



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

(21) BR 112020020341-6 A2



(22) Data do Depósito: 03/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 05/01/2021

(54) Título: VETORES DE VÍRUS DIRECIONADOS A TECIDOS OFTÁLMICOS

(51) Int. Cl.: A61K 48/00; C12N 7/00; C12N 15/864.

(30) Prioridade Unionista: 03/04/2018 US 62/652,108.

(71) Depositante(es): STRIDEBIO, INC..

(72) Inventor(es): DANIEL MCCOY; GARRETT E. BERRY.

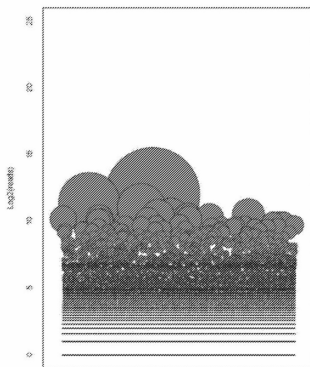
(86) Pedido PCT: PCT US2019025584 de 03/04/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/195423 de 10/10/2019

(85) Data da Fase Nacional: 02/10/2020

(57) Resumo: VETORES DE VÍRUS DIRECIONADOS A TECIDOS OFTÁLMICOS. A presente divulgação fornece proteínas do capsídeo de AAV que compreendem uma modificação na sequência de aminoácidos e vetores virais que compreendem a proteína do capsídeo de AAV modificada. A divulgação também fornece métodos de administração dos vetores virais e capsídeos dos vírus da divulgação a uma célula ou a um sujeito in vivo.

Pré-evolução



**VETORES DE VÍRUS DIRECIONADOS A TECIDOS OFTÁLMICOS**  
**REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS**

**[001]** Este pedido reivindica prioridade do Pedido de Patente Provisório US. nº 62/652.108, depositado em 3 de abril de 2018, que é incorporado neste documento por referência em sua totalidade para todos os fins.

**CAMPO DA DIVULGAÇÃO**

**[002]** A presente divulgação se refere a proteínas do capsídeo modificadas de vírus adenoassociados (AAV) e capsídeos de vírus e vetores de vírus compreendendo os mesmos. Em particular, a divulgação se refere a proteínas do capsídeo de AAV modificadas e capsídeos compreendendo as mesmas que podem ser incorporadas em vetores virais para conferir um perfil de transdução desejável em relação a tecidos alvo de interesse, tal como um tecido oftálmico.

**LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS**

**[003]** O presente pedido contém uma Listagem de Sequência que foi apresentada eletronicamente no formato ASCII e está incorporada por meio deste documento a título de referência em sua totalidade. A referida cópia ASCII, criada em 3 de abril de 2019, é denominada STRD-007\_01WO\_ST25.txt e tem 652 kb de tamanho.

**FUNDAMENTOS**

**[004]** Novas cepas de vírus adeno-associados (AAV) isoladas de tecidos animais e estoques adenovirais expandiram o painel de vetores AAV disponíveis para aplicações terapêuticas de transferência de genes. Esforços abrangentes para mapear os tropismos de tecido desses isolados de AAV em modelos de animais estão atualmente em andamento. A capacidade de direcionar o homing de vetores de AAV para órgãos seletivos é útil para terapia gênica e outras aplicações terapêuticas.

**[005]** A terapia gênica se mostra promissora no tratamento de doenças oftálmicas, e foi demonstrado que o AAV é capaz de transduzir vários tipos de células e camadas de células no olho. As composições e métodos fornecidos neste documento abordam uma necessidade na técnica de vetores de transmissão de ácido nucleico com características de direcionamento desejáveis, como direcionamento para regiões específicas do olho (por exemplo, o epitélio pigmentar da retina (RPE) ou retina).

## BREVE SUMÁRIO

**[006]** São fornecidas neste documento proteínas do capsídeo de AAV e vetores virais de AAV que visam especificamente e infectam um ou mais tecidos de interesse, como tecidos do olho (por exemplo, o RPE ou retina). Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece uma proteína do capsídeo de vírus adenoassociado (AAV) recombinante compreendendo uma ou mais substituições de aminoácidos, em que uma ou mais substituições de aminoácidos modificam uma ou mais alças expostas à superfície na proteína do capsídeo de AAV. Em algumas modalidades, a modificação de uma ou mais alças expostas à superfície resulta em um perfil de transdução aprimorado em relação a um tecido alvo. Nas modalidades, quando a proteína do capsídeo de AAV é incorporada em um vetor de AAV, a modificação de uma ou mais alças expostas à superfície resulta em transdução aprimorada para um tecido oftálmico. Em algumas modalidades, quando a proteína do capsídeo de AAV é incorporada em um vetor de AAV, a modificação de uma ou mais alças expostas à superfície resulta em transdução aprimorada para o epitélio pigmentar da retina (RPE) e/ou a retina em comparação com um capsídeo parental que não inclui a modificação.

**[007]** Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece uma proteína do capsídeo de AAV recombinante, em que a proteína do capsídeo compreende uma substituição em uma alça exposta à superfície da proteína do capsídeo de AAV, em que a substituição tem uma sequência de qualquer uma das SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193 e 194. Em algumas modalidades, o capsídeo de AAV recombinante compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de identidade de sequência com uma proteína do capsídeo de qualquer um de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV bovino e AAV aviário. Em algumas modalidades, a proteína do capsídeo de AAV recombinante compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma das SEQ ID NO: 11-12, 23-49 ou 195-254.

**[008]** Em algumas modalidades, a divulgação fornece uma proteína do capsídeo de AAV compreendendo uma substituição de aminoácido, em que a substituição

de aminoácido substitui os aminoácidos na região correspondente às posições de aminoácidos 591-596 da SEQ ID NO: 11 ou aminoácidos 590-595 da SEQ ID NO: 12.

**[009]** Em algumas modalidades, a divulgação fornece uma proteína do capsídeo de AAV recombinante caracterizada pelo fato de que a proteína do capsídeo compreende uma substituição compreendendo uma sequência de seis aminoácidos ( $X^1$ - $X^2$ - $X^3$ - $X^4$ - $X^5$ - $X^6$ ) que não ocorre na proteína nativa do capsídeo de AAV, em que  $X^2$  é V e  $X^5$  é L (SEQ ID NO: 186). Em algumas modalidades, a substituição é em uma alça exposta à superfície da proteína do capsídeo de AAV.

**[010]** Em algumas modalidades, a divulgação fornece uma proteína do capsídeo de AAV, em que a proteína do capsídeo compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 11-12, 23-49 ou 195-254. Em algumas modalidades, a divulgação fornece um vetor viral de AAV compreendendo uma proteína do capsídeo de AAV que compreende uma sequência de aminoácidos de pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de acordo com qualquer uma das SEQ ID NO: 11-12, 23-49 ou 195-254. Em algumas modalidades, o vetor viral de AAV visa e infecta especificamente o RPE e/ou a retina. Em algumas modalidades, o vetor viral de AAV demonstra aumento do direcionamento e infecção do RPE e/ou da retina em comparação com um vetor viral de AAV precursor ou do tipo selvagem.

**[011]** A presente divulgação também fornece uma sequência nucleotídica, ou um vetor de expressão compreendendo a mesma, que codifica uma ou mais das proteínas do capsídeo de AAV recombinante de acordo com a divulgação. A presente divulgação também fornece uma célula que compreende uma ou mais sequências nucleotídicas ou vetores de expressão de acordo com a divulgação.

**[012]** A presente divulgação também fornece um capsídeo de AAV que compreende uma proteína do capsídeo de AAV recombinante desta divulgação. É fornecido ainda um vetor viral que compreende um capsídeo de AAV desta divulgação, bem como uma composição que compreende uma proteína do capsídeo de AAV, capsídeo de AAV e/ou vetor viral de acordo com esta divulgação em um carreador farmacologicamente aceitável.

**[013]** A presente divulgação fornece adicionalmente um método de introdução de um ácido nucleico em uma célula, compreendendo o contato da célula com o vetor viral desta divulgação. A célula pode estar em um sujeito e, em algumas modalidades, o sujeito pode ser um sujeito humano.

**[014]** Em algumas modalidades, é fornecido um método de tratamento de um paciente em necessidade, tal método compreendendo a administração ao paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um vetor viral de AAV de acordo com a divulgação.

**[015]** Esses e outros aspectos são tratados com mais detalhes na descrição detalhada a seguir.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

**[016] FIG. 1A e FIG. 1B.** Gráficos de bolhas mostrando a análise da diversidade da biblioteca, a evolução direcionada e o enriquecimento de novas pegadas antigênicas. Bibliotecas precursoras (FIG. 1A) e evoluídas (FIG. 1B) foram submetidas a sequenciamento de alto rendimento usando a plataforma Illumina MiSeq. Após a análise com um script de Perl personalizado, sequências de aminoácidos enriquecidas foram plotadas. Cada bolha representa uma sequência de aminoácidos do capsídeo distinta com o raio da bolha proporcional ao número de leituras para a variante na respectiva biblioteca. O eixo y representa o número absoluto de leituras, transformado na base logarítmica 2. Os dados são distribuídos ao longo do eixo x para facilitar a visualização. A redução percentual em clones únicos (70,3%) demonstra diretamente que várias sequências "não ajustadas" foram removidas após uma primeira rodada de evolução.

**[017] Fig. 2A e Fig. 2B.** Gráficos de bolhas mostrando bibliotecas precursoras (Fig. 2A) e evoluídas (Fig. 2B) para uma primeira rodada de evolução. A Fig. 2A e a Fig. 2B mostram os mesmos dados da Fig. 1A e da Fig. 1B, respectivamente, mas os dados foram normalizados para o percentual total de leituras, permitindo a comparação longitudinal em rodadas subsequentes de evolução.

**[018] Fig. 3A e Fig. 3B.** Gráficos de bolhas mostrando bibliotecas precursoras (Fig. 3A) e evoluídas (Fig. 3B) para uma terceira rodada de evolução realizada na retina, normalizada para leituras totais percentuais.

**[019] Fig. 4A e Fig. 4B.** Gráficos de bolhas mostrando bibliotecas precursoras

(Fig. 3A) e evoluídas (Fig. 3B) para uma terceira rodada de evolução realizada no RPE, normalizado para leituras totais percentuais.

**[020] Fig. 5.** Gráfico que mostra a transdução de vários vetores de AAV-luciferase compreendendo proteínas do capsídeo mutante (STRD-1, SEQ ID NO: 34; STRD-2, SEQ ID NO: 32; STRD-3, SEQ ID NO: 36; STRD-4, SEQ ID NO: 195; STRD-5, SEQ ID NO: 35; STRD-6, SEQ ID NO: 196; STRD-7, SEQ ID NO: 37; e STRD-8, SEQ ID NO: 40) em células U87 em cultura. As células foram infectadas a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10.000 vg/célula. As unidades de luz relativa (RLUs) foram medidas 48 horas após a transdução.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA**

**[021]** Salvo definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente entendido por uma pessoa versada na técnica à qual esta divulgação pertence. A terminologia usada na descrição detalhada neste documento tem a finalidade de descrever modalidades em particular somente e não se destina a ser limitante.

**[022]** Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes, GenBank ou outros números de acesso e outras referências mencionadas neste documento são incorporadas neste documento por referência em sua totalidade.

**[023]** A designação de todas as posições de aminoácidos nas proteínas do capsídeo de AAV na divulgação e nas reivindicações anexas é em relação à numeração da subunidade do capsídeo VP1. Será entendido por aqueles versados na técnica que as modificações descritas neste documento, se inseridas no gene de cap de AAV, podem resultar em modificações nas subunidades de capsídeo VP1, VP2 e/ou VP3. Alternativamente, as subunidades de capsídeo podem ser expressas de forma independente para alcançar a modificação em apenas uma ou duas das subunidades de capsídeo (VP1, VP2, VP3, VP1 + VP2, VP1 + VP3 ou VP2 + VP3).

### **Definições**

**[024]** Os seguintes termos são usados na descrição neste documento e nas reivindicações anexas:

**[025]** As formas singulares “um”, “uma” e “o/a” estão destinadas a incluir também as formas plurais, a menos que o contexto indique claramente de outra forma.

**[026]** Além disso, o termo "cerca de", conforme usado neste documento, quando se refere a um valor mensurável, tal como uma quantidade do comprimento de um polinucleotídeo ou sequência polipeptídica, dose, tempo, temperatura e semelhantes, destina-se a abranger variações de  $\pm 20\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$ ,  $\pm 0,5\%$ , ou mesmo  $\pm 0,1\%$  da quantidade especificada.

**[027]** Também conforme usado neste documento, "e/ou" refere-se a e abrange todas e quaisquer combinações possíveis de um ou mais dos itens listados associados, bem como a falta de combinações quando interpretado na alternativa ("ou").

**[028]** A menos que o contexto indique o contrário, pretende-se especificamente que os vários recursos descritos neste documento possam ser usados em qualquer combinação.

**[029]** Além disso, a presente divulgação também contempla que, em algumas modalidades, qualquer recurso ou combinação de recursos estabelecidos neste documento podem ser excluídos ou omitidos. Para ilustrar ainda mais, se, por exemplo, a especificação indica que um determinado aminoácido pode ser selecionado dentre A, G, I, L e/ou V, esta linguagem também indica que o aminoácido pode ser selecionado dentre qualquer subconjunto deste(s) aminoácido(s), por exemplo, A, G, I ou L; A, G, I ou V; A ou G; apenas L; etc., como se cada uma dessas subcombinações fosse expressamente estabelecida neste documento. Além disso, essa linguagem também indica que um ou mais dos aminoácidos especificados podem ser rejeitados. por exemplo, em modalidades particulares, o aminoácido não é A, G ou I; não é A; não é G ou V; etc., como se cada uma dessas possíveis declarações fosse expressamente definida neste documento.

**[030]** Conforme usado neste documento, os termos "reduzir", "reduz", "redução" e termos semelhantes significam uma diminuição de pelo menos cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 35%, cerca de 50%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97% ou mais.

**[031]** Conforme usado neste documento, os termos "aumentar", "aprimorar", "potencializar", "potencializa", "potencialização" e termos semelhantes indicam um aumento de pelo menos cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%,

cerca de 50%, cerca de 75%, cerca de 100%, cerca de 150%, cerca de 200%, cerca de 300%, cerca de 400%, cerca de 500% ou mais.

**[032]** O termo "parvovírus", conforme usado neste documento, abrange a família Parvoviridae, incluindo parvovírus e dependovírus de replicação autônoma. Os parvovírus autônomos incluem membros dos gêneros *Protoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Bocaparvovirus* e da subfamília *Densovirus*. Parvovírus autônomos exemplificativos incluem, mas não estão limitados a, vírus miúdo do camundongo, parvovírus bovino, parvovírus canino, parvovírus de galinha, vírus da panleucopenia felina, parvovírus felino, parvovírus de ganso, parvovírus H1, parvovírus de pato moscovita, vírus B19 e qualquer outro parvovírus autônomo conhecido atualmente ou descoberto posteriormente. Outros parvovírus autônomos são conhecidos dos versados na técnica. Ver, por exemplo, BERNARD N. FIELDS et al, VIROLOGY, volume 2, capítulo 69 (4ª ed., Lippincott-Raven Publishers; Cotmore et al. Archives of Virology DOI 10.1007/S00705-013-1914-1).

**[033]** Conforme usado neste documento, o termo "vírus adeno-associado" (AAV) inclui, mas não está limitado a, AAV tipo 1, AAV tipo 2, AAV tipo 3 (incluindo os tipos 3A e 3B), AAV tipo 4, AAV tipo 5, AAV tipo 6, AAV tipo 7, AAV tipo 8, AAV tipo 9, AAV tipo 10, AAV tipo 11, AAV tipo 12, AAV tipo 13, AAV tipo rh32.33, AAV tipo rh8, AAV tipo rh10, AAV tipo rh74, AAV tipo hu.68, AAV aviário, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino, AAV de cobra, AAV de pógona, AAV2i8, AAV2g9, AAV-LK03, AAV7m8, AAV Anc80, AAV PHP.B e qualquer outro AAV agora conhecido ou descoberto posteriormente. Ver, por exemplo, BERNARD N. FIELDS et al, VIROLOGY, volume 2, capítulo 69 (4ª ed., Lippincott-Raven Publishers). Vários sorotipos e clados de AAV foram identificados (ver, por exemplo, Gao et al, (2004) J. Virology 78:6381-6388; Moris et al, (2004) Virology 33-:375-383; e Tabela 2).

**[034]** Conforme usado neste documento, o termo "AAV quimérico" refere-se a um AAV compreendendo uma proteína de capsídeo com regiões, domínios, aminoácidos individuais que são derivados de dois ou mais sorotipos diferentes de AAV. Em algumas modalidades, um AAV quimérico compreende uma proteína de capsídeo composta por uma primeira região que é derivada de um primeiro sorotipo de AAV e uma segunda região que é derivada de um segundo sorotipo de AAV.



Em algumas modalidades, um AAV quimérico compreende uma proteína de capsídeo composta por uma primeira região que é derivada de um primeiro sorotipo de AAV, uma segunda região que é derivada de um segundo sorotipo de AAV e uma terceira região que é derivada de um terceiro sorotipo de AAV. Em algumas modalidades, o AAV quimérico pode compreender regiões, domínios, aminoácidos individuais derivados de dois ou mais de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 e/ou AAV12. por exemplo, o AAV quimérico pode incluir regiões, domínios e/ou aminoácidos individuais de um primeiro e um segundo sorotipos de AAV, conforme mostrado abaixo (Tabela 1), em que AAVX+Y indica um AAV quimérico que inclui sequências derivadas de AAVX e AAVY.

**TABELA 1: AAVs Quiméricos**

		Segundo Sorotipo de AAV												
Primeiro Sorotipo de AAV		AAV1	AAV2	AAV3	AAV4	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV9	AAV10	AAV11	AAV12	
	<b>AAV1</b>	X	AAV 1+2	AAV1+3	AAV 1+4	AAV 1+5	AAV1+6	AAV1+7	AAV1+8	AAV1+9	0	AAV1+1	AAV1+1	AAV1+1
	<b>AAV2</b>	AAV2+1	X	AAV2+3	AAV2+4	AAV2+5	AAV2+6	AAV2+7	AAV2+8	AAV2+9	0	AAV2+1	AAV2+1	AAV2+1
	<b>AAV3</b>	AAV3+1	AAV3+2	X	AAV3+4	AAV3+5	AAV3+6	AAV3+7	AAV3+8	AAV3+9	0	AAV3+1	AAV3+1	AAV3+1
	<b>AAV4</b>	AAV4+1	AAV4+2	AAV4+3	X	AAV4+5	AAV4+6	AAV4+7	AAV4+8	AAV4+9	0	AAV4+1	AAV4+1	AAV4+1
	<b>AAV5</b>	AAV5+1	AAV5+2	AAV5+3	AAV5+4	X	AAV5+6	AAV5+7	AAV5+8	AAV5+9	0	AAV5+1	AAV5+1	AAV5+1
	<b>AAV6</b>	AAV6+1	AAV6+2	AAV6+3	AAV6+4	AAV6+5	X	AAV6+7	AAV6+8	AAV6+9	0	AAV6+1	AAV6+1	AAV6+1
	<b>AAV7</b>	AAV7+1	AAV7+2	AAV7+3	AAV7+4	AAV7+5	AAV7+6	X	AAV7+8	AAV7+9	0	AAV7+1	AAV7+1	AAV7+1
	<b>AAV8</b>	AAV8+1	AAV8+2	AAV8+3	AAV8+4	AAV8+5	AAV8+6	AAV8+7	X	AAV8+9	0	AAV8+1	AAV8+1	AAV8+1
	<b>AAV9</b>	AAV9+1	AAV9+2	AAV9+3	AAV9+4	AAV9+5	AAV9+6	AAV9+7	AAV9+8	X	AAV9+1	AAV9+1	AAV9+1	

				4						0	1	2
<b>AAV10</b>	AAV10+	AAV10+	AAV10+	AAV	AAV10+	AAV	AAV10+	AAV10+	AAV10+		AAV10+	AAV10+
	1	2	3	10+4	5	10+6	7	8	9	X	11	12
<b>AAV11</b>	AAV11+	AAV11+	AAV11+	AAV11+	AAV11+	AAV11+	AAV11+	AAV11+	AAV11+	AAV11+		AAV11+
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	12
<b>AAV12</b>	AAV12+	AAV12+	AAV12+	AAV12+	AAV12+	AAV12+	AAV12+	AAV12+	AAV12+	AAV12+	AAV12+	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	X

**[035]** Ao incluir aminoácidos individuais ou regiões de múltiplos sorotipos de AAV em uma proteína de capsídeo, podem ser obtidas proteínas de capsídeo que possuem múltiplas propriedades desejadas que são derivadas separadamente dos múltiplos sorotipos de AAV.

**[036]** As sequências genômicas de vários sorotipos de AAV e dos parvovírus autônomos, bem como as sequências das repetições terminais (TRs) nativas, proteínas Rep e subunidades de capsídeo são conhecidas na técnica. Essas sequências podem ser encontradas na literatura ou em bancos de dados públicos, como o GenBank. Ver, por exemplo, os Números de Acesso do GenBank NC\_002077, NC\_001401, NC\_001729, NC\_001863, NC\_001829, NC\_001862, NC\_000883, NC\_001701, NC\_001510, NC\_006152, NC\_006261, AF063497, U89790, AF043303, AF028705, AF028704, J02275, J01901, J02275, X01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, NC\_001358, NC\_001540, AF513851, AF513852, AY530579; cujas divulgações são incorporadas neste documento por referência para o ensino de sequências de ácidos nucleicos e aminoácidos de parvovírus e de AAV. Ver também, por exemplo, Srivistava et al., (1983) J. Virology 45: 555; Chiorini et al, (1998) J Virology 71: 6823; Chiorini et al., (1999) J. Virology 73: 1309; Bantel-Schaal et al., (1999) J Virology 73: 939; Xiao et al, (1999) J Virology 73: 3994; Muramatsu et al., (1996) Virology 221: 208; Shade et al, (1986) J. Virol. 58: 921; Gao et al, (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99: 11854; Moris et al, (2004) Virology 33:375-383; publicações de patentes internacionais WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; e Patente US Nº 6.156.303; cujas divulgações são incorporadas neste documento por referência para o ensino de sequências de ácidos nucleicos e aminoácidos de parvovírus e de AAV. Ver também a Tabela 2. As estruturas do capsídeo de parvovírus autônomos e AAV são descritas em mais detalhes em BERNARD N. FIELDS et al., VIROLOGY, volume 2, capítulos 69 e 70 (4ª ed., Lippincott-Raven Publishers). Ver também, description of the crystal structure of AAV2 (Xie et al., (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. 99: 10405-10), AAV9 (DiMattia et al., (2012) J. Virol. 86:6947-6958), AAV8 (Nam et al, (2007) J. Virol. 81: 12260-12271), AAV6 (Ng et al., (2010) J. Virol. 84: 12945-12957), AAV5 (Govindasamy et al. (2013) J. Virol. 87, 11187-11199), AAV4 (Govindasamy et al. (2006) J. Virol. 80:11556-11570), AAV3B (Lerch et al., (2010)

Virology 403:26-36), BPV (Kailasan et al., (2015) J. Virol. 89: 2603-2614) e CPV (Xie et al, (1996) J. Mol. Biol. 6:497-520 e Tsao et al, (1991) Science 251:1456-64).

**TABELA 2**

	<b>Número de acesso do GenBank</b>		<b>Número de acesso do GenBank</b>		<b>Número de acesso do GenBank</b>
<b>Genomas Completos</b>		Clado C		Rh57	<b>AY530569</b>
Vírus adeno-associado 1	NC 002077, AF063497	Hu9	AY530629	Rh50	AY530563
Vírus adeno-associado 2	NC_001401	Hu10	AY530576	Rh49	AY530562
Vírus adeno-associado 3	NC_001729	Hu11	AY530577	Hu39	AY530601
Vírus adeno-associado 3B	NC_001863	Hu53	AY530615	Rh58	AY530570
Vírus adeno-associado 4	NC_001829	Hu55	AY530617	Rh61	AY530572
Vírus adeno-associado 5	Y18065, AF085716	Hu54	AY530616	Rh52	AY530565
Vírus adeno-associado 6	NC_001862	Hu7	AY530628	Rh53	AY530566
AAV Aviário ATCC VR-865	AY186198, AY629583, NC_004828	Hu18	AY530583	Rh51	AY530564
AAV aviário cepa DA-1	NC 006263, AY629583	Hu15	AY530580	Rh64	AY530574
AAV Bovino	NC 005889, AY388617, AAR26465	Hu16	AY530581	Rh43	AY530560
AAV11	AAT46339, AY631966	Hu25	AY530591	AAV8	AF513852

AAV12	ABI16639, DQ813647	Hu60	AY530622	Rh8	AY242997
Clado A		Ch5	AY243021	Rh1	AY530556
AAV1	NC 002077, AF063497	Hu3	AY530595	Clado F	
AAV6	NC_001862	Hu1	AY530575	Hu14 (AAV9)	AY530579
Hu.48	AY530611	Hu4	AY530602	Hu31	AY530596
Hu 43	AY530606	Hu2	AY530585	Hu32	AY530597'
Hu 44	AY530607	Hu61	AY530623	HSC1	MI332400.1
Hu 46	AY530609	Clado D		HSC2	MI332401.1
Clado B		Rh62	AY530573	HSC3	MI332402.1
Hu. 19	AY530584	Rh48	AY530561	HSC4	MI332403.1
Hu. 20	AY530586	Rh54	AY530567	HSC5	MI332405.1
Hu 23	AY530589	Rh55	AY530568	HSC6	MI332404.1
Hu22	AY530588	Cy2	AY243020	HSC7	MI332407.1
Hu24	AY530590	AAV7	AF513851	HSC8	MI332408.1
Hu21	AY530587	Rh35	AY243000	HSC9	MI332409.1
Hu27	AY530592	Rh37	AY242998	HSC11	MI332406.1
Hu28	AY530593	Rh36	AY242999	HSC12	MI332410.1
Hu 29	AY530594	Cy6	AY243016	HSC13	MI332411.1
Hu63	AY530624	Cy4	AY243018	HSC14	MI332412.1
Hu64	AY530625	Cy3	AY243019	HSC15	MI332413.1
Hu13	AY530578	Cy5	AY243017	HSC16	MI332414.1
Hu56	AY530618	Rh13	AY243013	HSC17	MI332415.1
Hu57	AY530619	Clado E		Hu68	
Hu49	AY530612	Rh38	AY530558	Isolado de Clone	
Hu58	AY530620	Hu66	AY530626	AAV5	Y18065, AF085716
Hu34	AY530598	Hu42	AY530605	AAV 3	NC_001729

Hu35	AY530599	Hu67	AY530627	AAV3B	NC 001863
AAV2	NC_001401	Hu40	AY530603	AAV4	NC_001829
Hu45	AY530608	Hu41	AY530604	Rh34	AY243001
Hu47	AY530610	Hu37	AY530600	Rh33	AY243002
Hu51	AY530613	Rh40	AY530559	Rh32	AY243003
Hu52	AY530614	Rh2	AY243007	Outros	
Hu T41	AY695378	Bb1	AY243023	Rh74	
Hu S17	AY695376	Bb2	AY243022	AAV de pogona	
Hu T88	AY695375	Rh10	AY243015	AAV de cobra	NC_006148.1
Hu T71	AY695374	Hu17	AY530582		
Hu T70	AY695373	Hu6	AY530621		
Hu T40	AY695372	Rh25	AY530557		
Hu T32	AY695371	Pi2	AY530554		
Hu T17	AY695370	Pi1	AY530553		
Hu LG15	AY695377	Pi3	AY530555		

**[037]** O termo "tropismo", conforme usado neste documento, refere-se à entrada preferencial do vírus em certas células ou tecidos, opcionalmente seguida pela expressão (por exemplo, transcrição e, opcionalmente, tradução) de uma ou mais sequências carregadas pelo genoma viral na célula, por exemplo, para um vírus recombinante, expressão de um ou mais ácidos nucleicos heterólogos de interesse.

**[038]** Aqueles versados na técnica apreciarão que a transcrição de uma sequência de ácidos nucleicos heteróloga do genoma viral pode não ser iniciada na ausência de fatores de transação, por exemplo, para um promotor induzível ou sequência de ácido nucleico regulada de outra forma. No caso de um genoma de rAAV, a expressão gênica do genoma viral pode ser de um provírus integrado de forma estável, de um epissoma não integrado, bem como qualquer outra forma que o vírus possa assumir dentro da célula.

**[039]** Conforme usado neste documento, "tropismo sistêmico" e "transdução sistêmica" (e termos equivalentes) indicam que o capsídeo de vírus ou vetor de vírus da divulgação exibe tropismo para, ou transduz, respectivamente, tecidos por

todo o corpo (por exemplo, cérebro, pulmão, músculo esquelético, coração, fígado, rim e/ou pâncreas). Em modalidades, a transdução sistêmica de tecidos musculares (por exemplo, músculo esquelético, diafragma e músculo cardíaco) é observada. Em outras modalidades, a transdução sistêmica dos tecidos musculoesqueléticos é alcançada. por exemplo, em modalidades particulares, essencialmente todos os músculos esqueléticos em todo o corpo são transduzidos (embora a eficiência da transdução possa variar por tipo de músculo). Em modalidades particulares, a transdução sistêmica dos músculos dos membros, músculo cardíaco e músculo do diafragma é alcançada. Opcionalmente, o capsídeo de vírus ou vetor de vírus é administrado por meio de uma via sistêmica (por exemplo, via sistêmica, tal como intravenosa, intra-articular ou intralinfática).

**[040]** Alternativamente, em outras modalidades, o capsídeo ou vetor de vírus é transmitido localmente (por exemplo, para a planta do pé, intramuscularmente, intradermicamente, subcutaneamente, topicamente). A menos que indicado de outra forma, "transdução eficiente" ou "tropismo eficiente" ou termos semelhantes podem ser determinados por referência a um controle adequado (por exemplo, pelo menos cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95% ou mais da transdução ou tropismo, respectivamente, do controle). Em modalidades particulares, o vetor de vírus transduz eficientemente ou tem tropismo eficiente para músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo do diafragma, pâncreas (incluindo células p da ilhota), baço, trato gastrointestinal (por exemplo, epitélio e/ou músculo liso), células de o sistema nervoso central, olho, pulmão, células das articulações e/ou rim. Os controles adequados dependerão de uma variedade de fatores, incluindo o perfil de tropismo desejado. por exemplo, AAV8 e AAV9 são altamente eficientes na transdução do músculo esquelético, músculo cardíaco e músculo do diafragma, mas têm a desvantagem de também transduzir o fígado com alta eficiência. Assim, podem ser identificados vetores virais que demonstram a transdução eficiente de músculo esquelético, cardíaco e/ou do diafragma de AAV8 ou AAV9, mas com uma eficiência de transdução muito menor para o fígado. Além disso, como o perfil de tropismo de interesse pode refletir o tropismo em direção a vários tecidos alvo, será apreciado que um vetor adequado pode representar algumas compensações. Para ilustrar, um vetor de vírus da



divulgação pode ser menos eficiente do que AAV8 ou AAV9 na transdução de músculo esquelético, músculo cardíaco e/ou músculo do diafragma, mas por causa da transdução de baixo nível do fígado, pode, no entanto, ser muito desejável.

**[041]** Da mesma forma, pode ser determinado se um vírus "não faz a transdução de forma eficiente" ou "não tem tropismo eficiente" para um tecido alvo, ou termos semelhantes, por referência a um controle adequado. Em modalidades particulares, o vetor de vírus não transduz de forma eficiente (ou seja, não tem tropismo eficiente) para o fígado, rim, gônadas e/ou células germinativas. Em modalidades particulares, a transdução indesejável de tecidos (por exemplo, fígado) é de cerca de 20% ou menos, cerca de 10% ou menos, cerca de 5% ou menos, cerca de 1% ou menos, cerca de 0,1% ou menos do nível de transdução dos tecidos alvo desejados (por exemplo, músculo esquelético, músculo do diafragma, músculo cardíaco e/ou células do sistema nervoso central).

**[042]** Conforme usado neste documento, o termo "polipeptídeo" abrange peptídeos e proteínas, a menos que indicado de outra forma.

**[043]** Um "polinucleotídeo" é uma sequência de bases nucleotídicas e pode ser RNA, DNA ou sequências híbridas de DNA-RNA (incluindo nucleotídeos de ocorrência natural e não natural), mas em modalidades representativas são sequências de DNA de fita simples ou dupla.

**[044]** Conforme usado neste documento, um polinucleotídeo "isolado" (por exemplo, um "DNA isolado" ou um "RNA isolado") significa um polinucleotídeo pelo menos parcialmente separado de pelo menos alguns dos outros componentes do organismo ou vírus de ocorrência natural, por exemplo, os componentes estruturais de célula ou vírus ou outros polipeptídeos ou ácidos nucleicos comumente encontrados associados ao polinucleotídeo. Em modalidades representativas, um nucleotídeo "isolado" é enriquecido em pelo menos cerca de 10 vezes, cerca de 100 vezes, cerca de 1000 vezes, cerca de 10.000 vezes ou mais em comparação com a matéria-prima.

**[045]** Da mesma forma, um polipeptídeo "isolado" significa um polipeptídeo que é pelo menos parcialmente separado de pelo menos alguns dos outros componentes do organismo ou vírus de ocorrência natural, por exemplo, a célula ou componentes estruturais virais ou outros polipeptídeos ou ácidos nucleicos comumente

encontrados associados com o polipeptídeo. Em modalidades representativas, um polipeptídeo "isolado" é enriquecido em pelo menos cerca de 10 vezes, 100 vezes, 1000 vezes, 10.000 vezes ou mais em comparação com o material inicial.

**[046]** Conforme usado neste documento, por "isolar" ou "purificar" (ou equivalentes gramaticais) um vetor de vírus, significa que o vetor de vírus é pelo menos parcialmente separado de pelo menos alguns dos outros componentes do material inicial. Em modalidades representativas, um vetor de vírus "isolado" ou "purificado" é enriquecido em pelo menos cerca de 10 vezes, cerca de 100 vezes, cerca de 1000 vezes, cerca de 10.000 vezes ou mais em comparação com o material inicial.

**[047]** Um "polipeptídeo terapêutico" é um polipeptídeo que pode aliviar, reduzir, prevenir, atrasar e/ou estabilizar os sintomas que resultam de uma ausência ou defeito em uma proteína em uma célula ou sujeito e/ou é um polipeptídeo que de outra forma confere um benefício a um sujeito, por exemplo, efeitos anticâncer ou aprimoramento na sobrevida do transplante.

**[048]** Pelos termos "tratar", "tratando" ou "tratamento de" (e variações gramaticais dos mesmos), significa que a gravidade da condição do sujeito é reduzida, pelo menos parcialmente aprimorada ou estabilizada e/ou que algum alívio, mitigação, diminuição ou estabilização em pelo menos um sintoma clínico é alcançada e/ou há um retardo na progressão da doença ou distúrbio.

**[049]** Os termos "prevenir", "prevenindo" e "prevenção" (e variações gramaticais destes) referem-se à prevenção e/ou retardo do início de uma doença, distúrbio e/ou sintomas clínicos em um sujeito e/ou uma redução na gravidade do início da doença, distúrbio e/ou sintomas clínicos em relação ao que ocorreria na ausência dos métodos de divulgação. A prevenção pode ser completa, por exemplo, a ausência total da doença, distúrbio e/ou sintomas clínicos. A prevenção também pode ser parcial, de modo que a ocorrência da doença, distúrbio e/ou sintomas clínicos no sujeito e/ou a gravidade do início seja menor do que o que ocorreria na ausência da presente divulgação.

**[050]** "Quantidade terapeuticamente eficaz", conforme utilizado neste documento, refere-se a uma quantidade que, quando administrada a um sujeito para o tratamento de uma doença, ou pelo menos um dos sintomas clínicos de uma doença, é suficiente para afetar tal tratamento da doença ou sintoma desta. A

"quantidade terapeuticamente eficaz" pode variar dependendo, por exemplo, da doença e/ou dos sintomas da doença, da gravidade da doença e/ou dos sintomas da doença ou distúrbio, da idade, do peso e/ou da saúde do paciente a ser tratado, e do julgamento do médico. Uma quantidade apropriada em qualquer caso pode ser determinada por aqueles versados na técnica ou ser capaz de determinação por experimentação de rotina.

**[051]** Conforme usado neste documento, os termos "vetor de vírus", "vetor" ou "vetor de entrega de gene" referem-se a uma partícula de vírus (por exemplo, AAV) que funciona como um veículo de transmissão de ácido nucleico e que compreende o genoma do vetor (por exemplo, DNA viral [vDNA]) embalado dentro de um vírion.

**[052]** Alternativamente, em alguns contextos, o termo "vetor" pode ser usado para se referir ao genoma de vetor/vDNA por si só.

**[053]** Um "genoma de vetor rAAV" ou "genoma rAAV" é um genoma de AAV (ou seja, vDNA) que compreende uma ou mais sequências de ácido nucleico heterólogas. Os vetores de rAAV geralmente requerem apenas as repetições terminais em cis para gerar o vírus. Todas as outras sequências virais são dispensáveis e podem ser fornecidas em trans (Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97). Normalmente, o genoma de vetor de rAAV apenas reterá uma ou mais sequências de TR, de modo a maximizar o tamanho do transgene que pode ser eficientemente empacotado pelo vetor. As sequências de codificação de proteínas estruturais e não estruturais podem ser fornecidas em trans (por exemplo, de um vetor, como um plasmídeo, ou pela integração estável das sequências em uma célula de empacotamento). Em modalidades, o genoma de vetor de rAAV compreende pelo menos uma sequência de TR (por exemplo, sequência de TR de AAV), opcionalmente duas TRs (por exemplo, duas TRs de AAV), que normalmente estarão nas extremidades 5' e 3' do genoma de vetor e flanqueiam o ácido nucleico heterólogo, mas não precisam ser contíguos a ele. As TRs podem ser iguais ou diferentes uns dos outros.

**[054]** O termo "repetição terminal" ou "TR" inclui qualquer repetição terminal viral ou sequência sintética que forma uma estrutura em gancho e funciona como uma repetição terminal invertida (ou seja, medeia as funções desejadas, como replicação, empacotamento de vírus, integração e/ou resgate de provírus e

semelhantes). A TR pode ser uma TR de AAV ou uma TR não AAV. por exemplo, uma sequência de TR não AAV, como as de outros parvovírus (por exemplo, parvovírus canino (CPV), parvovírus de camundongo (MVM), parvovírus humano B-19) ou qualquer outra sequência de vírus adequada (por exemplo, o hairpin SV40 que serve como a origem da replicação de SV40) pode ser usada como uma TR, que pode ainda ser modificada por truncamento, substituição, deleção, inserção e/ou adição. Além disso, a TR pode ser parcial ou completamente sintética, tal como a "sequência duplo D", conforme descrito na Patente dos Estados Unidos No. 5.478.745 para Samulski et al.

**[055]** Uma "repetição terminal de AAV" ou "TR de AAV" pode ser de qualquer AAV, incluindo, mas não se limitando a sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou qualquer outro AAV agora conhecido ou descoberto posteriormente (ver, por exemplo, Tabela 2). Uma repetição terminal de AAV não precisa ter a sequência de repetição terminal nativa (por exemplo, uma sequência de TR de AAV nativa pode ser alterada por inserção, deleção, truncamento e/ou mutações missense), desde que a repetição terminal medeie as funções desejadas, por exemplo, replicação, empacotamento de vírus, integração e/ou resgate de provírus e semelhantes.

**[056]** Os vetores de vírus da divulgação podem ainda ser vetores de vírus "direcionados" (por exemplo, tendo um tropismo direcionado) e/ou um parvovírus "híbrido" (ou seja, em que os TRs virais e o capsídeo viral são de parvovírus diferentes), conforme descrito em publicação de patente WO00/28004 e Chao et al, (2000) *Molecular Therapy* 2: 619.

**[057]** Os vetores de vírus da divulgação podem ainda ser partículas de parvovírus duplexadas conforme descrito na publicação de patente internacional WO 01/92551 (a divulgação da qual é incorporada neste documento por referência em sua totalidade). Assim, em algumas modalidades, genomas de fita dupla (duplex) podem ser empacotados nos capsídeos de vírus da divulgação.

**[058]** Além disso, o capsídeo viral ou elementos genômicos podem conter outras modificações, incluindo inserções, deleções e/ou substituições.

**[059]** Conforme usado neste documento, o termo "aminoácido" abrange qualquer aminoácido de ocorrência natural, suas formas modificadas e aminoácidos sintéticos.

**[060]** Aminoácidos levógiros (L-) de ocorrência natural são mostrados na Tabela 3.

**TABELA 3: Resíduos de aminoácidos e abreviaturas.**

Resíduo de Aminoácido	Abreviação	
	Código de Três Letras	Código de Uma Letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico (Aspartato)	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico (Glutamato)	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

**[061]** Alternativamente, o aminoácido pode ser um resíduo de aminoácido modificado (exemplos não limitativos são mostrados na Tabela 4) e/ou pode ser um aminoácido que é modificado por modificação pós-tradução (por exemplo, acetilação, amidação, formilação, hidroxilação, metilação, fosforilação ou sulfatação).

**TABELA 4: Resíduos de Aminoácidos Modificados**

Resíduo de Aminoácido Modificado	Abreviação
Derivados de Resíduos de Aminoácidos	
Ácido 2-aminoadípico	Aad
Ácido 3-aminoadípico	bAad
beta-alanina, ácido beta-aminopropiônico	bAla
Ácido 2-aminobutírico	Abu
Ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico	4Abu
Ácido 6-aminocaproico	Acp
Ácido 2-aminoheptanoico	Ahe
Ácido 2-aminoisobutírico	Aib
Ácido 3-aminoisobutírico	bAib
Ácido 2-aminopimélico	Apm
t-butilalanina	t-BuA
Citrulina	Cit
Ciclohexilalanina	Cha
Ácido 2,4-diaminobutírico	Dbu
Desmosina	Des
Ácido 2,21-diaminopimélico	Dpm
Ácido 2,3-diaminopropiônico	Dpr
N-etil glicina	EtGly
N-Etilasparagina	EtAsn
Homoarginina	hArg
Homocisteína	hCys
Homoserina	hSer
Hidroxilisina	Hyl
Ala-Hidroxilisina	aHyl
3-Hidroxiprolina	3Hyp
4-Hidroxiprolina	4Hyp
Isodesmosina	Ide
alo-Isoleucina	alle
Sulfóxido de metionina	MSO

N-Metilglicina, sarcosina	MeGly
N-Metil isoleucina	Melle
6-N-Metilisina	MeLys
N-Metilvalina	MeVal
2-Naftilalanina	2-Nal
Norvalina	Nva
Norleucina	Nle
Ornitina	Orn
4-Clorofenilalanina	Phe(4-C1)
2-Fluorofenilalanina	Phe(2-F)
3-Fluorofenilalanina	Phe(3-F)
4-Fluorofenilalanina	Phe(4-F)
Fenilglicina	Phg
Beta-2-tienilalanina	Thi

**[062]** Além disso, o aminoácido de ocorrência não natural pode ser um aminoácido "não natural" (conforme descrito por Wang et al., Annu Rev Biophys Biomol Struct. 35:225-49 (2006)). Estes **aminoácidos** não naturais podem ser vantajosamente usados para ligar quimicamente moléculas de interesse à proteína do capsídeo de AAV.

**Proteínas do Capsídeo de AAV Modificadas e Capsídeos de Vírus e Vetores de Vírus Compreendendo os Mesmos.**

**[063]** A presente divulgação fornece proteínas do capsídeo de AAV (VP1, VP2 e/ou VP3) compreendendo uma modificação (por exemplo, uma substituição e/ou deleção) na sequência de aminoácidos e capsídeos de vírus e vetores de vírus compreendendo a proteína do capsídeo de AAV modificada. Os inventores descobriram que as modificações descritas neste documento podem conferir uma ou mais propriedades desejáveis aos vetores de vírus compreendendo a proteína do capsídeo de AAV modificada incluindo, sem limitação, transdução seletiva para um tecido alvo de interesse. Em algumas modalidades, o tecido alvo de interesse pode ser um tecido oftálmico, como o epitélio pigmentar da retina (RPE). Portanto, a presente divulgação aborda algumas das limitações associadas aos vetores de AAV convencionais.

**[064]** Conforme usado neste documento, uma "mutação" ou "modificação" em uma sequência de aminoácidos pode incluir substituições, inserções e/ou deleções, cada uma das quais pode envolver um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais aminoácidos. Em modalidades particulares, a modificação é uma substituição.

**[065]** As proteínas do capsídeo de vírus modificadas da invenção podem ser, mas não estão limitadas a proteínas do capsídeo de AAV em que os aminoácidos de uma proteína do capsídeo de AAV são substituídos em outra proteína do capsídeo de AAV, e os aminoácidos substituídos e/ou inseridos podem ser de qualquer fonte, e pode ainda ser natural ou parcial ou totalmente sintético.

**[066]** Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece uma proteína do capsídeo de vírus adenoassociado (AAV) compreendendo uma ou mais substituições de aminoácidos, em que uma ou mais substituições modificam uma ou mais alças expostas à superfície na proteína de capsídeo de AAV. A modificação de uma ou mais alças expostas à superfície resulta em transdução potencializada para um tecido alvo. O tecido alvo pode ser um tecido oftálmico, como o epitélio pigmentar da retina (RPE). As uma ou mais substituições de aminoácidos podem estar em uma ou mais alças expostas à superfície identificadas por mapeamento de epítipo de peptídeo e/ou estudos de microscopia crioeletrônica.

**[067]** As proteínas do capsídeo desta divulgação são modificadas para produzir um capsídeo de AAV que está presente em uma partícula de vírus de AAV ou vetor de vírus de AAV que tem um fenótipo de transdução aprimorada em relação a um tecido alvo de interesse (por exemplo, um tecido oftálmico, como o retinal epitélio pigmentar). A partícula de vírus de AAV ou vetor desta divulgação também pode ter um fenótipo de evasão de anticorpos neutralizantes.

**[068]** Em algumas modalidades, uma ou mais substituições de uma ou mais alças expostas à superfície podem introduzir uma ou mais alças expostas à superfície de uma proteína do capsídeo de um primeiro sorotipo de AAV na proteína do capsídeo de um segundo sorotipo de AAV que é diferente do referido primeiro sorotipo de AAV.

**[069]** A proteína do capsídeo de AAV desta divulgação pode ser uma proteína do capsídeo de um sorotipo de AAV selecionado dentre AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B,



AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, AAVrh74, AAV bovino, AAV aviário ou qualquer outro AAV conhecido atualmente ou identificado posteriormente. Em algumas modalidades, a proteína do capsídeo de AAV é quimérica.

**[070]** Em algumas modalidades, a substituição de aminoácidos substitui quaisquer seis aminoácidos em uma proteína do capsídeo de AAV de qualquer um dos sorotipos listados no parágrafo anterior. por exemplo, a substituição de aminoácidos pode substituir os seguintes aminoácidos (numeração de VP1) em uma proteína do capsídeo de AAV de qualquer um dos sorotipos listados no parágrafo anterior: 397-402, 403-408, 409-414, 415-420, 421-426, 427-432, 433-438, 439-444, 445-450, 451-456, 457-462, 463-468, 469-474, 475-480, 481-486, 487-492, 493- 489, 490-495, 496-501, 500-505, 506-510, 511-517, 523-528, 529-534, 535-540, 541-546, 547-552, 553-558, 559-560, 561-565, 566-571, 572-577, 578-583, 584-589, 590-595, 596-601, 602-607, 608-613, 614-619, 620-625, 626-631, 632- 637, 638-642, 643-648, 649-654, 655-670, 617-676, 677-682, 683-688, 689-694, 695-700, 701-706.

**[071]** Em algumas modalidades, a proteína do capsídeo de AAV compreende uma ou mais substituições de aminoácidos que não ocorrem na sequência do capsídeo, em que as substituições de aminoácidos são selecionadas dentre as sequências listadas na Tabela 5.

**TABELA 5: SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS**

Substituição de	SEQ ID NO.
KVRDLF	14
RVLALR	15
RVHALR	16
RVHSLR	17
GVGVLV	18
FVNALN	19
IVRSLN	20
HVLRNL	21
RVLALQ	22
RVRGLR	187

KVRTLR	188
MVGNLV	189
RVLGLR	190
KVAGLC	191
IVRPLV	192
KVRGLA	193
RVRGLG	194

**[072]** Em algumas modalidades, a substituição de aminoácidos substitui os aminoácidos na região correspondente às posições de aminoácidos 591-596 de SEQ ID NO. 11 ou aminoácidos 590-595 de SEQ ID NO. 12.

**[073]** Em algumas modalidades, o capsídeo de AAV compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 11-12, 23-49 ou 195-254. Em algumas modalidades, o capsídeo compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de homologia de sequência com qualquer uma das SEQ ID NO: 11-12, 23-49 ou 195-254.

**[074]** Em algumas modalidades, uma proteína do capsídeo recombinante tem uma sequência que é pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idêntica a qualquer uma dentre SEQ ID NO: 32, 35, 37 ou 40.

**[075]** Em algumas modalidades, uma proteína do capsídeo de AAV da SEQ ID NO: 4 compreende uma ou mais das seguintes substituições de aminoácidos: K492E, K503E, N585S, T590K, T590R, T590G, T590F, T590I, T590H, T590M, D592R, D592L, D592H, D592G, D592N, D592A, R593D, R593A, R593S, R593V, R593R, R593G, R593T, R593N, R593P, T595F, T595R, T595P, T595N, T595Q, T595V, T595C, T595A, T595G.

**[076]** Em algumas modalidades, uma proteína do capsídeo de AAV de SEQ ID NO: 11 compreende uma ou mais das seguintes substituições de aminoácidos: T591K, T591R, T591G, T591F, T591I, T591H, T591M, D593R, D593L, D593H, D593G, D593N, D593A, R594D, R594A, R594S, R594V, R594R, R594G, R594T, R594N, R594P, T596F, T596R, T596P, T596N, T596Q, T596V, T596C, T596A, T596G.

**[077]** Em algumas modalidades, uma proteína do capsídeo de AAV da SEQ ID NO:12 compreende uma ou mais das seguintes substituições de aminoácidos: T590K, T590R, T590G, T590F, T590I, T590H, T590M, D592R, D592L, D592H, D592G, D592N, D592A, R593D, R593A, R593S, R593V, R593R, R593G, R593T, R593N, R593P, T595F, T595R, T595P, T595N, T595Q, T595V, T595C, T595A, T595G.

**[078]** Em algumas modalidades, a proteína do capsídeo de AAV compreende uma substituição que compreende uma sequência de seis aminoácidos ( $X^1$ - $X^2$ - $X^3$ - $X^4$ - $X^5$ - $X^6$ ) que não ocorre na proteína do capsídeo de AAV nativa, em que  $X^2$  é V e  $X^5$  é L (SEQ ID NO: 186). Em algumas modalidades,  $X^1$  não é T,  $X^3$  não é D,  $X^4$  não é R e  $X^6$  não é T (SEQ ID NO: 255). Em algumas modalidades,  $X^1$  é K, G, F, I, H ou R (SEQ ID NO: 256). Em algumas modalidades,  $X^3$  é R, L, H, G ou N (SEQ ID NO: 257). Em algumas modalidades,  $X^4$  é D, A, S, V ou R (SEQ ID NO: 258). Em algumas modalidades,  $X^6$  é F, R, P, N ou Q (SEQ ID NO: 259). Em algumas modalidades,  $X^1$  é K,  $X^3$  é R,  $X^4$  é D e  $X^6$  é F (SEQ ID NO: 14). Em algumas modalidades,  $X^1$  é R,  $X^3$  é L,  $X^4$  é A e  $X^6$  é R (SEQ ID NO: 15). Em algumas modalidades,  $X^1$  é R,  $X^3$  é H,  $X^4$  é A e  $X^6$  é R (SEQ ID NO: 16). Em algumas modalidades,  $X^1$  é R,  $X^3$  é H,  $X^4$  é S e  $X^6$  é R (SEQ ID NO: 17). Em algumas modalidades,  $X^1$  é G,  $X^3$  é G,  $X^4$  é V e  $X^6$  é P (SEQ ID NO: 18). Em algumas modalidades,  $X^1$  é F,  $X^3$  é N,  $X^4$  é A e  $X^6$  é N (SEQ ID NO: 19). Em algumas modalidades,  $X^1$  é I,  $X^3$  é R,  $X^4$  é S e  $X^6$  é N (SEQ ID NO: 20). Em algumas modalidades,  $X^1$  é H,  $X^3$  é L,  $X^4$  é R e  $X^6$  é N (SEQ ID NO: 21). Em algumas modalidades,  $X^1$  é R,  $X^3$  é L,  $X^4$  é A e  $X^6$  é Q (SEQ ID NO: 22). Em algumas modalidades,  $X^1$  é R,  $X^3$  é L,  $X^4$  é A e  $X^6$  é Q (SEQ ID NO: 187). Em algumas modalidades,  $X^1$  é K,  $X^3$  é R,  $X^4$  é T e  $X^6$  é R (SEQ ID NO: 188). Em algumas modalidades,  $X^1$  é M,  $X^3$  é G,  $X^4$  é N e  $X^6$  é V (SEQ ID NO: 189). Em algumas modalidades,  $X^1$  é R,  $X^3$  é L,  $X^4$  é G e  $X^6$  é R (SEQ ID NO: 190). Em algumas modalidades,  $X^1$  é K,  $X^3$  é A,  $X^4$  é G e  $X^6$  é C (SEQ ID NO: 191). Em algumas modalidades,  $X^1$  é I,  $X^3$  é V,  $X^4$  é R e  $X^6$  é V (SEQ ID NO: 192). Em algumas modalidades,  $X^1$  é K,  $X^3$  é R,  $X^4$  é G e  $X^6$  é A (SEQ ID NO: 193). Em algumas modalidades,  $X^1$  é R,  $X^3$  é R,  $X^4$  é G e  $X^6$  é G (SEQ ID NO: 194).

**[079]** A presente divulgação também fornece uma sequência nucleotídica, ou um

vetor de expressão compreendendo a mesma, que codifica uma ou mais das proteínas do capsídeo de AAV de acordo com a divulgação. A sequência nucleotídica pode ser uma sequência de DNA ou uma sequência de RNA. A presente divulgação também fornece uma célula que compreende uma ou mais sequências nucleotídicas ou vetores de expressão de acordo com a divulgação.

**[080]** Também é fornecido um capsídeo de AAV que compreende uma proteína do capsídeo de AAV desta divulgação. É fornecido ainda neste documento um vetor viral que compreende um capsídeo de AAV desta divulgação, bem como uma composição que compreende a proteína do capsídeo de AAV, o capsídeo de AAV e/ou o vetor viral de acordo com esta divulgação em um carreador farmacologicamente aceitável.

**[081]** Em algumas modalidades, a modificação de uma ou mais alças expostas à superfície resulta em um perfil de transdução potencializado em relação a um tecido alvo de interesse, por exemplo, um tecido oftálmico, como o epitélio pigmentar da retina (RPE). Em algumas modalidades, a modificação de uma ou mais alças expostas à superfície resulta na inibição da ligação por um anticorpo a um ou mais sítios antigênicos na proteína do capsídeo de AAV. Em algumas modalidades, a modificação de uma ou mais alças expostas à superfície resulta na inibição da neutralização da infecciosidade de uma partícula de vírus que compreende a proteína do capsídeo de AAV.

**[082]** Conforme descrito neste documento, as sequências de ácido nucleico e de aminoácidos das proteínas do capsídeo de vários AAV são conhecidas na técnica. Portanto, os aminoácidos "correspondentes" às posições de aminoácidos da proteína do capsídeo de AAV nativa podem ser facilmente determinados para qualquer outro AAV (por exemplo, usando alinhamentos de sequência).

**[083]** A divulgação contempla que as proteínas do capsídeo modificadas podem ser produzidas pela modificação da proteína do capsídeo de qualquer AAV conhecido atualmente ou descoberto posteriormente.

**[084]** Além disso, a proteína do capsídeo de AAV que deve ser modificada pode ser uma proteína do capsídeo de AAV de ocorrência natural (por exemplo, uma proteína do capsídeo de AAV2, AAV3a ou 3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 ou AAV11 ou qualquer um dos AAV mostrados na Tabela 2), mas

sem limitação. Aqueles versados na técnica entenderão que uma variedade de manipulações das proteínas do capsídeo de AAV são conhecidas na técnica, e a divulgação não é limitada a modificações de proteínas do capsídeo de AAV de ocorrência natural. por exemplo, a proteína do capsídeo a ser modificada pode já ter alterações em comparação com AAV de ocorrência natural (por exemplo, é derivada de uma proteína do capsídeo de AAV de ocorrência natural, por exemplo, AAV2, AAV3a, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 ou qualquer outro AAV conhecido atualmente ou descoberto posteriormente). Em algumas modalidades, a proteína do capsídeo a ser modificada pode ser uma proteína do capsídeo quimérica. Em algumas modalidades, a proteína do capsídeo a ser modificada pode ser um AAV manipulado, como AAV2i8, AAV2g9, AAV-LK03, AAV7m8, AAV Anc80, AAV PHP.B. Em algumas modalidades, a proteína do capsídeo a ser modificada pode ter a sequência de SEQ ID NO: 11 ou SEQ ID NO: 12.

**[085]** Assim, em modalidades particulares, a proteína do capsídeo de AAV a ser modificada pode ser derivada de um AAV de ocorrência natural, mas compreende ainda uma ou mais sequências estranhas (por exemplo, que são exógenas ao vírus nativo) que são inseridas e/ou substituídas na proteína do capsídeo e/ou foram alteradas pela deleção de um ou mais aminoácidos.

**[086]** Conseqüentemente, quando há referência neste documento a uma proteína do capsídeo de AAV específica (por exemplo, uma proteína do capsídeo de AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 ou AAV11 ou uma proteína do capsídeo de qualquer um dos AAV mostrados na Tabela 2, etc.), esta destina-se a abranger a proteína do capsídeo nativa, bem como proteínas do capsídeo que possuem alterações além das modificações da divulgação. Essas alterações incluem substituições, inserções e/ou deleções. Em modalidades particulares, a proteína do capsídeo compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20, menos de 20, menos de 30, menos de 40, menos de 50, menos de 60 ou menos de 70 aminoácidos nela inseridos (além das inserções da presente divulgação) em comparação com a sequência de proteínas do capsídeo de AAV nativa. Em modalidades, a proteína do capsídeo compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20, menos de 20, menos de 30, menos

de 40, menos de 50, menos de 60 ou menos de 70 substituições de aminoácidos (além das substituições de aminoácidos de acordo com a presente divulgação) em comparação com a sequência de proteína do capsídeo de AAV nativa, nas modalidades da divulgação, a proteína do capsídeo compreende uma deleção de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20, menos de 20, menos de 30, menos de 40, menos de 50, menos de 60 ou menos de 70 aminoácidos (além das deleções de aminoácidos da divulgação) em comparação com a sequência de proteína do capsídeo de AAV nativa.

**[087]** Em modalidades particulares, a proteína do capsídeo de AAV tem a sequência de proteína do capsídeo de AAV nativa ou tem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97%, cerca de 98% ou cerca de 99% semelhante ou idêntica a uma sequência de proteína do capsídeo de AAV nativa. Por exemplo, em modalidades particulares, uma proteína do capsídeo de "AAV4" abrange a sequência de proteínas do capsídeo de AAV4 nativa, bem como sequências que são pelo menos cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97%, cerca de 98% ou cerca de 99% semelhantes ou idênticas à sequência de proteínas do capsídeo de AAV4 nativa.

**[088]** Os métodos para determinar a semelhança ou identidade de sequência entre duas ou mais sequências de aminoácidos são conhecidos na técnica. Similaridade de sequência ou identidade pode ser determinada através do uso de técnicas padrão conhecidas na técnica, incluindo, mas não limitadas a, o algoritmo de identidade de sequência local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2, 482 (1981), pelo alinhamento de algoritmo da sequência de identidade de Needleman & Wunsch, J Mol. Biol. 48, 443 (1970), pela busca por método por similaridade de Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444 (1988), por implementações computadorizadas desses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), o programa de sequência Best Fit descrito por Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12, 387-395 (1984), ou por inspeção.

**[089]** Outro algoritmo adequado é o algoritmo BLAST, descrito em Altschul et al., J Mol. Biol. 215, 403-410, (1990) e Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5873-5877 (1993). Um programa de BLAST particularmente útil é o programa WU-

BLAST-2, que foi obtido de Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266, 460-480 (1996);

**[090]** <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>. O WU-BLAST-2 usa vários parâmetros de pesquisa, que são opcionalmente configurados para os valores padrão. Os parâmetros são valores dinâmicos e são estabelecidos pelo próprio programa dependendo da composição da sequência específica e da composição do banco de dados específico em relação às quais a sequência de interesse está sendo pesquisada; no entanto, os valores podem ser ajustados para aumentar a sensibilidade. Além disso, um algoritmo útil adicional é o BLAST com lacuna, conforme relatado por Altschul et al, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

**[091]** A divulgação também fornece um capsídeo de vírus compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo na proteína do capsídeo de AAV modificada da divulgação. Em modalidades particulares, o capsídeo de vírus é um capsídeo de parvovírus, que pode ainda ser um capsídeo de parvovírus autônomo ou um capsídeo de dependovírus. Opcionalmente, o capsídeo de vírus é um capsídeo de AAV. Em modalidades particulares, o capsídeo de AAV é um capsídeo de AAV1, AAV2, AAV3a, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32.33, capsídeo de AAV bovino, capsídeo de AAV aviário ou qualquer outro AAV conhecido atualmente ou identificado posteriormente. Uma lista não limitativa de sorotipos de AAV é mostrada na Tabela 2. Um capsídeo de AAV desta divulgação pode ser qualquer sorotipo de AAV listado na Tabela 2 ou derivado de qualquer um dos anteriores por uma ou mais inserções, substituições e/ou deleções.

**[092]** Os capsídeos de vírus modificados podem ser usados como "veículos de capsídeo", como foi descrito, por exemplo, na Patente US Nº 5.863.541. As moléculas que podem ser empacotadas pelo capsídeo de vírus modificado e transferidas para uma célula incluem DNA heterólogo, RNA, polipeptídeos, pequenas moléculas orgânicas ou metais ou combinações destes.

**[093]** Moléculas heterólogas são definidas como aquelas que não são encontradas naturalmente em uma infecção de AAV, por exemplo, aquelas não codificadas por um genoma de AAV do tipo selvagem. Além disso, moléculas terapêuticamente úteis podem ser associadas com o exterior do capsídeo de vírus quimérico para

transferência das moléculas para as células alvo hospedeiras. Essas moléculas associadas podem incluir DNA, RNA, pequenas moléculas orgânicas, metais, carboidratos, lipídios e/ou polipeptídeos. Em uma modalidade da divulgação, a molécula terapeuticamente útil é ligada covalentemente (isto é, conjugada ou quimicamente acoplada) às proteínas do capsídeo. Os métodos para ligar moléculas covalentemente são conhecidos por aqueles versados na técnica.

**[094]** Os capsídeos de vírus modificados da divulgação também encontram uso na geração de anticorpos contra as novas estruturas de capsídeo. Como outra alternativa, uma sequência de aminoácidos exógena pode ser inserida no capsídeo do vírus modificado para apresentação de antígeno a uma célula, por exemplo, para administração a um sujeito para produzir uma resposta imunológica à sequência de aminoácidos exógena.

**[095]** Em outras modalidades, os capsídeos de vírus podem ser administrados para bloquear certos sítios celulares antes de e/ou simultaneamente com (por exemplo, separados por minutos ou horas um do outro) a administração de um vetor de vírus que distribui um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo ou RNA funcional de interesse. Por exemplo, os capsídeos da divulgação podem ser distribuídos para bloquear receptores celulares em células do fígado e um vetor de distribuição pode ser administrado subsequente ou simultaneamente, o que pode reduzir a transdução de células do fígado e aumentar a transdução de outros alvos (por exemplo, músculo esquelético, cardíaco e/ou do diafragma).

**[096]** De acordo com modalidades representativas, capsídeos de vírus modificados podem ser administrados a um sujeito antes e/ou simultaneamente com um vetor de vírus modificado de acordo com a presente divulgação. Além disso, a divulgação fornece composições e formulações farmacêuticas compreendendo os capsídeos de vírus modificados; opcionalmente, a composição também compreende um vetor de vírus modificado da divulgação.

**[097]** A divulgação também fornece ácidos nucleicos (opcionalmente, ácidos nucleicos isolados) que codificam os capsídeos de vírus modificados e proteínas de capsídeo da divulgação. São fornecidos ainda vetores que compreendem os ácidos nucleicos e células (in vivo ou em cultura) que compreendem os ácidos nucleicos e/ou vetores da divulgação. Como um exemplo, a presente divulgação



fornece um vetor de vírus que compreende: (a) um capsídeo de AAV modificado desta divulgação; e (b) um ácido nucleico que compreende pelo menos uma sequência de repetição terminal, em que o ácido nucleico é encapsidado pelo capsídeo de AAV.

**[098]** Outros vetores adequados incluem, sem limitação, vetores virais (por exemplo, adenovírus, AAV, herpesvírus, vaccinia, poxvírus, baculovírus e similares), plasmídeos, fago, YACs, BACs e similares. Tais ácidos nucleicos, vetores e células podem ser usados, por exemplo, como reagentes (por exemplo, construtos de empacotamento auxiliares ou células de empacotamento) para a produção de capsídeos de vírus modificados ou vetores de vírus conforme descrito neste documento.

**[099]** Os capsídeos de vírus de acordo com a divulgação podem ser produzidos usando qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, por expressão de um baculovírus (Brown et al., (1994) *Virology* 198:477-488).

**[100]** As modificações na proteína do capsídeo de AAV de acordo com a presente divulgação são modificações "seletivas". Esta abordagem está em contraste com trabalhos anteriores com trocas de subunidades inteiras ou trocas de domínio grandes entre sorotipos de AAV (ver, por exemplo, publicação de patente internacional WO 00/28004 e Hauck et al., (2003) *J. Virology* 77:2768-2774). Em modalidades particulares, uma modificação "seletiva" resulta na inserção e/ou substituição e/ou deleção de menos de ou exatamente cerca de 20, cerca de 18, cerca de 15, cerca de 12, cerca de 10, cerca de 9, cerca de 8, cerca de 7, cerca de 6, cerca de 5, cerca de 4 ou cerca de 3 aminoácidos contíguos.

**[101]** As proteínas do capsídeo modificadas e capsídeos da divulgação modificados podem compreender ainda qualquer outra modificação conhecida atualmente ou identificada posteriormente.

**[102]** Por exemplo, as proteínas do capsídeo de AAV e os capsídeos de vírus da divulgação podem ser quiméricos, no sentido de que podem compreender toda ou uma porção de uma subunidade de capsídeo de outro vírus, opcionalmente outro parvovírus ou AAV, por exemplo, conforme descrito na publicação de patente internacional WO 00/28004.

**[103]** Em algumas modalidades desta divulgação, o capsídeo de vírus pode ser

um capsídeo de vírus direcionado que compreende uma sequência de direcionamento (por exemplo, substituída ou inserida no capsídeo viral) que direciona o capsídeo do vírus para interagir com moléculas de superfície celular presentes no(s) tecido(s) alvo desejado(s) (ver, por exemplo, publicação de patente internacional WO 00/28004 e Hauck et al., (2003) *J. Virology* 77:2768-2774); Shi et al., *Human Gene Therapy* 17:353-361 (2006) [descrevendo a inserção do motivo de ligação do receptor de integrina RGD nas posições 520 e/ou 584 da subunidade de capsídeo de AAV]; e Patente US Nº 7.314.912 [descrevendo a inserção do peptídeo PI que contém um motivo RGD que segue as posições de aminoácidos 447, 534, 573 e 587 da subunidade de capsídeo de AAV2]). Outras posições dentro da subunidade do capsídeo de AAV que toleram inserções são conhecidas na técnica (por exemplo, posições 449 e 588 descritas por Grifman et al., *Molecular Therapy* 3:964-975 (2001)).

**[104]** Por exemplo, um capsídeo de vírus desta divulgação pode ter tropismo relativamente ineficiente em relação a certos tecidos-alvo de interesse (por exemplo, fígado, músculo esquelético, coração, músculo do diafragma, rim, cérebro, estômago, intestinos, pele, células endoteliais e/ou pulmões). Uma sequência de direcionamento pode ser vantajosamente incorporada a esses vetores de baixa transdução para, desse modo, conferir ao capsídeo de vírus um tropismo desejado e, opcionalmente, tropismo seletivo para tecido(s) específico(s). Proteínas do capsídeo, capsídeos e vetores de AAV compreendendo sequências de direcionamento são descritos, por exemplo, na publicação de patente internacional WO 00/28004. Como outro exemplo, um ou mais aminoácidos de ocorrência não natural, conforme descrito por Wang et al., *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35:225-49 (2006)) pode ser incorporado em uma subunidade de capsídeo de AAV desta divulgação em um sítio ortogonal como um meio para redirecionar um vetor de baixa transdução para o(s) tecido(s) alvo desejado(s). Estes aminoácidos não naturais podem ser vantajosamente usados para quimicamente ligar moléculas de interesse à proteína do capsídeo de AAV, incluindo, sem limitação: glicanos (direcionamento de células dendríticas de manose); RGD, bombesina ou um neuropeptídeo para distribuição direcionada a tipos específicos de células cancerígenas; peptídeos ou aptâmeros de RNA

selecionados dentre exibição de fagos direcionada a receptores de superfície celular específicos, como receptores de fator de crescimento, integrinas e similares.

**[105]** Métodos para modificar aminoácidos quimicamente são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 1ª edição, Academic Press, 1996).

**[106]** Em algumas modalidades, a sequência de direcionamento pode ser uma sequência de capsídeo de vírus (por exemplo, uma sequência de capsídeo de parvovírus autônomo, uma sequência de capsídeo de AAV ou qualquer outra sequência de capsídeo viral) que direciona a infecção para determinado(s) tipo(s) de célula(s).

**[107]** Como outro exemplo não limitativo, um domínio de ligação de heparina ou heparan sulfato (por exemplo, o domínio de ligação de heparina do vírus sincicial respiratório) pode ser inserido ou substituído em uma subunidade de capsídeo que normalmente não se liga a receptores de HS (por exemplo, AAV4, AAV5) para conferir heparina e/ou heparan sulfato ligando-se ao mutante resultante.

**[108]** B19 infecta células progenitoras eritroides primárias usando globosídeo como seu receptor (Brown et al, (1993) *Science* 262: 114). A estrutura de B19 foi determinada para resolução de 8 Å (Agbandje-McKenna et al, (1994) *Virology* 203: 106). A região do capsídeo de B19 que se liga ao globosídeo foi mapeada entre os aminoácidos 399-406 (Chapman et al, (1993) *Virology* 194:419), uma região em alça entre as estruturas E e F do barril  $\beta$  (Chipman et al, (1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93:7502). Consequentemente, o domínio de ligação do receptor de globosídeo do capsídeo B19 pode ser substituído em uma proteína do capsídeo de AAV desta divulgação para direcionar um capsídeo de vírus ou vetor de vírus compreendendo este para células eritroides.

**[109]** Em algumas modalidades, a sequência de direcionamento exógena pode ser qualquer sequência de aminoácidos que codifica um peptídeo que altera o tropismo de um capsídeo de vírus ou vetor de vírus compreendendo a proteína do capsídeo de AAV modificada. Em modalidades particulares, o peptídeo ou proteína de direcionamento pode ser de ocorrência natural ou, alternativamente, completa ou parcialmente sintética. Sequências de direcionamento exemplificativas incluem ligantes e outros peptídeos que se ligam a receptores de superfície celular e

glicoproteínas, como sequências de peptídeos ROD, bradicinina, hormônios, fatores de crescimento de peptídeo (por exemplo, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento nervoso, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento derivado de plaquetas, fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II, etc.), citocinas, hormônio estimulador de melanócitos (por exemplo,  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ), neuropeptídeos, endorfinas e similares e fragmentos destes, que retêm a capacidade de direcionar células para seus receptores cognatos. Outros peptídeos e proteínas ilustrativos incluem substância P, fator de crescimento de queratinócito, neuropeptídeo Y, peptídeo liberador de gastrina, interleucina 2, lisozima de clara de ovo de galinha, eritropoietina, gonadolibcrina, corticostatina,  $\beta$ -endorfina, leuencefalina, rimorfina, alfa-neo-encefalina, angiotensina, pneumadina, peptídeo intestinal vasoativo, neurotensina, motilina e fragmentos destes conforme descrito acima. Como outra alternativa, o domínio de ligação de uma toxina (por exemplo, toxina de tétano ou toxinas de cobra, como alfa-bungarotoxina e similares) pode ser substituído na proteína do capsídeo como uma sequência de direcionamento. Em ainda outra modalidade representativa, a proteína do capsídeo de AAV pode ser modificada por substituição de um peptídeo sinal de importação/exportação "não clássico" (por exemplo, fator de crescimento de fibroblastos-1 e -2, interleucina 1, proteína Tat de HIV-1, proteína VP22 do vírus da herpes e similares) conforme descrito por Cleves (Current Biology 7:R318 (1997)) na proteína do capsídeo de AAV. Também englobados são os motivos peptídicos que direcionam a captação por células específicas, por exemplo, um motivo peptídico FVFLP (SEQ ID NO: 50) desencadeia a captação pelas células do fígado.

**[110]** As técnicas de exibição de fago, bem como outras técnicas conhecidas, podem ser usadas para identificar peptídeos que reconhecem qualquer tipo de célula de interesse.

**[111]** A sequência de direcionamento pode codificar qualquer peptídeo que direcione para um sítio de ligação da superfície celular, incluindo receptores (por exemplo, proteína, carboidrato, glicoproteína ou proteoglicano). Exemplos de sítios de ligação à superfície celular incluem, mas não estão limitados a, sulfato de heparano, sulfato de condroitina e outros glicosaminoglicanos, frações de ácido siálico encontradas em mucinas, glicoproteínas e gangliosídeos, glicoproteínas de

MHC 1, componentes de carboidratos encontrados em glicoproteínas de membrana, incluindo manose, N-acetilgalactosamina, N-acetil-glicosamina, fucose, galactose e similares.

**[112]** Em modalidades particulares, um sulfato de heparano (HS) ou domínio de ligação de heparina é substituído no capsídeo de vírus (por exemplo, em um capsídeo de AAV que de outra forma não se liga a HS ou heparina). Sabe-se na técnica que a ligação de HS/heparina é mediada por um "adesivo básico" que é rico em argininas e/ou lisinas. Em modalidades exemplificativas, uma sequência que segue o motivo BXXB (SEQ ID NO: 51), em que "B" é um resíduo básico e X é neutro e/ou hidrofóbico pode ser empregada. Como um exemplo não limitativo, BXXB pode ser RGNR (SEQ ID NO: 52). Como outro exemplo não limitativo, BXXB é substituído pelas posições de aminoácidos 262 a 265 na proteína do capsídeo de AAV2 nativa ou na(s) posição(ões) correspondente(s) na proteína do capsídeo de outro sorotipo de AAV.

**[113]** A Tabela 6 mostra outros exemplos não limitativos de sequências de direcionamento adequadas.

**Tabela 6: Sequências de Direcionamento de AAV**

Sequência	SEQ ID NO	Referência
NSVRDL(G/S)	53	Muller et al., Nature Biotechnology 21: 1040-1046 (2003)
PRSVTVP	54	Muller et al., Nature Biotechnology 21: 1040-1046 (2003)
NSVSSX(S/A)	55	Muller et al., Nature Biotechnology 21: 1040-1046 (2003)
NGRAHA	56	Grifman et al., Molecular Therapy 3:964-975 (2001)
QPEHSST	57	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
VNTANST	58	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
HGPMQS	59	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693

<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Referência</b>
		(2006)
PHKPPLA	60	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
IKNNEMW	61	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
RNLDTPM	62	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
VDSHRQS	63	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
YDSKTKT	64	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
SQLPHQK	65	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
STMQQNT	66	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
TERYMTQ	67	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
QPEHSST	68	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
DASLSTS	69	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
DLPNKT	70	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
DLTAARL	71	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
EPHQFNY	72	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
EPQSNHT	73	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
MSSWPSQ	74	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693

<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Referência</b>
		(2006)
NPKHNAT	75	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
PDGMRTT	76	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
PNNNKTT	77	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
QSTTHDS	78	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
TGSKQKQ	79	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
SLKHQAL	80	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
SPIDGEQ	81	Work et al., Molecular Therapy 13:683-693 (2006)
WIFPWIQL	82	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CDCRGDCFC	83	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CNGRC	84	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CPRECES	85	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CTTHWGFTLC	86	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CGRRAGGSC	87	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CKGGRAKDC	88	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CVPELGHEC	89	Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006)
CRRETAWAK	90	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
VSWFSHRYS PFAV S	91	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
GYRDGYAGPILYN	92	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)

<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Referência</b>
XXXY*XXX	93	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
Y*E/MNW	94	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
RPLPPLP	95	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
APPLPPR	96	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
DVFYPYPYASGS	97	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
MYWYPY	98	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
DITWDQLWDLMK	99	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CWDD(G/L)WLC	100	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
EWCEYLGGLRCY A	101	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
YXCXXGPXTWXCX P	102	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
IEGPTLRQWLAARA	103	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
LWXX(Y/W/F/H)	104	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
XFXXYLW	105	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
RWGLCD	106	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
MSRPACPPNDKYE	107	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)



<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Referência</b>
CLRSGRGC	108	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CHWMFSPWC	109	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
WXXF	110	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CSSRLDAC	111	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CLPVASC	112	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CGFECVRQCPCRC	113	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CVALCREACGEGC	114	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
SWCEPGWCR	115	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
YSGGWG	116	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
GLSGGRS	117	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
LMLPRAD	118	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CSCFRDVCC	119	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CRDVVSVIC	120	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
CNGRC	121	Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999)
MARSGL	122	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology,

<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Referência</b>
		páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MARAKE	123	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MSRTMS	124	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
KCCYSL	125	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MYWGDSHWLQYW YE	126	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MQLPLAT	127	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
EWLS	128	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SNEW	129	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)

<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Referência</b>
TNYL	130	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
WIFPWIQL	131	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
WDLAWMFRLPVG	132	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CTVALPGGYVRVC	133	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CVPELGHEC	134	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CGRRAGGSC	135	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CVAYCIEHHCWTC	136	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CVFAHNYDYLC	137	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology,

<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Referência</b>
		páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CVFTSNYAFC	138	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
VHSPNKK	139	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CDCRGDCFC	140	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CRGDGWC	141	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
XRGCDX	142	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
PXX(S/T)	143	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CTTHWGFTLC	144	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)

<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Referência</b>
SGKGPRQITAL	145	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
A(A/Q)(N/A)(L/Y)(T/V /M/R)(R/K)	146	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
VYMSPF	147	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MQLPLAT	148	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
ATWLPPR	149	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
HTMYHHYQHHL	150	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SEVGCragPLQWL CEKYFG	151	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CGLLPVGRPDRNV WRWLC	152	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology,

<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Referência</b>
		páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CKGQCDRFKGLPW EC	153	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SGRSA	154	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
WGFP	155	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
LWXXAr	156	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
XFXXYLW	157	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
AEPMPHSLNFSQYL WYT	158	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
WAY(W/F)SP	159	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)

<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Referência</b>
IELLQAR	160	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
DITWDQLWDLMK	161	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
AYTKCSRQWRTCM TTH	162	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
PQNSKIPGPTFLDP H	163	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SMEPALPDWWWK MFK	164	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
ANTPCGPYTHDCP VKR	165	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
TACHQHVRMVRP	166	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
VPWMEPAYQRFL	167	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology,

<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Referência</b>
		páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
DPRATPGS	168	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
FRPNRAQDYNTN	169	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CTKNSYLMC	170	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
C(R/Q)L/RT(G/N)XX G(A/V)GC	171	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
CPIEDRPMC	172	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
HEWSYLAPYPWF	173	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
MCPKHPLGC	174	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)



<b>Sequência</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>Referência</b>
RMWPSSTVNLSAG RR	175	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SAKTAVSQRVWLP SHRGGEP	176	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
KSREHVNSACPS KRITAAL	177	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
EGFR	178	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
AGLGVR	179	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
GTRQGHTMRLGVS DG	180	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
IAGLATPGWSHWLA L	181	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
SMSIARL	182	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology,

Sequência	SEQ ID NO	Referência
		páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
HTFEPGV	183	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
NTSLKRISNKR1RR K	184	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)
LRIKRKRRKRKTR K	185	Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, páginas 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008)

**[114]** Ainda em uma outra modalidade, a sequência de direcionamento pode ser um peptídeo que pode ser usado para acoplamento químico (por exemplo, pode compreender resíduos de arginina e/ou lisina que podem ser acoplados quimicamente através de seus grupos R) a outra molécula que está direcionada à entrada em uma célula.

**[115]** Como outra modalidade, a proteína do capsídeo de AAV ou capsídeo de vírus da divulgação pode compreender uma mutação conforme descrita no documento WO 2006/066066. Por exemplo, a proteína do capsídeo pode compreender uma substituição de aminoácido seletiva na posição de aminoácido 263, 705, 708 e/ou 716 da proteína do capsídeo de AAV2 nativa ou uma alteração(ões) correspondente(s) em uma proteína do capsídeo de outro sorotipo de AAV.

**[116]** Adicionalmente, ou alternativamente, em modalidades representativas, a proteína do capsídeo, capsídeo de vírus ou vetor compreende uma inserção de aminoácido seletiva diretamente após a posição de aminoácido 264 da proteína do capsídeo de AAV2 ou uma alteração correspondente na proteína o capsídeo de

outro AAV. "Seguir diretamente a posição de aminoácido X" significa que a inserção segue imediatamente a posição de aminoácido indicada (por exemplo, "seguir a posição de aminoácido 264" indica um ponto de inserção na posição 265 ou uma inserção maior, por exemplo, das posições 265 a 268, etc.).

**[117]** Além disso, em modalidades representativas, a proteína do capsídeo, o capsídeo de vírus ou o vetor desta divulgação pode compreender modificações de aminoácidos, tal como descrito na Publicação PCT N° WO 2010/093784 (por exemplo, 2i8) e/ou na Publicação PCT N° WO 2014/144229 (por exemplo, glicano duplo).

**[118]** Em algumas modalidades desta divulgação, a proteína do capsídeo, o capsídeo de vírus ou o vetor desta divulgação podem ter eficiência de transdução equivalente ou aprimorada em relação à eficiência de transdução do sorotipo de AAV a partir do qual a proteína do capsídeo, o capsídeo de vírus ou o vetor desta divulgação se originaram. Em algumas modalidades desta divulgação, a proteína do capsídeo, o capsídeo de vírus ou o vetor desta divulgação pode ter eficiência de transdução reduzida em relação à eficiência de transdução do sorotipo de AAV a partir do qual a proteína do capsídeo, o capsídeo de vírus ou o vetor desta divulgação se originou. Em algumas modalidades desta divulgação, a proteína do capsídeo, o capsídeo de vírus ou o vetor desta divulgação pode ter tropismo equivalente ou aprimorado em relação ao tropismo do sorotipo de AAV a partir do qual a proteína do capsídeo, o capsídeo de vírus ou o vetor desta divulgação se originou. Em algumas modalidades desta divulgação, a proteína do capsídeo, o capsídeo de vírus ou o vetor desta divulgação pode ter um tropismo alterado ou diferente em relação ao tropismo do sorotipo de AAV a partir do qual a proteína do capsídeo, o capsídeo de vírus ou o vetor desta divulgação se originou. Em algumas modalidades desta divulgação, a proteína do capsídeo, o capsídeo de vírus ou o vetor desta divulgação podem ter ou ser manipulados para ter tropismo para tecido cerebral. Em algumas modalidades desta divulgação, a proteína do capsídeo, o capsídeo de vírus ou o vetor desta divulgação podem ter ou ser manipulados para ter tropismo para tecido do fígado.

**[119]** As modalidades anteriores podem ser usadas para distribuir um ácido nucleico heterólogo a uma célula ou sujeito, conforme descrito neste documento.

Por exemplo, o vetor modificado pode ser usado para tratar um distúrbio de armazenamento lisossomal, como um distúrbio de mucopolissacaridose (por exemplo, síndrome de Sly [ $\beta$ -glucuronidase], síndrome de Hurler [alfa-L-iduronidase], Síndrome de Scheie [alfa-L-iduronidase], Síndrome de Hurler-Scheie [alfa-L-iduronidase], Síndrome de Hunter [iduronato sulfatase], Síndrome de Sanfilippo A [heparan sulfamidase], B [N-acetilglucosaminidase], C [acetil-CoA:alfa-glucosaminida acetiltransferase], D [N-acetilglucosamina 6-sulfatase], Síndrome de Morquio A [galactose-6-sulfato sulfatase], B [ $\beta$ -galactosidase], Síndrome de Maroteaux-Lamy [N-acetilgalactosamina-4-sulfatase], etc.), doença de Fabry (a-galactosidase), Doença de Gaucher (glucocerebrosidase) ou um distúrbio de armazenamento de glicogênio (por exemplo, doença de Pompe; alfa-glucosidase de ácido lisossomal) conforme descrito neste documento.

**[120]** Aqueles versados na técnica reconhecerão que para algumas proteínas do capsídeo de AAV a modificação correspondente será uma inserção e/ou uma substituição, dependendo se as posições de aminoácidos correspondentes estão parcial ou completamente presentes no vírus ou, alternativamente, estão completamente ausentes.

**[121]** A divulgação também abrange vetores de vírus que compreendem as proteínas do capsídeo modificadas e capsídeos da divulgação. Em modalidades particulares, o vetor de vírus é um vetor de parvovírus (por exemplo, compreendendo um capsídeo de parvovírus e/ou genoma de vetor), por exemplo, um vetor de AAV (por exemplo, compreendendo um capsídeo de AAV e/ou genoma de vetor). Em modalidades representativas, o vetor de vírus compreende um capsídeo de AAV modificado que compreende uma subunidade de capsídeo modificada da divulgação e um genoma de vetor.

**[122]** Por exemplo, em modalidades representativas, o vetor de vírus compreende: (a) um capsídeo de vírus modificado (por exemplo, um capsídeo de AAV modificado) que compreende uma proteína do capsídeo modificada da divulgação; e (b) um ácido nucleico que compreende uma sequência de repetição terminal (por exemplo, uma TR de AAV), em que o ácido nucleico que compreende a sequência de repetição terminal é encapsidado pelo capsídeo de vírus modificado. O ácido nucleico pode opcionalmente compreender duas repetições terminais (por

exemplo, dois TRs de AAV).

**[123]** Em modalidades representativas, o vetor de vírus é um vetor de vírus recombinante que compreende um ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo ou RNA funcional de interesse. Vetores de vírus recombinantes são descritos em mais detalhes abaixo.

**[124]** Em modalidades particulares, os vetores de vírus da divulgação (i) possuem transdução reduzida do fígado em comparação com o nível de transdução por um vetor de vírus sem a proteína do capsídeo modificada; (ii) exibem transdução sistêmica aprimorada pelo vetor de vírus em um sujeito animal em comparação com o nível observado por um vetor de vírus sem a proteína do capsídeo modificada; (iii) demonstram movimento aprimorado através das células endoteliais em comparação com o nível de movimento de um vetor de vírus sem a proteína do capsídeo modificada, e/ou (iv) exibem um aumento seletivo na transdução de um tecido oftálmico (por exemplo, epitélio pigmentar da retina), (v) exibem um aprimoramento seletivo na transdução do tecido do fígado e/ou (vi) transdução reduzida de tecidos cerebrais (por exemplo, neurônios) em comparação com o nível de transdução por um vetor de vírus sem a proteína do capsídeo modificado.

**[125]** Será entendido por aqueles versados na técnica que as proteínas do capsídeo, capsídeos de vírus e vetores de vírus modificados da divulgação excluem as proteínas do capsídeo, capsídeos e vetores de vírus que possuem os aminoácidos indicados nas posições especificadas em seu estado nativo (ou seja, não são mutantes).

### **Métodos de Produção de Vetores de Vírus**

**[126]** A presente divulgação fornece ainda métodos de produção dos vetores de vírus descritos neste documento. Assim, em uma modalidade, a presente divulgação fornece um método de produção de um vetor de AAV que tem tropismo aprimorado para um tecido alvo de interesse (por exemplo, um tecido oftálmico), compreendendo: a) identificar resíduos de aminoácidos que formam uma alça exposta à superfície tridimensional em uma proteína do capsídeo de AAV; b) gerar uma biblioteca de proteínas do capsídeo de AAV compreendendo substituições dos resíduos de aminoácidos identificados em (a); c) produção de partículas de AAV compreendendo proteínas do capsídeo da biblioteca de proteínas do capsídeo de

AAV de (b); d) colocar as partículas de AAV de (c) em contato com células sob condições em que infecção e replicação podem ocorrer; e) selecionar partículas de AAV que podem completar pelo menos um ciclo infeccioso e replicar em títulos semelhantes às partículas de AAV de controle: 1) colocar as partículas de AAV selecionadas em (e) em contato com células de um tecido alvo de interesse sob condições em que infecção e replicação podem ocorrer; e g) selecionar partículas de AAV que transduzem o tecido alvo de interesse. Exemplos não limitativos de métodos para identificar resíduos de aminoácidos de alça exposta à superfície incluem mapeamento de epítomos peptídicos e/ou microscopia crioeletrônica.

**[127]** A resolução e identificação dos resíduos de alça exposta à superfície dentro da alça exposta à superfície tridimensional permite sua modificação subsequente por meio de mutagênese aleatória, racional e/ou degenerada para gerar capsídeos de AAV com padrões de transdução desejáveis que podem ser identificados por meio de seleção e/ou triagem adicional.

**[128]** Assim, em uma modalidade adicional, a presente divulgação fornece um método de produção de um vetor de AAV que tem um perfil de transdução aprimorado em relação a um tecido alvo de interesse, compreendendo: a) identificar resíduos de aminoácidos que formam uma alça exposta à superfície tridimensional em uma proteína do capsídeo de AAV; b) gerar proteínas do capsídeo de AAV compreendendo substituições dos resíduos de aminoácidos de alça exposta à superfície identificados em (a) por mutagênese aleatória, racional e/ou degenerada; c) produção de partículas de AAV compreendendo proteínas do capsídeo de AAV de (b); d) colocar as partículas de AAV de (c) em contato com células sob condições em que infecção e replicação podem ocorrer; e) selecionar partículas de AAV que podem completar pelo menos um ciclo infeccioso e replicar em títulos semelhantes às partículas de AAV de controle; f) colocar as partículas de AAV selecionadas em (e) em contato com células de um tecido alvo de interesse sob condições em que infecção e replicação podem ocorrer; e g) selecionar partículas de AAV que transduzem o tecido alvo de interesse.

**[129]** Exemplos não limitativos de métodos para identificar resíduos de aminoácidos de alça exposta à superfície incluem mapeamento de epítomos peptídicos e/ou microscopia crioeletrônica. Métodos de geração de proteínas do

capsídeo de AAV compreendendo substituições de resíduos de aminoácidos de alça de superfície por mutagênese aleatória, racional e/ou degenerada são conhecidos na técnica.

**[130]** Esta abordagem abrangente apresenta uma tecnologia de plataforma que pode ser aplicada para modificar qualquer capsídeo de AAV. A aplicação desta tecnologia de plataforma produz variantes de AAV derivadas do modelo de capsídeo de AAV original que possuem eficiência de transdução desejável. Como uma vantagem e benefício, a aplicação desta tecnologia expandirá a coorte de pacientes elegíveis para terapia gênica com vetores de AAV.

**[131]** Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um método de produção de um vetor de vírus, o método compreendendo fornecer a uma célula: (a) um modelo de ácido nucleico compreendendo pelo menos uma sequência de TR (por exemplo, sequência de TR de AAV), e (b) sequências de AAV suficientes para a replicação do modelo de ácido nucleico e encapsidação em capsídeos de AAV (por exemplo, sequências rep de AAV e sequências cap de AAV que codificam os capsídeos de AAV da divulgação). Opcionalmente, o modelo de ácido nucleico compreende ainda pelo menos uma sequência de ácidos nucleicos heterólogos. Em modalidades particulares, o modelo de ácido nucleico compreende duas sequências de ITR de AAV, que estão localizadas 5' e 3' em relação à sequência de ácidos nucleicos heterólogos (se presente), embora não precisem ser diretamente contíguas a esta.

**[132]** O modelo de ácido nucleico e as sequências rep e cap de AAV são fornecidos sob condições tais que o vetor de vírus compreendendo o modelo de ácido nucleico empacotado no capsídeo de AAV é produzido na célula. O método pode compreender ainda a etapa de coleta do vetor de vírus da célula. O vetor de vírus pode ser coletado do meio e/ou por lise das células.

**[133]** A célula pode ser uma célula permissiva para a replicação viral de AAV. Qualquer célula adequada conhecida na técnica pode ser empregada. Em algumas modalidades, a célula é uma célula de mamífero. Como outra opção, a célula pode ser uma linha celular de empacotamento de transcomplementação que fornece funções deletadas de um vírus auxiliar com defeito de replicação, por exemplo, células 293 ou outras células de transcomplementação E1a.

**[134]** As sequências de replicação e de capsídeo de AAV podem ser fornecidas por qualquer método conhecido na técnica. Protocolos atuais tipicamente expressam os genes rep/cap de AAV em um único plasmídeo. As sequências de replicação e empacotamento de AAV não precisam ser fornecidas em conjunto, embora possa ser conveniente fazê-lo. As sequências rep e/ou cap de AAV podem ser fornecidas por qualquer vetor viral ou não viral. Por exemplo, as sequências rep/cap podem ser fornecidas por um adenovírus híbrido ou vetor de herpesvírus (por exemplo, inserido nas regiões E1a ou E3 de um vetor de adenovírus deletado). Os vetores de EBV também podem ser empregados para expressar os genes cap e rep de AAV. Uma vantagem deste método é que os vetores de EBV são episossomais, mas ainda assim manterão um alto número de cópias ao longo de divisões celulares sucessivas (ou seja, são integrados de forma estável na célula como elementos extracromossômicos, designados como um "episoma nuclear baseado em EBV", ver Margolski, (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immun.* 158:67).

**[135]** Como outra alternativa, as sequências rep/cap podem ser incorporadas de forma estável em uma célula.

**[136]** Normalmente, as sequências rep/cap de AAV não serão flanqueadas pelas TRs para evitar resgate e/ou empacotamento dessas sequências.

**[137]** O modelo de ácido nucleico pode ser fornecido à célula usando qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, o modelo pode ser fornecido por um vetor não viral (por exemplo, plasmídeo) ou viral. Em modalidades particulares, o modelo de ácido nucleico é fornecido por um herpesvírus ou vetor de adenovírus (por exemplo, inserido nas regiões E1a ou E3 de um adenovírus deletado). Como outro exemplo, Palombo et al., (1998) *J. Virology* 72:5025, descreve um vetor de baculovírus que carrega um gene repórter flanqueado pelas TRs de AAV. Vetores de EBV também podem ser empregados para distribuir o modelo, conforme descrito acima em relação aos genes rep/cap.

**[138]** Em outra modalidade representativa, o modelo de ácido nucleico é fornecido por um vírus rAAV replicante. Em ainda outras modalidades, um provírus AAV compreendendo o modelo de ácido nucleico é integrado de forma estável no cromossomo da célula.

**[139]** Para aprimorar os títulos de vírus, funções de vírus auxiliares (por exemplo,



adenovírus ou herpesvírus) que promovem uma infecção de AAV produtiva podem ser fornecidas à célula. Sequências de vírus auxiliares necessárias para a replicação de AAV são conhecidas na técnica. Normalmente, essas sequências serão fornecidas por um adenovírus auxiliar ou vetor de herpesvírus. Alternativamente, as sequências de adenovírus ou herpesvírus podem ser fornecidas por outro vetor não viral ou viral, por exemplo, como um miniplasmídeo de adenovírus não infeccioso que carrega todos os genes auxiliares que promovem a produção eficiente de AAV, conforme descrito por Ferrari et al., (1997) Nature Med. 3: 1295, e Patentes US Nº 6.040.183 e 6.093.570.

**[140]** Além disso, as funções do vírus auxiliar podem ser fornecidas por uma célula de empacotamento com as sequências auxiliares incorporadas no cromossomo ou mantidas como um elemento extracromossômico estável. Geralmente, as sequências de vírus auxiliares não podem ser empacotadas em vírions de AAV, por exemplo, não são flanqueadas por TRs.

**[141]** Aqueles versados na técnica reconhecerão que pode ser vantajoso fornecer a

**[142]** replicação de AAV e sequências de capsídeos e as sequências de vírus auxiliares (por exemplo, sequências de adenovírus) em um único construto auxiliar. Este construto auxiliar pode ser um construto não viral ou viral. Como um exemplo não limitativo, o construto auxiliar pode ser um adenovírus híbrido ou um herpesvírus híbrido compreendendo os genes rep/cap de AAV.

**[143]** Em uma modalidade particular, as sequências rep/cap de AAV e as sequências auxiliares de adenovírus são fornecidas por um único vetor auxiliar de adenovírus. Este vetor pode ainda compreender o modelo de ácido nucleico. As sequências rep/cap de AAV e/ou o modelo de rAAV podem ser inseridos em uma região deletada (por exemplo, as regiões E1a ou E3) do adenovírus.

**[144]** Em uma modalidade adicional, as sequências rep/cap de AAV e as sequências auxiliares de adenovírus são fornecidas por um único vetor auxiliar de adenovírus. De acordo com esta modalidade, o modelo de rAAV pode ser fornecido como um modelo de plasmídeo.

**[145]** Em outra modalidade exemplificativa, as sequências rep/cap de AAV e sequências auxiliares de adenovírus são fornecidas por um único vetor auxiliar de

adenovírus, e o modelo de rAAV é integrado na célula como um provírus. Alternativamente, o modelo de rAAV é fornecido por um vetor de EBV que é mantido dentro da célula como um elemento extracromossômico (por exemplo, como um epissoema nuclear à base de EBV).

**[146]** Em uma modalidade exemplificativa adicional, as sequências rep/cap de AAV e as sequências auxiliares de adenovírus são fornecidas por um único auxiliar de adenovírus. O modelo de rAAV pode ser fornecido como um vetor viral de replicação separado. Por exemplo, o modelo de rAAV pode ser fornecido por uma partícula de rAAV ou uma segunda partícula de adenovírus recombinante.

**[147]** De acordo com os métodos anteriores, o vetor de adenovírus híbrido tipicamente compreende tipicamente as sequências cis 5' e 3' de adenovírus suficientes para replicação e empacotamento de adenovírus (isto é, as repetições terminais de adenovírus e a sequência PAC). As sequências rep/cap de AAV e, se presente, o modelo de rAAV são incorporados na estrutura do adenovírus e são flanqueados pelas sequências cis 5' e 3', de modo que essas sequências podem ser empacotadas em capsídeos de adenovírus. Conforme descrito acima, as sequências auxiliares de adenovírus e as sequências rep/cap de AAV geralmente não são flanqueadas por TRs, de modo que essas sequências não são empacotadas nos vírions de AAV.

**[148]** Zhang et al., ((2001) Gene Ther. 18:704-12) descrevem um auxiliar quimérico compreendendo adenovírus e os genes rep e cap de AAV.

**[149]** O herpesvírus também pode ser usado como um vírus auxiliar nos métodos de empacotamento de AAV. Os herpesvírus híbridos que codificam a(s) proteína(s) Rep de AAV podem facilitar vantajosamente os esquemas de produção de vetores de AAV escalonáveis. Um vetor de vírus herpes simplex tipo I (HSV-I) híbrido que expressa os genes rep e cap de AAV-2 foi descrito (Conway et al., (1999) Gene Therapy 6:986 e WO 00/17377).

**[150]** Como outra alternativa, os vetores de vírus da divulgação podem ser produzidos em células de inseto usando vetores de baculovírus para distribuir os genes rep/cap e o modelo de rAAV conforme descrito, por exemplo, por Urabe et al., (2002) Human Gene Therapy 13: 1935-43.

**[151]** Os estoques de vetores de AAV sem vírus auxiliar contaminantes podem ser

obtidos por qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, AAV e vírus auxiliar podem ser facilmente diferenciados com base no tamanho. O AAV também pode ser separado do vírus auxiliar com base na afinidade por um substrato de heparina (Zolotukhin et al. (1999) Gene Therapy 6:973). Vírus auxiliares de replicação defeituosa deletados podem ser usados de forma que qualquer vírus auxiliar contaminante não seja competente para replicação. Como outra alternativa, um adenovírus auxiliar sem expressão gênica tardia pode ser empregado, uma vez que apenas a expressão gênica precoce de adenovírus é necessária para mediar o empacotamento do vírus AAV. Mutantes de adenovírus defeituosos para expressão gênica tardia são conhecidos na técnica (por exemplo, mutantes de adenovírus ts100K e ts149).

#### **Vetores de Vírus Recombinantes**

**[152]** Os vetores de vírus da presente divulgação são úteis para a distribuição de ácidos nucleicos a células in vitro, ex vivo e in vivo. Em particular, os vetores de vírus podem ser vantajosamente empregados para distribuir ou transferir ácidos nucleicos para células de animais, incluindo mamíferos. Assim, em algumas modalidades, um ácido nucleico ("ácido nucleico de carga") pode ser encapsidado por uma proteína do capsídeo da divulgação.

**[153]** Em algumas modalidades, a divulgação fornece um vetor de AAV compreendendo uma proteína de capsídeo recombinante com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência com qualquer uma das SEQ ID NO: 11-12, 23-49 ou 195-254. Em algumas modalidades, um vetor de AAV compreendendo uma proteína de capsídeo recombinante com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência com qual que uma dentre SEQ ID NO: 32, 35, 37 ou 40. Em algumas modalidades, um vetor viral de AAV compreende uma proteína do capsídeo recombinante com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência com qualquer uma dentre as SEQ ID NO: 11-12, 23-49 ou 195-254 e compreende ainda um ácido nucleico de carga encapsidado pela proteína do capsídeo. Em algumas modalidades, um vetor viral de AAV compreende uma

proteína de capsídeo recombinante com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência com qualquer uma dentre as SEQ ID NO: 32, 35, 37 ou 40 e compreende ainda um ácido nucleico de carga encapsidado pela proteína do capsídeo. Em algumas modalidades, os vetores de AAV têm como alvo e infectam especificamente um tecido do olho (como o RPE ou a retina). Em algumas modalidades, os vetores de AAV exibem transdução aprimorada para o olho (por exemplo, o RPE ou a retina) em comparação com um capsídeo de AAV precursor.

**[154]** A sequência de ácidos nucleicos de carga distribuída nos vetores de vírus da presente divulgação pode ser qualquer (ou quaisquer) sequência(s) de ácidos nucleicos heteróloga(s) de interesse. Os ácidos nucleicos de interesse incluem ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos, incluindo polipeptídeos ou RNAs terapêuticos (por exemplo, para usos médicos ou veterinários) ou imunogênicos (por exemplo, para vacinas).

**[155]** Os polipeptídeos terapêuticos incluem, mas não estão limitados a, proteína reguladora transmembranar de fibrose cística (CFTR), distrofina (incluindo mini- e microdistrofinas, ver, por exemplo, Vincent et al, (1993) Nature Genetics 5: 130; Publicação de Patente US Nº 2003/017131; Publicação internacional WO/2008/088895, Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 97: 1 3714-13719 (2000); e Gregorevic et al., Mol. Ther. 16:657-64 (2008)), propeptídeo de miostatina, folistatina, receptor solúvel de ativina tipo 11, IGF-1, apolipoproteínas, tais como apoA (apoA1, apoA2, apoA4, apoA-V), apoB (apoB100, ApoB48), apoC (apoCI, apoCII, apoCIII, apoCIV), apoD, apoE, apoH, apoL, apo(a), polipeptídeos anti-inflamatórios, como o mutante dominante Ikappa B, amiloide beta, tau, sarcospana, utrofina (Tinsley et al, (1996) Nature 384:349), miniutrofina, fatores de coagulação (por exemplo, Fator VIII, Fator IX, Fator X, etc.), eritropoietina, angiostatina, endostatina, catalase, tirosina hidroxilase, superóxido dismutase, leptina, o receptor de LDL, lipoproteína lipase, progranulina, ornitina transcarbamilase,  $\beta$ -globina,  $\alpha$ -globina, espectrina, alfa-1-antitripsina, adenosina desaminase, hipoxantina guanina fosforibosil transferase,  $\beta$ -glucocerebrosidase, batenina, esfingomielinase, lisossomal hexosaminidase A, cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada, frataxina, proteína RP65, citocinas (por exemplo, alfa-interferon, beta-interferon,

gama-interferon, interleucina-2, interleucina-4, alfa sinucleína, parkina, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófago, linfotóxina e similares), fatores de crescimento de peptídeo, fatores neurotróficos e hormônios (por exemplo, somatotropina, insulina, fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2, fator de crescimento derivado de plaqueta, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento nervoso, fator neurotrófico -3 e -4, fator neurotrófico derivado do cérebro, proteínas morfogênicas ósseas [incluindo RANKL e VEGF], fator de crescimento derivado da glia, fator de crescimento transformador  $-\alpha$  e  $-\beta$  e similares), huntingtina, ácido lisossomal alfa-glucosidase, iduronato-2-sulfatase, N-sulfoglucosamina sulfo-hidrolase, alfa-galactosidase A, receptores (por exemplo, o receptor solúvel do fator de crescimento de necrose tumoral), S100A1, proteína ubiquitina ligase E3, parvalbumina, adenilil ciclase tipo 6, uma molécula que modula a manipulação de cálcio (por exemplo, SERCA<sub>2A</sub>, inibidor 1 de PP1 e seus fragmentos [por exemplo, WO 2006/029319 e WO 2007/100465]), uma molécula que efetua o silenciamento do receptor acoplado a proteína G quinase tipo 2, como um bARKct constitutivamente ativo truncado, fatores anti-inflamatórios, como IRAP, proteínas antimiotatina, aspartoacilase, anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de cadeia única; um Mab exemplificativo é o Mab Herceptin®), neuropeptídeos e fragmentos destes (por exemplo, galanina, Neuropeptídeo Y (ver, US 7.071.172)), inibidores de angiogênese, como Vasoibinas e outros inibidores de VEGF (por exemplo, Vasoibina 2 [ver, WO JP2006/073052]). Outras sequências de ácidos nucleicos heterólogas exemplificativas codificam produtos de genes suicidas (por exemplo, timidina quinase, citosina desaminase, toxina de difteria e fator de necrose tumoral), proteínas que aumentam ou inibem a transcrição de fatores do hospedeiro (por exemplo, Cas9 morto por nuclease ligado a um potencializador de transcrição ou elemento inibidor, proteínas de dedo de zinco ligadas a um potencializador de transcrição ou elemento inibidor, efetores semelhantes a ativadores de transcrição (TAL) ligados a um potencializador de transcrição ou elemento inibidor), proteínas que conferem resistência a um fármaco usado na terapia do câncer, produtos de genes supressores de tumor (por exemplo, p53, Rb, Wt-1), TRAIL, ligante de FAS, RS1, opsina, TKR-beta, C3, CFH e qualquer outro

polipeptídeo que tenha um efeito terapêutico em um sujeito em necessidade. Em algumas modalidades, um vetor de AAV pode ser usado para distribuir uma proteína complementar, como C21a, C4b, C3a, C3b, C5a, C5b, C6, C7, C8 ou C9. Os vetores de AAV também podem ser usados para distribuir anticorpos monoclonais e fragmentos de anticorpos, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de anticorpo direcionado contra miostatina (ver, por exemplo, Fang et al., *Nature Biotechnology* 23:584-590 (2005)). As sequências de ácidos nucleicos heterólogas que codificam polipeptídeos incluem as que codificam polipeptídeos repórteres (por exemplo, uma enzima). Os polipeptídeos repórteres são conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, Proteína Fluorescente Verde,  $\beta$ -galactosidase, fosfatase alcalina, luciferase e gene da cloranfenicol acetiltransferase.

**[156]** Opcionalmente, o ácido nucleico heterólogo codifica um polipeptídeo secretado (por exemplo, um polipeptídeo que é um polipeptídeo secretado em seu estado nativo ou que foi projetado para ser secretado, por exemplo, por associação operável com uma sequência de sinal secretora como é conhecido na técnica).

**[157]** Alternativamente, em modalidades particulares desta divulgação, o ácido nucleico heterólogo pode codificar um ácido nucleico antisense, uma ribozima (por exemplo, conforme descrito na Patente US Nº 5.877.022), RNAs que afetam mediados por spliceossomos/ram-splicing (ver, Puttaraju et al, (1999) *Nature Biotech.* 17:246; Patente US Nº 6.013.487; Patente US Nº 6.083.702), RNAs de interferência (RNAi), incluindo siRNA, shRNA ou miRNA que medeiam o silenciamento de genes (ver Sharp et al, (2000) *Science* 287: 2431) e outros RNAs não traduzidos, como RNAs "guia" (Gorman et al., (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 4929; Patente US Nº 5.869.248 de Yuan et al.) e semelhantes. RNAs não traduzidos exemplares incluem RNAi contra um produto de gene de resistência a múltiplas drogas (MDR) (por exemplo, para tratar e/ou prevenir tumores e/ou para administração ao coração para prevenir danos por quimioterapia), RNAi contra miostatina (por exemplo, para distrofia muscular de Duchenne), RNAi contra VEGF (por exemplo, para tratar e/ou prevenir tumores), RNAi contra fosfolambano (por exemplo, para tratar doenças cardiovasculares, ver, por exemplo, Andino et al., *J. Gene Med.* 10: 132-142 (2008) e Li et al., *Acta Pharmacol Sin.* 26:51-55 (2005)); moléculas inibidoras ou dominantes negativas de fosfolambam, como fosfolambam

S 16E (por exemplo, para tratar doenças cardiovasculares, ver, por exemplo, Hoshijima et al. Nat. Med. 8:864-871 (2002)), RNAi para adenosina quinase (por exemplo, para epilepsia) e RNAi direcionado contra organismos patogênicos e vírus (por exemplo, vírus da hepatite B e/ou C, vírus da imunodeficiência humana, CMV, vírus herpes simplex, vírus do papiloma humano, etc.).

**[158]** Além disso, uma sequência de ácidos nucleicos que direciona o splicing alternativo pode ser distribuída. Para ilustrar, uma sequência antisense (ou outra sequência inibitória) complementar ao sítio de splice 5' e/ou 3' do éxon 51 da distrofina pode ser distribuída em conjunto com um promotor de RNA nuclear pequeno (sn) U1 ou U7 para induzir o salto deste éxon. Por exemplo, uma sequência de DNA compreendendo um promotor de snRNA U1 ou U7 localizado 5' em relação à(s) sequência(s) antisense/inibitória(s) pode ser empacotada e distribuída em um capsídeo modificado da divulgação.

**[159]** Em algumas modalidades, uma sequência de ácidos nucleicos que direciona a edição gênica pode ser distribuída. Por exemplo, o ácido nucleico pode codificar um RNA guia. Em algumas modalidades, o RNA guia é um único RNA guia (sgRNA) que compreende uma sequência de crRNA e uma sequência de tracrRNA. Em algumas modalidades, o ácido nucleico pode codificar uma nuclease. Em algumas modalidades, a nuclease é uma nuclease de dedo de zinco, uma endonuclease homing, uma TALEN (nuclease efetora semelhante a ativador de transcrição), uma NgAgo (endonuclease agronauta), uma SGN (endonuclease guiada por estrutura), uma RGN (nuclease guiada por RNA), ou variantes modificadas ou truncadas destes. Em algumas modalidades, a nuclease guiada por RNA é uma nuclease Cas9, uma nuclease Cas12(a) (Cpf1), uma nuclease Cas12b, uma nuclease Cas12c, uma nuclease semelhante a TrpB, uma nuclease Cas13a (C2c2), uma nuclease Cas13b, uma nuclease Cas14, ou suas variantes modificadas ou truncadas. Em algumas modalidades, a nuclease Cas9 é isolada ou derivada de *pyogenes* ou *S. aureus*.

**[160]** Em algumas modalidades, uma sequência de ácido nucleico que direciona inativação do gene pode ser distribuída. Por exemplo, a sequência de ácido nucleico pode codificar um siRNA, um shRNA, um microRNA ou um ácido nucleico antisense. O vetor de vírus também pode compreender um ácido nucleico

heterólogo que compartilha homologia e se recombina com um locus em um cromossomo hospedeiro. Esta abordagem pode ser utilizada, por exemplo, para corrigir um defeito genético na célula hospedeira.

**[161]** O vetor de vírus também pode compreender um ácido nucleico heterólogo que compartilha homologia e se recombina com um locus em um cromossomo hospedeiro. Esta abordagem pode ser utilizada, por exemplo, para corrigir um defeito genético na célula hospedeira.

**[162]** A presente divulgação também fornece vetores de vírus que expressam um polipeptídeo imunogênico, por exemplo, para vacinação. O ácido nucleico pode codificar qualquer imunógeno de interesse conhecido na técnica, incluindo, mas não se limitando aos imunógenos do vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da imunodeficiência símia (SIV), vírus da influenza, proteínas gag do HIV ou SIV, antígenos tumorais, antígenos cancerosos, antígenos bacterianos, antígenos virais e semelhantes.

**[163]** O uso de parvovírus como vetores de vacina é conhecido na técnica (ver, por exemplo, Miyamura et al, (1994) Proc. Nat. Acad. Sci USA 91:8507; Patente US Nº 5.916.563 de Young et al, Patente US Nº 5.905.040 para Mazzara et al, Patente US Nº 5.882.652, Patente US Nº 5.863.541 para Samulski et al). O antígeno pode ser apresentado no capsídeo do parvovírus.

**[164]** Alternativamente, o antígeno pode ser expresso a partir de um ácido nucleico heterólogo introduzido em um genoma de vetor recombinante. Qualquer imunógeno de interesse como descrito neste documento e/ou como é conhecido na técnica pode ser fornecido pelo vetor de vírus da presente divulgação.

**[165]** Um polipeptídeo imunogênico pode ser qualquer polipeptídeo adequado para desencadear uma resposta imune e/ou proteger o sujeito contra uma infecção e/ou doença, incluindo, mas não se limitando a infecções e doenças microbianas, bacterianas, protozoárias, parasitárias, fúngicas e/ou virais. Por exemplo, o polipeptídeo imunogênico pode ser um imunógeno de ortomixovírus (por exemplo, um imunógeno do vírus influenza, como a proteína de superfície da hemaglutinina (HA) do vírus influenza ou a nucleoproteína do vírus influenza, ou um imunógeno do vírus influenza equina) ou um imunógeno do lentivírus (por exemplo, um imunógeno do vírus da anemia infecciosa equina, um imunógeno do vírus de



imunodeficiência símia (SIV) ou um imunógeno do vírus de imunodeficiência humana (HIV), como a proteína GP 160 do envelope do HIV ou SIV, a matriz/proteínas do capsídeo do HIV ou SIV e o HIV ou Produtos dos genes SIV gag, pol e env). O polipeptídeo imunogênico também pode ser um imunógeno de arenavírus (por exemplo, imunógeno do vírus da febre de Lassa, como a proteína do nucleocapsídeo do vírus da febre de Lassa e a glicoproteína do envelope da febre de Lassa), um imunógeno de poxvírus (por exemplo, um imunógeno do vírus de vaccinia, como o vaccinia LI ou produtos do gene L8), um imunógeno de flavivírus (por exemplo, um imunógeno do vírus da febre amarela ou um imunógeno do vírus da encefalite japonesa), um imunógeno de filovírus (por exemplo, um imunógeno do vírus Ebola ou um imunógeno do vírus de Marburg, como os produtos dos genes NP e GP), um imunógeno de bunyavírus (por exemplo, imunógenos de vírus RVFV, CCHF e/ou SFS) ou um imunógeno de coronavírus (por exemplo, um imunógeno de coronavírus humano infeccioso, como a glicoproteína de envelope de coronavírus humano, ou um imunógeno de vírus de gastroenterite porcina, ou um vírus infeccioso aviário imunógeno do vírus da bronquite). O polipeptídeo imunogênico pode ainda ser um imunógeno de poliomielite, um imunógeno de herpes (por exemplo, imunógenos de CMV, EBV, HSV), um imunógeno da caxumba, um imunógeno do sarampo, um imunógeno da rubéola, uma toxina da difteria ou outro imunógeno da difteria, um antígeno da coqueluche, um imunógeno da hepatite (por exemplo, hepatite A, hepatite B, hepatite C, etc.) e/ou qualquer outro imunógeno de vacina atualmente conhecido na técnica ou posteriormente identificado como um imunógeno<sup>o</sup>

**[166]** Alternativamente, o polipeptídeo imunogênico pode ser qualquer tumor ou antígeno de células cancerosas. Opcionalmente, o tumor ou antígeno canceroso é expresso na superfície da célula cancerosa.

**[167]** Câncer exemplificativo e antígenos de células tumorais são descritos em SA Rosenberg (Immunity 10: 281 (1991)). Outros antígenos de câncer e tumor ilustrativos incluem, mas não estão limitados a: produto do gene BRCA1, produto do gene BRCA2, gp100, tirosinase, GAGE- 1/2, BAGE, RAGE, LAGE, NY-ESO-1, CDK-4,  $\beta$ -catenina, MUM-1, Caspase-8, KIAA0205, HPVE, SART-1, FRAME, p15, antígenos de tumor de melanoma (Kawakami et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 91:3515; Kawakami et al., (1994) J. Exp. Med., 180:347; Kawakami et al., (1994) Cancer Res. 54:3124), MART-1, gp100, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, CEA, TRP-1, TRP-2, P-15, tirosinase (Brichard et al., (1993) J Exp. Med. 178:489); produto do gene HER-2/neu (Pat US Nº 4.968.603), CA 125, LK26, FB5 (endosialina), TAG 72, AFP, CA 19-9, NSE, DU-PAN-2, CA50, SPan-1, CA72-4, HCG, STN (antígeno sialil Tn), proteínas de c-erbB2, PSA, L-CanAg, receptor de estrogênio, globulina de gordura do leite, proteína supressora de tumor p53 (Levine, (1993) Ann. Rev. Biochem. 62: 623); antígenos de mucina (Publicação de Patente Internacional Nº WO 90/05142); telomerasas; proteínas da matriz nuclear; fosfatase ácida prostática; antígenos do vírus do papiloma; e/ou antígenos agora conhecidos ou posteriormente descobertos como associados aos seguintes cânceres: melanoma, adenocarcinoma, timoma, linfoma (por exemplo, linfoma não-Hodgkin, linfoma de Hodgkin), sarcoma, câncer de pulmão, câncer de fígado, câncer de cólon, leucemia, câncer uterino, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de bexiga, câncer de rim, câncer de pâncreas, câncer de cérebro e qualquer outro câncer ou condição maligna ou metástase agora conhecida ou posteriormente identificada (ver, por exemplo, Rosenberg, (1996) Ann. Rev. Med. 47: 481-91).

**[168]** Como outra alternativa, o ácido nucleico heterólogo pode codificar qualquer polipeptídeo que é desejavelmente produzido em uma célula in vitro, ex vivo ou in vivo. Por exemplo, os vetores de vírus podem ser introduzidos em células de cultura e o produto do gene expresso isolado delas.

**[169]** Será entendido por aqueles versados na técnica que o (s) ácido (s) nucleico (s) heterólogo (s) de interesse podem ser operacionalmente associados a sequências de controle apropriadas. Por exemplo, o ácido nucleico heterólogo pode ser operacionalmente associado a elementos de controle de expressão, tais como sinais de controle de transcrição/tradução, origens de replicação, sinais de poliadenilação, sítios de entrada de ribossomo interno (IRES), promotores e/ou potencializadores e semelhantes.

**[170]** Além disso, a expressão regulada do (s) ácido (s) nucleico (s) heterólogo (s) de interesse pode ser alcançada no nível pós-transcricional, por exemplo, regulando o splicing seletivo de diferentes íntrons pela presença ou ausência de

um oligonucleotídeo, molécula pequena e/ou outro composto que bloqueia seletivamente a atividade de splicing em sítios específicos (por exemplo, conforme descrito em WO 2006/119137).

**[171]** Os versados na técnica reconhecerão que uma variedade de elementos promotores/potencializadores podem ser usados dependendo do nível e da expressão específica de tecido desejada. O promotor/potencializador pode ser constitutivo ou indutível, dependendo do padrão de expressão desejado. O promotor/potencializador pode ser nativo ou estrangeiro e pode ser uma sequência natural ou sintética. Por estrangeiro, pretende-se que a região de iniciação da transcrição não seja encontrada no hospedeiro de tipo selvagem no qual a região de iniciação da transcrição é introduzida.

**[172]** Em modalidades particulares, os elementos promotores/potencializadores podem ser nativos da célula alvo ou sujeito a ser tratado. Em modalidades representativas, o elemento promotor/potencializador pode ser nativo para a sequência de ácido nucleico heteróloga. O elemento promotor/potencializador é geralmente escolhido de modo que funcione na (s) célula (s) alvo de interesse. Além disso, em modalidades particulares, o elemento promotor/potencializador é um elemento promotor/potencializador de mamífero. O elemento promotor/potencializador pode ser constitutivo ou indutível.

**[173]** Elementos de controle de expressão indutíveis são tipicamente vantajosos nos pedidos em que é desejável fornecer regulação sobre a expressão da (s) sequência (s) de ácido nucleico heteróloga. Os elementos promotores/potencializadores induzíveis para a distribuição do gene podem ser elementos promotores/ potencializadores específicos do tecido ou preferidos e incluem músculo específico ou preferido (incluindo específico ou preferido do músculo cardíaco, esquelético e/ou liso), tecido neural específico ou preferido (incluindo específico do cérebro ou preferido), específico do olho ou preferido (incluindo específico da retina e específico da córnea), específico do fígado ou preferido, específico da medula óssea ou preferido, específico do pâncreas ou preferido, específico do baço ou preferido, e específico do pulmão ou elementos do promotor preferido/potencializador. Outros elementos promotores/potencializadores indutíveis incluem elementos indutíveis por

hormônios e indutíveis por metal. Promotores/elementos potencializadores indutíveis exemplares incluem, mas não estão limitados a um elemento Tet on/off, um promotor indutível por RU486, um promotor indutível por ecdisona, um promotor indutível por rapamicina e um promotor de metalotioneína.

**[174]** Em modalidades em que a (s) sequência (s) de ácido nucleico heterólogo (s) é (são) transcrita (s) e então traduzida (s) nas células alvo, sinais de iniciação específicos são geralmente incluídos para tradução eficiente de sequências de codificação de proteína inseridas. Estas sequências de controle de tradução exógenas, que podem incluir o códon de iniciação ATG e sequências adjacentes, podem ser de uma variedade de origens, naturais e sintéticas.

**[175]** Os vetores de vírus de acordo com a presente divulgação fornecem um meio para a entrega de ácidos nucleicos heterólogos em uma ampla gama de células, incluindo células em divisão e não divisão. Os vetores de vírus podem ser empregados para entregar um ácido nucleico de interesse a uma célula in vitro, por exemplo, para produzir um polipeptídeo in vitro ou para terapia genética ex vivo. Os vetores de vírus são adicionalmente úteis em um método de entrega de um ácido nucleico a um sujeito em necessidade, por exemplo, para expressar um polipeptídeo imunogênico ou terapêutico ou um RNA funcional. Desta forma, o polipeptídeo ou RNA funcional pode ser produzido in vivo no sujeito. O sujeito pode necessitar do polipeptídeo porque o sujeito tem uma deficiência do polipeptídeo. Além disso, o método pode ser praticado porque a produção do polipeptídeo ou RNA funcional no sujeito pode conferir algum efeito benéfico.

**[176]** Os vetores de vírus também podem ser usados para produzir um polipeptídeo de interesse ou RNA funcional em células cultivadas ou em um sujeito (por exemplo, usando o sujeito como um biorreator para produzir o polipeptídeo ou para observar os efeitos do RNA funcional no sujeito, por exemplo, em conexão com métodos de triagem).

**[177]** Em geral, os vetores de vírus da presente divulgação podem ser empregues para distribuir um ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo ou RNA funcional para tratar e/ou prevenir qualquer estado de doença para o qual seja benéfico distribuir um polipeptídeo terapêutico ou RNA funcional. Estados de doença exemplificativos incluem, mas não estão limitados a: fibrose cística

(proteína reguladora da membrana da fibrose cística) e outras doenças do pulmão, hemofilia A (Fator VIII), hemofilia B (Fator IX), talassemia ( $\beta$ -globina), anemia (eritropoietina) e outras doenças do sangue. Doença de Alzheimer (GDF; neprilina), esclerose múltipla (interferon- $\beta$ ), doença de Parkinson (fator neurotrófico derivado da linhagem celular glial [GDNF]), doença de Huntington (RNAi para remover repetições), doença de Canavan, esclerose lateral amiotrófica, epilepsia (galanina, fatores neurotróficos) e outros distúrbios neurológicos, câncer (endostatina, angiostatina, TRAIL, ligante FAS, citocinas, incluindo interferons; RNAi incluindo RNAi contra VEGF ou o produto gênico de resistência a múltiplas drogas, mir-26a [por exemplo, para carcinoma hepatocelular]), diabetes mellitus (insulina), distrofias musculares incluindo Duchenne (distrofina, minidistrofina, fator de crescimento semelhante à insulina I, um sarcoglicano [por exemplo,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ], RNAi contra propeptídeo de miostatina, folistatina, receptor solúvel de ativina tipo II, polipeptídeos anti-inflamatórios, como o mutante dominante de Ikappa B, sarcospana, utrofina, mini-utrofina, antisense ou RNAi contra junções de splice no gene da distrofina para induzir o salto de éxon [ver, por exemplo, WO/2003/095647], antisense contra U7 snRNAs para induzir o salto de éxon [ver, por exemplo, WO/2006/021724] e anticorpos ou fragmentos de anticorpos contra miostatina ou propeptídeo de miostatina) e distrofia muscular de Becker, distrofia miotônica 1 ou 2, distrofia muscular fascio-escápulo-umeral (FSHD), Doença de Gaucher (glucocerebrosidase), doença de Hurler ( $\alpha$ -L-iduronidase), deficiência de adenosina desaminase (adenosina desaminase), doenças de armazenamento de glicogênio (por exemplo, doença de Fabry [ $\alpha$ -galactosidase] e doença de Pompe [ácido lisossomal alfa-glucosidase]) e outros distúrbios metabólicos, enfisema congênito (alfa-1-antitripsina), Síndrome de Lesch-Nyhan (hipoxantina guanina fosforibosil transferase), doença de Niemann-Pick (esfingomielinase), doença de Tay-Sachs (hexosaminidase lisossomal A), demência frontotemporal, Doença da Urina do Xarope de Bordo (desidrogenase de ácido ceto de cadeia ramificada), doenças degenerativas da retina (e outras doenças do olho e da retina; por exemplo, PDGF para degeneração macular e/ou vasoibina ou outros inibidores de VEGF ou outros inibidores da angiogênese para tratar/prevenir distúrbios da retina, por exemplo, em diabetes Tipo I), doenças de órgãos sólidos, como cérebro

(incluindo doença de Parkinson [GDNF], astrocitomas [endostatina, angiostatina e/ou RNAi contra VEGF], glioblastomas [endostatina, angiostatina e/ou RNAi contra VEGF]), fígado, rim, coração, incluindo insuficiência cardíaca congestiva ou doença arterial periférica (PAD) (por exemplo, pela distribuição de inibidor da proteína fosfatase 1 (I-1) e seus fragmentos (por exemplo, IIC), serca2a, proteínas de dedo de zinco que regulam o gene fosfolambano, Barkct, [receptor 32-adrenérgico, receptor 2-adrenérgico quinase (BARK), fosfoinositídeo-3 quinase (PI3 quinase), S100A1, parvalbumina, adenilil ciclase tipo 6, uma molécula que efetua a inativação do receptor acoplado à proteína G quinase tipo 2, como um bARKct constitutivamente ativo truncado; cal sarcina, RNAi contra fosfolambano; inibidor de fosfolambano ou moléculas dominante-negativas, como fosfolambano S16E, etc.), artrite (fatores de crescimento semelhantes à insulina), distúrbios articulares (fator de crescimento semelhante à insulina 1 e/ou 2), hiperplasia intimal (por exemplo, por distribuição de enos, inos), sobrevivência aprimorada de transplantes de coração (superóxido dismutase), AIDS (CD4 solúvel), perda de massa muscular (fator de crescimento semelhante à insulina I), deficiência renal (eritropoietina), anemia (eritropoietina), artrite (fatores antiinflamatórios, como I RAP e receptor solúvel de TNFa), hepatite (a-interferon), deficiência do receptor de LDL (receptor de LDL), hiperamonemia (ornitina transcarbamilase), doença de Krabbe (galactocerebrosidase), doença de Batten, ataxias cerebrais espinhais, incluindo SCA1, SCA2 e SCA3, fenilcetonúria (fenilalanina hidroxilase), doenças autoimunes e semelhantes A divulgação pode ainda ser usada após o transplante de órgão para aumentar o sucesso do transplante e/ou para reduzir os efeitos colaterais negativos do transplante de órgão ou terapias adjuvantes (por exemplo, pela administração de agentes imunossupressores ou ácidos nucleicos inibidores para bloquear a produção de citocinas). Como outro exemplo, proteínas morfogênicas ósseas (incluindo BNP 2, 7, etc., RANKL e/ou VEGF) podem ser administradas com um aloenxerto ósseo, por exemplo, após uma fratura ou remoção cirúrgica em um paciente com câncer.

**[178]** Em algumas modalidades, os vetores de vírus da presente divulgação podem ser empregues para distribuir um ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo ou RNA funcional para tratar e/ou prevenir uma doença ou distúrbio

do fígado. A doença ou distúrbio do fígado pode ser, por exemplo, cirrose biliar primária, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), esteato-hepatite não alcoólica (NASH), hepatite autoimune, hepatite B, hepatite C, doença hepática alcoólica, fibrose, icterícia, colangite esclerosante primária (PSC), síndrome de BuddChiari, hemocromatose, doença de Wilson, fibrose alcoólica, fibrose não alcoólica, esteatose hepática, síndrome de Gilbert, atresia biliar, deficiência de alfa-1-antitripsina, síndrome de alagille, colestase intra-hepática familiar progressiva, Hemofilia B, Angioedema hereditário (HAE), Hipercolesterolemia Familiar Homozigótica (HoFH), Hipercolesterolemia Familiar Heterozigótica (HeFH), Doença de Von Gierke (GSD I), Hemofilia A, Acidemia Metilmalônica, Acidemia Propiônica, Homocistinúria, Deficiência de Fenilcetonúria Tipo 1, Deficiência de Arginemia Lyinocetonúria (PKU), deficiência de carbamoil-fosfato sintetase 1, citrulinemia tipo 1, deficiência de citrina, síndrome de Crigler-Najjar Tipo 1, Cistinose, Doença de Fabry, Doença de Armazenamento de Glicogênio 1b, Deficiência de LPL, Deficiência de N-Acetilglutamato Sintetase, Deficiência de Ornitina Transcarbamilase, Deficiência de Ornitina Translocase, Hiperoxalúria Primária Tipo 1, ou ADA SCID.

**[179]** A divulgação também pode ser usada para produzir células-tronco pluripotentes induzidas (iPS). Por exemplo, um vetor de vírus da divulgação pode ser usado para entregar ácido (s) nucleico (s) associado (s) a células-tronco em uma célula não pluripotente, como fibroblastos adultos, células da pele, células do fígado, células renais, células adiposas, células cardíacas, neurais células, células epiteliais, células endoteliais e semelhantes.

**[180]** Os ácidos nucleicos que codificam os fatores associados às células-tronco são conhecidos na técnica. Exemplos não limitativos de tais fatores associados a células-tronco e pluripotência incluem Oct-3/4, a família SOX (por exemplo, SOX 1, SOX2, SOX3 e/ou SOX 15), a família Klf (por exemplo, Klf1, Klf4 e/ou Klf5), a família Myc (por exemplo, C-myc, L-myc e/ou N-myc), NANOG e/ou LIN28.

**[181]** A divulgação também pode ser praticada para tratar e/ou prevenir um distúrbio metabólico, como diabetes (por exemplo, insulina), hemofilia (por exemplo, Fator IX ou Fator VIII), um distúrbio de armazenamento lisossomal, como um distúrbio de mucopolissacaridose (por exemplo, síndrome de Sly [ $\beta$ -

glucuronidase], Síndrome de Hurler [alfa-L-iduronidase], Síndrome de Scheie [alfa-L-iduronidase], Síndrome de Hurler-Scheie [alfa-L-iduronidase], Síndrome de Hunter [iduronato sulfatase], Síndrome de Sanfilippo A [heparan sulfamidase], B[Nacetilglucosaminidase], C[acetil-CoA:alfa-glucosaminida acetiltransferase], D[Nacetilglucosamina 6-sulfatase], Síndrome de Morquio A [galactoses-sulfato sulfatase], B [ $\beta$ galactosidase], Síndrome de Maroteaux-Lamy [N-acetilgalactosamina-4-sulfatase], etc.), doença de Fabry (alfa-galactosidase), doença de Gaucher (glicocerebrosidase) ou um glicogênio distúrbio de armazenamento (por exemplo, doença de Pompe; ácido lisossomal alfa-glucosidase).

**[182]** A transferência de genes tem uso substancial para compreender e fornecer terapia para estados de doença. Existem várias doenças hereditárias nas quais os genes defeituosos são conhecidos e foram clonados. Em geral, os estados de doença acima caem em duas classes: estados de deficiência, geralmente de enzimas, que geralmente são herdados de maneira recessiva, e estados desequilibrados, que podem envolver proteínas regulatórias ou estruturais, e que são tipicamente herdados de maneira dominante. Para doenças em estado de deficiência, a transferência de genes pode ser usada para trazer um gene normal para os tecidos afetados para terapia de substituição, bem como para criar modelos animais para a doença usando mutações antisense. Para estados de doença desequilibrados, a transferência de genes pode ser usada para criar um estado de doença em um sistema modelo, que pode então ser usado em esforços para neutralizar o estado de doença. Assim, os vetores de vírus de acordo com a presente divulgação permitem o tratamento e/ou prevenção de doenças genéticas.

**[183]** Os vetores de vírus de acordo com a presente divulgação também podem ser empregados para fornecer um RNA funcional a uma célula in vitro ou in vivo. O RNA funcional pode ser, por exemplo, um RNA não codificante. Em algumas modalidades, a expressão do RNA funcional na célula pode diminuir a expressão de uma proteína alvo específica pela célula. Conseqüentemente, o RNA funcional pode ser administrado para diminuir a expressão de uma proteína particular em um sujeito em necessidade. Em algumas modalidades, a expressão do RNA funcional na célula pode aumentar a expressão de uma proteína alvo particular pela célula.



Conseqüentemente, o RNA funcional pode ser administrado para aumentar a expressão de uma proteína particular em um sujeito em necessidade. Em algumas modalidades, a expressão do RNA funcional pode regular o splicing de um determinado RNA alvo em uma célula. Conseqüentemente, o RNA funcional pode ser administrado para regular o splicing de um RNA específico em um sujeito que dele necessite. Em algumas modalidades, a expressão do RNA funcional na célula pode regular a função de uma proteína alvo específica pela célula. Conseqüentemente, o RNA funcional pode ser administrado para regular a função de uma proteína particular em um sujeito em necessidade. O RNA funcional também pode ser administrado a células in vitro para regular a expressão gênica e/ou fisiologia celular, por exemplo, para otimizar sistemas de cultura de células ou tecidos ou em métodos de triagem.

**[184]** Além disso, os vetores de vírus de acordo com a presente divulgação encontram uso em métodos de diagnóstico e triagem, em que um ácido nucleico de interesse é transitória ou estavelmente expresso em um sistema de cultura de células ou, alternativamente, um modelo de animal transgênico.

**[185]** Os vetores de vírus da presente divulgação também podem ser usados para vários fins não terapêuticos, incluindo, mas sem limitação, ao uso em protocolos para avaliar o direcionamento de genes, depuração, transcrição, tradução, etc., como seria aparente para uma pessoa versada na técnica. Os vetores de vírus também podem ser usados com o propósito de avaliar a segurança (disseminação, toxicidade, imunogenicidade, etc.). Esses dados, por exemplo, são considerados pela United States Food and Drug Administration como parte do processo de aprovação regulatória antes da avaliação da eficácia clínica.

**[186]** Como um outro aspecto, os vetores de vírus da presente divulgação podem ser usados para produzir uma resposta imune em um sujeito. De acordo com esta modalidade, um vetor de vírus compreendendo uma sequência de ácido nucleico heteróloga que codifica um polipeptídeo imunogênico pode ser administrado a um sujeito e uma resposta imune ativa é montada pelo sujeito contra o polipeptídeo imunogênico. Os polipeptídeos imunogênicos são conforme descritos acima. Em algumas modalidades, uma resposta imune protetora é induzida.

**[187]** Alternativamente, o vetor de vírus pode ser administrado a uma célula ex

vivo e a célula alterada é administrada ao sujeito. O vetor de vírus que compreende o ácido nucleico heterólogo é introduzido na célula e a célula é administrada ao sujeito, onde o ácido nucleico heterólogo que codifica o imunógeno pode ser expresso e induzir uma resposta imune no sujeito contra o imunógeno. Em modalidades particulares, a célula é uma célula apresentadora de antígeno (por exemplo, uma célula dendrítica).

**[188]** Uma "resposta imune ativa" ou "imunidade ativa" é caracterizada pela participação de tecidos e células do hospedeiro após um encontro com o imunógeno. Ela envolve a diferenciação e proliferação de células imunocompetentes em tecidos linforreticulares, os quais levam à síntese de anticorpos ou ao desenvolvimento de reatividade mediada por células, ou ambos". Herbert B. Herscovitz, Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation, em IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES 117 (Joseph A. Bellanti ed., 1985). Definido de outra forma, uma resposta imune ativa é montada pelo hospedeiro após a exposição a um imunógeno por infecção ou por vacinação. A imunidade ativa pode ser contrastada com a imunidade passiva, que é adquirida através da transferência de substâncias pré-formadas (anticorpo, fator de transferência, enxerto tímico, interleucina-2) de um hospedeiro ativamente imunizado para um hospedeiro não imune.

**[189]** Uma resposta imune "protetora" ou imunidade "protetora", conforme usado neste documento, indica que a resposta imune confere algum benefício ao sujeito na medida em que previne ou reduz a incidência da doença. Alternativamente, uma resposta imune protetora ou imunidade protetora pode ser útil no tratamento e/ou prevenção de doenças, em particular câncer ou tumores (por exemplo, evitando câncer ou formação de tumor, causando regressão de um câncer ou tumor e/ou prevenindo metástase e/ou impedindo o crescimento de nódulos metastáticos). Os efeitos protetores podem ser completos ou parciais, desde que os benefícios do tratamento superem quaisquer desvantagens.

**[190]** Em modalidades particulares, o vetor de vírus ou célula compreendendo o ácido nucleico heterólogo pode ser administrado em uma quantidade imunogenicamente eficaz, conforme descrito abaixo.

**[191]** Os vetores de vírus da presente divulgação também podem ser

administrados para imunoterapia contra o câncer por administração de um vetor de vírus que expressa um ou mais antígenos de células cancerosas (ou uma molécula imunologicamente semelhante) ou qualquer outro imunógeno que produz uma resposta imune contra uma célula cancerosa. Para ilustrar, uma resposta imune pode ser produzida contra um antígeno de células cancerosas em um sujeito pela administração de um vetor de vírus compreendendo um ácido nucleico heterólogo que codifica o antígeno de células cancerosas, por exemplo, para tratar um paciente com câncer e/ou prevenir o desenvolvimento de câncer no sujeito. O vetor de vírus pode ser administrado a um sujeito in vivo ou usando métodos ex vivo, conforme descrito neste documento.

**[192]** Alternativamente, o antígeno de câncer pode ser expresso como parte do capsídeo de vírus ou de outra forma associado ao capsídeo de vírus (por exemplo, como descrito acima).

**[193]** Como outra alternativa, qualquer outro ácido nucleico terapêutico (por exemplo, RNAi) ou polipeptídeo (por exemplo, citocina) conhecido na técnica pode ser administrado para tratar e/ou prevenir o câncer.

**[194]** Conforme utilizado neste documento, o termo "câncer" abrange cânceres formadores de tumores. Da mesma forma, o termo "tecido cancerígeno" abrange tumores. Um "antígeno de células cancerígenas" abrange antígenos tumorais.

**[195]** O termo "câncer" tem seu significado conhecido na técnica, por exemplo, um crescimento descontrolado de tecido que tem o potencial de se espalhar para locais distantes do corpo (ou seja, metástase). Cânceres exemplificativos incluem, mas não estão limitados a, melanoma, adenocarcinoma, timoma, linfoma (por exemplo, linfoma não-Hodgkin, linfoma de Hodgkin), sarcoma, câncer de pulmão, câncer de fígado, câncer de cólon, leucemia, câncer uterino, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de bexiga, câncer de rim, câncer de pâncreas, câncer de cérebro e qualquer outro câncer ou condição maligna atualmente conhecida ou posteriormente identificada. Em modalidades representativas, a divulgação fornece um método de tratamento e/ou prevenção de cânceres formadores de tumor.

**[196]** O termo "tumor" também é entendido na técnica, por exemplo, como uma massa anormal de células indiferenciadas dentro de um organismo multicelular. Os

tumores podem ser malignos ou benignos. Em modalidades representativas, os métodos divulgados neste documento são usados para prevenir e tratar tumores malignos.

**[197]** Pelos termos "tratando câncer", "tratamento de câncer" e termos equivalentes, pretende-se que a gravidade do câncer seja reduzida ou pelo menos parcialmente eliminada e/ou a progressão da doença seja retardada e/ou controlada e/ou a doença seja estabilizada. Em modalidades particulares, estes termos indicam que a metástase do câncer é evitada ou reduzida ou pelo menos parcialmente eliminada e/ou que o crescimento de nódulos metastáticos é prevenido ou reduzido ou pelo menos parcialmente eliminado.

**[198]** Pelos termos "prevenir o câncer" ou "prevenção do câncer" e termos equivalentes, pretende-se que os métodos eliminem, pelo menos parcialmente, ou reduzam e/ou retardem a incidência e/ou gravidade do início do câncer. Alternativamente declarado, o aparecimento de câncer no sujeito pode ser reduzido em possibilidade ou probabilidade e/ou retardado.

**[199]** Em modalidades particulares, as células podem ser removidas de um sujeito com câncer e colocadas em contato com um vetor de vírus que expressa um antígeno de células cancerosas de acordo com a presente divulgação. A célula modificada é então administrada ao sujeito, pelo que uma resposta imune contra o antígeno da célula cancerosa é induzida. Este método pode ser vantajosamente empregado com sujeitos imunocomprometidos que não podem montar uma resposta imune suficiente in vivo (ou seja, não podem produzir anticorpos potencializadores em quantidades suficientes).

**[200]** É conhecido na técnica que as respostas imunes podem ser potencializadas por citocinas imunomoduladoras (por exemplo, alfa-interferon, beta-interferon, gama-interferon, ômega-interferon, tau-interferon, interleucina-1-alfa, interleucina-1 $\beta$ , interleucina-2, interleucina-3, interleucina-4, interleucina-5, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-8, interleucina-9, interleucina-10, interleucina-11, interleucina-12, interleucina-13, interleucina-14, interleucina-18, fator de crescimento de células B, ligante de CD40, fator de necrose tumoral alfa, fator de necrose tumoral- $\beta$ , proteína quimioatraente de monócito-1, fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago e linfotóxina). Conseqüentemente, as citocinas

imunomoduladoras (preferencialmente, citocinas indutivas de CTL) podem ser administradas a um sujeito em conjunto com o vetor de vírus. As citocinas podem ser administradas por qualquer método conhecido na técnica. As citocinas exógenas podem ser administradas ao sujeito ou, alternativamente, um ácido nucleico que codifica uma citocina pode ser distribuída ao sujeito usando um vetor adequado e a citocina produzida in vivo.

### **Sujeitos, Formulações Farmacêuticas e Modos de Administração**

**[201]** Os vetores de vírus e capsídeos de acordo com a presente divulgação encontram uso em aplicações veterinárias e médicas. Os sujeitos adequados incluem aves e mamíferos. O termo "ave", conforme usado neste documento, inclui, mas não está limitado a galinhas, patos, gansos, codornizes, perus, faisões, papagaios, periquitos e semelhantes. O termo "mamíferos", tal conforme usado neste documento, inclui, mas não está limitado aos humanos, primatas não humanos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, felinos, caninos, lagomorfos, etc. Sujeitos humanos incluem neonatos, bebês, jovens, adultos e sujeitos geriátricos. Em algumas modalidades, um sujeito humano pode ter menos de 6 meses, menos de 2 anos, menos de 5 anos, menos de 10 anos, 10-18 anos, 19-29 anos, 30-35 anos, 36-40 anos, ou mais de 40 anos.

**[202]** Em modalidades representativas, o sujeito está "em necessidade" dos métodos descritos neste documento.

**[203]** Em modalidades particulares, uma composição farmacêutica é fornecida compreendendo um vetor de vírus e/ou capsídeo e/ou proteína de capsídeo e/ou partícula de vírus da divulgação em um carreador farmacêuticamente aceitável e, opcionalmente, outros agentes medicinais, agentes farmacêuticos, agentes estabilizadores, tampões, carreadores, adjuvantes, diluentes, etc. Para injeção, o carreador será tipicamente um líquido. Para outros métodos de administração, o carreador pode ser sólido ou líquido. Para administração por inalação, o carreador será respirável e, opcionalmente, pode estar na forma de partículas sólidas ou líquidas.

**[204]** Por "farmacêuticamente aceitável" entende-se um material que não é tóxico ou indesejável, isto é, o material pode ser administrado a um sujeito sem causar quaisquer efeitos biológicos indesejáveis.

**[205]** Um aspecto da presente divulgação é um método de transferência de um ácido nucleico para uma célula in vitro. O vetor de vírus pode ser introduzido nas células na multiplicidade apropriada de infecção de acordo com métodos de transdução padrão adequados para as células alvo específicas. Os títulos do vetor de vírus a administrar podem variar, dependendo do tipo e número de células alvo e do vetor de vírus específico, e podem ser determinados por aqueles versados na técnica sem experimentação indevida. Em modalidades representativas, pelo menos cerca de  $10^3$  unidades infecciosas, opcionalmente, pelo menos cerca de  $10^5$  unidades infecciosas são introduzidas na célula.

**[206]** As células nas quais o vetor de vírus é introduzido podem ser de qualquer tipo, incluindo, mas não se limitando a células neurais (incluindo células dos sistemas nervosos periférico e central, em particular, células cerebrais, como neurônios e oligodendrócitos), células pulmonares, células do olho (incluindo células da retina, epitélio pigmentar da retina e células da córnea), células epiteliais (por exemplo, intestino e células epiteliais respiratórias), células musculares (por exemplo, células do músculo esquelético, células do músculo cardíaco, células do músculo liso e/ou células do músculo diafragma), células dendríticas, células pancreáticas (incluindo células das ilhotas), células hepáticas, células do miocárdio, células ósseas (por exemplo, células-tronco da medula óssea), células-tronco hematopoéticas, células do baço, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células da próstata, células germinativas e semelhantes. Em modalidades representativas, a célula pode ser qualquer célula progenitora. Como outra possibilidade, a célula pode ser uma célula-tronco (por exemplo, célula-tronco neural, célula-tronco do fígado). Ainda como outra alternativa, a célula pode ser uma célula cancerosa ou tumoral. Além disso, a célula pode ser de qualquer espécie de origem, conforme indicado acima.

**[207]** O vetor de vírus pode ser introduzido em células in vitro com o propósito de administrar a célula modificada a um sujeito. Em modalidades particulares, as células foram removidas de um sujeito, o vetor de vírus é introduzido nas mesmas e as células são então administradas de volta ao sujeito. Os métodos de remoção de células do sujeito para manipulação ex vivo, seguido pela introdução de volta no sujeito são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, a patente US. Nº 5.399.346).

Alternativamente, o vetor de vírus recombinante pode ser introduzido em células de um sujeito doador, em células de cultura ou em células de qualquer outra fonte adequada, e as células são administradas a um sujeito em necessidade deste (ou seja, um sujeito "receptor").

**[208]** As células adequadas para distribuição de ácido nucleico ex vivo são conforme descrito acima. As dosagens das células para administrar a um sujeito irão variar de acordo com a idade, condição e espécie do sujeito, o tipo de célula, o ácido nucleico sendo expresso pela célula, o modo de administração e semelhantes. Tipicamente, pelo menos cerca de  $10^2$  a cerca de  $10^8$  células ou pelo menos cerca de  $10^3$  a cerca de  $10^6$  células serão administradas por dose em um carreador farmacologicamente aceitável. Em modalidades particulares, as células transduzidas com o vetor de vírus são administradas ao sujeito em uma quantidade terapêuticamente eficaz em combinação com um carreador farmacêutico.

**[209]** Em algumas modalidades, o vetor de vírus é introduzido em uma célula e a célula pode ser administrada a um sujeito para provocar uma resposta imunogênica contra o polipeptídeo distribuído (por exemplo, expresso como um transgene ou no capsídeo). Normalmente, é administrada uma quantidade de células que expressam uma quantidade imunogenicamente eficaz do polipeptídeo em combinação com um carreador farmacologicamente aceitável. Uma "quantidade imunogenicamente eficaz" é uma quantidade do polipeptídeo expresso que é suficiente para evocar uma resposta imune ativa contra o polipeptídeo no sujeito ao qual a formulação farmacêutica é administrada. Em modalidades particulares, a dosagem é suficiente para produzir uma resposta imune protetora (conforme definido acima). O grau de proteção conferido não precisa ser completo ou permanente, desde que os benefícios da administração do polipeptídeo imunogênico superem quaisquer desvantagens deste.

**[210]** Assim, a presente divulgação fornece um método de administração de um ácido nucleico a uma célula, o método compreendendo o contato da célula com o vetor de vírus, partícula de vírus e/ou composição desta divulgação.

**[211]** Um outro aspecto da divulgação é um método de administração do vetor de vírus, partícula de vírus e/ou capsídeo de vírus desta divulgação a um sujeito. Assim, a presente divulgação também fornece um método de distribuição de um

ácido nucleico a um sujeito, compreendendo a administração ao sujeito de uma partícula de vírus, vetor de vírus e/ou composição desta divulgação. A administração dos vetores de vírus, partículas de vírus e/ou capsídeos de acordo com a presente divulgação a um sujeito humano ou um animal em necessidade pode ser por qualquer meio conhecido na técnica. Opcionalmente, o vetor de vírus, partícula de vírus e/ou capsídeo é distribuído em uma dose terapeuticamente eficaz em um carreador farmacologicamente aceitável. Em modalidades preferidas, uma quantidade terapeuticamente eficaz do vetor de vírus, partícula de vírus e/ou capsídeo é distribuído.

**[212]** Os vetores de vírus e/ou capsídeos da divulgação podem ainda ser administrados para induzir uma resposta imunogênica (por exemplo, como uma vacina). Normalmente, as composições imunogênicas da presente divulgação compreendem uma quantidade imunogenicamente eficaz de vetor de vírus e/ou capsídeo em combinação com um carreador farmacologicamente aceitável. Opcionalmente, a dosagem é suficiente para produzir uma resposta imune protetora (conforme definido acima). O grau de proteção conferido não precisa ser completo ou permanente, desde que os benefícios da administração do polipeptídeo imunogênico superem quaisquer desvantagens deste. Os sujeitos e imunogênicos são conforme descritos acima.

**[213]** As dosagens do vetor de vírus e/ou capsídeo a serem administrados a um sujeito dependem do modo de administração, a doença ou condição a ser tratada e/ou prevenida, a condição do sujeito individual, o vetor de vírus ou capsídeo particular e o ácido nucleico a ser distribuído, e semelhantes, e pode ser determinado de uma maneira rotineira. Doses exemplificativas para alcançar efeitos terapêuticos são títulos de pelo menos cerca de  $10^5$ , cerca de  $10^6$ , cerca de  $10^7$ , cerca de  $10^8$ , cerca de  $10^9$ , cerca de  $10^{10}$ , cerca de  $10^{11}$ , cerca de  $10^{12}$ , cerca de  $10^{13}$ , cerca de  $10^{14}$ , cerca de  $10^{15}$  unidades de transdução, opcionalmente cerca de  $10^8$  -  $10^{13}$  unidades de transdução.

**[214]** Em modalidades particulares, mais de uma administração (por exemplo, duas, três, quatro ou mais administrações) pode ser empregada para atingir o nível desejado de expressão gênica ao longo de um período de vários intervalos, por exemplo, diário, semanal, mensal, anual, etc.



**[215]** Modos exemplificativos de administração incluem oral, retal, transmucosa, intranasal, inalação (por exemplo, através de um aerossol), bucal (por exemplo, sublingual), vaginal, intratecal, intraocular, transdérmica, in utero (ou in ovo), parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutâneo, intradérmico, intramuscular [incluindo administração ao esqueleto, diafragma e/ou músculo cardíaco], intradérmico, intrapleural, intracerebral e intra-articular), tópico (por exemplo, para ambas as superfícies da pele e mucosas, incluindo superfícies das vias aéreas e administração transdérmica), intralinfático e semelhantes, bem como injeção direta em tecido ou órgão (por exemplo, no fígado, músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo diafragma ou cérebro). A administração também pode ser em um tumor (por exemplo, dentro ou perto de um tumor ou nódulo linfático). Em algumas modalidades, o vetor ou composição de vírus é administrado ao olho do sujeito, por exemplo, por meio de uma via intravítrea, sub-retiniana, subconjuntiva, retrobulbar, intracameral e/ou supracoroidal. A rota mais adequada em qualquer caso dependerá da natureza e gravidade da condição a ser tratada e/ou prevenida e da natureza do vetor específico que está sendo usado.

**[216]** A administração ao músculo esquelético de acordo com a presente divulgação inclui, mas não está limitada à administração ao músculo esquelético dos membros (por exemplo, braço, antebraço, perna superior e/ou perna), costas, pescoço, cabeça (por exemplo, língua), tórax, abdômen,

**[217]** pelve/períneo e/ou dedos. Os músculos esqueléticos adequados incluem, mas não estão limitados ao abductor do dedo mínimo (na mão), abductor do dedo mínimo (no pé), abductor do hálux, abductor ossis do quinto metatarso, abductor curto do polegar, abductor longo do polegar, adutor curto, adutor do hálux, adutor longo, adutor magno, adutor do polegar, ancôneo, escaleno anterior, gênero articular, bíceps braquial, bíceps femoral, braquial, braquiorradial, bucinador, coracobraquial, corrugador do supercílio, deltoide, depressor do ângulo da boca, depressor do lábio inferior, digastral, interósseo dorsal (na mão), interósseo dorsal (no pé), extensor radial curto do carpo, extensor radial longo do carpo, extensor ulnar do carpo, extensor do dedo mínimo, extensor dos dedos, extensor curto dos dedos, extensor longo dos dedos, extensor curto do hálux, extensor longo do hálux, extensor do indicador, extensor curto do polegar, extensor longo do polegar, flexor radial do

carpo, flexor ulnar do carpo, flexor curto mínimo do dedo (na mão), flexor curto mínimo dos dedos (no pé), flexor curto dos dedos, flexor longo dos dedos, flexor profundo dos dedos, flexor superficial dos dedos, flexor curto do hálux, flexor longo do hálux, flexor curto do polegar, flexor longo do polegar, frontal, gastrocnêmio, genio-hióideo, glúteo máximo, glúteo médio, glúteo mínimo, grácil, iliocostal cervical, iliocostal lombar, iliocostal torácico, íliaco, gemelo inferior, oblíquo inferior, reto inferior, infraespinhal, interespinal, intertransversal, pterigoide lateral, reto lateral, latíssimo do dorso, elevador do ângulo da boca, elevador da pálpebra superior, elevador da escápula, rotador longo, levantador do ângulo da boca, levantador do lábio superior, levantador do lábio superior e da asa do nariz, levantador superior da pálpebra, levantador da escápula, rotadores longos, longuíssimo da cabeça, longuíssimo cervical, longuíssimo torácico, longo da cabeça, longo do colo, lumbricais (na mão), lumbricais (no pé), masseter, pterigoide medial, reto medial, escaleno médio, multífido, milo-hióideo, oblíquo inferior da cabeça, oblíquo superior da cabeça, obturador externo, obturador interno, occipital, omo-hióideo, oponente do dedo mínimo, oponente do polegar, orbicular do olho, interósseo palmar, curto palmar, longo palmar, pectíneo, peitoral maior, peitoral menor, fibular curto, fibular longo, fibular terceiro, piriforme, interósseo plantar, plantar, platisma, poplíteo, escaleno posterior, pronador quadrado, pronador redondo, psoas maior, quadrado femoral, quadrado plantar, reto da cabeça lateral, reto da cabeça posterior maior, reto da cabeça posterior menor, reto femoral, romboide maior, romboide menor, risório, sartório, escaleno mínimo, semimembranoso, semiespinal da cabeça, semispinal cervical, semiespinal torácico, semitendinoso, espinhal serrátil anterior, sóleo curto da cabeça, epinal cervical, espinhal torácico, esplênio da cabeça, esplênio cervical, esternocleidomastóideo, esterno-hioideo, esternotireóideo, estilo-hióideo, subclávio, subescapular, gemelo superior, oblíquo superior, reto superior, supinador, esterno-hioideo, esternotireoideo, estilo-hióideo, subclávio, subescapular, gemelo superior, oblíquo superior, reto superior, supinador, fasorial superior supraespinhal, músculo redondo menor, tórax, tireo-hioideo, tibial anterior, tibial posterior, trapézio, tríceps braquial, vasto intermediário, vasto lateral, vasto medial, zigomático maior e zigomático menor, e qualquer outro músculo esquelético

adequado conforme conhecido na técnica.

**[218]** O vetor de vírus e/ou capsídeo pode ser distribuído ao músculo esquelético por administração intravenosa, administração intra-arterial, administração intraperitoneal, perfusão de membro (opcionalmente, perfusão de membro isolada de uma perna e/ou braço; ver, por exemplo, Arruda et al., (2005) Blood 105: 3458-3464), e/ou injeção intramuscular direta. Em modalidades particulares, o vetor de vírus e/ou capsídeo é administrado a um membro (braço e/ou perna) de um sujeito (por exemplo, um sujeito com distrofia muscular, como DMD) por perfusão de membro, opcionalmente perfusão de membro isolado (por exemplo, por administração intravenosa ou intra-articular). Em modalidades da divulgação, os vetores de vírus e/ou capsídeos da divulgação podem ser vantajosamente administrados sem o emprego de técnicas "hidrodinâmicas". A distribuição de tecido (por exemplo, ao músculo) de vetores da técnica anterior é frequentemente aumentada por técnicas hidrodinâmicas (por exemplo, administração intravenosa/intravenosa em um grande volume), que aumentam a pressão na vasculatura e facilitam a capacidade do vetor de cruzar a barreira celular endotelial. Em modalidades particulares, os vetores virais e/ou capsídeos da divulgação podem ser administrados na ausência de técnicas hidrodinâmicas, como infusões de alto volume e/ou pressão intravascular elevada (por exemplo, maior do que a pressão sistólica normal, por exemplo, menor ou igual a um aumento de 5%, 10%, 15%, 20%, 25% na pressão intravascular sobre a pressão sistólica normal). Esses métodos podem reduzir ou evitar os efeitos colaterais associados às técnicas hidrodinâmicas, como edema, lesão nervosa e/ou síndrome compartimental. A administração ao músculo cardíaco inclui a administração ao átrio esquerdo, átrio direito, ventrículo esquerdo, ventrículo direito e/ou septo. O vetor de vírus e/ou capsídeo pode ser distribuído ao músculo cardíaco por administração intravenosa, administração intra-arterial, como administração intra-aórtica, injeção cardíaca direta (por exemplo, no átrio esquerdo, átrio direito, ventrículo esquerdo, ventrículo direito) e/ou perfusão da artéria coronária.

**[219]** A administração ao músculo diafragma pode ser por qualquer método adequado, incluindo administração intravenosa, administração intra-arterial e/ou administração intra-peritoneal.

**[220]** A distribuição a um tecido alvo também pode ser alcançada pela distribuição de um depósito compreendendo o vetor de vírus e/ou capsídeo. Em modalidades representativas, um depósito compreendendo o vetor de vírus e/ou capsídeo é implantado em tecido muscular esquelético, cardíaco e/ou diafragma ou o tecido pode ser contatado com uma película ou outra matriz compreendendo o vetor de vírus e/ou capsídeo. Tais matrizes ou substratos implantáveis são descritos na Patente US. N°. 7.201.898.

**[221]** Em modalidades particulares, um vetor de vírus e/ou capsídeo de vírus de acordo com a presente divulgação é administrado ao músculo esquelético, músculo diafragma e/ou músculo cardíaco (por exemplo, para tratar e/ou prevenir distrofia muscular, doença cardíaca [por exemplo, PAD ou insuficiência cardíaca congestiva]).

**[222]** Em modalidades representativas, a divulgação é usada para tratar e/ou prevenir distúrbios do músculo esquelético, cardíaco e/ou diafragma.

**[223]** Em uma modalidade representativa, um método de tratamento e/ou prevenção de distrofia muscular em um sujeito em necessidade deste é fornecido, o método compreendendo: a administração de um tratamento ou quantidade eficaz de prevenção de um vetor de vírus da divulgação a um sujeito mamífero, em que o vírus vetor compreende um ácido nucleico heterólogo que codifica distrofina, uma minidistrofina, uma microdistrofina, propeptídeo de miostatina, folistatina, receptor solúvel de ativina tipo II, IGF-1, polipeptídeos anti-inflamatórios, como o mutante dominante I $\kappa$ B, sarcospan, utrofina, uma microdistrofina, laminina-a2, alfa-sarcoglicano, beta-sarcoglicano, gama-sarcoglicano, deltasarcoglicano, IGF-1, um anticorpo ou fragmento de anticorpo contra miostatina ou propeptídeo de miostatina e/ou RNAi contra miostatina. Em modalidades particulares, o vetor de vírus pode ser administrado ao esqueleto, diafragma e/ou músculo cardíaco, conforme descrito em outro lugar neste documento.

**[224]** Alternativamente, a divulgação pode ser praticada para distribuir um ácido nucleico ao músculo esquelético, cardíaco ou do diafragma, que é usado como uma plataforma para a produção de um polipeptídeo (por exemplo, uma enzima) ou RNA funcional (por exemplo, RNAi, micro RNA, RNA antisense) que normalmente circula no sangue ou para distribuição sistêmica a outros tecidos para tratar e/ou prevenir

um distúrbio (por exemplo, um distúrbio metabólico, como diabetes [por exemplo, insulina], hemofilia [por exemplo, Fator IX ou Fator VIII], um distúrbio de mucopolissacarídeo [por exemplo, síndrome de Sly, síndrome de Hurler, síndrome de Scheie, síndrome de Hurler-Scheie, síndrome de Hunter, síndrome de Sanfilippo A, B, C, D, síndrome de Morquio, síndrome de Maroteaux-Lamy, etc.] ou um distúrbio de armazenamento lisossomal, como Doença de Gaucher [glucocerebrosidase] ou doença de Fabry [a-galactosidase A] ou um distúrbio de armazenamento de glicogênio como a doença de Pompe [ácido lisossomal alfa glucosidase]). Outras proteínas adequadas para o tratamento e/ou prevenção de distúrbios metabólicos são descritas neste documento. O uso de músculo como uma plataforma para expressar um ácido nucleico de interesse é descrito na Publicação de Patentes US. Nº US 2002/0192189.

**[225]** Assim, como um aspecto, a divulgação abrange ainda um método de tratamento e/ou prevenção de um distúrbio metabólico em um sujeito em necessidade deste, o método compreendendo: administrar um tratamento ou quantidade eficaz de prevenção de um vetor de vírus da divulgação ao músculo esquelético de um sujeito, em que o vetor de vírus compreende um ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo, em que o distúrbio metabólico é resultado de uma deficiência e/ou defeito no polipeptídeo. Distúrbios metabólicos ilustrativos e ácidos nucleicos heterólogos que codificam polipeptídeos são descritos neste documento. Opcionalmente, o polipeptídeo é secretado (por exemplo, um polipeptídeo que é um polipeptídeo secretado em seu estado nativo ou que foi modificado para ser secretado, por exemplo, por associação operável com uma sequência de sinal secretora como é conhecido na técnica). Sem estar limitado por qualquer teoria particular da divulgação, de acordo com esta modalidade, a administração ao músculo esquelético pode resultar na secreção do polipeptídeo para a circulação sistêmica e distribuição ao (s) tecido (s) alvo. Os métodos de distribuição de vetores de vírus ao músculo esquelético são descritos em mais detalhes neste documento.

**[226]** A divulgação também pode ser praticada para produzir RNA não codificador, como RNA antisense, RNAi ou outro RNA funcional (por exemplo, uma ribozima) para distribuição sistêmica.

**[227]** A divulgação também fornece um método de tratamento e/ou prevenção de insuficiência cardíaca congênita ou PAD em um sujeito em necessidade deste, o método compreendendo a administração de um tratamento ou quantidade eficaz de prevenção de um vetor de vírus da divulgação a um sujeito mamífero, em que o vetor de vírus compreende um ácido nucleico heterólogo que codifica, por exemplo, um endoretículo sarcoplasmático  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a), um fator angiogênico, inibidor de fosfatase I (I-1) e fragmentos destes (por exemplo, I1 C), RNAi contra fosfolambano; uma molécula inibitória ou dominante negativa do fosfolambano, como o fosfolambano S16E, uma proteína zinc\_finger que regula o gene fosfolambano, receptor beta-2-adrenérgico, receptor quinase beta-2-adrenérgico (BARK), quinase PI3, calsarcano, um inibidor da quinase receptor  $\beta$ -adrenérgico (PARKct), inibidor 1 da proteína fosfatase 1 e fragmentos destes (por exemplo, I1C), S100A1, parvalbumina, adenilil ciclase tipo 6, uma molécula que efetua o knockdown do receptor acoplado à proteína G quinase de tipo 2, como um bARKct, Pim-1, PGC-I a, SOD-1, SOD-2, EC-SOD, calicreína truncado constitutivamente ativo. HIF, timosina-p4, mir-1, mir-133, mir-206, mir-208 e/ou mir-26a.

**[228]** Os injetáveis podem ser preparados em formas convencionais, como soluções ou suspensões líquidas, formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injeção, ou como emulsões. Alternativamente, pode-se administrar o vetor de vírus e/ou capsídeos de vírus da divulgação de uma maneira local em vez de sistêmica, por exemplo, em um depósito ou formulação de liberação sustentada. Além disso, o vetor de vírus e/ou capsídeo de vírus pode ser distribuído aderido a uma matriz implantável cirurgicamente (por exemplo, conforme descrito na Publicação de Patente US N°. US-2004-0013645-A1).

**[229]** Os vetores de vírus e/ou capsídeos de vírus divulgados neste documento podem ser administrados aos pulmões de um sujeito por qualquer meio adequado, opcionalmente por administração de uma suspensão de aerossol de partículas respiráveis compreendidas pelos vetores de vírus e/ou capsídeos de vírus, que o sujeito inala. As partículas respiráveis podem ser líquidas ou sólidas. Aerossóis de partículas líquidas compreendendo os vetores de vírus e/ou capsídeos de vírus podem ser produzidos por qualquer meio adequado, tal como com um nebulizador de aerossol acionado por pressão ou um nebulizador ultrassônico, como é

conhecido pelos versados na técnica. Ver, por exemplo, Patente US. N° 4.501.729. Aerossois de partículas sólidas compreendendo os vetores de vírus e/ou capsídeos podem da mesma forma ser produzidos com qualquer gerador de aerossol de medicamento em partículas sólidas, por técnicas conhecidas na técnica farmacêutica.

**[230]** Os vetores de vírus e capsídeos de vírus podem ser administrados a tecidos do SNC (por exemplo, cérebro, olho) e podem resultar vantajosamente em uma distribuição mais ampla do vetor ou capsídeo de vírus do que seria observado na ausência da presente divulgação.

**[231]** Em modalidades particulares, os vetores de distribuição descritos neste documento podem ser administrados para tratar doenças do SNC, incluindo distúrbios genéticos, distúrbios neurodegenerativos, distúrbios psiquiátricos e tumores. Doenças ilustrativas do SNC incluem, mas não estão limitadas a Adrenomieloneuropatia (AMN), doença de Alzheimer, Síndrome de Angelman, doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Canavan, doença de Leigh, doença de Refsum, síndrome de Tourette, esclerose lateral primária, esclerose lateral amiotrófica, atrofia muscular progressiva, doença de Pick, distrofia muscular, esclerose múltipla, miastenia gravis, doença de Binswanger, trauma devido à medula espinhal ou lesão na cabeça, doença de Tay Sachs (GM2 Gangliosidose), doença de Lesch-Nyhan, Obesidade MC4R, Leucodistrofia metacromática (MLD), MPS I (Hurler/Scheie), MPS IIIA (Sanfilippo A), Niemann Pick C1, Síndrome de Rett, Atrofia Muscular Espinhal (SMA), Deficiência de AADC, Esclerose Lateral Amiotrófica Monogênica (ALS), Alfa manosidose, Doença de Alzheimer, Síndrome de Aspartilglucosaminúria, Síndrome de Dravet, Neuropatia Axonal Gigante, Leucodistrofia de Células Globoides (Krabbe), Deficiência de Glut 1, Gangliosidose GM 1, Lipofuscinose Ceroide Neuronal Infantil (INCL, Batten), Lipofuscinose Ceroide Neuronal Juvenil (JNCL, Batten), Lipofuscinose Ceroide Neuronal Infantil Tardia (LINCL, Batten), MPS II (Hunter), MPS IIIB (Sanfilippo B), MPS IIIC (Sanfilippo C), MPS IVA (Síndrome de Morquio), MPS VI (Maroteaux-Lamy), distúrbios da biogênese de peroxissoma (espectro da síndrome de Zellweger), doença de Sandhoff (Gangliosidose GM2), epilepsia, infartos cerebrais, distúrbios psiquiátricos, incluindo distúrbios do humor (por exemplo, depressão,

distúrbio afetivo bipolar, distúrbio afetivo persistente, distúrbio do humor secundário), esquizofrenia, dependência de drogas (por exemplo, alcoolismo e outras dependências de substâncias), neuroses (por exemplo, ansiedade, transtorno obsessivo, transtorno somatoforme, transtorno dissociativo, luto, depressão pós-parto), psicose (por exemplo, alucinações e delírios), demência, paranoia, distúrbio de déficit de atenção, distúrbios psicosexuais, distúrbios do sono, distúrbios da dor, distúrbios alimentares ou de peso (por exemplo, obesidade, caquexia, anorexia nervosa e bulimia) e cânceres e tumores (por exemplo, tumores hipofisários) do SNC.

**[232]** Os distúrbios do SNC podem incluir distúrbios oftálmicos envolvendo a retina, o trato posterior e o nervo óptico. Por exemplo, tais distúrbios podem incluir retinite pigmentosa, retinopatia diabética e outras doenças degenerativas da retina, uveíte, degeneração macular relacionada à idade, neurite óptica, amaurose congênita de Leber, neuropatia óptica hereditária de Leber, acromatopsia, retinosquose ligada ao X, neurite óptica, coroideremia, atrofia óptica, distrofia do cone da retina, retinopatia, retinoblastoma, glaucoma, síndrome de Bardet-Biedl, síndrome de Usher, aniridia, ataxia de Friedreich, distrofia macular viteliforme, retinoblastoma, doença de Stargardt, doença de Charcot-Marie-Tooth, distrofia de Fuch, acidemia propiônica ou daltonismo.

**[233]** Assim, em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método de tratamento de um distúrbio oftálmico ou defeito em um sujeito, compreendendo a administração ao sujeito de um vetor de vírus desta divulgação, em que o vetor viral compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína terapêutica ou RNA terapêutico eficaz no tratamento do distúrbio ou defeito oftálmico. Em algumas modalidades deste método, o vetor viral é administrado por via intravítrea, sub-retiniana, subconjutiva, retrobulbar, intracameral e/ou supracoroidal.

**[234]** A maioria, senão todas, as doenças e distúrbios oftálmicos estão associados a um ou mais dos três tipos de indicações: (1) angiogênese, (2) inflamação e (3) degeneração. Os vetores de distribuição da presente divulgação podem ser empregados para distribuir fatores anti-angiogênicos; fatores anti-inflamatórios; fatores que retardam a degeneração celular, promovem preservação celular ou



promovem o crescimento celular e combinações dos anteriores.

**[235]** Retinopatia diabética, por exemplo, é caracterizada por angiogênese. A retinopatia diabética pode ser tratada aplicando um ou mais fatores antiangiogênicos intraoculares (por exemplo, no vítreo) ou periocular (por exemplo, na região subtenoniana). Um ou mais fatores neurotróficos também podem ser administrados simultaneamente, seja intraocular (por exemplo, intravítreo) ou periocular.

**[236]** A uveíte envolve inflamação. Um ou mais fatores anti-inflamatórios podem ser administrados por administração intraocular (por exemplo, vítreo ou câmara anterior) de um vetor de distribuição da divulgação.

**[237]** A retinite pigmentosa, por comparação, é caracterizada por degeneração retinal. Em modalidades representativas, a retinite pigmentosa pode ser tratada por intraocular (por exemplo, administração vítrea) de um vetor de distribuição que codifica um ou mais fatores neurotróficos.

**[238]** A degeneração macular relacionada à idade envolve tanto a angiogênese quanto a degeneração retinal. Este distúrbio pode ser tratado pela administração dos vetores de distribuição que codificam um ou mais fatores neurotróficos intraocularmente (por exemplo, vítreo) e/ou um ou mais fatores antiangiogênicos intraocularmente ou periocularmente (por exemplo, na região do sub-Tenon).

**[239]** O glaucoma é caracterizado por aumento da pressão ocular e perda de células ganglionares da retina. Os tratamentos para o glaucoma incluem a administração de um ou mais agentes neuroprotetores que protegem as células de danos excitotóxicos usando os vetores de distribuição. Tais agentes incluem antagonistas de N-metil-D-aspartato (NMDA), citocinas e fatores neurotróficos, administrados intraocularmente, opcionalmente intravítreamente.

**[240]** Em outras modalidades, a presente divulgação pode ser usada para tratar convulsões, por exemplo, para reduzir o início, incidência ou gravidade das convulsões. A eficácia de um tratamento terapêutico para convulsões pode ser avaliada por meios comportamentais (por exemplo, tremores, tiques do olho ou da boca) e/ou eletrográficos (a maioria das convulsões tem anormalidades eletrográficas características). Assim, a divulgação também pode ser usada para tratar a epilepsia, que é marcada por vários ataques ao longo do tempo.

**[241]** Em uma modalidade representativa, a somatostatina (ou um fragmento ativo desta) é administrada ao cérebro usando um vetor de distribuição da divulgação para tratar um tumor pituitário. De acordo com esta modalidade, o vetor de distribuição que codifica a somatostatina (ou um fragmento ativo deste) é administrado por microinfusão na pituitária. Da mesma forma, esse tratamento pode ser usado para tratar a acromegalia (secreção anormal do hormônio do crescimento pela hipófise). O ácido nucleico (por exemplo, GenBank N°. de Acesso J00306) e aminoácido (por exemplo, GenBank N°. de Acesso P01166; contém peptídeos ativos processados somatostatina-28 e sequências de somatostatina-14) de somatostatinas são conhecidas na técnica.

**[242]** Em modalidades particulares, o vetor pode compreender um sinal secretor, conforme descrito na Patente US. N° 7.071.172.

**[243]** Em modalidades representativas da divulgação, o vetor do vírus e/ou capsídeo do vírus é administrado ao SNC (por exemplo, ao cérebro ou ao olho). O vetor de vírus e/ou de capsídeo pode ser introduzido na medula espinhal, tronco cerebral (medula oblonga, ponte), mesencéfalo (hipotálamo, tálamo, epitálamo, glândula pituitária, substância negra, glândula pineal), cerebelo, telencéfalo (corpo estriado, cérebro incluindo os lobos occipital, temporal, parietal e frontal, córtex, gânglios basais, hipocampo e porta-amígdala), sistema límbico, neocórtex, corpo estriado, cérebro e colículo inferior. O vetor de vírus e/ou de capsídeo também pode ser administrado a diferentes regiões do olho, como a retina, córnea e/ou nervo óptico.

**[244]** O vetor de vírus e/ou de capsídeo pode ser distribuído no líquido cefalorraquidiano (por exemplo, por punção lombar) para uma administração mais dispersa do vetor de distribuição. O vetor de vírus e/ou de capsídeo pode ainda ser administrado por via intravascular ao SNC em situações em que a barreira hematoencefálica tenha sido perturbada (por exemplo, tumor cerebral ou infarto cerebral).

**[245]** O vetor de vírus e/ou de capsídeo pode ser administrado à (s) região (ões) desejada (s) do SNC por qualquer via conhecida na técnica, incluindo, mas não se limitando a intratecal, intraocular, intracerebral, intraventricular, intravenosa (por exemplo, na presença de um açúcar, como manitol), distribuição intranasal, intra-

aural, intra-ocular (por exemplo, intra-vítreo, sub-retinal, câmara anterior) e periocular (por exemplo, região subtenoniana), bem como distribuição intramuscular com retrógrado distribuição aos neurônios motores. Em modalidades particulares, o vetor de vírus e/ou de capsídeo é administrado em uma formulação líquida por injeção direta (por exemplo, injeção estereotáxica) na região ou compartimento desejado no SNC. Em outras modalidades, o vetor de vírus e/ou de capsídeo pode ser fornecido por aplicação tópica na região desejada ou por administração intranasal de uma formulação de aerossol. A administração no olho pode ser por aplicação tópica de gotículas de líquido. Como outra alternativa, o vetor de vírus e/ou de capsídeo pode ser administrado como uma formulação sólida de liberação lenta (ver, por exemplo, Patente US. N° 7.201.898).

**[246]** Ainda em modalidades adicionais, o vetor de vírus pode ser usado para transporte retrógrado para tratar e/ou prevenir doenças e distúrbios envolvendo neurônios motores (por exemplo, esclerose lateral amiotrófica (ALS); atrofia muscular espinhal (SMA), etc.). Por exemplo, o vetor do vírus pode ser distribuído ao tecido muscular, a partir do qual pode migrar para os neurônios.

**[247]** Os exemplos a seguir, que são incluídos neste documento apenas para fins ilustrativos, não se destinam a ser limitantes.

#### **MODALIDADES NUMERADAS**

**[248]** As seguintes modalidades numeradas estão incluídas no escopo da divulgação.

**[249]** 1. Uma proteína do capsídeo de vírus adeno-associado (AAV) recombinante, em que a proteína do capsídeo compreende uma substituição em uma alça da proteína do capsídeo AAV exposta na superfície, em que a substituição tem uma sequência de qualquer uma das SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, ou 194.

**[250]** 2. A proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a modalidade 1, em que a substituição tem uma sequência de qualquer uma das SEQ ID NO: 14, 17, 19, ou 22.

**[251]** 3. A proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a modalidade 1 ou 2, em que a proteína do capsídeo compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de identidade de sequência com uma proteína

do capsídeo de qualquer um dentre AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV bovino ou AAV aviário.

**[252]** 4. A proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a modalidade 1-3, em que a proteína do capsídeo compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma das SEQ ID NO: 11-12, 23-49, ou 195-254.

**[253]** 5. A proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-3, em que o capsídeo compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 11-12, 23-49, ou 195-254.

**[254]** 6. A proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a modalidade 5, em que o capsídeo compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO. 32, 35, 37, ou 40.

**[255]** 7. A proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-3, em que a substituição de aminoácidos substitui os aminoácidos na região correspondente às posições de aminoácidos 591-596 da SEQ ID NO. 11 ou os aminoácidos 590-595 da SEQ ID NO. 12.

**[256]** 8. Uma proteína de capsídeo de AAV recombinante, em que a proteína de capsídeo compreende uma substituição compreendendo uma sequência de seis aminoácidos ( $X^1$ - $X^2$ - $X^3$ - $X^4$ - $X^5$ - $X^6$ ) que não ocorre na proteína de capsídeo de AAV nativa, em que  $X^2$  é V e  $X^5$  é L (SEQ ID NO: 186).

**[257]** 9. A proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a modalidade 8, em que a substituição substitui os aminoácidos na região correspondente às posições de aminoácidos 591-596 da SEQ ID NO. 11 ou os aminoácidos 590-595 da SEQ ID NO. 12.

**[258]** 10. A proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a modalidade 8 ou 9, em que a substituição está em uma alça da proteína do capsídeo de AAV exposta na superfície.

**[259]** 11. A proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-10, em que  $X^1$  não é T,  $X^3$  não é D,  $X^4$  não é R e  $X^6$  não é T.

**[260]** 12. A proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer

uma das modalidades 8-11, em que X<sup>1</sup> é K, G, F, I, H, ou R.

**[261]** 13. A proteína do capsídeo de AAV recombinante de qualquer uma das modalidades 8-12, em que X<sup>3</sup> é R, L, H, G ou N.

**[262]** 14. A proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das modalidades 8-13, em que X<sup>4</sup> é D, A, S, ou V, ou R.

**[263]** 15. A proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das modalidades 8-14, em que X<sup>6</sup> é F, R, P, N, ou Q.

**[264]** 16. A proteína do capsídeo de AAV recombinante de qualquer uma das modalidades 8-11, em que X<sup>1</sup> é K, X<sup>3</sup> é R, X<sup>4</sup> é D, e X<sup>6</sup> é F.

**[265]** 17. A proteína do capsídeo de AAV recombinante de qualquer uma das modalidades 8-11, em que X<sup>1</sup> é R, X<sup>3</sup> é L, X<sup>4</sup> é A, e X<sup>6</sup> é R.

**[266]** 18. A proteína do capsídeo de AAV recombinante de qualquer uma das modalidades 8-11, em que X<sup>1</sup> é R, X<sup>3</sup> é H, X<sup>4</sup> é A, e X<sup>6</sup> é R.

**[267]** 19. A proteína do capsídeo de AAV recombinante de qualquer uma das modalidades 8-11, em que X<sup>1</sup> é R, X<sup>3</sup> é H, X<sup>4</sup> é S, e X<sup>6</sup> é R.

**[268]** 20. A proteína do capsídeo de AAV recombinante de qualquer uma das modalidades 8-11, em que X<sup>1</sup> é G, X<sup>3</sup> é G, X<sup>4</sup> é V, e X<sup>6</sup> é P.

**[269]** 21. A proteína do capsídeo de AAV recombinante de qualquer uma das modalidades 8-11, em que X<sup>1</sup> é F, X<sup>3</sup> é N, X<sup>4</sup> é A, e X<sup>6</sup> é N.

**[270]** 22. A proteína do capsídeo de AAV recombinante de qualquer uma das modalidades 8-11, em que X<sup>1</sup> é I, X<sup>3</sup> é R, X<sup>4</sup> é S, e X<sup>6</sup> é N.

**[271]** 23. A proteína do capsídeo de AAV recombinante de qualquer uma das modalidades 8-11, em que X<sup>1</sup> é H, X<sup>3</sup> é L, X<sup>4</sup> é R, e X<sup>6</sup> é N.

**[272]** 24. A proteína do capsídeo de AAV recombinante de qualquer uma das modalidades 8-11, em que X<sup>1</sup> é R, X<sup>3</sup> é L, X<sup>4</sup> é A, e X<sup>6</sup> é Q.

**[273]** 25. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das modalidades 8-24, em que a proteína do capsídeo de AAV é de um sorotipo de AAV selecionado dentre AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV bovino e AAV aviário.

**[274]** 26. Uma proteína do capsídeo de AAV recombinante compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 11-12, 23-49, ou 195-

254.

**[275]** 27. A proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a modalidade 26, compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 32, 35, 37, ou 40.

**[276]** 28. Uma sequência nucleotídica em que codifica uma proteína do capsídeo de AAV de acordo com qualquer uma das modalidades 1-27.

**[277]** 29. A sequência nucleotídica, de acordo com a modalidade 28, em que a sequência nucleotídica é uma sequência de DNA.

**[278]** 30. A sequência nucleotídica, de acordo com a modalidade 28, em que a sequência nucleotídica é uma sequência de RNA.

**[279]** 31. Um vetor de expressão compreendendo a sequência nucleotídica de acordo com qualquer uma das modalidades 28-30.

**[280]** 32. Uma célula compreendendo a sequência de nucleotídeos de qualquer uma das modalidades 28 a 30 ou o vetor de expressão da modalidade 31.

**[281]** 33. Um vetor viral de AAV recombinante compreendendo a proteína do capsídeo de acordo com qualquer uma das modalidades de 1 a 27.

**[282]** 34. O vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a modalidade 33, em que o vetor viral de AAV tem um perfil de transdução potencializado em relação a um tecido alvo, em comparação com um vetor viral de AAV contendo uma proteína do capsídeo que não compreende a substituição.

**[283]** 35. O vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a modalidade 34, em que o tecido alvo é um tecido oftálmico.

**[284]** 36. O vetor viral de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das modalidades 33-35, compreendendo ainda um ácido nucleico de carga encapsulado pela proteína do capsídeo.

**[285]** 37. O vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a modalidade 36, em que o ácido nucleico de carga codifica uma proteína terapêutica ou RNA.

**[286]** 38. O vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a modalidade 36 ou 37, em que o ácido nucleico de carga codifica uma ou mais das seguintes proteínas ou um anticorpo que se liga a ele: proteína reguladora da condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR), distrofina, pró-peptídeo de miostatina, folistatina, receptor solúvel da activina tipo 11, IGF- I, mutante dominante para

kappa B, sarcospan, utrofina, mini-utrofina, Fator VIII, Fator IX, Fator X, eritropoietina, angiostatina, endostatina, catalase, tirosina hidroxilase, superóxido dismutase, leptina, o receptor de LDL, lipoproteína lipase, ornitina transcarbamilase, p-globina, a-globina, espectrina, alfa-1-antitripsina, adenosina desaminase, hipoxantina guanina fosforribosil transferase, p-glucocerebrosidase, esfingomielinase, hexosaminidase A lisossomal, desidrogenase de cetoácido de cadeia ramificada, proteína RP65, interferon alfa, interferon beta, interferon gama, interleucina-2, interleucina-4, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, linfotoxina, fatores de crescimento peptídicos, fatores neurotróficos, somatotropina, insulina, fatores de crescimentos semelhantes à insulina tipo 1 ou 2, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento do nervo, fator neurotrófico-3 ou -4, fator neurotrófico derivado do cérebro, RANKL, VEGF, fator de crescimento derivado da glia, fator de transformação do crescimento-alfa ou beta, alfa-glicosidase ácida lisossomal, alfa-galactosidase A, receptor solúvel do fator de crescimento de necrose tumoral, S100A1, parvalbumina, adenilil ciclase tipo 6, inibidor 1 da SERCA<sub>2A</sub> de PP 1 ou fragmentos destes, bARKct ativo constitutivamente truncado, IRAP, proteína anti-miostatina, aspartoacilase, trastuzumabe, galanina, Neuropeptídeo Y, Vasohibin 2, timidina quinase, citosina desaminase, toxina diftérica, fator de necrose tumoral, p53, Rb, Wt-1, TRAIL, RS1, opsina, TKR-beta, C3, CFH, e/ou FAS-ligante.

**[287]** 39. O vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 36 ou 37, em que o ácido nucleico de carga codifica uma molécula de edição gênica.

**[288]** 40. O vetor viral de AAV recombinante da modalidade 39, em que a molécula de edição gênica é uma nuclease.

**[289]** 41. O vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, em que a molécula de edição gênica é uma nuclease Cas9.

**[290]** 42. O vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a modalidade 39 ou 40, em que a molécula de edição gênica é uma nuclease Cpf1.

**[291]** 43. O vetor viral de AAV recombinante da modalidade 39, em que a molécula de edição gênica é um RNA guia.

**[292]** 44. Uma composição farmacêutica compreendendo o vetor viral de AAV

recombinante de acordo com qualquer uma das modalidades de 33 a 43.

**[293]** 45. A composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 44, em que a composição compreende ainda um carreador farmacêuticamente aceitável.

**[294]** 46. Um método de tratamento de um paciente em necessidade deste, compreendendo a administração ao paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um vetor viral de AAV recombinante de qualquer uma das modalidades 33 a 43 ou a composição farmacêutica da modalidade 44 ou 45.

**[295]** 47. O método, de acordo com a modalidade 46, em que o paciente tem uma doença ou distúrbio ocular.

**[296]** 48. O método, de acordo com a modalidade 47, em que a doença ou distúrbio ocular é retinite pigmentosa, degeneração macular, neurite óptica, amaurose congênita de Leber, neuropatia óptica hereditária de Leber, acromatopsia, retinosquise ligada ao X, neurite óptica, coroideremia, atrofia óptica, distrofia de cones da retina, retinopatia, retinoblastoma, glaucoma, síndrome de Bardet-Biedl, síndrome de Usher, aniridia, ataxia de Friedreich, distrofia macular viteliforme, retinoblastoma, doença de Stargardt, doença de Charcot-Marie-Tooth, distrofia de Fuchs, acidemia propiônica, ou daltonismo.

**[297]** 49. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 46-48, em que o paciente é um mamífero.

**[298]** 50. O método da modalidade 49, em que o paciente é um humano.

**[299]** 51. Um método de introdução de uma molécula de ácido nucleico em uma célula, compreendendo o contato da célula com o vetor viral de AAV recombinante de acordo com qualquer uma das modalidades 33-43.

**[300]** 52. Um vetor viral de AAV, de acordo com qualquer uma das modalidades 32-43, em que é para uso como um medicamento.

**[301]** 53. Um vetor viral de AAV, de acordo com qualquer uma das modalidades 32-43, em que é para uso em um método de tratamento.

## **EXEMPLOS**

### **EXEMPLO 1. Modificação combinatória e seleção de vetores de AAV direcionados aos tecidos oftálmicos**

**[302]** O método para gerar mutantes de AAV direcionados aos tecidos oftálmicos (ou seja, o RPE e/ou retina) é o seguinte. A primeira etapa envolve a identificação



de alça 3D conformacional na superfície do capsídeo de AAV, por exemplo, usando microscopia crioeletrônica. Resíduos selecionados dentro da alça exposta na superfície são então submetidos a mutagênese usando primers degenerados com cada códon substituído por nucleotídeos NNK e fragmentos de genes combinados por montagem de Gibson e/ou PCR de várias etapas. Genes que codificam capsídeos contendo uma biblioteca degenerada de motivos antigênicos mutados são clonados em um genoma de AAV de tipo selvagem para substituir a sequência de DNA codificadora de Cap original, produzindo uma biblioteca de plasmídeos. As bibliotecas de plasmídeo são então transfectadas em 293 linhagens de células produtoras com um plasmídeo helper adenoviral para gerar bibliotecas de capsídeo de AAV, que podem então ser submetidas à seleção. A geração bem-sucedida de bibliotecas AAV é confirmada por meio de sequenciamento de DNA.

**[303]** A fim de selecionar novas cepas de AAV que tenham perfis de transdução desejáveis, as bibliotecas de AAV são submetidas a vários ciclos de infecção em primatas não humanos. Em cada estágio, os tecidos de interesse são isolados de sujeitos animais. Os lisados celulares colhidos dos tecidos de interesse são sequenciados para identificar isolados do vetor AAV que transduzem com sucesso um tecido alvo de interesse. Após múltiplas rodadas de infecção em primatas não humanos, as sequências isoladas de cada região mutagenizada são combinadas em todas as permutações e combinações.

**[304]** Como um exemplo específico não limitativo, uma alça exposta à superfície em uma proteína da capsídeo de AAV foi submetida a mutagênese como descrito acima para produzir bibliotecas degeneradas de vetores de AAV. As bibliotecas degeneradas foram então submetidas a uma primeira rodada de infecção em primatas não humanos (FIG. 1A, FIG. 2A). Especificamente, as bibliotecas foram administradas ao olho dos primatas por injeção intravítrea. O epitélio pigmentar da retina (RPE) foi colhido no dia 7 pós-infecção e sequenciado para identificar isolados de AAV únicos (FIG. 1B, FIG. 2B).

**[305]** Os AAVs isolados durante a primeira rodada de evolução (FIG. 2B) foram então reintroduzidos em um segundo primata não humano por injeção intravítrea. O epitélio pigmentar da retina (RPE) (Fig. 3A) e a retina (FIG. 4A) foram colhidos no dia 7 pós-infecção e sequenciados para identificar isolados de AAV únicos.

**[306]** Os AAVs isolados durante a segunda rodada de evolução em RPE foram reintroduzidos em um terceiro primata não humano, e os AAVs isolados durante a segunda rodada de evolução na retina foram reintroduzidos em um quarto primata não humano por injeção intravítrea. O RPE foi colhido no dia 7 pós-infecção do terceiro primata (FIG. 3B) e a retina foi colhida no dia 7 pós-infecção do quarto primata (FIG. 4B) e sequenciado para identificar isolados de AAV únicos.

**[307]** Uma descrição dos vários isolados identificados em RPE e/ou retina é fornecida na Tabela 7. Estes isolados visam e infectam especificamente o RPE e/ou a retina in vivo, em primatas não humanos.

**TABELA 7. Substituições de alça de superfície em AAVs recombinantes isolados de RPE e/ou retina**

<b>Sequência Substituindo Sequência de Alça de Superfície</b>	<b>Sequência de Capsídeo Completo</b>	
KVRDLF (SEQ ID NO: 14)	SEQ ID NOs	32, 41
RVLALR (SEQ ID NO: 15)	SEQ ID NOs	33, 42
RVHALR (SEQ ID NO: 16)	SEQ ID NOs	34, 43
RVHSLR (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NOs	35, 44
GVGVLV (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NOs	36, 45
FVNALN (SEQ ID NO: 19)	SEQ ID NOs	37, 46
IVRSLN (SEQ ID NO: 20)	SEQ ID NOs	38, 47
HVLRLN (SEQ ID NO: 21)	SEQ ID NOs	39, 48
RVLALQ (SEQ ID NO: 22)	SEQ ID NOs	40, 49
RVRGLR (SEQ ID NO: 187)	SEQ ID NOs	195, 203
KVRTLR (SEQ ID NO: 188)	SEQ ID NOs	196, 204
MVGNLV (SEQ ID NO: 189)	SEQ ID NOs	197, 205
RVLGLR (SEQ ID NO: 190)	SEQ ID NOs	198, 206
KVAGLC (SEQ ID NO: 191)	SEQ ID NOs	199, 207
IVRPLV (SEQ ID NO: 192)	SEQ ID NOs	200, 208
KVRGLA (SEQ ID NO: 193)	SEQ ID NOs	201, 209
RVRGLG (SEQ ID NO: 194)	SEQ ID NOs	202, 210

**EXEMPLO 2. Vetores AAV recombinantes transduzem células em cultura**

**[308]** Para confirmar se vários vetores de AAV isolados de RPE e/ou retina de primata não humano no Exemplo 1 são geralmente infecciosos e capazes de transduzir células em cultura, vários vetores de AAV empacotando um transgene de luciferase foram preparados, em que cada vetor de AAV incluiu uma sequência de capsídeo compreendendo uma das substituições listadas na Tabela 7. Os vetores de AAV foram colocados em contato com células U87 (linhagem de células de glioblastoma primária) mantidas em condições de cultura padrão. As células foram infectadas a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10.000 vg/célula. 48 horas depois, as células foram lisadas, o lisado foi contactado com um substrato bioluminescente e RFUs foram medidos.

**[309]** Como mostrado na FIG. 5, todos os vetores de AAV testados foram capazes de transduzir com sucesso células U87 em cultura, resultando na expressão de seu transgene empacotado (luciferase) nas células. Estes dados confirmam que os vetores de AAV recombinantes são infecciosos e podem ser usados para distribuir um transgene a uma célula de interesse.

**[310]** O precedente é ilustrativo da presente invenção e não deve ser interpretado como uma limitação desta. A invenção é definida pelas seguintes reivindicações, com equivalentes das reivindicações a serem incluídos nestas.

## REIVINDICAÇÕES

1. Proteína do capsídeo de vírus adeno-associado (AAV) recombinante, **caracterizada** pelo fato de que a proteína do capsídeo compreende uma substituição em uma alça da proteína do capsídeo de AAV exposta na superfície, em que a substituição tem uma sequência de qualquer uma das SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, ou 194.

2. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a substituição tem uma sequência de qualquer uma das SEQ ID NO: 14, 17, 19, ou 22.

3. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que a proteína do capsídeo compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de identidade de sequência com uma proteína do capsídeo de qualquer um dentre AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV bovino e AAV aviário.

4. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que a proteína do capsídeo compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 90% de identidade de sequência com qualquer uma das SEQ ID NO: 11-12, 23-49, ou 195-254.

5. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de que o capsídeo compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 11-12, 23-49, ou 195-254.

6. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de que o capsídeo compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO. 32, 35, 37, ou 40.

7. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a substituição de aminoácidos substitui os aminoácidos na região correspondente às posições de aminoácidos 591-596 da SEQ ID NO. 11 ou os aminoácidos 590-595 da SEQ ID NO. 12.

8. Proteína do capsídeo de AAV recombinante **caracterizada** pelo fato de

que a proteína do capsídeo compreende uma substituição compreendendo uma sequência de seis aminoácidos ( $X^1$ - $X^2$ - $X^3$ - $X^4$ - $X^5$ - $X^6$ ) que não ocorre na proteína nativa do capsídeo de AAV, em que  $X^2$  é V e  $X^5$  é L (SEQ ID NO: 186).

9. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que a substituição substitui os aminoácidos na região correspondente às posições de aminoácidos 591-596 da SEQ ID NO. 11 ou os aminoácidos 590-595 da SEQ ID NO. 12.

10. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, **caracterizada** pelo fato de que a substituição está em uma alça da proteína do capsídeo de AAV exposta na superfície.

11. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-10, **caracterizada** pelo fato de que  $X^1$  não é T,  $X^3$  não é D,  $X^4$  não é R e  $X^6$  não é T.

12. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, **caracterizada** pelo fato de que  $X^1$  é K, G, F, I, H, ou R.

13. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, **caracterizada** pelo fato de que  $X^3$  é R, L, H, G, ou N.

14. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, **caracterizada** pelo fato de que  $X^4$  é D, A, S, ou V, ou R.

15. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, **caracterizada** pelo fato de que  $X^6$  é F, R, P, N, ou Q.

16. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, **caracterizada** pelo fato de que  $X^1$  é K,  $X^3$  é R,  $X^4$  é D e  $X^6$  é F.

17. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, **caracterizada** pelo fato de que  $X^1$  é R,  $X^3$  é L,  $X^4$  é A e  $X^6$  é R.

18. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, **caracterizada** pelo fato de que  $X^1$  é R,  $X^3$  é H,  $X^4$  é A e  $X^6$  é R.

19. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, **caracterizada** pelo fato de que X<sup>1</sup> é R, X<sup>3</sup> é H, X<sup>4</sup> é S e X<sup>6</sup> é R.

20. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, **caracterizada** pelo fato de que X<sup>1</sup> é G, X<sup>3</sup> é G, X<sup>4</sup> é V e X<sup>6</sup> é P.

21. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, **caracterizada** pelo fato de que X<sup>1</sup> é F, X<sup>3</sup> é N, X<sup>4</sup> é A e X<sup>6</sup> é N.

22. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, **caracterizada** pelo fato de que X<sup>1</sup> é I, X<sup>3</sup> é R, X<sup>4</sup> é S e X<sup>6</sup> é N.

23. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, **caracterizada** pelo fato de que X<sup>1</sup> é H, X<sup>3</sup> é L, X<sup>4</sup> é R e X<sup>6</sup> é N.

24. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-11, **caracterizada** pelo fato de que X<sup>1</sup> é R, X<sup>3</sup> é L, X<sup>4</sup> é A e X<sup>6</sup> é Q.

25. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-24, **caracterizada** pelo fato de que a proteína do capsídeo de AAV é de um sorotipo de AAV selecionado dentre AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh32.33, AAVrh74, AAV bovino e AAV aviário.

26. Proteína do capsídeo de AAV recombinante **caracterizada** pelo fato de que compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 11-12, 23-49, ou 195-254.

27. Proteína do capsídeo de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizada** pelo fato de que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 32, 35, 37, ou 40.

28. Sequência nucleotídica **caracterizada** pelo fato de que codifica uma proteína do capsídeo de AAV de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-27.

29. Sequência nucleotídica, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizada** pelo fato de que a sequência nucleotídica é uma sequência de DNA.

30. Sequência nucleotídica, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizada** pelo fato de que a sequência nucleotídica é uma sequência de RNA.

31. Vetor de expressão **caracterizado** pelo fato de que compreende a sequência nucleotídica de acordo com qualquer uma das reivindicações 28-30.

32. Célula **caracterizada** pelo fato de que compreende a sequência nucleotídica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 28 a 30, ou o vetor de expressão de acordo com a reivindicação 31.

33. Vetor viral de AAV recombinante **caracterizado** pelo fato de que compreende a proteína do capsídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 27.

34. Vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizado** pelo fato de que o vetor viral de AAV tem um perfil de transdução aprimorado em relação a um tecido alvo, em comparação com um vetor viral de AAV contendo uma proteína do capsídeo que não compreende a substituição.

35. Vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 34, **caracterizado** pelo fato de que o tecido alvo é um tecido oftálmico.

36. Vetor viral de AAV recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 33-35, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um ácido nucleico de carga encapsulado pela proteína do capsídeo.

37. Vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico de carga codifica uma proteína terapêutica ou RNA.

38. Vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 36 ou 37, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico de carga codifica uma ou mais das seguintes proteínas ou um anticorpo que se liga às mesmas: proteína reguladora da condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR), distrofina, pró-peptídeo de miostatina, folistatina, receptor solúvel da activina tipo 11, IGF-I, mutante dominante para kappa B, sarcospan, utrofina, mini-utrofina, Fator VIII, Fator IX, Fator X, eritropoietina, angiostatina, endostatina, catalase, tirosina hidroxilase, superóxido dismutase, leptina, o receptor de LDL, lipoproteína lipase,

ornitina transcarbamilase,  $\beta$ -globina,  $\alpha$ -globina, espectrina, alfa-1-antitripsina, adenosina desaminase, hipoxantina guanina fosforribosil transferase,  $\beta$ -glucocerebrosidase, esfingomielinase, hexosaminidase A lisossomal, desidrogenase de cetoácido de cadeia ramificada, proteína RPE65, interferon alfa, interferon beta, interferon gama, interleucina-2, interleucina-4, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, linfotóxina, fatores de crescimento peptídicos, fatores neurotróficos, somatotropina, insulina, fatores de crescimentos semelhantes à insulina tipo 1 ou 2, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento do nervo, fator neurotrófico-3 ou -4, fator neurotrófico derivado do cérebro, RANKL, VEGF, fator de crescimento derivado da glia, fator de transformação do crescimento-alfa ou beta, alfa-glicosidase ácida lisossomal, alfa-galactosidase A, receptor solúvel do fator de crescimento de necrose tumoral, S100A1, parvalbumina, adenilil ciclase tipo 6, SERCA<sub>2A</sub>, inibidor 1 de PP 1 ou seus fragmentos, bARKct ativo constitutivamente truncado, IRAP, proteína anti-miostatina, aspartoacilase, trastuzumabe, galanina, Neuropeptídeo Y, Vasohibin 2, timidina quinase, citosina desaminase, toxina diftérica, fator de necrose tumoral, p53, Rb, Wt-1, TRAIL, RS1, opsina, TKR-beta, C3, CFH e/ou FAS-ligante.

39. Vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 36 ou 37, **caracterizado** pelo fato de que o ácido nucleico de carga codifica uma molécula de edição gênica.

40. Vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 39, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de edição gênica é uma nuclease.

41. Vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de edição gênica é uma nuclease Cas9.

42. Vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de edição gênica é uma nuclease Cpf1.

43. Vetor viral de AAV recombinante, de acordo com a reivindicação 39, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de edição gênica é um RNA guia.

44. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de que compreende



o vetor viral de AAV recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações de 33 a 43.

45. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizada** pelo fato de que a composição compreende ainda um carreador farmacêuticamente aceitável.

46. Método de tratamento de um paciente em necessidade, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração, ao paciente, de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um vetor viral de AAV recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações de 33 a 43.

47. Método, de acordo com a reivindicação 46, **caracterizado** pelo fato de que o paciente tem uma doença ou distúrbio ocular.

48. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que a doença ou distúrbio ocular é retinite pigmentosa, degeneração macular, neurite óptica, amaurose congênita de Leber, neuropatia óptica hereditária de Leber, acromatopsia, retinosquise ligada ao X, neurite óptica, coroideremia, atrofia óptica, distrofia de cones da retina, retinopatia, retinoblastoma, glaucoma, síndrome de Bardet-Biedl, síndrome de Usher, aniridia, ataxia de Friedreich, distrofia macular viteliforme, retinoblastoma, doença de Stargardt, doença de Charcot-Marie-Tooth, distrofia de Fuchs, acidemia propiônica, ou deficiência de visão para cores.

49. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46-48, **caracterizado** pelo fato de que o paciente é um mamífero.

50. Método, de acordo com a reivindicação 49, **caracterizado** pelo fato de que o paciente é um humano.

51. Método de introdução de uma molécula de ácido nucleico em uma célula, **caracterizado** pelo fato de que compreende o contato da célula com o vetor viral de AAV recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 33-43.

52. Vetor viral de AAV, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32-43, **caracterizado** pelo fato de que é para uso como um medicamento.

53. Vetor viral de AAV, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32-43, **caracterizado** pelo fato de que é para uso em um método de tratamento.

Pré-evolução

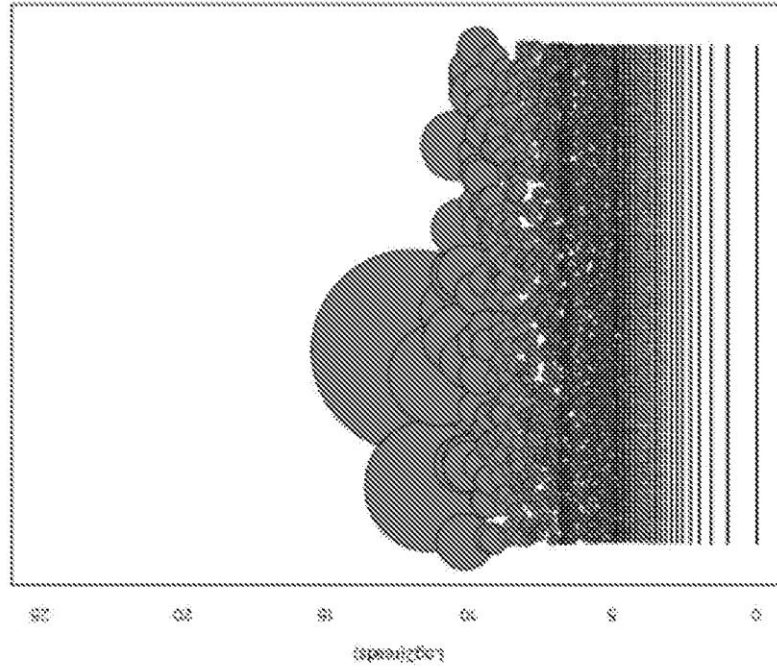
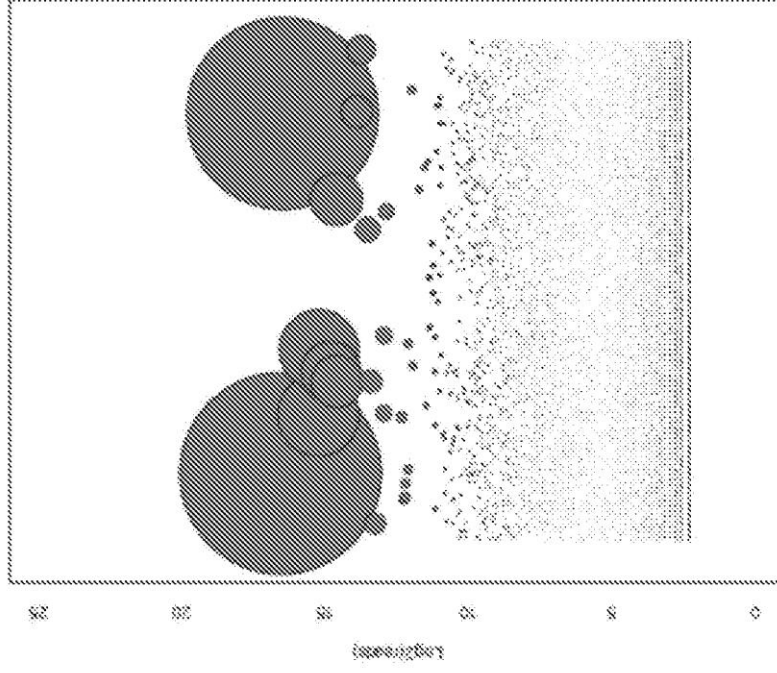


Fig. 1A

Após 1 Rodada de Evolução



70,3% de  
redução em  
clones únicos

Fig. 1B

Entrada na 2ª Rodada

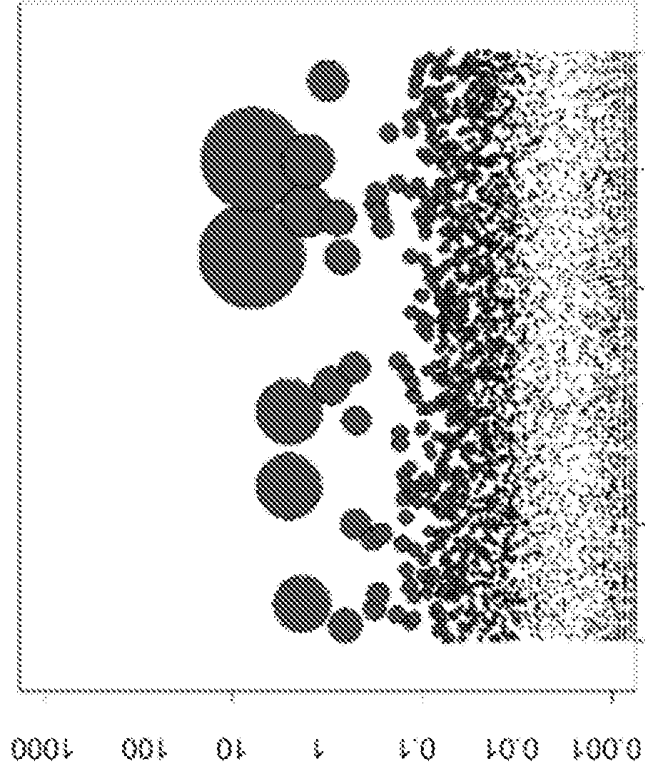


Fig. 2B

Entrada na 1ª Rodada

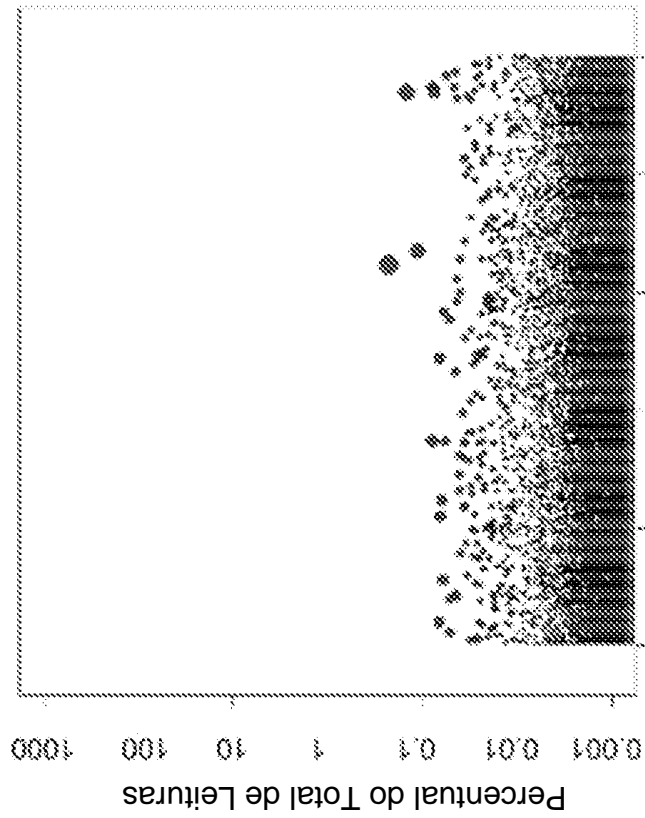
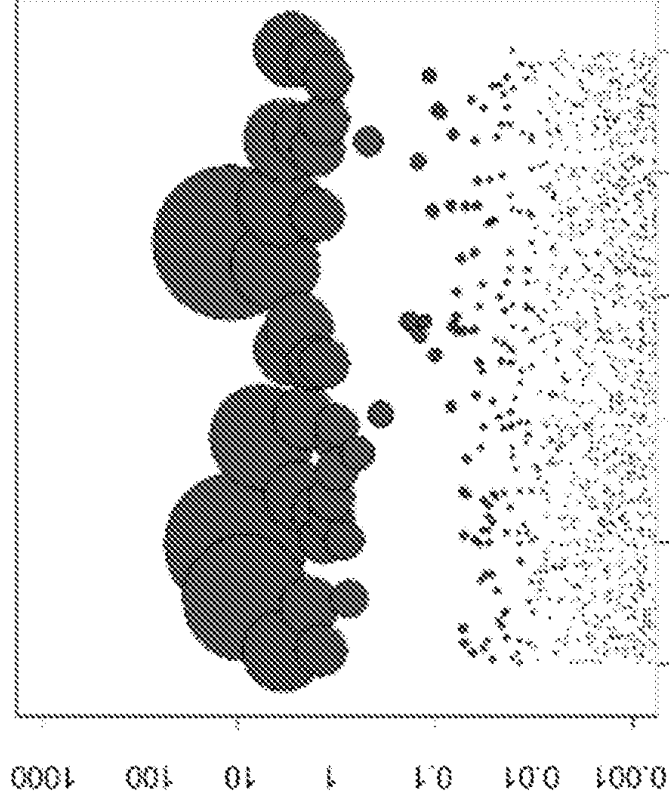


Fig. 2A

Saída na 3ª Rodada

(retina)



Entrada na 3ª Rodada

(retina)

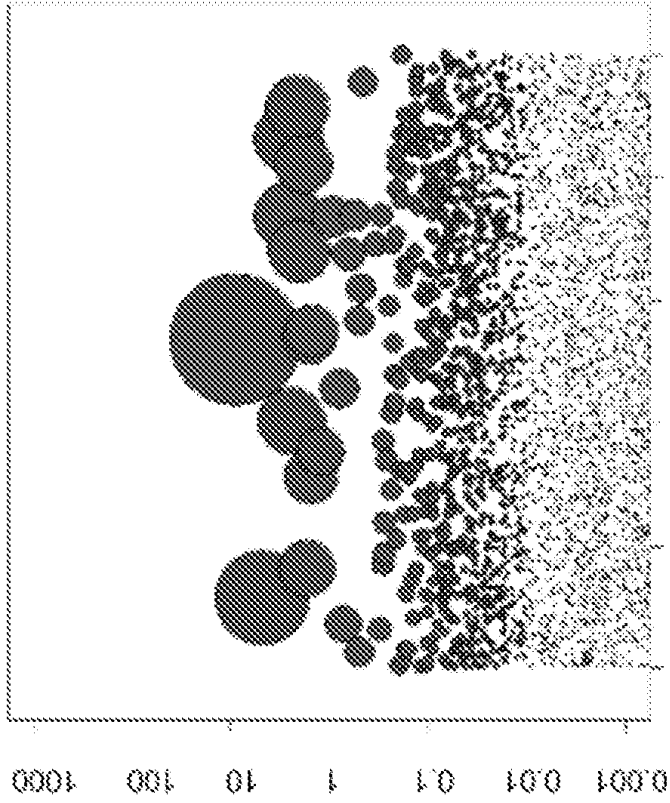


Fig. 3B

Fig. 3A

Saída na 3ª Rodada

(RPE)

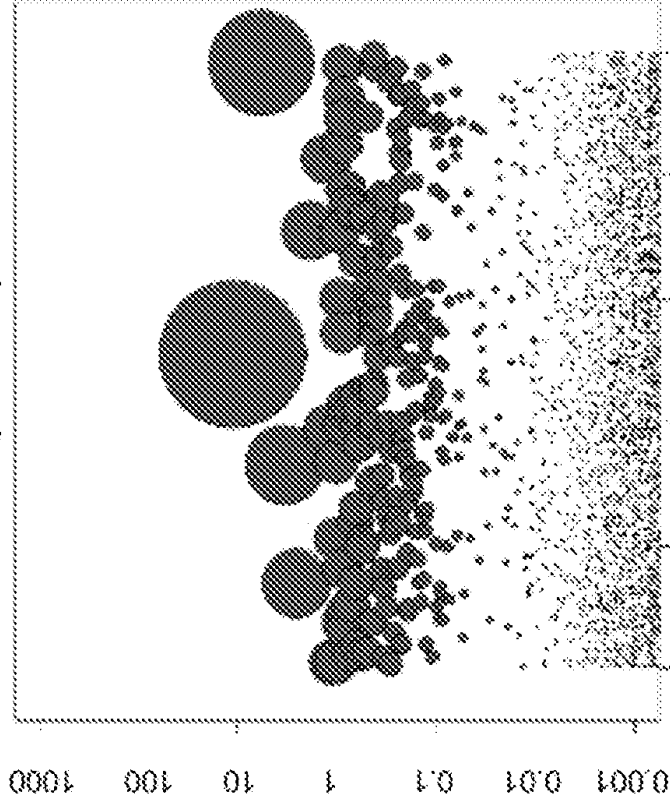


Fig. 4B

Entrada na 3ª Rodada

(RPE)

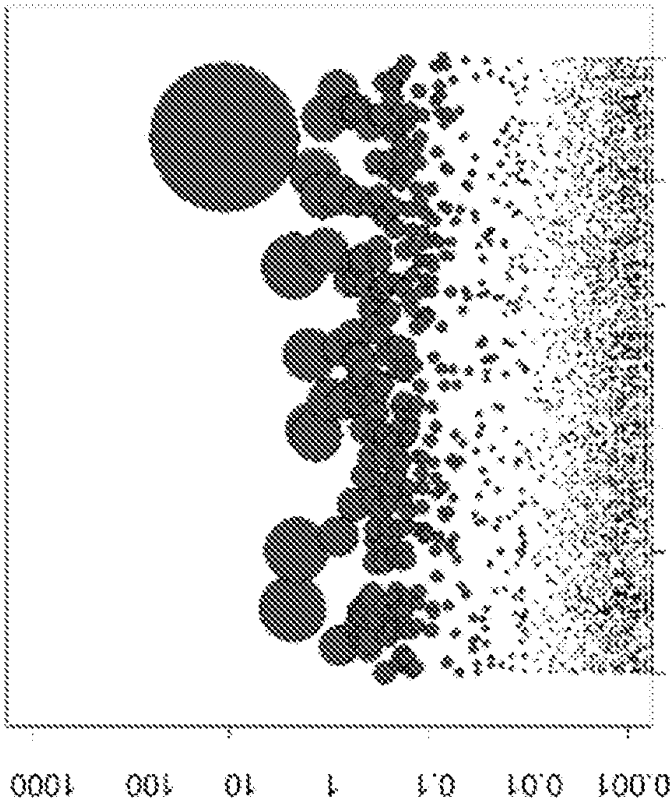


Fig. 4A

U87

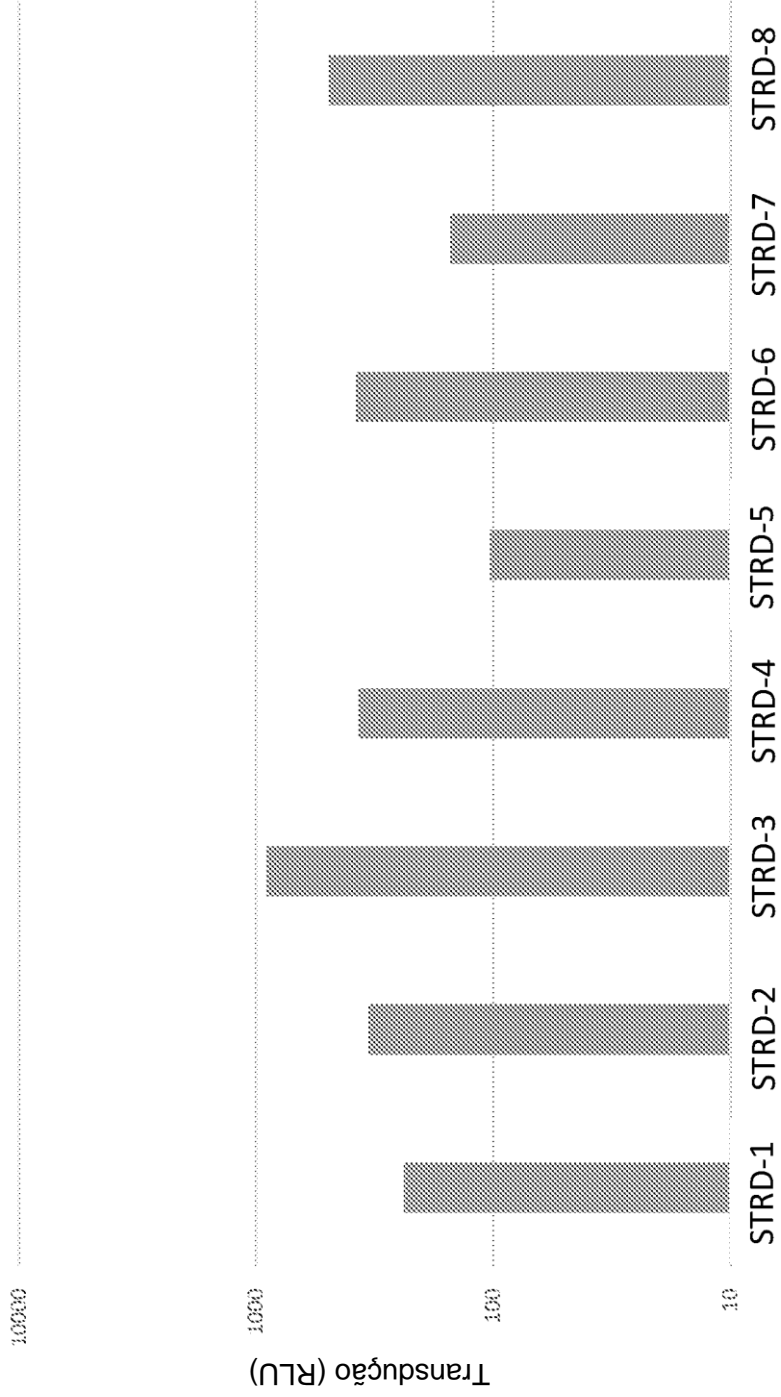


Fig. 5

## **RESUMO**

### **VETORES DE VÍRUS DIRECIONADOS A TECIDOS OFTÁLMICOS**

A presente divulgação fornece proteínas do capsídeo de AAV que compreendem uma modificação na sequência de aminoácidos e vetores virais que compreendem a proteína do capsídeo de AAV modificada. A divulgação também fornece métodos de administração dos vetores virais e capsídeos dos vírus da divulgação a uma célula ou a um sujeito *in vivo*.

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

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 202001233 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 07/12/2020
- Hora de Geração do Código: 09:55:34
- Código de Controle:
  - Campo 1: D8A3C5CB6B037278
  - Campo 2: F47265DB005FFF22