ctagcgggcg cggggcgaag cggtgcggcg ccggcaggaa ggaaatgggc ggggagggcc 1680
ttcgtgcgtc gccgcgccgc cgtccccttc tccctctcca gcctcggggc tgtccgcggg 1740
gggacggctg ccttcggggg ggacggggca gggcggggtt cggcttctgg cgtgtgaccg 1800
gcggctctag agcctctgct aaccatgttc atgccttctt ctttttccta cagctcctgg 1860
gcaacgtgct ggttattgtg ctgtctcatc attttggcaa agaattgatt aattcgagcg 1920
aacgcgtgcc accatgcccc cacctagaac cggaagagga ttgctctggc tcggacttgt 1980
gctgtccagc gtgtgtgtgg ccctgggctc ggaaacccag gccaacagca ccaccgacgc 2040
cctgaatgtg ctgctgatta tcgtggacga tctccggcct tcgctgggct gctacgggga 2100
taagctggtc cgctccccga atatcgacca actggcttca catagcctgc ttttccaaaa 2160
cgcattcgcc caacaagccg tgtgcgcccc gagccgcgtg tctttcctca ccggccggcg 2220
ccctgatact acccggctct acgacttcaa cagctactgg agagtgcacg caggaaactt 2280
ctccaccatt cctcagtact ttaaggagaa cggttacgtc accatgagcg tggggaaggt 2340
gttccaccct ggaatttcct ccaaccacac cgacgactcg ccatactcct ggtcctttcc 2400
cccttaccac ccatcatccg agaagtacga gaacaccaag acgtgcaggg gcccagacgg 2460
ggaactgcac gcgaacctcc tctgcccggt cgatgtgctg gatgtgcccg aaggcaccct 2520
ccctgacaaa cagagcaccg aacaggccat ccagctcctc gagaagatga aaacttcagc 2580
ctccccgttc tttctggccg tgggatacca caagccgcat atccccttcc ggtacccaaa 2640
ggagttccag aagctgtacc cgctggagaa cattaccctg gctcctgatc ccgaagtgcc 2700
ggacggcctg ccgcccgtgg catacaaccc ttggatggac atccgccaga gggaggatgt 2760
gcaagccctg aacatctccg tgccatacgg tccgatcccg gtcgacttcc agcggaagat 2820
taggcagtca tatttcgcgt ccgtgtccta cttggacact caggtcggac gcctcctctc 2880
cgctctcgac gatctgcagc tggccaactc gaccattatc gcgttcacct cggaccatgg 2940
ttgggctctg ggcgaacacg gagaatgggc caagtacagc aatttcgatg tcgcgactca 3000
cgtgcccctg atcttctacg tgcccggacg cacagccagc ttgcctgaag cgggggaaaa 3060
gctgttccct tacctggatc ccttcgactc cgcctctcaa cttatggagc caggcagaca 3120
gtcgatggac ctggtggaac tcgtgtcact gttccctacc ctcgccggtc tggccggact 3180
tcaggtcccg cctcggtgcc cggtgccgtc cttccacgtg gagctgtgtc gcgagggaaa 3240
gaacctcctg aaacacttcc ggttccgcga cctggaggaa gatccctact tgccgggcaa 3300

cccgagagaa cttatcgcat actcccagta ccctcgcccc tccgacatcc cgcagtggaa 3360

ctccgacaag ccgagcctga aggacattaa gatcatgggg tactccatcc ggactattga 3420

ctatcggtac actgtgtggg tcgggttcaa cccagatgag tttctggcca acttctccga 3480

tatccatgcc ggagagctgt acttcgtgga ctcggacccg ctgcaggacc acaacatgta 3540

caacgactca cagggcggcg acctgttcca gttgctgatg ccctgagaat tcgagctcgg 3600

tacccgggaa tcaattcact cctcaggtgc aggctgccta tcagaaggtg gtggctggtg 3660

tggccaatgc cctggctcac aaataccact gagatctttt tccctctgcc aaaaattatg 3720

gggacatcat gaagcccctt gagcatctga cttctggcta ataaaggaaa tttattttca 3780

ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa 3840

atcatttaaa acatcagaat gagtatttgg tttagagttt ggcaacatat gcccatatgc 3900

tggctgccat gaacaaaggt tggctataaa gaggtcatca gtatatgaaa cagccccctg 3960

ctgtccattc cttattccat agaaaagcct tgacttgagg ttagattttt tttatatttt 4020

gttttgtgtt atttttttct ttaacatccc taaaattttc cttacatgtt ttactagcca 4080

gatttttcct cctctcctga ctactcccag tcatagctgt ccctcttctc ttatggagat 4140

ccctcgacct gcagcccaag ctgtagataa gtagcatggc gggttaatca ttaactacaa 4200

ggaaccccta gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc 4260

cgcccgggct ttgcccgggc ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcag 4307

<210> 8
<211> 1653
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ohIDS-version2

<400> 8

atgcctcctc ctagaactgg aagggggctg ctgtggctgg ggctggtcct gtcatcagtg 60

tgtgtcgctc tgggctccga gactcaggca aactccacca cagacgccct gaatgtgctg 120

ctgatcattg tcgacgatct gcgaccttcc ctggggtgct acggcgacaa gctggtgagg 180

tctccaaaca tcgatcagct ggcttcacac agcctgctgt tccagaatgc ctttgctcag 240

caggcagtgt gtgcaccatc acgggtcagc ttcctgaccg gaaggagacc tgacactacc 300

aggctgtacg attttaactc atattggaga gtgcatgccg ggaatttcag caccatccca 360

cagtacttta aggagaacgg ctatgtgaca atgtccgtgg gaaaagtctt ccaccccggc 420

attagctcca atcatacaga cgattctcca tactcctggt cttttccccc ttatcacccc 480

tctagtgaga agtacgaaaa cacaaaaact tgcaggggac cagacgggga gctgcatgca 540

aatctgctgt gtcccgtgga cgtcctggat gtgcccgaag gcacactgcc tgataagcag 600

agcactgagc aggccattca gctgctggaa aagatgaaaa caagtgcttc acccttcttt 660

ctggcagtgg gatatcacaa accacatatc cccttcagat atcccaagga gtttcagaaa 720

ctgtaccctc tggaaaacat tactctggct cccgaccctg aggtgcctga tggactgcca 780

cccgtcgcat ataacccatg gatggacatc cggcagcgcg aggatgtgca ggccctgaat 840

atcagtgtcc cttacgggcc aattcccgtg gacttccaga gaaagattcg gcagtcttac 900

tttgccagcg tctcctatct ggatactcaa gtgggacgac tgctgagcgc tctggacgat 960

ctgcagctgg ccaacagcac catcattgct ttcacatccg accacggatg ggctctggga 1020

gagcatggag aatgggcaaa gtatagcaat ttcgatgtgg ccactcacgt cccactgatc 1080

ttttacgtgc ccggccgaac cgcatccctg ccagaggctg gagaaaaact gttcccttac 1140

ctggacccat ttgattctgc tagtcagctg atggagcctg gccgacagtc tatggacctg 1200

gtggaactgg tcagtctgtt ccctacactg gctggactgg caggactgca ggtgcctcca 1260

agatgccctg tgccatcttt tcacgtcgag ctgtgtcggg aaggcaagaa cctgctgaaa 1320

catttcaggt tcagggacct ggaggaagat ccttatctgc caggaaatcc cagggagctg 1380

atcgcctaca gtcagtatcc ccgcccttca gacattcctc agtggaactc cgacaagcca 1440

tctctgaagg atatcaaaat tatgggatac agcatccgca ctattgatta ccgatatacc 1500

gtgtgggtcg ggttcaaccc cgacgagttc ctggcaaatt ttagtgatat ccacgccggc 1560

gaactgtatt ttgtggactc agatcctctg caggaccata acatgtacaa tgacagccag 1620

ggcggagatc tgttccagct gctgatgcca tga 1653

<210> 9
<211> 7888
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAAV-CAG-ohIDS-version2

<400> 9

cgcgtgccac catgcctcct cctagaactg gaagggggct gctgtggctg gggctggtcc 60

tgtcatcagt gtgtgtcgct ctgggctccg agactcaggc aaactccacc acagacgccc 120

tgaatgtgct gctgatcatt gtcgacgatc tgcgaccttc cctggggtgc tacggcgaca 180

agctggtgag gtctccaaac atcgatcagc tggcttcaca cagcctgctg ttccagaatg 240

cctttgctca gcaggcagtg tgtgcaccat cacgggtcag cttcctgacc ggaaggagac 300
ctgacactac caggctgtac gattttaact catattggag agtgcatgcc gggaatttca 360
gcaccatccc acagtacttt aaggagaacg gctatgtgac aatgtccgtg ggaaaagtct 420
tccaccccgg cattagctcc aatcatacag acgattctcc atactcctgg tcttttcccc 480
cttatcaccc ctctagtgag aagtacgaaa acacaaaaac ttgcagggga ccagacgggg 540
agctgcatgc aaatctgctg tgtcccgtgg acgtcctgga tgtgcccgaa ggcacactgc 600
ctgataagca gagcactgag caggccattc agctgctgga aaagatgaaa acaagtgctt 660
cacccttctt tctggcagtg ggatatcaca aaccacatat ccccttcaga tatcccaagg 720
agtttcagaa actgtaccct ctggaaaaca ttactctggc tcccgaccct gaggtgcctg 780
atggactgcc acccgtcgca tataacccat ggatggacat ccggcagcgc gaggatgtgc 840
aggccctgaa tatcagtgtc ccttacgggc caattcccgt ggacttccag agaaagattc 900
ggcagtctta ctttgccagc gtctcctatc tggatactca agtgggacga ctgctgagcg 960
ctctggacga tctgcagctg gccaacagca ccatcattgc tttcacatcc gaccacggat 1020
gggctctggg agagcatgga gaatgggcaa agtatagcaa tttcgatgtg gccactcacg 1080
tcccactgat cttttacgtg cccggccgaa ccgcatccct gccagaggct ggagaaaaac 1140
tgttccctta cctggaccca tttgattctg ctagtcagct gatggagcct ggccgacagt 1200
ctatggacct ggtggaactg gtcagtctgt tccctacact ggctggactg gcaggactgc 1260
aggtgcctcc aagatgccct gtgccatctt ttcacgtcga gctgtgtcgg gaaggcaaga 1320
acctgctgaa acatttcagg ttcagggacc tggaggaaga tccttatctg ccaggaaatc 1380
ccagggagct gatcgcctac agtcagtatc cccgcccttc agacattcct cagtggaact 1440
ccgacaagcc atctctgaag gatatcaaaa ttatgggata cagcatccgc actattgatt 1500
accgatatac cgtgtgggtc gggttcaacc ccgacgagtt cctggcaaat tttagtgata 1560
tccacgccgg cgaactgtat tttgtggact cagatcctct gcaggaccat aacatgtaca 1620
atgacagcca gggcggagat ctgttccagc tgctgatgcc atgagaattc gagctcggta 1680
cccgggaatc aattcactcc tcaggtgcag gctgcctatc agaaggtggt ggctggtgtg 1740
gccaatgccc tggctcacaa ataccactga gatctttttc cctctgccaa aaattatggg 1800
gacatcatga agccccttga gcatctgact tctggctaat aaaggaaatt tattttcatt 1860
gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc tcactcggaa ggacatatgg gagggcaaat 1920
catttaaaac atcagaatga gtatttggtt tagagtttgg caacatatgc ccatatgctg 1980
gctgccatga acaaaggttg gctataaaga ggtcatcagt atatgaaaca gccccctgct 2040

gtccattcct tattccatag aaaagccttg acttgaggtt agatttttt tatattttgt 2100
tttgtgttat ttttttcttt aacatcccta aaattttcct tacatgtttt actagccaga 2160
tttttcctcc tctcctgact actcccagtc atagctgtcc ctcttctctt atggagatcc 2220
ctcgacctgc agcccaagct gtagataagt agcatggcgg gttaatcatt aactacaagg 2280
aacccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc actgaggccg 2340
cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagctgca ttaatgaatc 2400
ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact 2460
gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta 2520
atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 2580
caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc 2640
cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta 2700
taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg 2760
ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc 2820
tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac 2880
gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac 2940
ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 3000
aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga 3060
agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt 3120
agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag 3180
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct 3240
gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg 3300
atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat 3360
gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc 3420
tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg 3480
gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccgc gagacccacg ctcaccggct 3540
ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca 3600
actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg 3660
ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg 3720
tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc 3780
cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag 3840

ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg 3900
ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag 3960
tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat 4020
agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg 4080
atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca 4140
gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca 4200
aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat 4260
tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag 4320
aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa 4380
gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt 4440
ctcgcgcgtt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc 4500
acagcttgtc tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt 4560
gttggcgggt gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg 4620
caccatatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcga 4680
ttccaacatc caataaatca tacaggcaag gcaaagaatt agcaaaatta agcaataaag 4740
cctcagagca taaagctaaa tcggttgtac caaaaacatt atgaccctgt aatacttttg 4800
cgggagaagc ctttatttca acgcaaggat aaaaattttt agaaccctca tatattttaa 4860
atgcaatgcc tgagtaatgt gtaggtaaag attcaaacgg gtgagaaagg ccggagacag 4920
tcaaatcacc atcaatatga tattcaaccg ttctagctga taaattcatg ccggagaggg 4980
tagctatttt tgagaggtct ctacaaaggc tatcaggtca ttgcctgaga gtctggagca 5040
aacaagagaa tcgatgaacg gtaatcgtaa aactagcatg tcaatcatat gtaccccggt 5100
tgataatcag aaaagcccca aaaacaggaa gattgtataa gcaaatattt aaattgtaag 5160
cgttaatatt ttgttaaaat tcgcgttaaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca 5220
ataggccgaa atcggcaaaa tcccttataa atcaaaagaa tagaccgaga tagggttgag 5280
tgttgttcca gtttggaaca agagtccact attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg 5340
gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa ccatcaccct aatcaagttt 5400
tttggggtcg aggtgccgta aagcactaaa tcggaaccct aaagggagcc cccgatttag 5460
agcttgacgg ggaaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa gggaagaaag cgaaaggagc 5520
gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggt cacgctgcgc gtaaccacca cacccgccgc 5580
gcttaatgcg ccgctacagg gcgcgtacta tggttgcttt gacgagcacg tataacgtgc 5640

tttcctcgtt agaatcagag cgggagctaa acaggaggcc gattaaaggg attttagaca 5700
ggaacggtac gccagaatcc tgagaagtgt ttttataatc agtgaggcca ccgagtaaaa 5760
gagtctgtcc atcacgcaaa ttaaccgttg tcgcaatact tctttgatta gtaataacat 5820
cacttgcctg agtagaagaa ctcaaactat cggccttgct ggtaatatcc agaacaatat 5880
taccgccagc cattgcaacg gaatcgccat tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa 5940
gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgc gcgctcgctc gctcactgag 6000
gccgcccggg caaagcccgg gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc agtgagcgag 6060
cgagcgcgca gagagggagt ggccaactcc atcactaggg gttccttgta gttaatgatt 6120
aacccgccat gctacttatc tactcgacat tgattattga ctagttatta atagtaatca 6180
attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta 6240
aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat 6300
gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg 6360
taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac 6420
gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt 6480
cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtcga ggtgagcccc 6540
acgttctgct tcactctccc catctccccc ccctccccac ccccaatttt gtatttattt 6600
atttttaat tattttgtgc agcgatgggg gcgggggggg gggggggcg cgcgccaggc 6660
ggggcggggc ggggcgaggg gcggggcggg gcgaggcgga gaggtgcggc ggcagccaat 6720
cagagcggcg cgctccgaaa gtttcctttt atggcgaggc ggcggcggcg gcggccctat 6780
aaaaagcgaa gcgcgcggcg ggcgggagtc gctgcgttgc cttcgccccg tgccccgctc 6840
cgccgccgcc tcgcgccgcc cgccccggct ctgactgacc gcgttactcc cacaggtgag 6900
cgggcgggac ggcccttctc ctccgggctg taattagcgc ttggtttaat gacggcttgt 6960
ttcttttctg tggctgcgtg aaagccttga ggggctccgg gagggccctt tgtgcggggg 7020
gagcggctcg gggggtgcgt gcgtgtgtgt gtgcgtgggg agcgccgcgt gcggctccgc 7080
gctgcccggc ggctgtgagc gctgcgggcg cggcgcgggg ctttgtgcgc tccgcagtgt 7140
gcgcgagggg agcgcggccg ggggcggtgc cccgcggtgc gggggggct gcgaggggaa 7200
caaaggctgc gtgcggggtg tgtgcgtggg ggggtgagca gggggtgtgg gcgcgtcggt 7260
cgggctgcaa cccccccctgc accccccctcc ccgagttgct gagcacggcc cggcttcggg 7320
tgcggggctc cgtacggggc gtggcgcggg gctcgccgtg ccgggcgggg ggtggcggca 7380
ggtgggggtg ccgggcgggg cggggccgcc tcgggccggg gagggctcgg gggaggggcg 7440

cggcggcccc cggagcgccg gcggctgtcg aggcgcggcg agccgcagcc attgcctttt 7500

atggtaatcg tgcgagaggg cgcagggact tcctttgtcc caaatctgtg cggagccgaa 7560

atctgggagg cgccgccgca ccccctctag cgggcgcggg gcgaagcggt gcggcgccgg 7620

caggaaggaa atgggcgggg agggccttcg tgcgtcgccg cgccgccgtc cccttctccc 7680

tctccagcct cggggctgtc cgcgggggga cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc 7740

ggggttcggc ttctggcgtg tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc 7800

cttcttcttt ttcctacagc tcctgggcaa cgtgctggtt attgtgctgt ctcatcattt 7860

tggcaaagaa ttgattaatt cgagcgaa 7888

<210> 10
<211> 4307
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> AAV9-CAG-ohIDS-version2

<400> 10

attacgccag ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg 60

ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa 120

ctccatcact aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctactcg 180

acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 240

atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa 300

cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac 360

tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg cagtacatca 420

agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg 480

gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt 540

agtcatcgct attaccatgg tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tccccatctc 600

cccccccctcc ccacccccaa ttttgtattt atttattttt taattatttt gtgcagcgat 660

gggggcgggg gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg 720

cggggcgagg cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc 780

ttttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggg 840

agtcgctgcg ttgccttcgc cccgtgcccc gctccgccgc cgcctcgcgc cgcccgcccc 900

ggctctgact gaccgcgtta ctcccacagg tgagcgggcg ggacggccct tctcctccgg 960

gctgtaatta gcgcttggtt taatgacggc ttgtttcttt tctgtggctg cgtgaaagcc 1020
ttgaggggct ccgggagggc cctttgtgcg gggggagcgg ctcgggggt gcgtgcgtgt 1080
gtgtgtgcgt ggggagcgcc gcgtgcggct ccgcgctgcc cggcggctgt gagcgctgcg 1140
ggcgcggcgc ggggctttgt gcgctccgca gtgtgcgcga ggggagcgcg gccgggggcg 1200
gtgccccgcg gtgcgggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg 1260
tgggggggtg agcagggggt gtgggcgcgt cggtcgggct gcaacccccc ctgcaccccc 1320
ctccccgagt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtacg gggcgtggcg 1380
cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc ggggcggggc 1440
cgcctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg cccccggagc gccggcggct 1500
gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg 1560
gacttccttt gtcccaaatc tgtgcggagc cgaaatctgg gaggcgccgc cgcacccccct 1620
ctagcgggcg cggggcgaag cggtgcggcg ccggcaggaa ggaaatgggc ggggagggcc 1680
ttcgtgcgtc gccgcgccgc cgtccccttc tccctctcca gcctcggggc tgtccgcggg 1740
gggacggctg ccttcggggg ggacggggca gggcggggtt cggcttctgg cgtgtgaccg 1800
gcggctctag agcctctgct aaccatgttc atgccttctt ctttttccta cagctcctgg 1860
gcaacgtgct ggttattgtg ctgtctcatc attttggcaa agaattgatt aattcgagcg 1920
aacgcgtgcc accatgcctc ctcctagaac tggaaggggg ctgctgtggc tggggctggt 1980
cctgtcatca gtgtgtgtcg ctctgggctc cgagactcag gcaaactcca ccacagacgc 2040
cctgaatgtg ctgctgatca ttgtcgacga tctgcgacct tccctggggt gctacggcga 2100
caagctggtg aggtctccaa acatcgatca gctggcttca cacagcctgc tgttccagaa 2160
tgcctttgct cagcaggcag tgtgtgcacc atcacgggtc agcttcctga ccggaaggag 2220
acctgacact accaggctgt acgattttaa ctcatattgg agagtgcatg ccgggaattt 2280
cagcaccatc ccacagtact ttaaggagaa cggctatgtg acaatgtccg tgggaaaagt 2340
cttccacccc ggcattagct ccaatcatac agacgattct ccatactcct ggtcttttcc 2400
cccttatcac ccctctagtg agaagtacga aaacacaaaa acttgcaggg gaccagacgg 2460
ggagctgcat gcaaatctgc tgtgtcccgt ggacgtcctg gatgtgcccg aaggcacact 2520
gcctgataag cagagcactg agcaggccat tcagctgctg gaaaagatga aaacaagtgc 2580
ttcacccttc tttctggcag tgggatatca caaaccacat atccccttca gatatcccaa 2640
ggagtttcag aaactgtacc ctctggaaaa cattactctg gctcccgacc ctgaggtgcc 2700
tgatggactg ccacccgtcg catataaccc atggatggac atccggcagc gcgaggatgt 2760

gcaggccctg aatatcagtg tcccttacgg gccaattccc gtggacttcc agagaaagat 2820

tcggcagtct tactttgcca gcgtctccta tctggatact caagtgggac gactgctgag 2880

cgctctggac gatctgcagc tggccaacag caccatcatt gctttcacat ccgaccacgg 2940

atgggctctg ggagagcatg gagaatgggc aaagtatagc aatttcgatg tggccactca 3000

cgtcccactg atcttttacg tgcccggccg aaccgcatcc ctgccagagg ctggagaaaa 3060

actgttccct tacctggacc catttgattc tgctagtcag ctgatggagc ctggccgaca 3120

gtctatggac ctggtggaac tggtcagtct gttccctaca ctggctggac tggcaggact 3180

gcaggtgcct ccaagatgcc ctgtgccatc ttttcacgtc gagctgtgtc gggaaggcaa 3240

gaacctgctg aaacatttca ggttcaggga cctggaggaa gatccttatc tgccaggaaa 3300

tcccagggag ctgatcgcct acagtcagta tccccgccct tcagacattc ctcagtggaa 3360

ctccgacaag ccatctctga aggatatcaa aattatggga tacagcatcc gcactattga 3420

ttaccgatat accgtgtggg tcgggttcaa ccccgacgag ttcctggcaa attttagtga 3480

tatccacgcc ggcgaactgt attttgtgga ctcagatcct ctgcaggacc ataacatgta 3540

caatgacagc cagggcggag atctgttcca gctgctgatg ccatgagaat tcgagctcgg 3600

tacccgggaa tcaattcact cctcaggtgc aggctgccta tcagaaggtg gtggctggtg 3660

tggccaatgc cctggctcac aaataccact gagatctttt tccctctgcc aaaaattatg 3720

gggacatcat gaagcccctt gagcatctga cttctggcta ataaaggaaa tttattttca 3780

ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa 3840

atcatttaaa acatcagaat gagtatttgg tttagagttt ggcaacatat gcccatatgc 3900

tggctgccat gaacaaaggt tggctataaa gaggtcatca gtatatgaaa cagccccctg 3960

ctgtccattc cttattccat agaaaagcct tgacttgagg ttagattttt tttatatttt 4020

gttttgtgtt atttttttct ttaacatccc taaaattttc cttacatgtt ttactagcca 4080

gatttttcct cctctcctga ctactcccag tcatagctgt ccctcttctc ttatggagat 4140

ccctcgacct gcagcccaag ctgtagataa gtagcatggc gggttaatca ttaactacaa 4200

ggaaccccta gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc 4260

cgcccgggct ttgcccgggc ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcag 4307

<210> 11
<211> 1665
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> omIDS

<400> 11

atgagcccac ctcccccacc cccaatctgg cggcagctga gcttcagcct gctgctgggc 60
agcttctgta tcgccctgga aagcgccaag cttgcccagg gcaacagcgc caccgacgcc 120
ctgaacatcc tgctgatcat cgtggacgac ctgaggccca gcctgggatg ctacggcgac 180
aagctggtcc gcagccccaa catcgaccag ctggcttctc acagcgtgct gttccagaac 240
gcattcgcac agcaggccgt gtgcgccccc agcagagtgt ctttcctgac cggcagaagg 300
cccgacacca ccagactgta cgacttcaac agctactggc gggtgcacag cggcaacttc 360
agcaccatcc cccagtactt caaagaaaac ggctacgtga ccatgagcgt gggcaaggtg 420
ttccaccccg gcatcagcag caaccacagc gacgactacc cctacagctg gtccttccca 480
ccctaccacc ccagcagcga gaagtacgag aacaccaaga cctgcaaggg ccaggacggc 540
aagctgcacg ccaacctgct gtgccctgtg gacgtggcag acgtgccaga gggaaccctg 600
cctgacaagc agagcaccga ggaagccatc agactgctgg aaaagatgaa gaccagcgcc 660
agccccttct tcctggccgt gggctaccac aagccccaca tccctttcag ataccccaaa 720
gagttccaga agctgtaccc cctggaaaac atcaccctgg cccccgaccc ccacgtgcca 780
gattctctgc cccccgtggc ctacaacccc tggatggata tccgcgagcg cgaggacgtg 840
caggctctga acatcagcgt gccctacggc cctatccccg aggacttcca gagaaagatc 900
agacagagct acttcgccag cgtgtcctac ctggacaccc aagtgggaca cgtgctgagc 960
gccctggacg atctgagact ggcccacaac accatcattg ccttcaccag cgaccacggc 1020
tgggctctgg gagagcacgg cgagtgggcc aagtacagca acttcgacgt ggccaccaga 1080
gtgcccctga tgctgtacgt gcccggcaga accgcccctc tgcctgccgc tggacagaag 1140
ctgttccctt accgggaccc cttcgacccc gccagcgatt ggatggacgc cggcagacac 1200
accgaggacc tggtggaact ggtgtccctg ttccccaccc tggccggact ggctggactg 1260
cctgtgcccc ccagatgccc catccctagc ttccacgtcg aactgtgcag agagggccag 1320
aacctgcaga aacatctgca gctgcacgac ctggaagagg aacccgacct gttcggcaac 1380
cccagagagc tgatcgccta cagccagtac cccagacccg ccgacttccc ccagtggaac 1440
agcgacaagc ccagcctgaa cgacatcaaa gtgatgggct acagcatcag gaccgtggac 1500
tacagataca ccgtgtgggt cggattcgac cccagcgagt tcctggccaa cttcagcgac 1560
atccacgccg gcgagctgta cttcgtggac agcgaccccc tgcaggacca caacgtgtac 1620
aacgacagcc agcacggcgg cctgctgcac agcctgaggc cttga 1665

<210> 12
<211> 7914
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pAAV-CAG-omIDS

<400> 12

cgcgtgctag cgccaccatg agcccacctc ccccaccccc aatctggcgg cagctgagct 60

tcagcctgct gctgggcagc ttctgtatcg ccctggaaag cgccaagctt gcccagggca 120

acagcgccac cgacgccctg aacatcctgc tgatcatcgt ggacgacctg aggcccagcc 180

tgggatgcta cggcgacaag ctggtccgca gccccaacat cgaccagctg gcttctcaca 240

gcgtgctgtt ccagaacgca ttcgcacagc aggccgtgtg cgcccccagc agagtgtctt 300

tcctgaccgg cagaaggccc gacaccacca gactgtacga cttcaacagc tactggcggg 360

tgcacagcgg caacttcagc accatccccc agtacttcaa agaaaacggc tacgtgacca 420

tgagcgtggg caaggtgttc caccccggca tcagcagcaa ccacagcgac gactacccct 480

acagctggtc cttcccaccc taccacccca gcagcgagaa gtacgagaac accaagacct 540

gcaagggcca ggacggcaag ctgcacgcca acctgctgtg ccctgtggac gtggcagacg 600

tgccagaggg aaccctgcct gacaagcaga gcaccgagga agccatcaga ctgctggaaa 660

agatgaagac cagcgccagc cccttcttcc tggccgtggg ctaccacaag ccccacatcc 720

ctttcagata ccccaaagag ttccagaagc tgtacccccct ggaaaacatc accctggccc 780

ccgaccccca cgtgccagat tctctgcccc ccgtggccta caacccctgg atggatatcc 840

gcgagcgcga ggacgtgcag gctctgaaca tcagcgtgcc ctacggccct atccccgagg 900

acttccagag aaagatcaga cagagctact tcgccagcgt gtcctacctg gacacccaag 960

tgggacacgt gctgagcgcc ctggacgatc tgagactggc ccacaacacc atcattgcct 1020

tcaccagcga ccacggctgg gctctgggag agcacggcga gtgggccaag tacagcaact 1080

tcgacgtggc caccagagtg cccctgatgc tgtacgtgcc cggcagaacc gcccctctgc 1140

ctgccgctgg acagaagctg ttcccttacc gggacccctt cgaccccgcc agcgattgga 1200

tggacgccgg cagacacacc gaggacctgg tggaactggt gtccctgttc cccaccctgg 1260

ccggactggc tggactgcct gtgccccccca gatgccccat ccctagcttc cacgtcgaac 1320

tgtgcagaga gggccagaac ctgcagaaac atctgcagct gcacgacctg gaagaggaac 1380

ccgacctgtt cggcaacccc agagagctga tcgcctacag ccagtacccc agacccgccg 1440

acttccccca gtggaacagc gacaagccca gcctgaacga catcaaagtg atgggctaca 1500

gcatcaggac cgtggactac agatacaccg tgtgggtcgg attcgacccc agcgagttcc 1560
tggccaactt cagcgacatc cacgccggcg agctgtactt cgtggacagc gacccccctgc 1620
aggaccacaa cgtgtacaac gacagccagc acggcggcct gctgcacagc ctgaggcctt 1680
gagcggccgc gaattcgagc tcggtacccg ggaatcaatt cactcctcag gtgcaggctg 1740
cctatcagaa ggtggtggct ggtgtggcca atgccctggc tcacaaatac cactgagatc 1800
tttttccctc tgccaaaaat tatggggaca tcatgaagcc ccttgagcat ctgacttctg 1860
gctaataaag gaaatttatt ttcattgcaa tagtgtgttg gaatttttg tgtctctcac 1920
tcggaaggac atatgggagg gcaaatcatt taaaacatca gaatgagtat ttggtttaga 1980
gtttggcaac atatgcccat atgctggctg ccatgaacaa aggttggcta taaagaggtc 2040
atcagtatat gaaacagccc cctgctgtcc attccttatt ccatagaaaa gccttgactt 2100
gaggttagat tttttttata ttttgttttg tgttattttt ttctttaaca tccctaaaat 2160
tttccttaca tgttttacta gccagatttt tcctcctctc ctgactactc ccagtcatag 2220
ctgtccctct tctcttatgg agatccctcg acctgcagcc caagctgtag ataagtagca 2280
tggcgggtta atcattaact acaaggaacc cctagtgatg gagttggcca ctccctctct 2340
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag 2400
cgagcgcgca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattg 2460
ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag 2520
cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag 2580
gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc 2640
tggcgttttt ccataggctc cgcccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc 2700
agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc 2760
tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt 2820
cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg 2880
ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat 2940
ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag 3000
ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt 3060
ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc 3120
cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggta 3180
gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag 3240
atcctttgat cttttctacg gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga 3300

ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa 3360
gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa 3420
tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc 3480
ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga 3540
taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa 3600
gggccgagcg cagaagtggt cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt 3660
gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg 3720
ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc 3780
aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca tgttgtgcaa aaaagcggtt agctccttcg 3840
gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag 3900
cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt 3960
actcaaccaa gtcattctga gaatagtgta tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt 4020
caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac 4080
gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac 4140
ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag 4200
caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa 4260
tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga 4320
gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc 4380
cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa 4440
ataggcgtat cacgaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct 4500
gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac 4560
aagcccgtca gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggctggctt aactatgcgg 4620
catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaaataccg cacagatgcg 4680
taaggagaaa ataccgcatc aggcgattcc aacatccaat aaatcataca ggcaaggcaa 4740
agaattagca aaattaagca ataaagcctc agagcataaa gctaaatcgg ttgtaccaaa 4800
aacattatga ccctgtaata cttttgcggg agaagccttt atttcaacgc aaggataaaa 4860
atttttagaa ccctcatata ttttaaatgc aatgcctgag taatgtgtag gtaaagattc 4920
aaacgggtga gaaaggccgg agacagtcaa atcaccatca atatgatatt caaccgttct 4980
agctgataaa ttcatgccgg agagggtagc tatttttgag aggtctctac aaaggctatc 5040
aggtcattgc ctgagagtct ggagcaaaca agagaatcga tgaacggtaa tcgtaaaact 5100

agcatgtcaa tcatatgtac cccggttgat aatcagaaaa gccccaaaaa caggaagatt 5160
gtataagcaa atatttaaat tgtaagcgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt 5220
tgttaaatca gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca 5280
aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta 5340
aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta 5400
cgtgaaccat caccctaatc aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg 5460
aaccctaaag ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga 5520
aaggaaggga agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg 5580
ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gtactatggt 5640
tgctttgacg agcacgtata acgtgctttc ctcgttagaa tcagagcggg agctaaacag 5700
gaggccgatt aaagggattt tagacaggaa cggtacgcca gaatcctgag aagtgttttt 5760
ataatcagtg aggccaccga gtaaaagagt ctgtccatca cgcaaattaa ccgttgtcgc 5820
aatacttctt tgattagtaa taacatcact tgcctgagta gaagaactca aactatcggc 5880
cttgctggta atatccagaa caatattacc gccagccatt gcaacggaat cgccattcgc 5940
cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc 6000
agctgcgcgc tcgctcgctc actgaggccg cccgggcaaa gcccgggcgt cgggcgacct 6060
ttggtcgccc ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc aactccatca 6120
ctaggggttc cttgtagtta atgattaacc cgccatgcta cttatctact cgacattgat 6180
tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg 6240
agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc aacgaccccc 6300
gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg actttccatt 6360
gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc 6420
atatgccaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg 6480
cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcatcg 6540
ctattaccat ggtcgaggtg agccccacgt tctgcttcac tctccccatc tcccccccct 6600
ccccaccccc aattttgtat ttatttattt tttaattatt ttgtgcagcg atgggggcgg 6660
gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg cgaggggcgg ggcggggcga 6720
ggcggagagg tgcggcggca gccaatcaga gcggcgcgct ccgaaagttt ccttttatgg 6780
cgaggcggcg gcggcggcgg ccctataaaa agcgaagcgc gcggcgggcg ggagtcgctg 6840
cgttgccttc gccccgtgcc ccgctccgcc gccgcctcgc gccgcccgcc ccggctctga 6900

ctgaccgcgt tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctcctcc gggctgtaat 6960

tagcgcttgg tttaatgacg gcttgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag ccttgagggg 7020

ctccgggagg gccctttgtg cgggggggagc ggctcggggg gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc 7080

gtggggagcg ccgcgtgcgg ctccgcgctg cccggcggct gtgagcgctg cgggcgcggc 7140

gcggggcttt gtgcgctccg cagtgtgcgc gaggggagcg cggccggggg cggtgccccg 7200

cggtgcgggg ggggctgcga ggggaacaaa ggctgcgtgc ggggtgtgtg cgtgggggggg 7260

tgagcagggg gtgtgggcgc gtcggtcggg ctgcaacccc ccctgcaccc ccctccccga 7320

gttgctgagc acggcccggc ttcgggtgcg gggctccgta cggggcgtgg cgcggggctc 7380

gccgtgccgg gcgggggggtg gcggcaggtg ggggtgccgg gcggggcggg gccgcctcgg 7440

gccggggagg gctcgggggga ggggcgcggc ggcccccgga gcgccggcgg ctgtcgaggc 7500

gcggcgagcc gcagccattg ccttttatgg taatcgtgcg agagggcgca gggacttcct 7560

ttgtcccaaa tctgtgcgga gccgaaatct gggaggcgcc gccgcacccc ctctagcggg 7620

cgcggggcga agcggtgcgg cgccggcagg aaggaaatgg gcggggaggg ccttcgtgcg 7680

tcgccgcgcc gccgtcccct tctccctctc cagcctcggg gctgtccgcg gggggacggc 7740

tgccttcggg ggggacgggg cagggcgggg ttcggcttct ggcgtgtgac cggcggctct 7800

agagcctctg ctaaccatgt tcatgccttc ttctttttcc tacagctcct gggcaacgtg 7860

ctggttattg tgctgtctca tcattttggc aaagaattga ttaattcgag cgaa 7914

<210> 13
<211> 4333
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> AAV9-CAG-omIDS

<400> 13

attacgccag ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg 60

ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa 120

ctccatcact aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctactcg 180

acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 240

atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa 300

cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac 360

tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg cagtacatca 420

agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg 480

gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt 540
agtcatcgct attaccatgg tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tccccatctc 600
cccccccctcc ccacccccaa ttttgtattt atttattttt taattatttt gtgcagcgat 660
gggggcgggg gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg 720
cggggcgagg cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc 780
ttttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggg 840
agtcgctgcg ttgccttcgc cccgtgcccc gctccgccgc cgcctcgcgc cgcccgcccc 900
ggctctgact gaccgcgtta ctcccacagg tgagcgggcg ggacggccct tctcctccgg 960
gctgtaatta gcgcttggtt taatgacggc ttgtttcttt tctgtggctg cgtgaaagcc 1020
ttgaggggct ccgggagggc cctttgtgcg gggggagcgg ctcgggggt gcgtgcgtgt 1080
gtgtgtgcgt ggggagcgcc gcgtgcggct ccgcgctgcc cggcggctgt gagcgctgcg 1140
ggcgcggcgc ggggctttgt gcgctccgca gtgtgcgcga ggggagcgcg gccgggggcg 1200
gtgccccgcg gtgcgggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg 1260
tgggggggtg agcagggggt gtgggcgcgt cggtcgggct gcaacccccc ctgcaccccc 1320
ctccccgagt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtacg gggcgtggcg 1380
cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc ggggcggggc 1440
cgcctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg cccccggagc gccggcggct 1500
gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg 1560
gacttccttt gtcccaaatc tgtgcggagc cgaaatctgg gaggcgccgc cgcacccccct 1620
ctagcgggcg cggggcgaag cggtgcggcg ccggcaggaa ggaaatgggc ggggagggcc 1680
ttcgtgcgtc gccgcgccgc cgtccccttc tccctctcca gcctcggggc tgtccgcggg 1740
gggacggctg ccttcggggg ggacggggca gggcggggtt cggcttctgg cgtgtgaccg 1800
gcggctctag agcctctgct aaccatgttc atgccttctt ctttttccta cagctcctgg 1860
gcaacgtgct ggttattgtg ctgtctcatc attttggcaa agaattgatt aattcgagcg 1920
aacgcgtgct agcgccacca tgagcccacc tcccccaccc ccaatctggc ggcagctgag 1980
cttcagcctg ctgctgggca gcttctgtat cgccctggaa agcgccaagc ttgcccaggg 2040
caacagcgcc accgacgccc tgaacatcct gctgatcatc gtggacgacc tgaggcccag 2100
cctgggatgc tacggcgaca agctggtccg cagccccaac atcgaccagc tggcttctca 2160
cagcgtgctg ttccagaacg cattcgcaca gcaggccgtg tgcgcccccca gcagagtgtc 2220
tttcctgacc ggcagaaggc ccgacaccac cagactgtac gacttcaaca gctactggcg 2280

ggtgcacagc ggcaacttca gcaccatccc ccagtacttc aaagaaaacg gctacgtgac 2340
catgagcgtg ggcaaggtgt tccaccccgg catcagcagc aaccacagcg acgactaccc 2400
ctacagctgg tccttcccac cctaccaccc cagcagcgag aagtacgaga acaccaagac 2460
ctgcaagggc caggacggca agctgcacgc caacctgctg tgccctgtgg acgtggcaga 2520
cgtgccagag ggaaccctgc ctgacaagca gagcaccgag gaagccatca gactgctgga 2580
aaagatgaag accagcgcca gccccttctt cctggccgtg ggctaccaca agccccacat 2640
ccctttcaga taccccaaag agttccagaa gctgtacccc ctggaaaaca tcaccctggc 2700
ccccgacccc cacgtgccag attctctgcc ccccgtggcc tacaacccct ggatggatat 2760
ccgcgagcgc gaggacgtgc aggctctgaa catcagcgtg ccctacggcc ctatccccga 2820
ggacttccag agaaagatca gacagagcta cttcgccagc gtgtcctacc tggacaccca 2880
agtgggacac gtgctgagcg ccctggacga tctgagactg gcccacaaca ccatcattgc 2940
cttcaccagc gaccacggct gggctctggg agagcacggc gagtgggcca agtacagcaa 3000
cttcgacgtg gccaccagag tgcccctgat gctgtacgtg cccggcagaa ccgcccctct 3060
gcctgccgct ggacagaagc tgttccctta ccgggacccc ttcgaccccg ccagcgattg 3120
gatggacgcc ggcagacaca ccgaggacct ggtggaactg gtgtccctgt tccccaccct 3180
ggccggactg gctggactgc ctgtgccccc cagatgcccc atccctagct tccacgtcga 3240
actgtgcaga gagggccaga acctgcagaa acatctgcag ctgcacgacc tggaagagga 3300
acccgacctg ttcggcaacc ccagagagct gatcgcctac agccagtacc ccagacccgc 3360
cgacttcccc cagtggaaca gcgacaagcc cagcctgaac gacatcaaag tgatgggcta 3420
cagcatcagg accgtggact acagatacac cgtgtgggtc ggattcgacc ccagcgagtt 3480
cctggccaac ttcagcgaca tccacgccgg cgagctgtac ttcgtggaca gcgacccccct 3540
gcaggaccac aacgtgtaca acgacagcca gcacggcggc ctgctgcaca gcctgaggcc 3600
ttgagcggcc gcgaattcga gctcggtacc cgggaatcaa ttcactcctc aggtgcaggc 3660
tgcctatcag aaggtggtgg ctggtgtggc caatgccctg gctcacaaat accactgaga 3720
tctttttccc tctgccaaaa attatgggga catcatgaag ccccttgagc atctgacttc 3780
tggctaataa aggaaattta ttttcattgc aatagtgtgt tggaattttt tgtgtctctc 3840
actcggaagg acatatggga gggcaaatca tttaaaacat cagaatgagt atttggttta 3900
gagtttggca acatatgccc atatgctggc tgccatgaac aaaggttggc tataaagagg 3960
tcatcagtat atgaaacagc cccctgctgt ccattcctta ttccatagaa aagccttgac 4020
ttgaggttag atttttttta tattttgttt tgtgttattt ttttctttaa catccctaaa 4080

attttcctta catgttttac tagccagatt tttcctcctc tcctgactac tcccagtcat 4140

agctgtccct cttctcttat ggagatccct cgacctgcag cccaagctgt agataagtag 4200

catggcgggt taatcattaa ctacaaggaa cccctagtga tggagttggc cactccctct 4260

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg 4320

agcgagcgcg cag 4333

<210> 14
<211> 646
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Promotor CAG

<400> 14

actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc 60

cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 120

ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 180

caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 240

ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 300

tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 360

accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca 420

cccccaattt tgtatttatt tatttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcgggggg 480

gggggggggc gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg 540

agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt tatggcgagg 600

cggcggcggc ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc gggcgg 646

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador directo

<400> 15

ttttgtgtac tccaaccccg 20

<210> 16
<211> 20

<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso

<400> 16

tgtctgcata acagcccagg 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Mutación del cebador inverso

<400> 17

gccctcacat tgccaaagga 20

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia nucleotídica aislada que codifica para la proteína iduronato-2-sulfatasa (IDS) según la SEQ ID NO: 1, donde dicha secuencia nucleotídica se selecciona de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8.

2. Un plásmido que contiene una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1.

3. El plásmido según la reivindicación 2, que es pAAV-CAG-ohIDS-versión1 con número de acceso DSM 29867, según la SEQ ID NO: 6.

4. El plásmido según la reivindicación 2, que es pAAV-CAG-ohIDS-versión2 con número de acceso DSM 29868, según la SEQ ID NO: 9.

5. Un vector de virus adeno-asociado recombinante de serotipo 9, vector AAV9, que contiene una secuencia nucleotídica según la reivindicación 1.

6. El vector recombinante según la reivindicación 5, que es AAV9-CAG-ohIDS-versión1 que contiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 5 unida al promotor CAG de SEQ ID NO: 14.

7. El vector recombinante según la reivindicación 5, que es AAV9-CAG-ohIDS-versión2 que contiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 8 unida al promotor CAG de SEQ ID NO: 14.

8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la secuencia nucleotídica según la reivindicación 1, el plásmido según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 o el vector recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.

9. La secuencia nucleotídica según la reivindicación 1, el plásmido según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 o el vector recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para su uso en el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II.

10. Un método de producción de los vectores definidos en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 que comprende las etapas de:

i) proporcionar un primer vector que comprende la secuencia que codifica para la proteína de interés interpuesta entre una primera repetición terminal de AAV y una segunda repetición terminal de AAV, un promotor CAG operativamente unido a la secuencia que codifica para la proteína de interés; un segundo vector que comprende un gen *rep* de AAV y un gen *cap* de AAV de serotipo 9; y un tercer vector que comprende el gen de función auxiliar de adenovirus;

ii) co-transfectar células competentes con los vectores de la etapa i);

iii) cultivar las células transfectadas de la etapa ii); y

iv) purificar los vectores de expresión del cultivo de la etapa iii).

11. Un método para la preparación del plásmido según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende las etapas de:

i) cortar la secuencia que codifica para la proteína de interés del plásmido de partida, por digestión, en particular usando MluI/EcoRI,

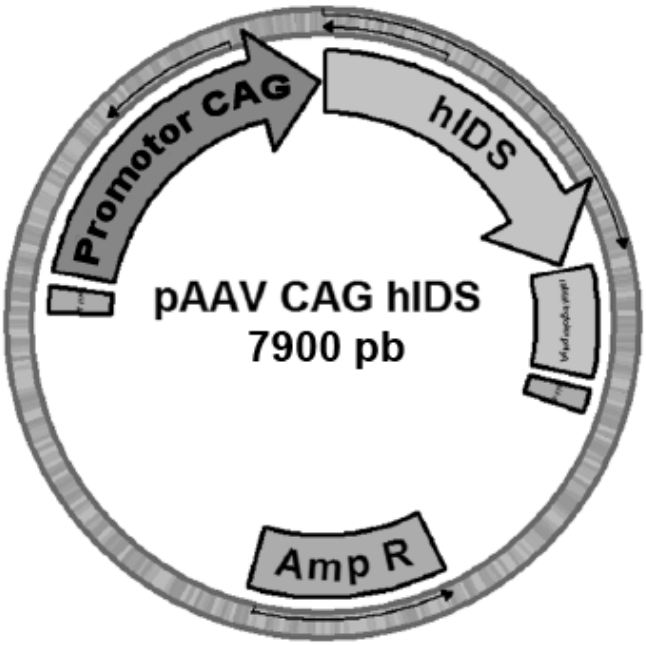
ii) clonar la secuencia que codifica para la proteína de interés entre dos sitios de restricción del plásmido de esqueleto de AAV pAAV-CAG, obteniéndose de esta forma el plásmido correspondiente que incluye la secuencia que codifica para la proteína de interés.

12. Una célula aislada que comprende la secuencia nucleotídica según la reivindicación 1.

Figura 1

IDS humana

A

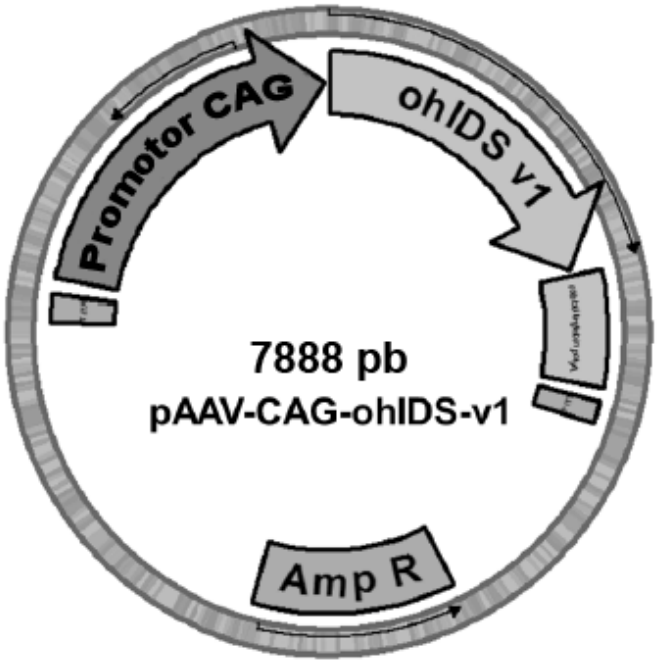


B

Figura 2

IDS humana optimizada-versión1

A



B

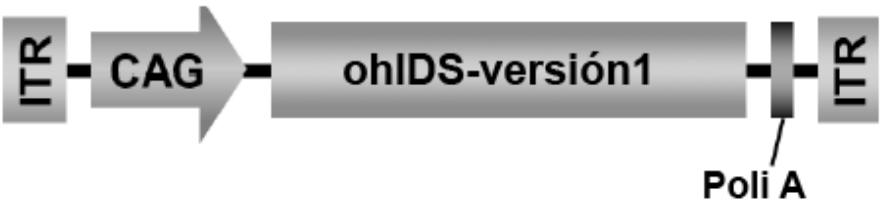
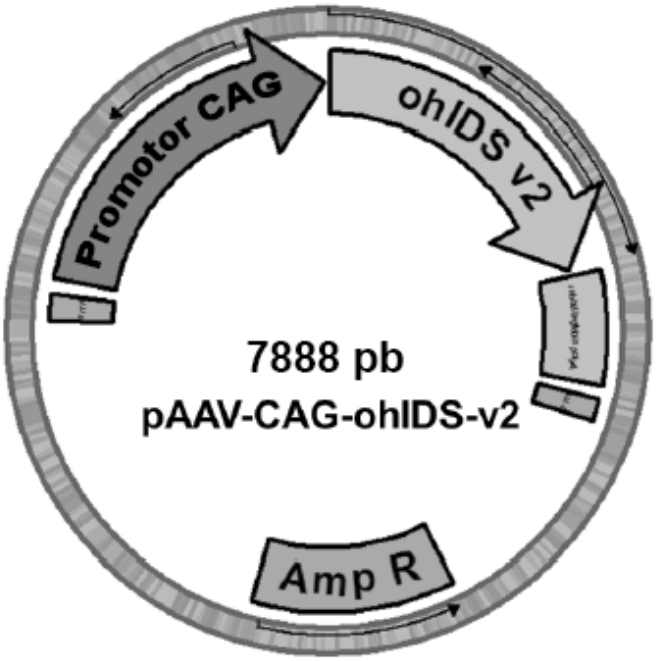


Figura 3

IDS humana optimizada-versión2

A



B

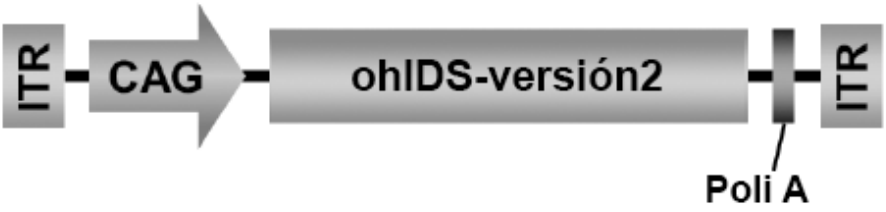
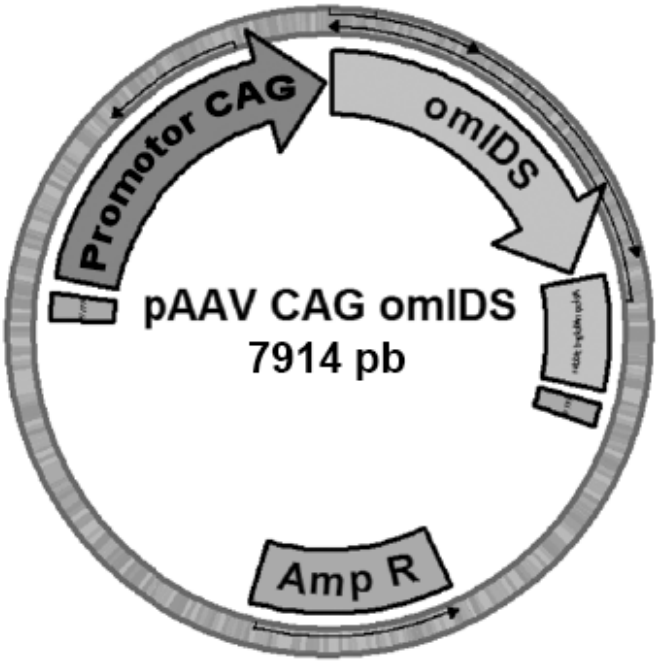


Figura 4

IDS murina optimizada

A



B

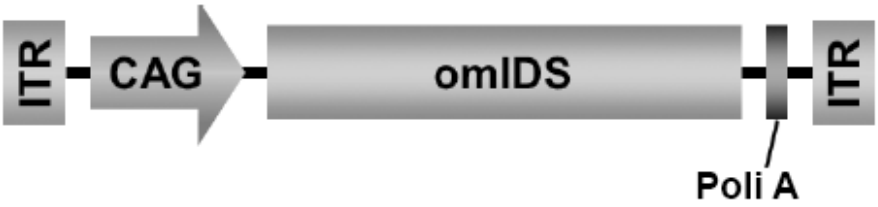


Figura 5

Inyección hidrodinámica de plásmidos pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 en ratones sanos

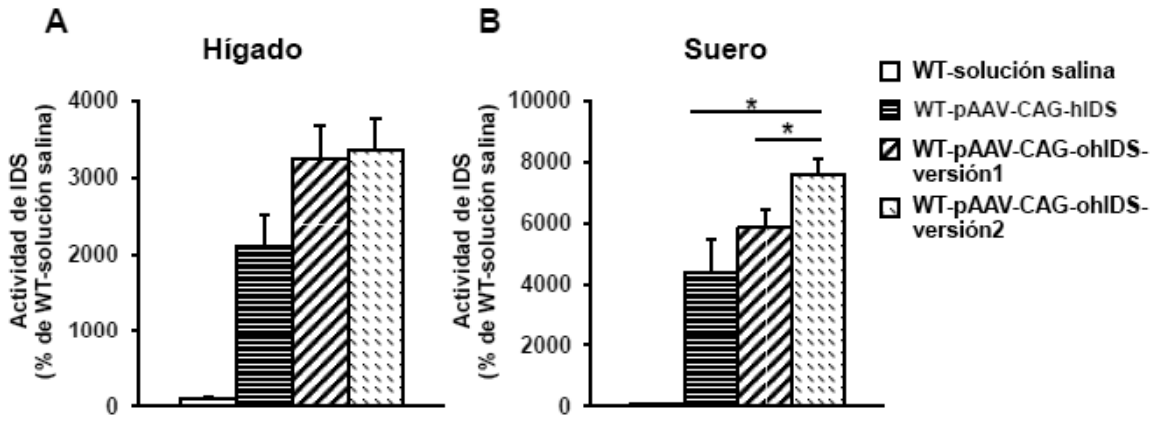


Figura 6

Inyección hidrodinámica de plásmidos pAAV-CAG-hIDS, pAAV-CAG-ohIDS-versión1 y pAAV-CAG-ohIDS-versión2 en ratones con MPSII

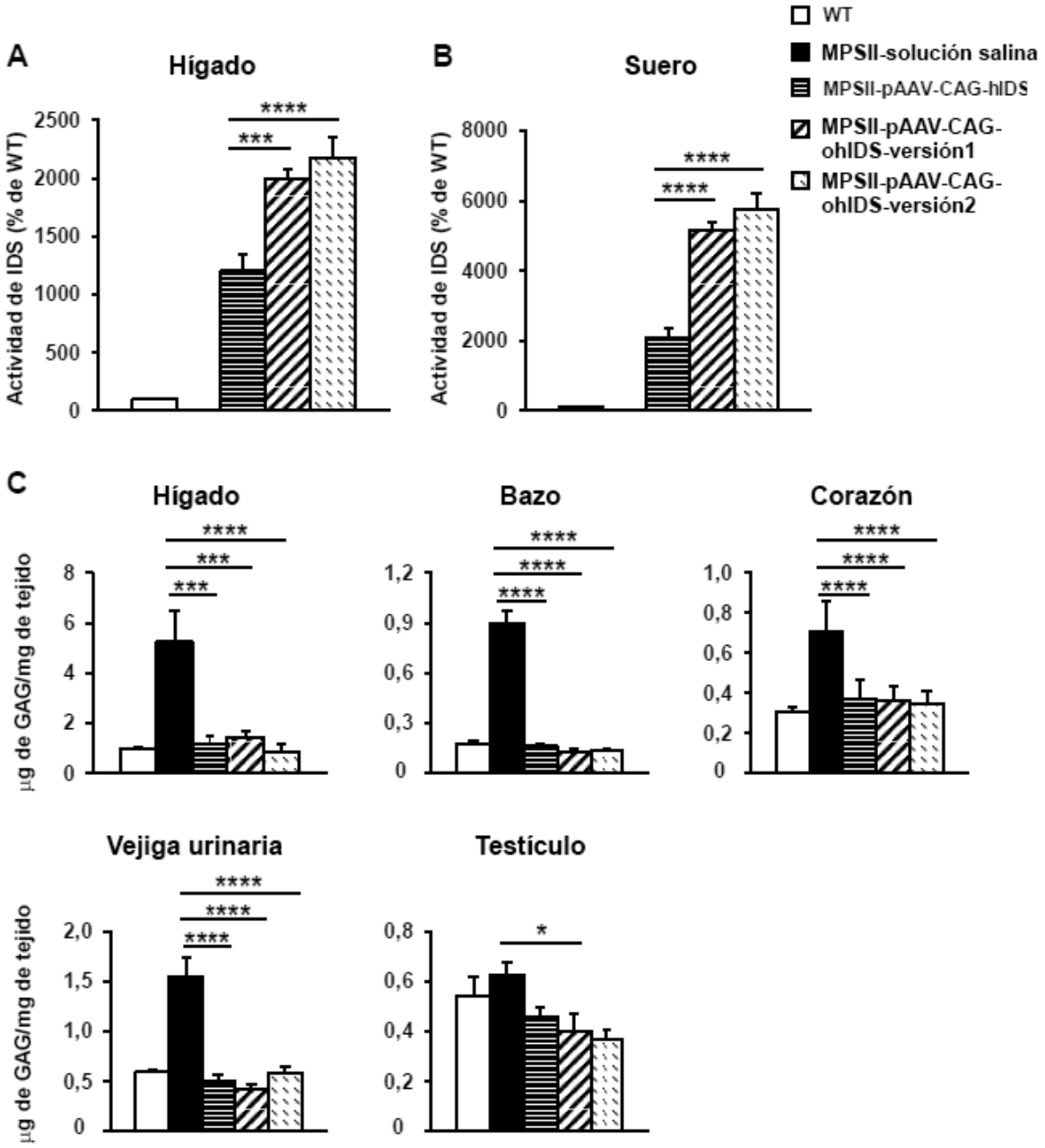


Figura 7

Inyección intravenosa de vectores AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2 en ratones con MPSII

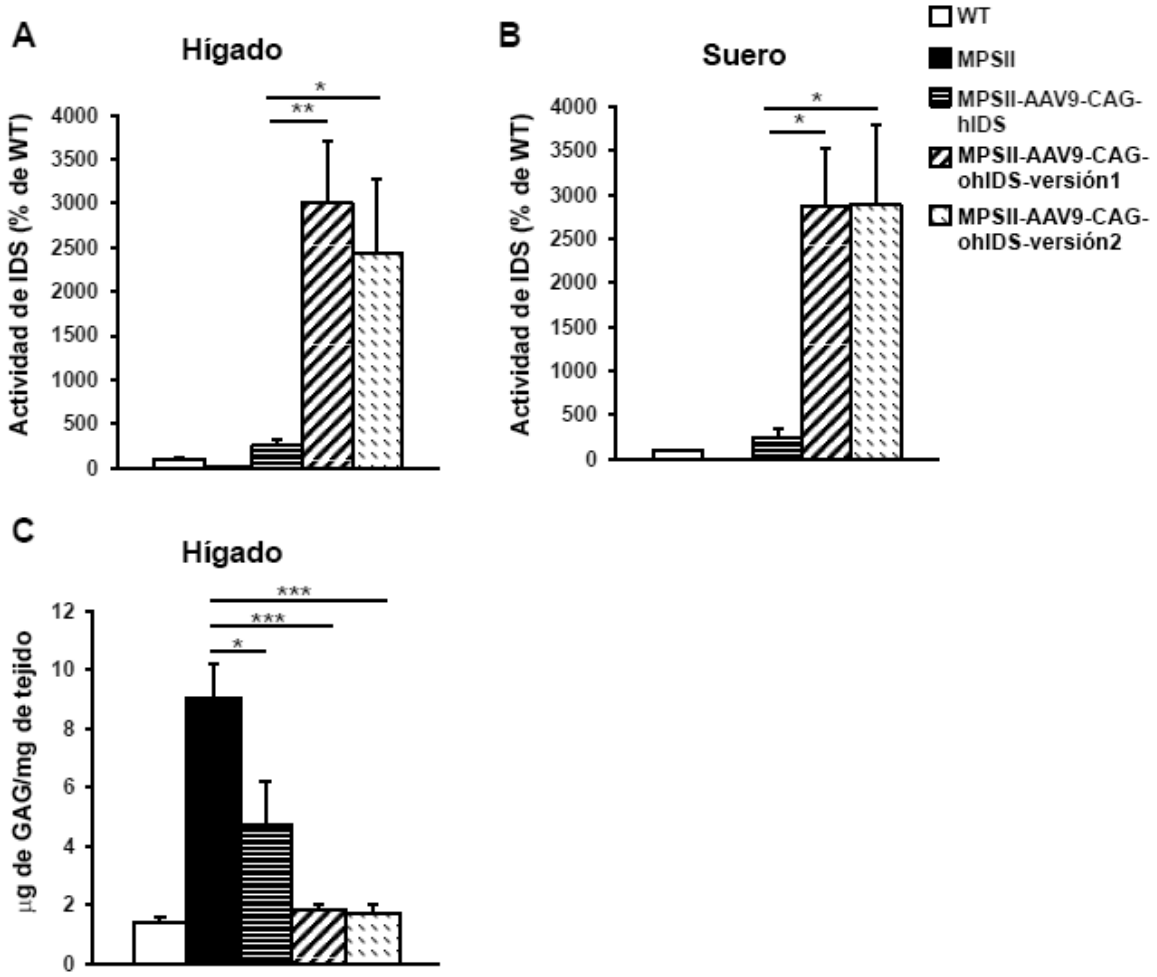


Figura 8

Inyección intra-LCR de AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2 en ratones con MPSII.

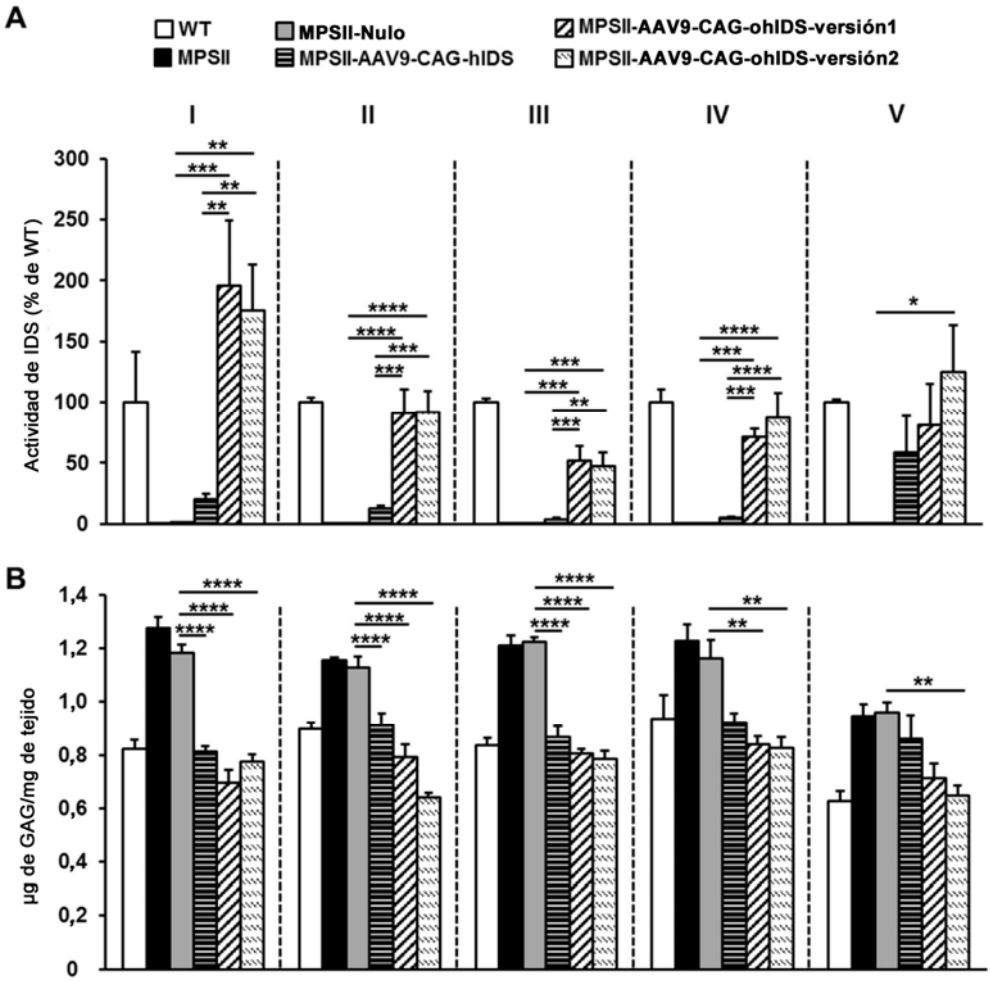


Figura 9

Inyección intra-LCR de AAV9-CAG-hIDS, AAV9-CAG-ohIDS-versión1 y AAV9-CAG-ohIDS-versión2 en ratones con MPSII.

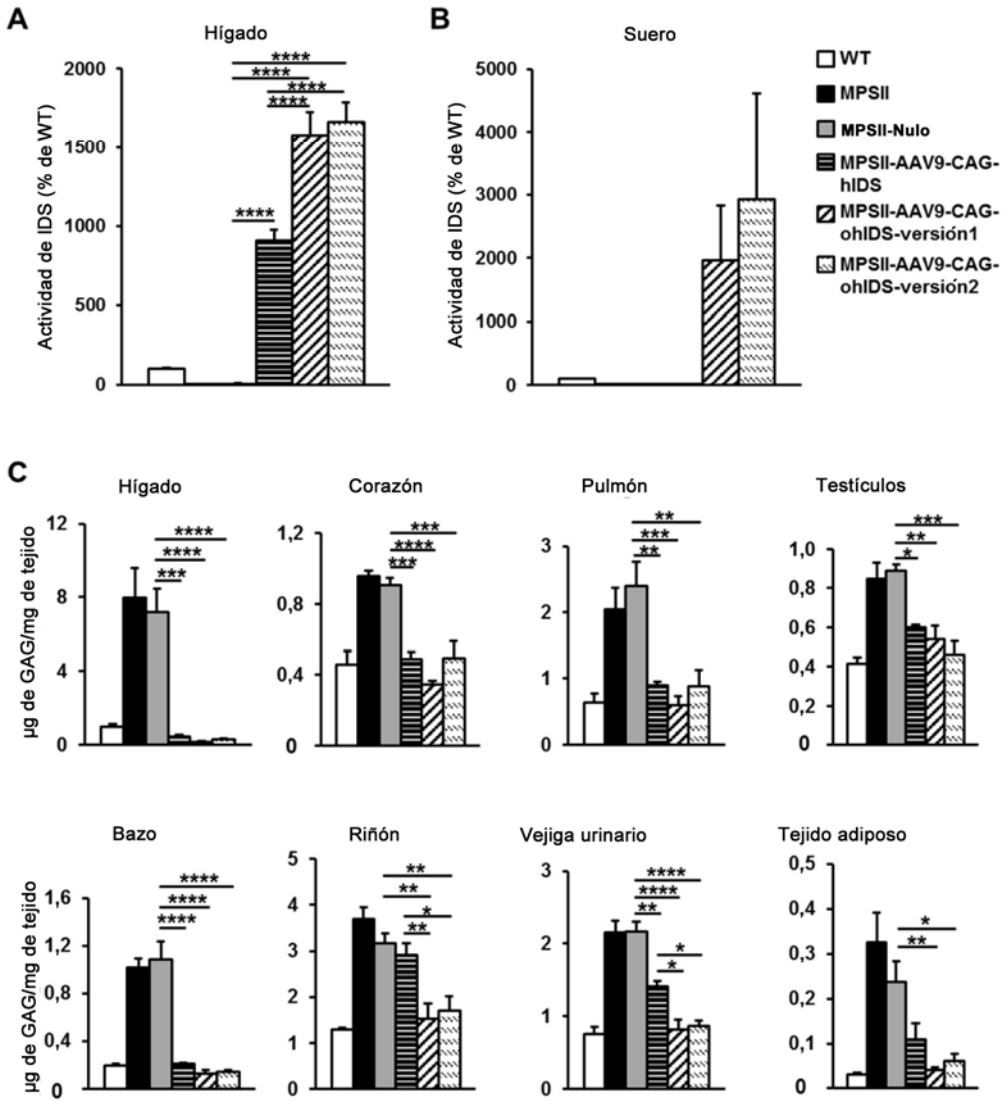


Figura 10

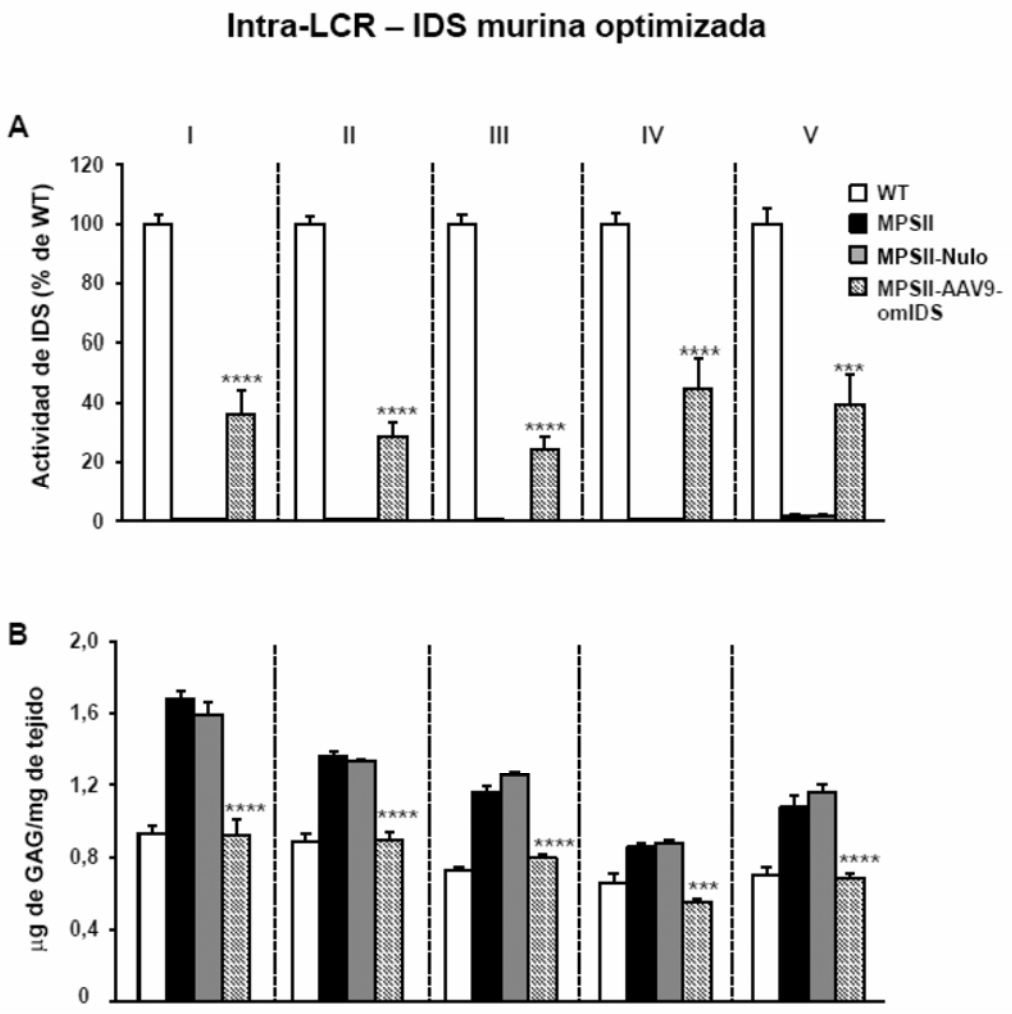

Intra-LCR – IDS murina optimizada
A
I
II
III
IV
V
Actividad de IDS (% de WT)
120
100
80
60
40
20
0
WT
MPSII
MPSII-Nulo
MPSII-AAV9-omIDS
****
***
B
µg de GAG/mg de tejido
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
0

Figura 11

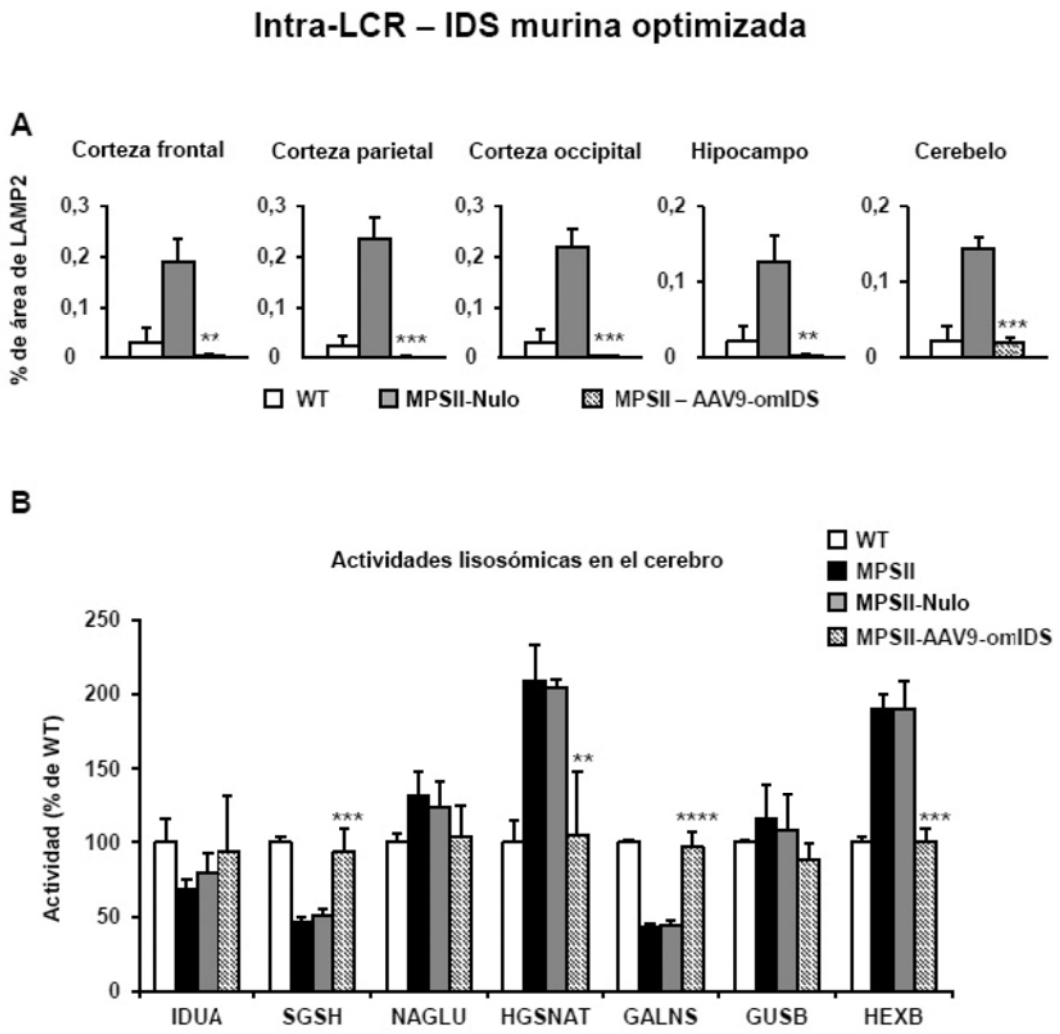

Intra-LCR – IDS murina optimizada
A
Corteza frontal
Corteza parietal
Corteza occipital
Hipocampo
Cerebelo
% de área de LAMP2
0,3
0,2
0,1
0
**
***
WT
MPSII-Nulo
MPSII – AAV9-omIDS
B
Actividades lisosómicas en el cerebro
WT
MPSII
MPSII-Nulo
MPSII-AAV9-omIDS
Actividad (% de WT)
250
200
150
100
50
0
IDUA
SGSH
NAGLU
HGSNAT
GALNS
GUSB
HEXB

Figura 12

Intra-LCR – IDS murina optimizada (largo plazo)

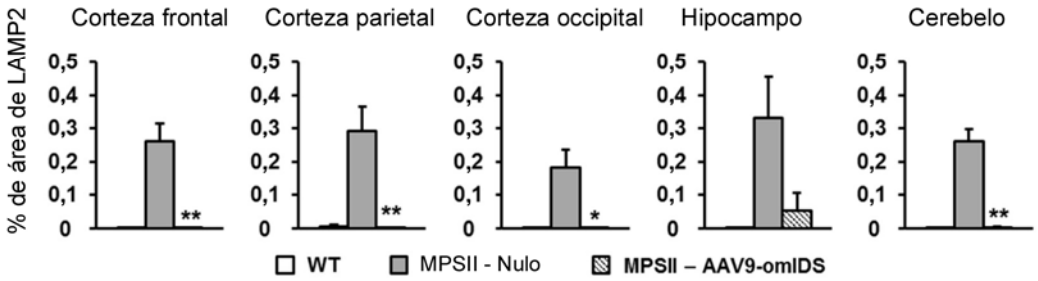


Figura 13

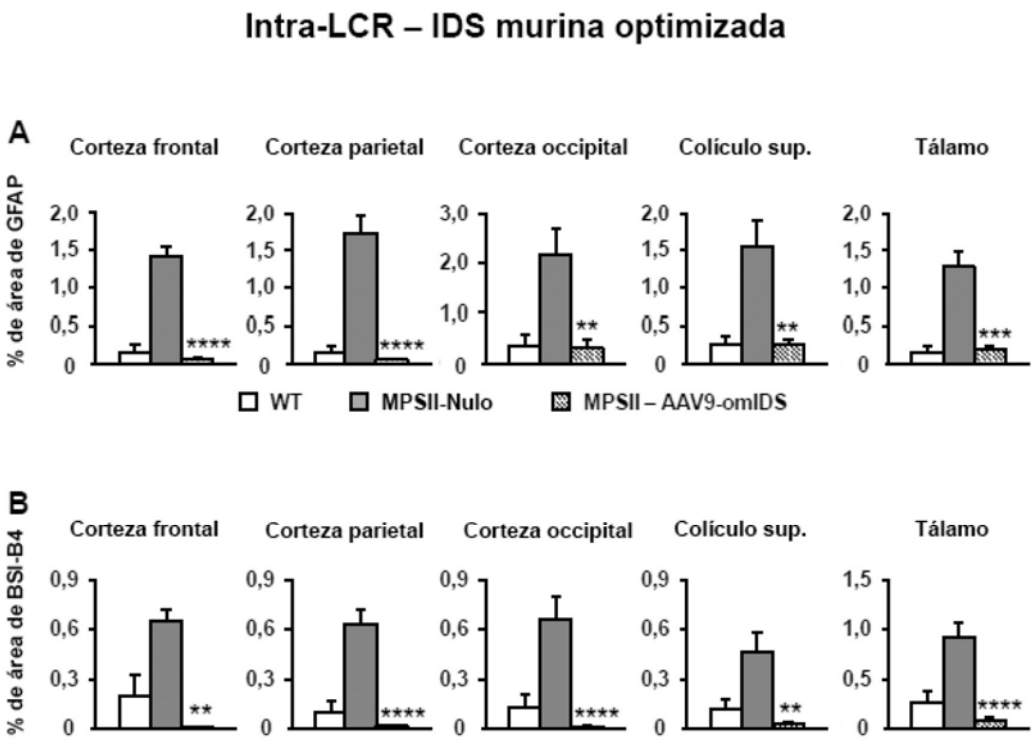

Intra-LCR – IDS murina optimizada
A
Corteza frontal
Corteza parietal
Corteza occipital
Colículo sup.
Tálamo
% de área de GFAP
2,0
1,5
1,0
0,5
0
3,0
****
**
***
WT
MPSII-Nulo
MPSII – AAV9-omIDS
B
% de área de BSI-B4
0,9
0,6
0,3
1,5

Figura 14

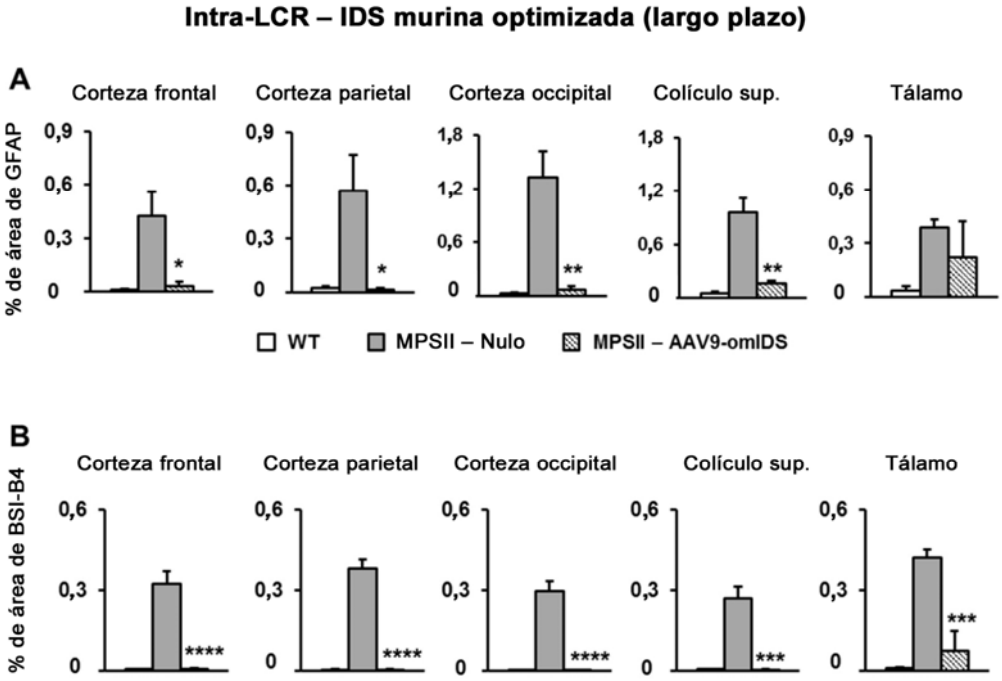

Intra-LCR – IDS murina optimizada (largo plazo)
A
Corteza frontal
Corteza parietal
Corteza occipital
Colículo sup.
Tálamo
% de área de GFAP
0,9
0,6
0,3
0
1,8
1,2
*
**
WT
MPSII – Nulo
MPSII – AAV9-omIDS
B
% de área de BSI-B4
****
***

Figura 15

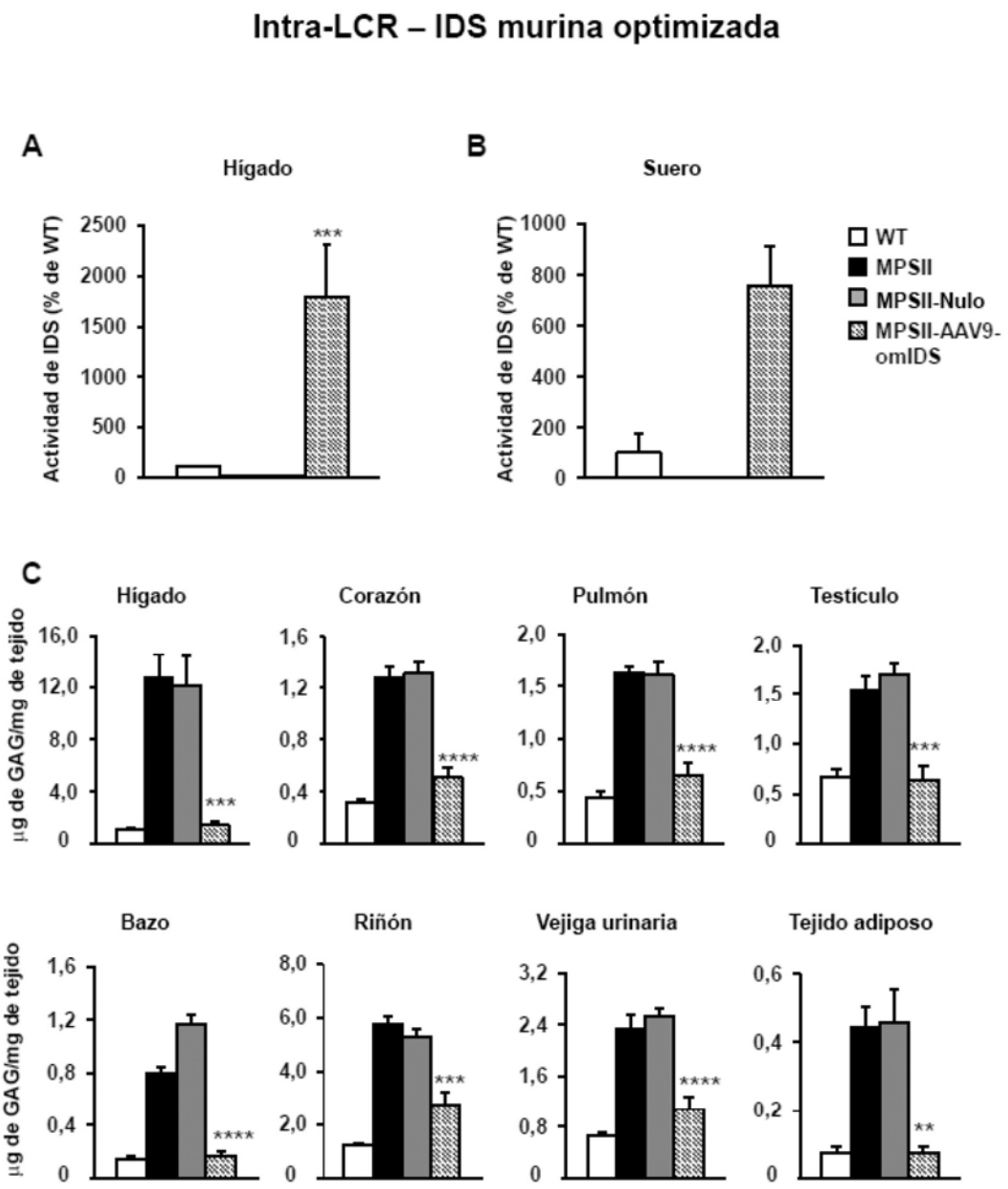
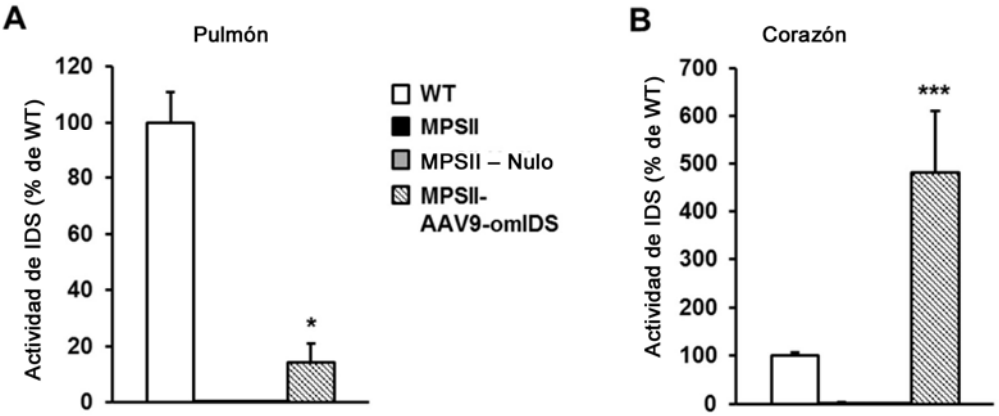

Intra-LCR – IDS murina optimizada
A
Hígado
Actividad de IDS (% de WT)
2500
2000
1500
1000
500
0
***
B
Suero
Actividad de IDS (% de WT)
1000
800
600
400
200
0
WT
MPSII
MPSII-Nulo
MPSII-AAV9-omIDS
C
Hígado
Corazón
Pulmón
Testículo
µg de GAG/mg de tejido
16,0
12,0
8,0
4,0
0
1,6
1,2
0,8
0,4
2,0
1,5
1,0
0,5
****
***
Bazo
Riñón
Vejiga urinaria
Tejido adiposo
8,0
6,0
4,0
2,0
3,2
2,4
1,6
0,8
0,6
0,4
0,2
**

Figura 16

Intra-LCR – IDS murina optimizada



C

	Número de copias de genoma de vector / genoma diploide (gv/gd)						
	MSPII no tratados	MSPII tratados con AAV9-Ids					
	1	1	2	3	4	5	Media ± EEM
Hígado	0,002	0,401	0,073	0,159	0,195	0,384	0,243 ± 0,064
Pulmón	0,002	0,004	0,003	0,004	0,003	0,005	0,004 ± 0,000
Corazón	0,002	0,007	0,007	0,006	0,007	0,005	0,006 ± 0,000

Figura 17

Intra-LCR – IDS murina optimizada

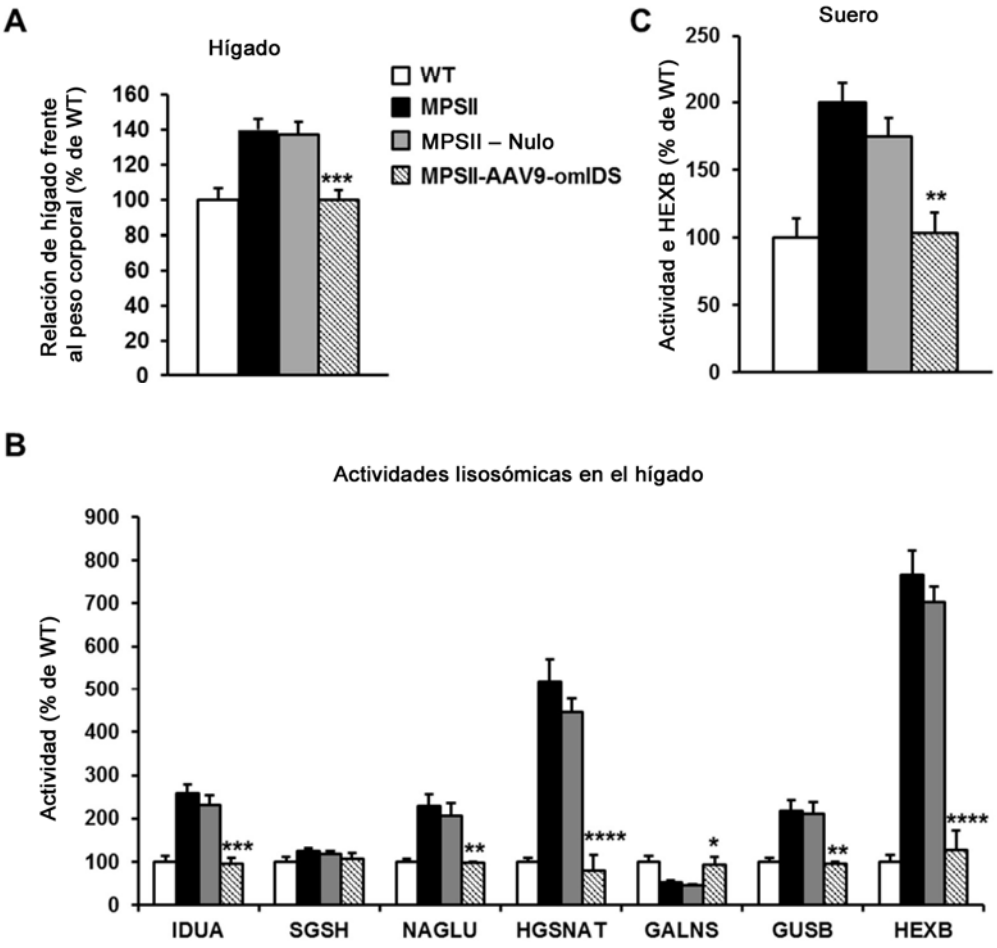


Figura 18

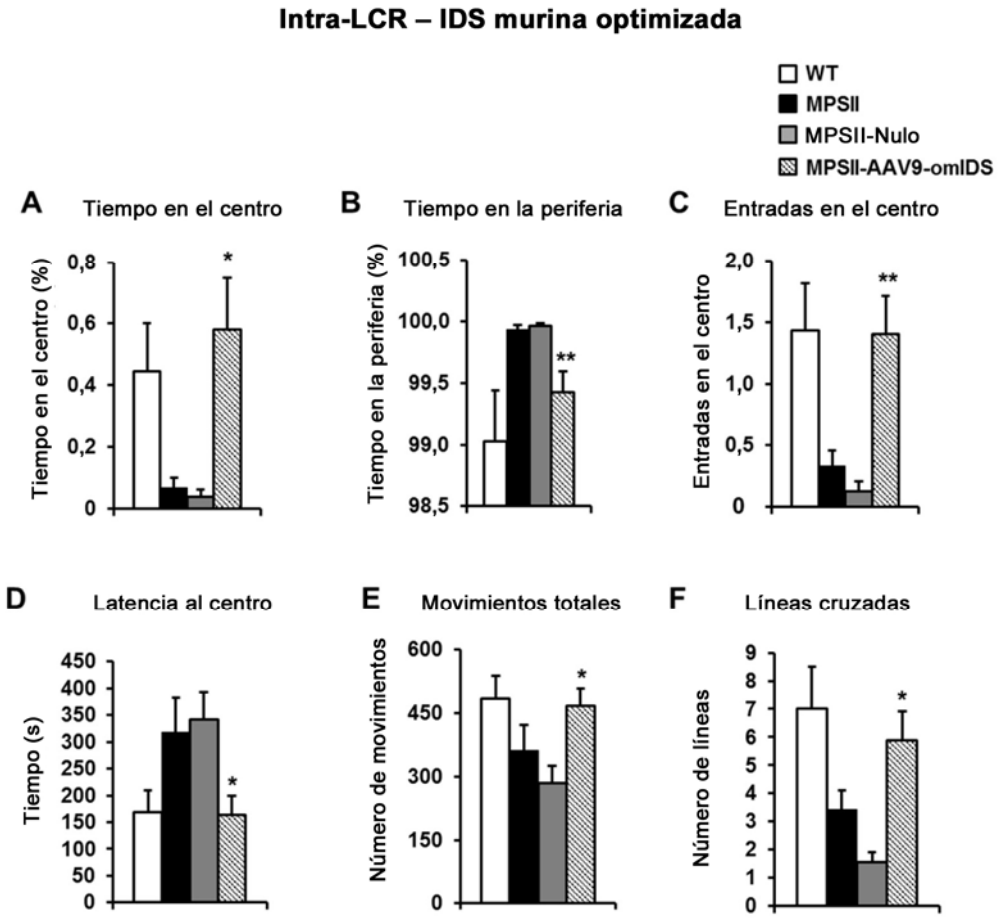

Intra-LCR – IDS murina optimizada
WT
MPSII
MPSII-Nulo
MPSII-AAV9-omIDS
A
Tiempo en el centro
Tiempo en el centro (%)
0,8
0,6
0,4
0,2
0
*
B
Tiempo en la periferia
Tiempo en la periferia (%)
100,5
100,0
99,5
99,0
98,5
**
C
Entradas en el centro
Entradas en el centro
2,0
1,5
1,0
0,5
0
**
D
Latencia al centro
Tiempo (s)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
*
E
Movimientos totales
Número de movimientos
600
450
300
150
0
*
F
Líneas cruzadas
Número de líneas
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*

Figura 19

Intra-LCR – IDS murina optimizada

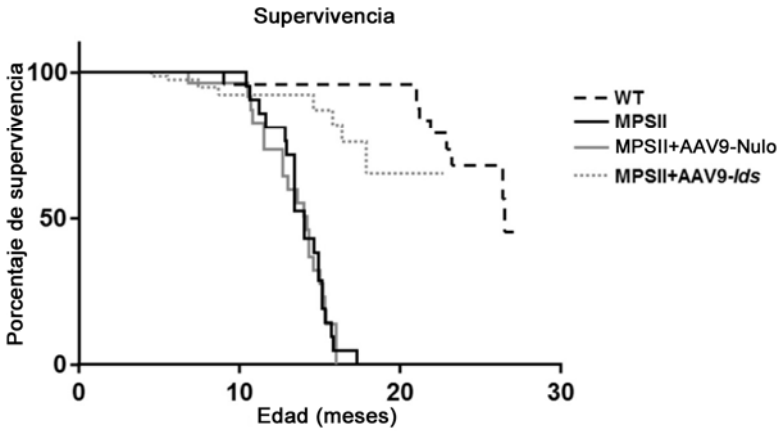


Figura 20

Intra-LCR – Respuesta a dosis de IDS murina optimizada

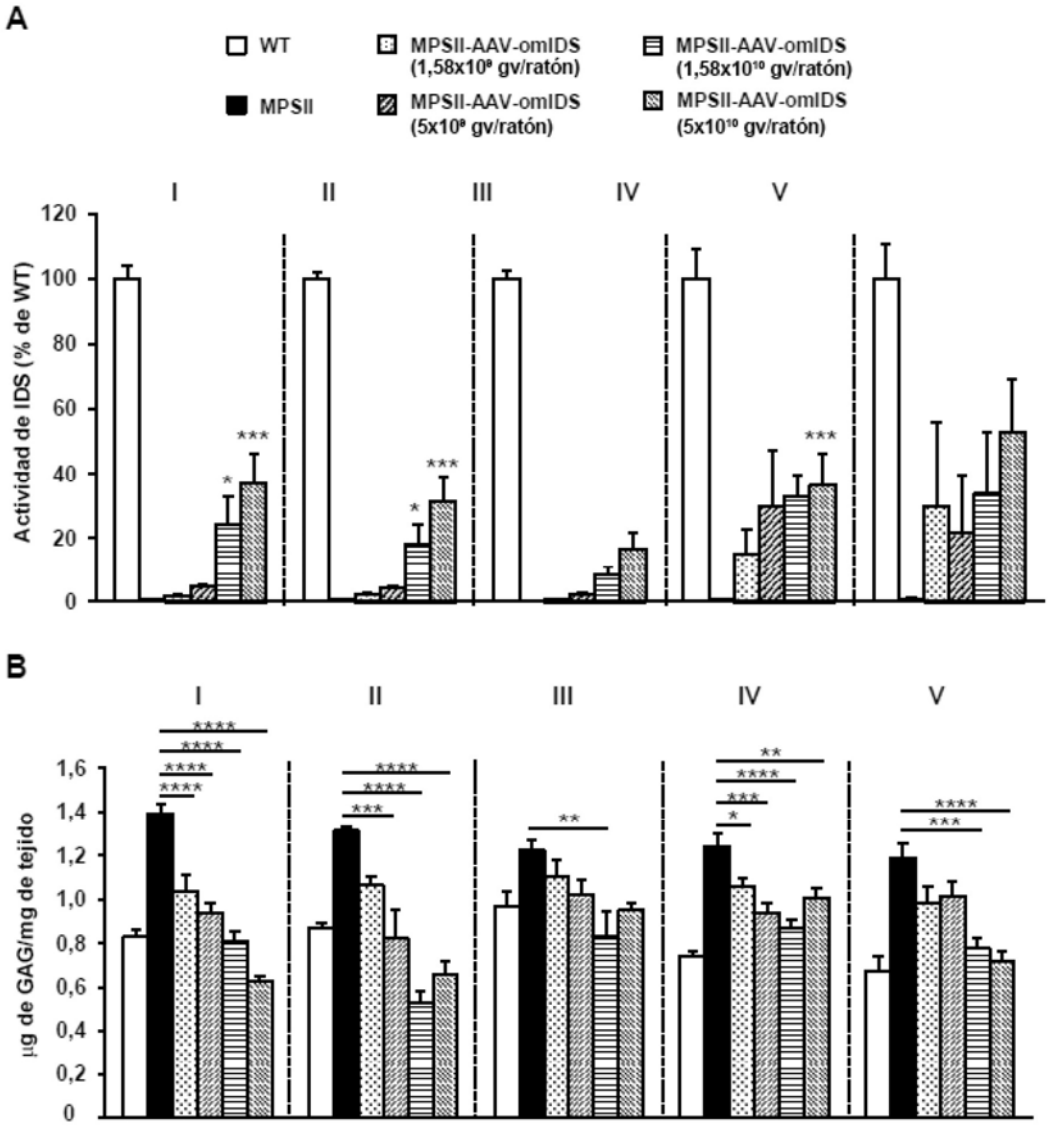
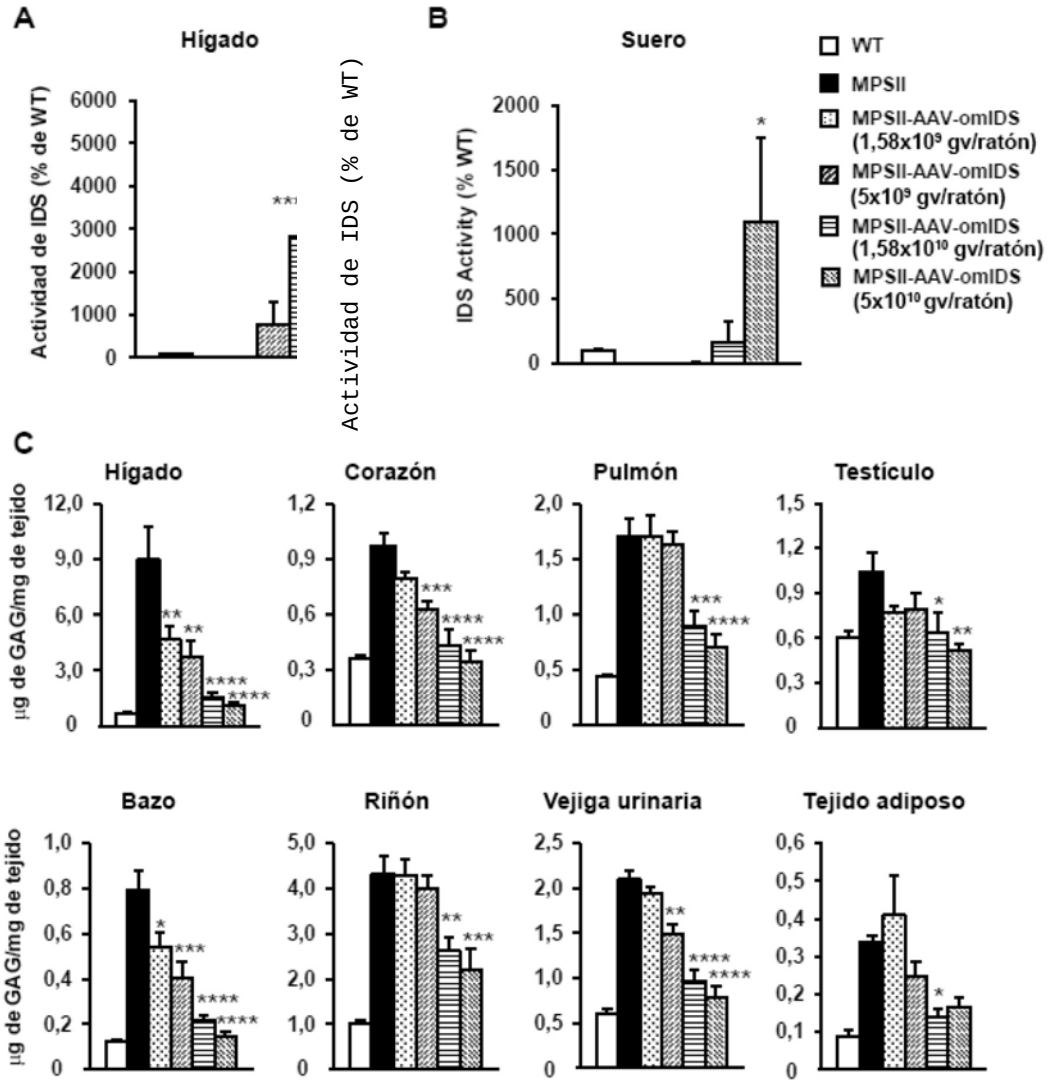


Figura 21

Intra-LCR – Respuesta a dosis de IDS murina optimizada