

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0710671-8 A2**

(22) Data de Depósito: 09/04/2007
(43) Data da Publicação: 16/08/2011
(RPI 2119)



(51) Int.Cl.:

A01N 43/04 2006.01
A01N 63/00 2006.01
A61B 5/055 2006.01
A61K 49/00 2006.01
C07H 21/04 2006.01
C12N 15/00 2006.01

(54) Título: **MÉTODOS E COMPOSIÇÕES
RELACIONADAS À PARTÍCULAS DE VÍRUS FAGO
ADENOASSOCIADAS**

(30) Prioridade Unionista: 07/04/2006 US 60/744.492

(73) Titular(es): The Board Of Regents Of The University Of Texas
System

(72) Inventor(es): Amin Hajitou, Frank C. Marini III, Juri Gelovani,
Martin Trepel, Mian Alauddin, Renata Pasqualini, Wadih Arap

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel-shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2007066265 de 09/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/118245 de 18/10/2007

(57) Resumo: MÉTODOS E COMPOSIÇÕES RELACIONADAS À PARTÍCULAS DE VÍRUS FAGO ADENOASSOCIADAS. Modalidades da invenção são geralmente direcionadas a composições e métodos de liberação de um ou mais transgenes a uma célula alvo, tal como uma célula de tumor, em um sítio específico de maneira a alcançar expressão aprimorada e para construções e composições úteis em tais aplicações. A invenção refere-se também ao uso para preparar medicamentos. Em certos aspectos, a expressão de um ácido nucléico terapêutico pode ser acessada antes da administração de um tratamento ou procedimento de diagnóstico em um indivíduo.

"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES RELACIONADAS A PARTÍCULAS DE VÍRUS:
FAGO ADENOASSOCIADAS"

Este pedido reivindica a prioridade do pedido de patente provisório US 60/744.492 depositado em 7 de abril de 2005, que é aqui incorporado a título de referência em sua
5 totalidade.

O Governo dos Estados Unidos possui direitos sobre esta invenção conforme uma concessão do National Institutes of Health (NIH).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

10

I. CAMPO DA INVENÇÃO

As modalidades desta invenção são direcionadas geralmente à biologia e à medicina. Em particular, a invenção é direcionada ao campo da terapia gênica usando AAVP em combinação com imageamento para proporcionar terapia gênica a um paciente.

II. ANTECEDENTES

15

Uma limitação de muitas terapias com base biológica tem sido a incapacidade de conseguirem uma distribuição controlada e eficaz de moléculas biologicamente ativas às células tumorais ou a sua matriz circundante. O objetivo de empregar terapia com base em gene é obter a distribuição eficaz dos produtos biológicos, como resultado da expressão de gene, ao seu sítio de ação dentro da célula. A terapia com base em gene pode proporcionar
20 também controle sobre o nível, sincronização, e duração da ação desses produtos biologicamente ativos por inclusão de elementos de promotor/ativador no material genético transferido, resultando em uma intervenção terapêutica eficaz. Métodos estão sendo desenvolvidos para a distribuição controlada de genes a vários tecidos somáticos e tumores usando novas formulações de DNA, e para controlar a expressão de gene usando sistemas
25 de expressão específica para célula, ativada por replicação e controlada por fármaco.

25

Em uma abordagem, a terapia gênica tenta alvejar células de um modo específico. Assim, um gene terapêutico é ligado, de alguma maneira, a uma molécula de alvejamento de modo a distribuir o gene em uma célula ou tecido alvo. Os métodos correntes envolvem tipicamente ligar uma molécula de alvejamento tal como um ligante ou anticorpo que
30 reconhece um receptor de internalização ao ou DNA simples ou um vírus de célula mamífera contendo o gene desejado. Quando o DNA simples é usado ele deve ser condensado *in vitro* em uma geometria compacta para entrar nas células. Um polícatión, tal como polilisina, é usado para neutralizar a carga sobre o DNA e condensá-lo em estruturas toroidais. Contudo, esse processo de condensação é pouco entendido e de controle difícil,
35 fazendo, assim, com que a fabricação de fármacos homogêneos para terapia gênica seja extremamente desafiadora.

35

Bacteriófago (fago), tal como fago lambda e filamentosos, tem sido usado,

ocasionalmente, nos esforços de transferir DNA para células de mamíferos. Em geral, verificou-se que a transdução de lambda era um evento relativamente raro e a expressão do gene repórter era fraca. Em um esforço para intensificar a eficácia de transdução, métodos que utilizam fosfato de cálcio ou lipossomos (que não alvejam tipicamente um receptor de superfície de célula) foram usados em conjunto com lambda. Transferência de gene foi observada via fago lambda usando co-precipitação de fosfato de cálcio, ou via fago filamentoso usando DEAE-dextrana ou lipopoliamina. Contudo, esses métodos de introduzir DNA em células mamíferas não são práticas para aplicações de terapia gênica, já que a eficácia de transfecção tende a ser baixa, não específica, e a transfecção é não somente inconveniente, mas também promíscua quanto ao tipo de célula.

Correntemente, vírus eucarióticos proporcionam, inquestionavelmente, a distribuição de transgene e transdução superiores (Kootstra e Verma, 2003; Machida, 2003), mas alvejamento direcionado por ligante de tais vetores geralmente requer ablação de seu tropismo nativo para receptores de células mamíferas (Miller *et al.*, 2003; Mizuguchi e Hayakawa, 2004; White *et al.*, 2004). Em contraste, vírus procarióticos, tal como bacteriófago (fago), são geralmente considerados veículos fracos para a transdução de células mamíferas. Contudo, apesar de suas deficiências inerentes como vírus "eucarióticos", partículas de fago não têm tropismo para células mamárias (Zacher *et al.*, 1980; Barrow e Soothill, 1997; Barbas *et al.*, 2001) e foram ainda adaptadas para transduzir tais células (Ivanenkov *et al.*, 1999; Larocca *et al.*, 1999; Poul e Marks, 1999; Piersanti *et al.*, 2004), embora com baixa eficácia.

Meios mais confiáveis para alvejar vetores a células específicas (ou receptores) e para assegurar um grau terapeuticamente útil de distribuição e expressão de gene são assim requeridos, se vetores úteis em aplicações terapêuticas têm que ser obtidos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

As modalidades da invenção são geralmente direcionadas a composições e métodos de distribuição de um ou mais transgenes para uma célula alvo, tal como uma célula tumoral, de um modo específico para sítio para obter expressão intensificada, e a construções e composições úteis em tais aplicações. Em certos aspectos, a expressão de um ácido nucléico terapêutico pode ser avaliada antes da administração de um tratamento ou procedimento diagnóstico a ou em um paciente. Em um outro aspecto, a determinação ou a avaliação de expressão na região ou localização necessária para benefício terapêutico é avaliada e qualquer tratamento desnecessário ou benéfico marginal pode ser mantido em vista dos tratamentos alternativos.

Sem estar ligado a qualquer teoria ou mecanismo em particular, a presente exposição é baseada na observação que a expressão de transgene pode ser aumentada quando o transgene é integrado a um genoma com uma multiplicidade maior que um. De

particular interesse é a capacidade de certas partículas de AAVP quimérico de transduzirem células com mais que uma cópia do transgene, freqüentemente como um concatâmero. Células transduzidas podem ser também monitoradas pela expressão de um gene repórter transportado pelas partículas de AAVP quimérico. Qualquer transgene pode ser incluído em e expresso de uma partícula de AAVP desta exposição.

Certas modalidades da invenção incluem métodos e composições para detectar transferência de gene para e/ou expressão de gene em um tecido alvo de um paciente, que compreende uma ou mais das seguintes etapas:

(a) Uma etapa que pode ser usada nos presentes métodos inclui distribuir para o tecido alvo de um paciente um vetor de AAVP contendo um gene repórter que pode estar ou não presente no paciente hospedeiro. Tipicamente, o gene repórter não será expresso no local ou na região a ser imageada e/ou tratada. Em certos aspectos, o gene repórter é um tipo selvagem, um mutante, ou uma quinase geneticamente engenheirada. Em um outro aspecto, a quinase é uma timidina quinase. Em ainda um outro aspecto, a quinase é um gene da timidina quinase do vírus do herpes simples ou uma timidina quinase humana tipo 2. Tipicamente, o vetor de transferência ou AAVP é introduzido nas células do tecido alvo, e o gene repórter é expresso nas células do tecido alvo, gerando, assim, um produto de gene repórter (proteína) que se acumula somente nas células efetivamente transfectadas pelo vetor AAVP.

(b) Uma outra etapa que pode ser usada é administrar ao paciente hospedeiro um substrato repórter marcado onde as células expressando um produto do gene repórter da etapa (a) metabolizam o substrato repórter marcado para produzir um metabólito repórter marcado onde o substrato repórter marcado compreende um análogo de nucleosídeo radiomarcado; e

(c) Ainda uma outra etapa que pode ser usada nos presentes métodos inclui efetuar o imageamento não invasivo do tecido ou células alvo contendo o metabólito marcado do substrato repórter depois da depuração do substrato repórter. Em certos aspectos, o paciente é submetido ao imageamento depois da depuração do substrato repórter residual não metabolizado pelo produto gênico repórter do paciente hospedeiro de modo a detectar a transferência de gene e expressão no tecido alvo. Em um outro aspecto, o paciente ou pacientes são submetidos ao imageamento depois de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais minutos, horas, dias, ou semanas, dependendo do metabolismo de depuração do substrato repórter não metabolizado.

Os métodos podem compreender ainda esperar por um período de tempo depois da etapa (b) suficiente para permitir que cerca de, pelo menos, ou no máximo, 60, 65, 67, 70, 75, 77, 80, 85, 87, 90, 95, 97% ou mais, incluindo todos os valores e faixas entre eles não metabolizados (substrato repórter não metabolizado pelo produto de expressão) pelo

produto gênico repórter para depurar do paciente. O substrato não metabolizado pode incluir marcação não específica derivada do substrato repórter residual não metabolizado. O vetor de AAVP pode ser introduzido nas células do tecido alvo por transfecção *in vitro* ou *in vivo* (transdução). Em certos aspectos, AAVP é administrado via intravenosa, intratumoral, intra-
 5 arterial, intrapleural, intrabronquico, e/ou oral.

Em certos aspectos, um substrato repórter é marcado com um radioisótopo adequado por imageamento por tomografia de emissão de pósitron, câmera gama, tomografia computadorizada por emissão de fóton único. O substrato repórter e/ou metabólito do substrato repórter são compostos que contêm um nuclídeo de isótopo estável
 10 que inclui, mas sem limitação, ^2H , ^{13}C , ^{15}N e ^{19}F . Em um outro aspecto, o metabólito de repórter marcado é submetido ao imageamento por câmera gama ou tomografia computadorizada por emissão de fóton único. Em ainda outros aspectos, o metabólito de substrato repórter marcado é submetido ao imageamento por imageamento de ressonância magnética.

Um vetor de AAVP pode incorporar um gene repórter e promotor de transcrição adequados e elementos intensificadores, que asseguram a ativação transcricional específica de tecido, seletiva de tecido, ou específica de fator de transcrição, ou específica de transdução de sinal de co-expressão de gene repórter ou terapêutico. Em certos aspectos, o órgão, tecido, células, ou uma célula são transfectados com um gene repórter acoplado
 20 operavelmente a elementos reguladores de transcrição, tais como promotor e/ou elementos intensificadores *ex vivo* (*in vitro*) antes da administração das células ou uma célula a um paciente. Um análogo de 2'-flúor-nucleosídeo marcado inclui, mas sem limitação, 2'-flúor-2'-desóxi-1β-D-arabinofuranosil-5-etil-uracil (FEAU); 5-[^{123}I]-2'-flúor-5-iodo-1β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[^{124}I]-2'-flúor-5-iodo-1β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[^{131}I]-2'-flúor-5-iodo-1β-D-arabinofuranosil-uracil, 5-[^{18}F]-2'-flúor-5-flúor-1β-D-arabinofuranosil-uracil; 2-[^{11}I]-
 25 e 5-([^{11}C]-metil)-2'-flúor-5-metil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 2-[^{11}C]-2'-flúor-5-etil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-([^{11}C]-etil)-2'-flúor-5-etil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-(2-[^{18}F]-etil)-2'-flúor-5-(2-flúor-etil)-1-β-D-arabinofuranosil-uracil, 5-[^{123}I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[^{124}I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[^{131}I]-2'-
 30 flúor-5-iodovinil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[^{123}I]-2'-flúor-5-iodo-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[^{124}I]-2'-flúor-5-iodo-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[^{131}I]-2'-flúor-5-iodo-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[^{123}I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[^{124}I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[^{131}I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-ribofuranosil-uracil; ou 9-4-[^{18}F]flúor-3-(hidroximetil)butilguanina.

Os dados de imageamento podem englobar, mas sem limitação, imageamento obtido com imageamento de ressonância magnética nuclear (MRI), medicina nuclear, tomografia de emissão de pósitron (PET), tomografia computadorizada (CT), ultra-

sonografia (US), imageamento óptico, imageamento no infravermelho; microscopia in vivo e radiografia com raios X. O imageamento pode ser acoplado a dispositivos médicos, fármacos ou compostos, agentes de contraste ou outros agentes ou estímulos que podem ser usados para gerar informação adicional do imageamento. As imagens são obtidas usando essas modalidades da lesão, tecido, espécime, sistema, organismo, paciente ou indivíduo e podem ser imagens estáticas ou dinâmicas, ambas no tempo e/ou no espaço.

O imageamento pode ter correspondência com o tecido, espécime, sistema, organismo, ou paciente dos quais são obtidos dados biológicos em grande escala. A informação proveniente do imageamento é extraída de cada imagem, estudo ou estudos ou exames do imageamento, e pode consistir em características de imageamento quantitativas ou qualitativas que podem englobar, mas sem limitação, diferenças na morfologia, composição, estrutura, fisiologia, expressão de gene, ou função de uma lesão, um tecido, espécime, sistema, organismo, ou do paciente. Exemplos de informação de imageamento incluem, mas sem limitação, características de imageamento que podem ser extraídas de CT dinâmico intensificado em contraste multifásico, imageamento funcional, espectroscopia de ressonância magnética, imageamento por tensor de difusão, imageamento com base em difusão ou perfusão, bem como imageamento alvejado encapsulado por medicina nuclear ou PET. Como exemplo, vide as Publicações de Patente US 20030033616 e US 20060223141, que são aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade.

Em certas modalidades, a invenção inclui métodos de tratamento de um paciente que compreende uma ou mais das seguintes etapas:

(a) administrar um AAVP terapêutico que codifica um repórter a um paciente tendo, suspeito de ter ou em risco de desenvolver uma condição patológica ou doença;

(b) avaliar a expressão *in situ* do AAVP terapêutico em um tecido ou célula alvejada para tratamento pela detecção do repórter codificado ou da atividade do repórter.

Em certos aspectos, os métodos podem compreender ainda administrar um tratamento de câncer ao paciente com base na expressão de um nível terapeuticamente suficiente de um agente terapêutico expresso pelo ácido nucléico de AAVP no órgão, tecido ou célula alvos. Em um outro aspecto, o segundo AAVP terapêutico pode ser administrado se a expressão do primeiro AAVP terapêutico não é expressa em um nível terapeuticamente eficaz. O segundo AAVP terapêutico pode compreender um segundo ligante de alvejamento ou uma combinação ou ligantes. Também, o segundo AAVP pode compreender um segundo elemento de controle para a expressão no órgão, tecido, células ou célula, alvos. A avaliação da expressão do AAVP pode ser por detecção não invasiva do repórter ou de uma atividade do repórter (por exemplo, detecção do substrato marcado metabolizado por uma proteína repórter). Em certos aspectos, o repórter é uma proteína terapêutica. Em um outro aspecto, a proteína terapêutica é uma enzima conversora de pró-fármaco. Em ainda um

outro aspecto, o repórter é uma enzima, e particularmente uma quinase. Em certas modalidades, a quinase é a timidina quinase, por exemplo, uma HSV-tk ou uma tk2 humana. Tipicamente, a quinase modifica ou metaboliza um componente detectavelmente marcado ou substrato marcado. Em certos aspectos, o substrato ou o composto compreende um

5 marcador detectável que é detectável por fluorescência, quimioluminescência, espectroscopia de raman intensificada (SERS), imageamento de ressonância magnética (MRI), tomografia computadorizada (CT), imageamento por tomografia de emissão de pósitron (PET). Em certos aspectos, o composto detectavelmente marcado é um análogo de nucleosídeo. O composto detectavelmente marcado pode incluir, mas sem limitação,

10 fluordesoxiglicose (FDG); 2'-flúor-2'-desóxi-1β-D-arabinofuranosil-5-etil-uracil (FEAU); 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodo-1β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodo-1β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodo-1β-D-arabinofuranosil-uracil, 5-[¹⁸F]-2'-flúor-5-flúor-1β-D-arabinofuranosil-uracil; 2-[¹¹I]- e 5-([¹¹C]-metil)-2'-flúor-5-metil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 2-[¹¹C]-2'-flúor-5-etil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-([¹¹C]-etil)-2'-flúor-5-etil-1-β-D-

15 arabinofuranosil-uracil; 5-(2-[¹⁸F]-etil)-2'-flúor-5-(2-flúor-etil)-1-β-D-arabinofuranosil-uracil, 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodo-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodo-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodo-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-ribofuranosil-uracil; ou 9-4-[¹⁸F]flúor-3-(hidroximetil)butilguanina.

Em um outro aspecto, o substrato ou composto marcado pode ser marcado com

18F, ²⁷⁷Ac, ²¹¹At, ¹²⁸Ba, ¹³¹Ba, ⁷Be, ²⁰⁴Bi, ²⁰⁵Bi, ²⁰⁶Bi, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ⁸²Br, ¹⁰⁹Cd, ⁴⁷Ca, ¹¹C, ¹³C, ¹⁴C, ³⁶Cl, ⁴⁸Cr, ⁵¹Cr, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁶⁵Dy, ¹⁵⁵Eu, ¹⁵³Gd, ⁶⁶Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²Ga, ¹⁹⁸Au, ²H, ³H, ¹⁶⁶Ho, ¹¹¹In, ¹¹³In, ¹¹⁵In, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁹Ir, ¹⁹¹Ir, ¹⁹²Ir, ¹⁹⁴Ir, ¹⁹F, ⁵²Fe, ⁵⁵Fe, ⁵⁹Fe, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵O, ¹⁹¹Os, ¹⁰⁹Pd, ³²P, ³³P, ⁴²K, ²²⁶Ra, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁸²Rb, ¹⁵³Sm, ⁴⁶Sc, ⁴⁷Sc, ⁷²Se, ⁷⁵Se, ¹⁰⁵Ag, ¹⁵N, ²²Na, ²⁴Na, ⁸⁹Sr, ³⁵S, ³⁸S, ¹⁷⁷Ta, ⁹⁶Tc, ^{99m}Tc, ²⁰¹Tl, ²⁰²Tl, ¹¹³Sn, ^{117m}Sn, ¹²¹Sn, ¹⁶⁶Yb, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ⁶²Zn, or ⁶⁵Zn. Em aspectos particulares, o marcador detectável é o marcador

25 ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹¹¹I, ^{99m}Tc, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ³²P, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Ga, ²⁰¹Tl, ⁷⁷Br, ou ¹⁸F.

30 Um AAVP da invenção pode compreender uma fração que alveja seletivamente um tecido ou célula alvejada para tratamento. Em certos aspectos, a fração é codificada por ou acoplada a uma proteína capsídeo e/ou uma proteína capsídeo recombinante de um AAVP. Em certos aspectos, uma proteína capsídeo compreende um peptídeo de alvejamento. O peptídeo de alvejamento pode ser um peptídeo cíclico, um peptídeo bicíclico e/ou um

35 peptídeo linear. O peptídeo de alvejamento se liga seletivamente a uma célula que expressa uma integrina na superfície da célula. Uma integrina pode ser uma αvβ3 ou αvβ5 integrina. Em um outro aspecto, o peptídeo compreende um motivo RGD. Em ainda um outro aspecto,

o peptídeo pode se ligar especificamente a uma célula que expressa um receptor de transferrina, tal peptídeo pode incluir uma seqüência de aminoácidos que compreende CRTIGPSVC.

Em certos aspectos, um paciente pode ter, estar suspeito de ter, ou em risco de desenvolver uma doença hiperproliferativa. Doenças hiperproliferativas incluem, mas sem limitação, fibrossarcoma, miossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiossarcoma, endoteliossarcoma, linfangiossarcoma, linfangioendoteliossarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, câncer gástrico, câncer esofágico, câncer retal, câncer pancreático, 5 câncer ovariano, câncer da próstata, câncer uterino, câncer da cabeça e do pescoço, câncer de pele, câncer do cérebro, carcinoma de células escamosas, carcinoma da glândula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de célula renal, hepatoma, carcinoma do duto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilm, câncer cervical, 10 câncer testicular, carcinoma de pequenas células de pulmão, carcinoma de não pequenas células de pulmão, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, ou sarcoma de Kaposi. Em um aspecto particular, a doença 15 hiperproliferativa é glioma.

Em uma outra modalidade, um gene repórter e/ou terapêutico é operativamente acoplado a um promotor seletivo de tecido ou de célula, ou um promotor específico de tecido ou de célula. Em certos aspectos, avaliar a expressão compreende administrar um composto ou substrato marcado que é metabolizado por uma célula que expressa ácido 25 nucléico de AAVP e que é tipicamente não metabolizado em uma extensão significativa por tecidos não alvo.

Um AAVP terapêutico pode codificar também um segundo gene terapêutico. O segundo gene terapêutico pode ser, mas sem limitação, um supressor de tumor, um RNA inibidor, um DNA inibidor, ou uma enzima conversora de pró-fármaco.

30 Em ainda outras modalidades, as composições da invenção podem incluir um ácido nucléico de AAVP terapêutico que compreende um segmento de ácido nucléico compreendendo RNA inibidor ou um DNA inibidor. O RNA inibidor pode ser um siRNA, um miRNA, ou RNA ou DNA anti-sentido. Em certos aspectos, um ácido nucléico de AAVP está compreendido em uma partícula de fago. Em um outro aspecto, a partícula compreende um 35 ligante de alvejamento conforme descrito aqui.

Certas modalidades incluem composições e métodos para modular a expressão de um gene que compreende um ácido nucléico de AAVP ou partícula que compreende tal.

De acordo com a presente invenção, um gene ou polipeptídeo selecionado pode se referir a qualquer proteína, polipeptídeo, ou peptídeo. Um gene ou polipeptídeo terapêutico é um gene ou polipeptídeo que pode ser administrado a um paciente com a finalidade de tratar ou prevenir uma doença. Por exemplo, um gene terapêutico pode ser um gene

5 administrado a um paciente para o tratamento ou prevenção de câncer. Exemplos de genes terapêuticos incluem, mas sem limitação, Rb, CFTR, p16, p21, p27, p57, p73, C-CAM, APC, CTS-1, *zac1*, *scFV ras*, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, MMAC1, FCC, MCC, BRCA2, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 IL-12, GM-CSF, G-CSF, timidina quinase, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri, Fas-L, *mda-7*, *fus*,

10 interferon α , interferon β , interferon γ , p53, ABLI, BLC1, BLC6, CBFA1, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ETS1, ETS2, ETV6, FGR, FOX, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TCL3, YES, MADH4, RB1, TP53, WT1, TNF, BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, ApoA1, ApoAIV, ApoE, Rap1A, citosina desaminase, Fab, ScFv, BRCA2, *zac1*, ATM, HIC-1,

15 DPC-4, FHIT, PTEN, ING1, NOEY1, NOEY2, OVCA1, MADR2, 53BP2, IRF-1, *zac1*, DBCCR-1, *rks-3*, COX-1, TFPI, PGS, Dp, E2F, *ras*, *myc*, *neu*, *raf*, *erb*, *fms*, *trk*, *ret*, *gsp*, *hst*, *abl*, E1A, p300, VEGF, FGF, trombospondina, BAI-1, GDAIF, ou MCC.

Outros exemplos de genes terapêuticos incluem genes que codificam enzimas. Exemplos incluem, mas sem limitação, ACP dessaturase, uma ACP hidroxilase, uma ADP-glicose piroforilase, uma ATPase, uma álcool desidrogenase, uma amilase, uma amiloglicosidase, uma catalase, uma celulase, uma ciclooxygenase, uma descarboxilase, uma dextrinase, uma esterase, uma DNA polimerase, uma RNA polimerase, a hialuron sintase, uma galactosidase, uma glucanase, uma glicose oxidase, uma GTPase, uma

20 helicase, uma hemicelulase, uma hialuronidase, uma integrase, uma invertase, uma isomerase, uma quinase, uma lactase, uma lipase, uma lipoxigenase, uma liase, uma lisozima, uma pectinaesterase, uma peroxidase, uma fosfatase, uma fosfolipase, uma fosforilase, uma poligalacturonase, uma proteinase, uma peptidase, uma pulanase, uma recombinase, uma transcriptase reversa, uma topoisomerase, uma xilanase, um gene repórter, uma interleucina, ou uma citocina.

30 Outros exemplos de genes terapêuticos incluem o gene que codifica a carbamoil sintetase I, ornitina transcarbamilase, arginossuccinato sintetase, arginossuccinato liase, arginase, fumarilacetoacetato hidrolase, fenilalanina hidroxilase, alfa-1 antitripsina, glicose-6-fosfatase, receptor de lipoproteína de baixa densidade receptor, porfobilinogênio desaminase, fator VIII, fator IX, cistationa beta.-sintase, cetoácido de cadeia ramificada

35 descarboxilase, albumina, isovaleril-CoA desidrogenase, propionil CoA carboxilase, metil malonil CoA mutase, glutaril CoA desidrogenase, insulina, -glicosidase, piruvato carboxilase, fosforilase hepática, fosforilase quinase, glicina descarboxilase, H-proteína, T-proteína,

ATPase transportadora de cobre da doença de Menkes, ATPase transportadora de cobre da doença de Wilson, citosina desaminase, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, galactose-1-fosfato uridiltransferase, fenilalanina hidroxilase, glicocerbrosidase, esfingomielinase, -L-iduronidase, glicose-6-fosfato desidrogenase, HSV timidina quinase, ou timidina quinase humana.

Genes terapêuticos incluem também genes que codificam hormônios. Exemplos incluem, mas sem limitação, genes que codificam o hormônio do crescimento, prolactina, lactogênio placentário, hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante, gonadotropina coriônica, hormônio estimulador da tireóide, leptina, adrenocorticotropina, angiotensina I, angiotensina II, β -endorfina, hormônio estimulador de β -melanócito, colecistocinina, endotelina I, galanina, peptídeo inibidor gástrico, glucagon, insulina, lipotropinas, neurofisinas, somatostatina, calcitonina, peptídeo relacionado ao gene de calcitonina, peptídeo relacionado ao gene de β -calcitonina, hipercalcemia de fator de malignidade, proteína relacionado ao hormônio paratireóide, peptídeo similar ao glucagon, pancreastatina, peptídeo pancreático, peptídeo YY, PHM, secretina, peptídeo intestinal vasoativo, oxitocina, vasopressina, vasotocina, encefalinamida, metorfinamida, hormônio estimulador de alfa melanócito, fator natriurético atrial, amilina, componente de amiloide P, hormônio liberador de corticotropina, fator liberador do hormônio de crescimento, hormônio liberador do hormônio luteinizante, neuropeptídeo Y, substância K, substância P, ou hormônio liberador de tirotropina.

Outras modalidades da invenção são discutidas por todo este relatório descritivo. Qualquer modalidade discutida com respeito a um aspecto da invenção se aplica também a outros aspectos da invenção e vice versa. As modalidades na seção de Exemplos devem ser entendidas como modalidades da invenção que são aplicáveis a todos os aspectos da invenção.

Os termos “inibir”, “reduzir”, ou “prevenção”, ou qualquer variação destes termos, quando usados nas reivindicações e/ou no relatório descritivo, incluem qualquer decréscimo mensurável ou inibição completa para alcançar um resultado desejado.

A palavra “um” ou “uma”, quando usada em conjunto com o termo “compreender” nas reivindicações e/ou no relatório descritivo, pode significar “um (1)”, mas é também consistente com o significado de “um ou mais”, “pelo menos um”, e “um ou mais que um”.

É contemplado que qualquer modalidade discutida aqui pode ser implementada com respeito a qualquer método ou composição da invenção, e vice-versa. Além disso, as composições e kits da invenção podem ser usados para obter os métodos da invenção.

Por todo este relatório descritivo, o termo “cerca de” é usado para indicar que um valor inclui um desvio padrão de erro para o dispositivo ou método que está sendo empregado para determinar o valor.

O termo “ou” na reivindicações é usado com o significado de “e/ou” a menos que indicado explicitamente para referir-se somente a alternativas ou as alternativas são mutuamente exclusivas, embora a descrição suporte uma definição que se refira às alternativas apenas e “e/ou”.

Como usadas neste relatório descritivo e na(s) reivindicação(coes), as palavras “compreendendo” (e qualquer forma de compreendendo, tais como “compreender” e “compreende”), “tendo” (e qualquer forma de ter, tais como “têm” e “tem”), “incluindo” (e qualquer forma de incluindo, tais como “inclui” e “incluem”) e “contendo” (e qualquer forma de contendo, “tais como “contêm” e “contém”) são inclusivas ou de terminações livres e não excluem elementos adicionais não citados ou etapas dos métodos.

Outros objetivos, características e vantagens da presente invenção tornar-se-ão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada. Contudo, deve ser entendido que a descrição detalhada e os exemplos específicos, quando indicando modalidades específicas da invenção, são dados tão-somente a título de ilustração, pois várias alterações e modificações dentro do espírito e escopo da invenção tornar-se-ão aparentes para aqueles versados na técnica a partir desta descrição detalhada.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As seguintes figuras formam parte do presente relatório descritivo e estão incluídas para demonstrar adicionalmente alguns aspectos da presente invenção. A invenção pode ser mais bem entendida com referência a uma ou mais destas figuras em combinação com a descrição das modalidades específicas apresentadas aqui. Algumas modalidades exemplares específicas da descrição podem ser entendidas, em parte, por referência à seguinte descrição e às figuras acompanhantes.

Figuras 1A-1E. A Figura 1A é um gráfico que mostra a ligação de RGD-4C AAVP às células mamíferas que expressam αv integrinas, em contraste com o AAVP não alvejado ou AAVP que compreende peptídeos de controle negativo tais como RGE-4C ou várias versões misturadas da seqüência de RGD-4C. A Figura 1B é uma imagem que mostra RGD-4C AAVP transportando genes repórter indicando internalização direcionada por ligante. A Figura 1C mostra a transferência do gene alvejado mediada por RGD-4C AAVP- β -galactosidase para as células KS 1767. A Figura 1D mostra inibição da transdução pelo peptídeo RGD-4C sintético, mas não por um peptídeo de controle não relacionado; níveis de transdução não específica foram determinados usando AAVP não alvejado. Um anticorpo anti- β -gal foi usado para coloração e a expressão do gene foi detectada por imunofluorescência. A Figura 1E mostra o resgate do AAV recombinante de células infectadas com RGD-4C AAVP. Células 293 humanas foram incubadas com RGD-4C AAVP (10^6 unidades transdutoras/célula) ou controles negativos (RGD-4C fago-GFP não quimérico, alvejado, AAVP-GFP não alvejado). Quatro dias depois da infecção, as células

foram infectadas com um plasmídeo de expressão de AAV:rep e cap e superinfectadas com adenovírus tipo 5 do tipo selvagem (Ad). As células foram colhidas 72 horas pós-infecção adenoviral e os sobrenadantes foram então usados para infectar novas células 293. A expressão da GFP foi analisada por citometria de fluxo 48 horas mais tarde. São mostrados os aumentos médios de AAV-GFP produzida sobre o substrato depois do resgate de cada construção.

As Figuras 2A-2C. A Figura 2A é um histograma que mostra um sumário de análises de citometria de fluxo de clones 293 estavelmente transduzidos com AAVP-GFPneo (n=9) ou fago-GFPneo (n = 9). Os triângulos abertos indicam percentagens de células positivas à proteína fluorescente verde (GFP) e as barras pretas representam níveis de expressão da GFP (intensidade fluorescente média; MFI). A Figura 2B mostra análise de Southern blot da persistência do cassete de transgene em linhas de células clonais transduzidas com RGD-4C AAVP-GFPneo ou RGD-4C fago-GFPneo. DNA celular total de células parentais 293 não transduzidas ou cada um dos clones de células transduzidas (#1-9 para cada grupo) foi duplamente digerido com AF1II-XhoI (um sítio de digestão de restrição por cada enzima dentro da construção DNA que flanqueia o cassete de transgene). A Figura 2C mostra a análise de concatêmeros, de cabeça à cauda, potenciais do cassete de transgene por Southern blot. O DNA celular total foi digerido com Xho-I (sítio de digestão de restrição única dentro do cassete de transgene próximo à 3'ITR) antes do Southern blotting.

Figuras 3A-3B. A Figura 3A mostra a coloração imunoistoquímica contra fago em xenoenxertos derivados de KS 1767 depois da administração sistêmica (via intravenosa na veia da cauda) de RGD-4C AAVP (5×10^{10} TU) ou controles negativos (AAVP não alvejado, RGD-4C AAVP misturado, ou RGE-4C AAVP) em camundongos sem pelagem (*nude*) profundamente anestesiados compreendendo xenoenxertos de tumores derivados de KS1767. As construções de AAVP foram deixadas em circulação por 5 minutos, seguido por perfusão e remoção cirúrgica dos tumores. Um anticorpo policlonal contra fago foi usado para colorir em secções tumorais embutidas em parafina. As setas apontam para a coloração do fago em vasos sangüíneos tumorais. A Figura 3B mostra a análise de imunofluorescência da expressão da GFP em xenoenxertos derivados de KS1767 no dia 7 depois da administração sistêmica ou de RGD 4C AAVP-GFP ou de controles negativos (não alvejados, misturados ou mutantes) conforme indicados.

Figuras 4A-4E. A Figura 4A mostra o imageamento bioluminescente *in vivo* da expressão de luciferase de vagalume depois da distribuição sistêmica de AAVP alvejado. Camundongos sem pelagem (*nude*) contendo xenoenxertos de tumores derivados de DU145 receberam uma dose única sistêmica de ou RGD-4C AAVP-luc (5×10^{11} TU, via intravenosa) ou de controles (AAVP-Luc não alvejada, ou RGD-4C AAVP-Luc misturada).

Dez dias depois, o imageamento por bioluminescência (BLI) de camundongos tendo tumor foi realizado para avaliar a expressão do transgene. As escalas de calibração estão fornecidas nos painéis. A Figura 4B mostra imageamento por PET com multi-traçador em camundongos contendo tumor depois da distribuição sistêmica de RGD-4C AAVP-HSVtk alvejada. Os camundongos sem pelagem (*nude*) contendo xenoenxertos de tumores derivados de DU145 ($n = 9$ camundongos contendo tumor por cada coorte) receberam uma dose única sistêmica (5×10^{11} UT, via intravenosa) de RGD-4C AAVP-HSVtk ou de AAVP-HSVtk não alvejada. São apresentadas as imagens de PET com [^{18}F]-FDG e [^{18}F]-FEAU obtidos antes e depois do tratamento com GCV. T, tumor; H, coração; BR, cérebro; BL, bexiga. As escalas de calibração estão fornecidas nos painéis. A sobreposição das imagens por PET e as imagens fotográficas de camundongos contendo tumores representativos foram realizadas para simplificar a interpretação da biodistribuição de [^{18}F]-FDG e [^{18}F]-FEAU. A Figura 4C mostra as curvas de xenoenxertos de tumores individuais depois da administração de AAVP. A Figura 4D mostra a dinâmica temporal da expressão do gene de HSVtk conforme avaliada por imageamento por PET repetitivo com [^{18}F]-FEAU em dias diferentes depois da administração de AAVP. A Figura 4E mostra as alterações na viabilidade do tumor antes e depois da terapia com GCV conforme avaliação com [^{18}F]-FDG PET.

Figuras 5A-5G. A Figura 5A é um gráfico mostrando os volumes de tumor médios $\pm$ desvios padrão (DP) plotados versus tempo. Foram usadas coortes de camundongos sem pelagem (*nude*) imunodeficientes com xenoenxertos humanos estabelecidos (tamanho correspondendo a aproximadamente 50 mm^2) derivados de células KS 1767. Os camundongos receberam uma administração sistêmica única (5×10^{10} TU, via intravenosa) de ou RGD-4C AAVP-HSVtk ou de controles (AAP-HSVtk não alvejada, RGD-4C AAVP-GFP, ou o veículo sozinho). Ganciclovir (GCV) foi administrado aos camundongos a partir do dia 2 pós-tratamento até o final dos experimentos. Posteriormente, todos os camundongos receberam GCV exceto um grupo de controle adicional tratado com RGD-4C AAVP-HSVtk mas sem GCV. A Figura 5B é um gráfico mostrando os volumes de tumor médios $\pm$ desvios padrão (DP) plotados versus tempo. Foram usadas coortes de camundongos sem pelagem (*nude*) imunodeficientes com xenoenxertos humanos estabelecidos (tamanho correspondendo a aproximadamente 50 mm^2) derivados de células de carcinoma UC3 da bexiga. Os camundongos receberam uma administração sistêmica única (5×10^{10} TU, via intravenosa) de ou RGD-4C AAVP-HSVtk ou de controles (AAP-HSVtk não alvejada, RGD-4C AAVP-GFP, ou o veículo sozinho). Ganciclovir (GCV) foi administrado aos camundongos a partir do dia 2 pós-tratamento até o final dos experimentos. Posteriormente, todos os camundongos receberam GCV exceto um grupo de controle adicional tratado com RGD-4C AAVP-HSVtk, mas sem GCV. A Figura 5C é um

gráfico que mostra os volumes de tumor médios $\pm$ desvios padrão (DP) plotados versus tempo. Foram usadas coortes de camundongos sem pelagem (*nude*) imunodeficientes com xenoinxertos humanos estabelecidos (tamanho correspondendo a aproximadamente 50 mm²) derivados de células de carcinoma DU145 da próstata. OS camundongos receberam uma administração sistêmica única (5×10^{10} TU, via intravenosa) de ou RGD-4C AAVP-HSVtk ou de controles (AAP-HSVtk não alvejada, RGD-4C AAVP-GFP, ou o veículo sozinho). Ganciclovir (GCV) foi administrado aos camundongos a partir do dia 2 pós-tratamento até o final dos experimentos. Posteriormente, todos os camundongos receberam GCV exceto um grupo de controle adicional tratado com RGD-4C AAVP-HSVtk, mas sem GCV. São mostrados os volumes de tumor médios $\pm$ desvios padrão (DP) plotados versus tempo. A Figura 5D é um gráfico que mostra a inibição de crescimento de xenoinxertos derivados de DU145 grande (em aproximadamente 150 mm²) por uma dose sistêmica única (5×10^{10} TU, via intravenosa) de RGD-4C AAVP-HSVtk. A Figura 5E é um gráfico que mostra a inibição do crescimento de tumor do carcinoma mamário de camundongo EF43-FGF4 (tamanho correspondente a aproximadamente 50 mm²) em camundongos BALB/c, imunocompetentes, por uma dose intravenosa única (5×10^{10} TU) de RGD-4C AAVP-HSVtk. A Figura 5F é um gráfico que mostra a eficácia de longo prazo de RGD-4C AAVP-HSVtk e GCV por doses repetidas de AAVP (5×10^{10} TU cada, via intravenosa) a camundongos BALB/c, imunocompetentes, contendo tumores EF43-FGR4 isogênicos. Os resultados da terapia foram consistentemente observados em experimentos independentes com coortes de camundongos contendo tumor ($n = 10$ camundongos por grupo de tratamento). As setas indicam os tempos de administração de AAVP. A Figura 5G é um gráfico que mostra o efeito da imunorresposta humoral contra fago em terapia com RGD-4C AAVP-HSVtk. Camundongos BALB/C imunocompetentes ($n = 7$ camundongos por grupo) foram inicialmente "vacinados" recebendo três doses sistêmicas de RGD-4C AAVP-GFP (10^{10} TU por semana, durante três semanas, via intravenosa). Os camundongos foram implantados com células EF43-FGF. Quando os tumores estavam estabilizados (tamanho correspondente a aproximadamente 50 mm²), os camundongos contendo tumor receberam uma dose sistêmica única de RGD-4C AAVP-HSVtk ou RGD-4C AAVP-HSVtk seguido pela manutenção do GCV (iniciada no dia 2 depois da administração do AAVP). Amostras de soro foram coletadas de camundongos, pré- e pós vacinação foi iniciada e de novo no final do esquema de vacinação antes da administração de AAVP de modo a confirmar a presença de títulos altos (até aproximadamente 1:10.000) de IgG anti-fago circulante por ELISA. A vacinação pareceu não afetar os efeitos antitumorais, apesar da presença de anticorpos anti-fago.

Figuras 6A-6B. A Figura 6A é uma imagem de camundongos contendo tumor (painel superior) e tumores removidos cirurgicamente correspondentes (painel inferior) de

todos os grupos experimentais da terapia (tumores mamíferos EF43-FGF4 em camundongos BALB/c imunocompetentes). A Figura 6B é uma análise histopatológica de tumores tratados com EF43-FGF4. Tumores EF43-FGF4 foram recuperados, seccionados e coloridos. Tumores tratados com AAVP-HSVtk não alvejadas (painéis esquerdos), as bordas entre os aros externos e as áreas tumorais centrais (painéis do meio), e áreas tumorais centrais de tumores tratados com RGD-4C AAVP-HSVtk (painel) são mostrados como vistas de alta ampliação dos insertos de baixa ampliação da secções tumorais em série. Com coloração de hematoxilina e eosina (H&E), a imunocoloração anti-CD31 e a coloração de TUNEL de secções tumorais são mostradas. As setas apontam para vasos sanguíneos de tumor e células apoptóticas.

Figura 7. A Figura 7 é um esquema mostrando a formação da construção de RGD-4C AAVP, estratégia de clonagem e estrutura dos vetores resultantes.

Figuras 8A-8C. A Figura 8A mostra uma análise de Southern blot do DNA de RGD-4C AAVP-GFPneo ou RGD-4C fago-GFPneo em linhagens de células clonais transduzidas 293. DNA celular total de células parentais 293 não transduzidas ou clones de células estáveis individuais transduzidas (#1-9 para cada vetor) foi incubada com Stul (sem sítio de digestão de restrição dentro do DNA do vetor), Xba-I (sítio de digestão de restrição único dentro do DNA do vetor), ou SacI-M1ul. Fragmentos de DNA resultantes foram espalhados em gel de agarose a 0,8%, transferidos para uma membrana de náilon e hibridizados com uma neo sonda marcada como indicado. Plasmídeos de vetor digeridos foram também usados como controle. A Figura 8B mostra uma análise de PCR de concatêmeros do cassete de transgene em linhagens de células clonais 293 transduzidas estavelmente com RGD-4C fago-GFPneo ou RGD-4C AAVPGFPneo. Células parentais 293 transduzidas serviram como controle negativo; controles negativos adicionais e um marcador molecular 100 bp (Invitrogen) são também mostrados conforme indicado. *Nested* PCR com iniciadores anelando próximos à extremidade 5' e 3' do cassete de transgene foi realizado para identificar formas concateméricas nos DNAs correspondentes ao RGD-4C AAVP e ao fago RGD-4C. As setas indicam iniciadores (H, cabeça; T, cauda). Produtos de ampliação por PCR foram detectados em géis de agarose a 2% e revelaram o DNA do vetor concatemérico exclusivamente nos clones de células transduzidos com AAVP. A Figura 8C mostra os resultados de seqüenciamento de formas concateméricas diferentes em DNA de AAVP (letras maiúsculas denotam a extremidade 3' do cassete de transgene, as letras em itálico denotam a extremidade 5' do cassete de transgene), concatêmeros de Cabeça à Cauda revelados com ITRs..

Figura 9. A Figura 9 é uma imagem que mostra a imunocoloração da expressão de gene repórter, GFP em órgãos de controle de cérebro, fígado, pâncreas e rim no dia 7 depois de uma dose intravenosa (5×10^{10} TU) de ou RGD-4C AAVP-GFP ou AAVP-GFP em

camundongos.

Figuras 10A-10B. A Figura 10A é uma imagem de coloração imunoistoquímica contra AAVP depois da administração intravenosa de RGD-4C AAVP (painel direito) ou AAVP não alvejado (painel do meio) em camundongos BALB/c imunocompetentes contendo tumores EF43-FGF4. As construções foram deixadas circularem por 5 minutos, seguido por perfusão e recuperação tecidual conforme descrição. Um anticorpo policlonal contra o fago foi usado para coloração. O painel esquerdo mostra a coloração de vaso sangüíneo usando um anticorpo anti-CD3 1. As setas apontam para os vasos sangüíneos tumorais. A Figura 10B é uma imagem da análise da imunofluorescência da expressão de GFP em tumores EF43-FGF4 em 1 semana depois da administração intravenosa do AAVP-GFP não marcado (painel esquerdo) ou RGD-4C AAVP-GFP (painel do meio) em camundongos contendo tumores EF43-FGF4. É também mostrada a imunocoloração contra αv -integrina em tumores EF43-FGF4 (painel direito).

Figura 11. A Figura 11 mostra imagens de análise histológica de órgãos de controle. Fígado, coração e rim de camundongos tratados com AAVP-HSVtk não alvejada, vetores de RGD-4C AAVP-HSVtk, ou o veículo sozinho mais a manutenção de GCV são mostrados. Nenhum sinal histológico de toxicidade foi detectado nestes órgãos por coloração de H&E.

Figuras 12A-12C. Células mamíferas infectadas com AAVP alvejado com RGD expressam um produto gênico funcional. (Figura 12A) Células de melanoma humano, M21 foram infectados com AAVP; TNF- α não alvejado expressando o fago fdTNF- α (painel superior) e TNF- α expressando o vírus RGDTNF- α (painel inferior) e detectado usando um anticorpo primário específico de fd seguido pelo anticorpo secundário marcado com FITC. (Figura 12B) Células M21 infectadas com PBS, vírus não alvejado vazio (fd), vírus alvejado vazio (RGD), vírus (fdTNF- α) expressando o TNF α não alvejado e o vírus RGDTNF- α expressando o TNF- α alvejado. Cinco dias depois da infecção, o sobrenadante da cultura foi analisado para medir o TNF- α por ELIS. O sobrenadante da cultura, 12 dias depois da infecção é também mostrado. (Figura 12C) Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foram tratadas com o sobrenadante do dia 5 de vários grupos infectados com células M21; PBS, fd (vírus nulo não marcado), RGD (vírus null alvejado), fdTNF (vírus que expressa o TNF- α não alvejado) e RGDTNF (vírus que expressa o TNF- α alvejado) e analisados quanto ao fator tecidual (TF). TNF- α recombinante foi usado como controle positivo. Para checar a especificidade, O sobrenadante de M21 de células infectadas com RGDRNF incubadas com anticorpo específico de TNF- α , antes da aplicação no HUVEC. O sobrenadante do dia 23, depois da infecção, foi também testado quanto à secreção de TF.

Figuras 13A-13H AAVP está especificamente alvejado para a vasculatura do tumor. Xenoenxertos de melanoma injetados com ou PBS ou RGDTNF- α colorido com anticorpo

específico de bacteriófago e anticorpo de vaso sanguíneo CD31. A detecção foi efetuada usando Alexa Flour 488, Alexa Flour 594 e DAPI para visualizar vasos sanguíneos, AAVP e núcleos de células, respectivamente (250X). Nenhum dos animais injetados com PBS mostrou a presença de AAVP em nenhum período de tempo. É mostrada uma secção do tumor representativa de um animal injetado com PBS por 15 minutos (Figura 13A). Os animais injetados com AAVP expressando RGDTNF- α mostraram a co-localização de partículas de vírus nos vasos sanguíneos tão cedo quando 15 minutos (Figura 13B) e em pontos de tempo subsequentes: dia 1 (Figura 13C), dia 2 (Figura 13D), dia 3 (Figura 13E), dia 4 (Figura 13F), dia 8 (Figura 13G), e dia 10 (Figura 13H).

Figuras 14A-14E. As partículas de AAVP não foram detectadas no tecido do fígado normal. O fígado de animais com xenoinxertos de melanoma humano injetado com RGDTNF- α coloriram com anticorpo específico de bacteriófago e anticorpo de vaso sanguíneo CD31. A detecção foi efetuada usando Alexa Flour 488, Alexa Flour 594 e DAPI para visualizar os vasos sanguíneos, AAVP e os núcleos das células (250X), respectivamente. Os animais injetados com AAVP expressando RGDTNF- α mostraram alguma coloração das partículas de vírus no dia 1 (Figura 14A) no tecido do fígado. Contudo, a coloração do vírus foi reduzida para os níveis mínimos no dia 2 (Figura 14B) com nenhuma coloração de vírus observada nos pontos de tempo do dia 3 (Figura 14C), dia 8 (Figura 14D), e dia 10 (Figura 14E). Todos os tecidos de fígado em pontos de tempo diferentes mostraram boa coloração dos vasos.

Figuras 15A-15E. As partículas de AAVP não foram detectadas no tecido do rim normal. O rim proveniente dos animais com xenoinxertos de melanoma humano injetados com RGDTNF- α foi colorido com o anticorpo específico de bacteriófago e anticorpo de vaso sanguíneo CD31. A detecção foi efetuada usando Alexa Flour 488, Alexa Flour 594 e DAPI para visualizar os vasos sanguíneos, AAVP e os núcleos das células, respectivamente (250X). Não observamos a presença de AAVP no rim em nenhum dos pontos de tempo testados, dia 1 (Figura 15A), dia 2 (Figura 15B), dia 3 (Figura 15C), dia 8 (Figura 15D) e dia 10 (Figura 15E). No entanto, todos os tecidos do rim em pontos de tempo diferentes mostram boa coloração dos vasos.

Figura 16. AAVP expressa o produto gênico específico, *in vivo*. Secções congeladas dos animais com xenoinxertos de melanoma humano injetados com ou PBS ou RGDTNF- α foram usados para extrair a proteína total. 50 μ g da proteína total foram usados para medir os níveis de proteína do TNF- α por ELISA, em duplicatas. Os níveis basais de expressão de TNF- α , endógena, foram observados em todos os tecidos testados. Animais injetados com PBS não mostraram nenhum aumento sobre os níveis endógenos em quaisquer dos pontos de tempo testados. Os camundongos injetados com RGDTNF- α AAVP mostram expressão de TNF- α começando no dia 4 e aumentando gradualmente no

dia 10.

Figuras 17A-17B. AAVP expressa TNF- α na vasculatura e produz apoptose *in vivo*. (Figura 17A) Secções congeladas dos animais com xenoenxertos de melanoma humano injetados com RGD-TNF- α AAVP colorido com anticorpo específico de TNF- α usando análise histoquímica. A coloração de TNF- α é vista como uma mancha de cor marrom em volta dos vasos sanguíneos (painel esquerdo, 100X; painel direito 400X). (Figura 17B). Secções congeladas dos animais com xenoenxertos de melanoma humano injetados com RGD-TNF- α AAVP colorido para detectar células apoptóticas. O vaso sanguíneo e as células tumorais circundantes mostraram apoptose vista nas células coloridas de azul com o marcador azul TACS (painel esquerdo, 200X). As amostras foram contra-coloradas com vermelho rápido nuclear. O painel direito mostra vasos sanguíneos coloridos com o anticorpo específico CD31 (200X).

Figuras 18A-18B. Tratamento do melanoma humano sensível ao TNF- α , M21 (Figura 18A) e melanoma humano resistente ao TNF- α , Pmel (Figura 18B), com AAVP. Camundongos sem pelagem (*nude*) com tumores M21/Pmel implantados subcutaneamente foram tratados com AAVP sistemicamente através de injeção na veia da cauda e os volumes tumorais foram medidos em diferentes pontos de tempo. Os volumes tumorais plotados versus os dias diferentes pós-tratamento. (Figura 18A) Os animais tratados com RGD-TNF- α mostraram redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no volume do tumor começando no dia direção axial 20. (Figura 18B) Melanoma humano resistente ao TNF- α foi tornado sensível à terapia com TNF- α por distribuição de EMAP-II através de AAVP seguido pelo tratamento com TNF- α recombinante. Os camundongos tratados tanto com rTNF- α como com AAVP expressando EMAP-II (RGDEMAP-II) sozinho mostraram muito pouco efeito e não estavam significativamente diferentes do grupo PBS ou fdEMAP-II. Os camundongos tratados com o vírus RGD-EMAP-II e rTNF- α mostraram redução significativa de volume tumoral ($p = 0,007$).

Figuras 19A-19B Transdução de células de glioma humano em cultura por CRTIGPSVC (SEQ ID NO:1) AAVP – Luc células de glioma humano derivadas de U87 foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 40.000 células/poço /poço e cultivadas O.N. a 37°C. No dia seguinte, as células foram incubadas com AAVP, de acordo com o protocolo Nature Method. RGD-4C AAVP GFP e RGD-4C AAVP Luc foram usadas como controle positivo para eficácia de transdução. As imagens foram tomadas no dia 7. A absorção de fago está baixa, mas aumenta dramaticamente quando as células são cultivadas em hidrogel de Ferro AAVP (última coluna da placa e gráfico).

Embora a presente invenção seja suscetível de várias modificações e formas alternativas, as modalidades específicas nos exemplos foram mostradas nas figuras e são aqui descritas com mais detalhes. Contudo, deve ser entendido que a descrição das

modalidades específicas nos exemplos não tem o objetivo de limitar a invenção às formas particulares expostas, mas ao contrário, é para abranger todas as modificações e equivalentes conforme ilustrados em parte, pelas reivindicações apenas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 A presente descrição, de acordo com certas modalidades, se refere, em geral, a métodos para distribuir um ou mais transgenes a uma célula alvo, tal como uma célula de tumor, em um modo sítio-específico para obter uma expressão intensificada e às construções e às composições úteis em tais aplicações. Em certos aspectos, a expressão de um ácido nucléico terapêutico pode ser avaliada antes da administração de um
10 tratamento ou procedimento de diagnóstico a ou em um paciente. Em um outro aspecto, a determinação ou avaliação da expressão na região ou local necessário para o benefício terapêutico é avaliada e qualquer tratamento desnecessário ou benéfico marginal pode ser mantido em vista de tratamentos alternativos.

Sem desejar estar ligado a qualquer teoria ou mecanismo, a presente invenção é
15 baseada na observação de que a expressão de transgene pode ser aumentada quando o transgene está integrado a um genoma com uma multiplicidade maior que um. Particularmente de interesse é a capacidade de certas partículas de AAVP quimérico de transduzirem células com mais que uma cópia do transgene, freqüentemente como um concatâmero. Células transduzidas podem ser também monitoradas pela expressão de um
20 gene repórter transportado pelas partículas de AAVP quimérico. Qualquer transgene pode ser incluído em uma forma expressa de uma partícula de AVVP desta invenção.

I. PARTÍCULA DE FAGO VIRAL ADENOASSOCIADO

Vírus adenoassociado (AAV) é um membro defeituoso da família de parvovírus. O genoma do AAV é encapsulado como uma molécula de DNA de fita simples de maior ou
25 menor polaridade. Fitas de ambas as polaridades são acondicionadas, mas em partículas de vírus separadas e ambas as fitas são infecciosas. O genoma do DNA de fita simples do vírus adenoassociado do tipo humano (AAV2) tem um comprimento de 4681 pares de bases e é flanqueado por seqüências de repetições terminais invertidas (ITRs) de 145 pares de base cada. Além disso, a proteína rep viral parece para mediar a recombinação não
30 homóloga através das ITRs. Por conseguinte, como genomas parvovirais têm ITRs em cada extremidade que desempenham um papel na recombinação e que são geralmente requeridos para replicação parvoviral e acondicionamento, AAVPs da presente invenção contêm geralmente toda ou uma porção de pelo menos uma das ITRs ou um equivalente funcional destas.

35 AAVs podem ser prontamente obtidos e seu uso como vetores para distribuição de genes foram descritos, por exemplo, por Muzyczka, 1992; na Patente US 4.797.368, e na publicação de PCT WO 91/18088. A construção de vetores de AAV está descrita em várias

publicações, incluindo Lebkowski et al., 1988; Tratshtin et al., 1985; Hermonat e Muzyczka, 1984.

A presente invenção proporciona os vetores de bacteriófagos virais adenoassociados (AAV) (tais como os vetores AAV-M13) (AAVPs) que são produzidos em bactérias e métodos para expressar um transgene em uma célula alvo, tal como uma célula de tumor, por transdução da célula com o AAVP. Uma vez purificada, a partícula de bacteriófago alvejada contendo o bacteriófago e as seqüências de AAV com cassete de transgene é usada para transfectar células mamíferas. Seguinte à internalização do vetor dentro da célula mamífera, o transgene é integrado no genoma das células alvo. O termo “vetor” como usado aqui é definido como um veículo de ácido nucléico para a distribuição de um ácido nucléico de interesse a uma célula. O vetor pode ser uma molécula linear ou uma molécula circular.

Um AAVP combina elementos selecionados tanto do fago como dos sistemas de vetor de AAV proporcionando um vetor que é simples para produção em bactéria sem limite de acondicionamento, enquanto permite a infecção das células mamíferas combinadas com integração no cromossomo hospedeiro. Os vetores contendo muitos dos elementos apropriados estão comercialmente disponíveis, e podem ser ainda modificados por metodologias padrão para incluir as seqüências necessárias. No mínimo, para uso com os métodos da presente invenção, o vetor deve aceitar um cassete contendo um promotor e um transgene. Os vetores de AAVP da presente invenção possibilitam uma expressão de transgene intensificada mediante incorporação no genoma de célula alvo. Em certas modalidades, o transgene pode ser integrado no genoma da célula alvo como um concatâmero.

Entre outras coisas, AAVPs não requerem vírus auxiliares ou fatores de transação. Além disso, o tropismo nativo do AAV para células mamíferas é eliminado já que não há formação de capsídeo de AAV.

A. Alvejando o AAVP

Os AAVPs da presente invenção podem ser alvejados a receptores específicos pela expressão de ligante na superfície da partícula de fago. Em certas modalidades, os peptídeos ou outras frações que permitem ou promovem o escape dos vetores (e de qualquer molécula ligada aos mesmos ou contida neles) do endossomo podem ser incorporados e expressos na superfície do fago. Tais “outras frações” incluem moléculas que não são elas próprias peptídeos, mas que têm a capacidade de romper a membrana endossômica, facilitando, assim, o escape do vetor, e de moléculas que de outro modo mimetizam as propriedades de escape endossômico das seqüências de peptídeo descritas (vide, por exemplo, a publicação PCT WO 96/10038 e Wagner et al., 1992).

Os AAVP da presente invenção são geralmente compreendidos de partículas de

fago filamentoso que expressam um ou mais ligantes pré-selecionados sobre a superfície da partícula, independente do modo pelo qual os ligantes são ligados. Portanto, se o meio de ligação para um ligante for covalente ou via proteína do capsídeo, os AAVP da presente invenção são capazes de distribuir um ou mais transgenes para as células alvo por ligação do ligante a um receptor seguido por internalização dos vetores. Por exemplo, a partícula de ligante expressa sobre a superfície da partícula pode ser o peptídeo bicíclico CDCRGDCFC (RGD-4C) (SEQ ID NO:2) que se liga seletivamente às $\alpha v \beta 3$ e $\alpha v \beta 5$ -integrinas. Essas integrinas são altamente superexpressas na invasão das células endoteliais tumorais. Como usada aqui, "partícula de fago filamentoso" refere-se às partículas contendo tanto um genoma de fago ou um genoma de fagemídeo. As partículas podem conter proteínas de capsídeo filamentosas. Como usado aqui, "ligante" refere-se a qualquer peptídeo, polipeptídeo, proteína ou não-proteína, tal como um peptidomimético, que é capaz de se ligar a uma molécula da superfície celular e internalizar. Como usado aqui, "ligar a um receptor" refere-se à capacidade de um ligante de reconhecer de modo específico e se ligar a um receptor, como ensaiado por ensaios padrão *in vitro* ou *in vivo*.

Tipicamente, os AAVPs da presente invenção incluem uma inserção de oligonucleotídeo no genoma do plasmídeo do fago que codifica um peptídeo de alvejamento, que possibilita as propriedades de alvejamento do receptor de ligante dos vetores.

As proteínas do capsídeo do fago ou proteínas do capsídeo podem ser modificadas por acoplamento ou fusão do total ou de parte de um polinucleotídeo de proteína de capsídeo ou de proteína codificada pelo polinucleotídeo a um ligante de alvejamento. O ligante de alvejamento pode direcionar, re-direcionar, alvejar ou intensificar a ligação do AAVP da invenção para uma célula específica, tecido e/ou órgão.

Os vírus alvejados foram originalmente criados para superar problemas encontrados por tropismos de célula hospedeira natural de vetores na terapia gênica. Nos anos recentes, foram expedidas muitas patentes sobre terapia gênica em que o vetor contém um polipeptídeo heterólogo usado para alvejar o vetor a células específicas, tais vetores contendo glicoproteínas de fusão quimérica (Kayman et al, Patente US 5.643.756, aqui incorporada a título de referência) e vetores que contêm um anticorpo para uma proteína do capsídeo do vírus (Cotten et al., Patente US 5.693.509). Um AAVP da invenção pode ser geneticamente modificado de tal modo que a partícula é alvejada para um tipo particular de célula (por exemplo, células da musculatura lisa, células hepáticas, células renais, fibroblastos, queratinócitos, células-tronco, células-tronco mesênquimas, células da medula óssea, condrócito, células epiteliais, células intestinais, células neoplásicas ou cancerosas e outras conhecidas da técnica) de modo que o genoma do ácido nucléico é distribuído para uma célula não divisora alvo, uma célula divisora alvo, ou uma célula alvo

que tem um distúrbio proliferativo ou outro. Um modo de alvejar os vírus é direcionar o vírus para uma célula alvo por ligação preferencial a células tendo uma molécula na superfície externa da célula. Esse método de alvejar o vírus utiliza expressão ou incorporação de um ligante de alvejamento sobre ou no capsídeo do vírus para auxiliar o alvejamento do vírus às células ou tecidos que têm um receptor ou molécula ligante. Depois da infecção de uma célula pelo vírus, o material genético pode ser processado e expresso na célula hospedeira. O material genético pode ser integrado ao genoma da célula hospedeira ou episomicamente mantido dentro da célula.

Em certas modalidades da invenção, uma proteína do capsídeo pode ser modificada para incluir uma fração alvejadora de modo que um AAVP pode ser distribuído para tipos específicos de células ou de tecido. A especificidade de alvejamento dos sistemas de deliberação com base em ligante é baseada na distribuição dos receptores de ligante nos tipos diferentes de células. Um ligante alvejador pode estar associado tanto não covalentemente como covalentemente a uma proteína do capsídeo.

Em certas modalidades, uma seqüência de ácido nucléico heterólogo de interesse pode ser inserida no vetor viral da invenção. Por exemplo, uma proteína do capsídeo pode ser operativamente acoplada a um ligante para um receptor em uma célula alvo específica.

Ligantes alvejadores referem-se a qualquer ligante específico para um componente característico da região alvejada. Ligantes alvejadores preferidos incluem proteínas tais como anticorpos policlonais ou monoclonais, fragmentos de anticorpos, ou anticorpos quiméricos, enzimas, peptídeos ou hormônios, ou açúcares tais como mono, oligo e polissacarídeos. Em certas modalidades da invenção, os ligantes alvejadores contemplados interagem com integrinas, proteoglicanos, glicoproteínas, receptores, ou transportadores. Ligantes adequados incluem quaisquer deles que sejam específicos ou seletivos para células do órgão alvo, ou para estruturas do órgão alvo exposto à circulação como resultado da patologia local, tais como tumores.

Em certas modalidades da presente invenção, de modo a intensificar a transdução de células resistentes, para aumentar a transdução de células alvo, ou para limitar a transdução de células indesejadas, anticorpo ou frações alvejadoras de peptídeo cíclico (ligantes) podem ser associados ao AAVP. A fração alvejadora de anticorpo, em um exemplo particular, é um anticorpo de receptor anti-EGF monoclonal. Os receptores de EGF são distribuídos na superfície celular de vários órgãos e estão presentes em queimaduras, ferimentos, derme e tumores. A fração alvejadora de peptídeo pode ser também um peptídeo cíclico contendo dentro de sua seqüência um motivo de ligação de RGD-integrina. Ligantes, tais como o RGD peptídeo, que se ligam às integrinas na superfície da célula, podem mediar a internalização, aumentando, assim, a eficácia de distribuição do complexo alvejado. O peptídeo alvejador pode incluir uma seqüência de RGDFV (SEQ ID NO:3), em

que o peptídeo inclui a seqüência de RGD na qual o peptídeo tem um comprimento de 3 a 30 aminoácidos. Em outras modalidades, o motivo de ligação de RGD-integrina tem um comprimento de 3 a 20 aminoácidos ou um comprimento de 4 a 10 aminoácidos. Em modalidades particulares da presente invenção, o motivo de ligação de RGD-integrina é um peptídeo com um comprimento de 5 aminoácidos. Embora peptídeos cíclicos que contêm o motivo de ligação de RGD-integrina dentro de sua seqüência sejam preferidos, peptídeos lineares podem ser também utilizados na presente invenção. 20060239968 Composições e métodos de uso de peptídeos alvejadores para diagnóstico e terapia de câncer humano. As Publicações de Patente US 20060094762, US 20050191294, US 20050187161, US 20050074812, US 20050074747, US 20050037417, US 20050003466, US 20040170955, US 20040131623, US 200400966441, US 20040096441, US 20040071689, US 20040071689, US 20040048243, US 20030152578, US 20030113320, e US 20010046498, bem como as publicações de PCT WO 2006/060171, WO 2006/010070, WO 2005/065418, WO 2005/026195, WO 2004/02099, WO 2003/02991, WO 2002/020822, WO 2002/020769, WO 2002/020723, e WO 2002/020722 descrevem várias composições e métodos para identificar ligantes alvejadores, cada um dos quais é aqui incorporado a título de referência em sua totalidade.

Como usado aqui, "ligante" refere-se a qualquer peptídeo, polipeptídeo, proteína ou não proteína, tal como um peptidomimético, que é capaz de se ligar a uma molécula na superfície celular e internalizar. Como usado aqui, "se ligar a um receptor" se refere à capacidade de um ligante de reconhecer especificamente e se ligar detectavelmente a um receptor, como ensaiado por ensaios padrão *in vitro* ou *in vivo*.

Dentro do contexto desta invenção, o ligante é acoplado a uma proteína de um fago (por exemplo, uma proteína do capsídeo), ou como uma proteína de fusão ou através de conjugação química, e é usado para distribuir um ácido nucléico para uma célula. Fragmentos de ligantes podem ser usados na presente invenção desde que o fragmento retenha a capacidade de se ligar à molécula de superfície da célula apropriada. Igualmente, os ligantes com substituições e outras alterações, mas que retêm a capacidade de ligação, podem ser também usados. Ainda, um ligante particular se refere a um polipeptídeo ou polipeptídeos tendo uma seqüência de aminoácidos do ligante nativo, bem como seqüências modificadas (por exemplo, tendo substituições, deleções, inserções ou adições de aminoácidos em comparação com a proteína nativa (muteínas)), desde que o ligante retenha a capacidade de se ligar ao seu receptor em uma célula endotelial e resulte na distribuição de um ácido nucléico a uma célula.

Os ligantes podem englobar também muteínas ou proteínas mutantes que possuem a capacidade de se ligarem a seu receptor expressando células e serem internalizadas. Tais muteínas incluem, mas sem limitação, aquelas produzidas por reposição de uma ou mais

das cisteínas com serina. Tipicamente, tais muteínas terão trocas de aminoácidos conservativos. DNA que codifica tais muteínas, a menos que modificado por reposição de códons regenerados, hibridizará sob condições de pelo menos baixa estrigência para a seqüência de DNA nativo que codifica o ligante do tipo selvagem.

5 DNA que codifica um ligante pode ser preparado sinteticamente com base em seqüência de aminoácidos ou de DNA conhecida, isolada usando métodos conhecidos daqueles versados na técnica (por exemplo, ampliação por PCR), ou obtida de fontes comerciais ou outras fontes. O DNA que codifica um ligante pode diferir das seqüências acima por substituição de códons degenerados ou por codificação de aminoácidos
10 diferentes. Diferenças nas seqüências de aminoácidos, tais como aquelas que ocorrem entre os ligantes homólogos bem como organismos ou espécies individuais, são tolerados desde que o ligante se ligue a seu receptor. Os ligantes podem ser isolados de fontes naturais ou feitos sinteticamente, tais como por meios recombinantes ou síntese química.

Não é necessário que os ligantes usados no contexto desta invenção retenham
15 quaisquer de suas atividades biológicas in vivo em vez de se ligarem a um receptor uma célula e serem internalizados. Se o ligante foi modificado de modo a carecer de uma ou mais atividades biológicas, ligação e internalização podem ser ainda prontamente ensaiadas, por exemplo, pelos seguintes testes ou outros testes conhecidos da técnica. Geralmente, esses testes envolvem a marcação do ligante, e incubação deste com células
20 alvo, e visualização ou medição do marcador intracelular. Por exemplo, em resumo, o ligante pode ser fluorescentemente marcado com FITCC ou radiomarcado com ^{125}I , incubado com células e examinado microscopicamente por microscopia de fluorescência ou microscopia confocal para internalização.

Os ligantes podem ser produzidos por meios recombinantes ou outros meios em
25 preparação para ligação às proteínas do capsídeo de fago. As seqüências de DNA e métodos para obter as seqüências destes ligantes são ligantes bem conhecidos. Com base nas seqüências de DNA, os genes podem ser sintetizados tanto sinteticamente (para proteínas pequenas), ampliados de célula genômica ou cDNA, isolados de bibliotecas genômicas ou de cDNA. Os sítios de restrição para facilitar a clonagem no vetor do fago ou
30 do fagemídeo podem ser incorporados, tais como em iniciadores para ampliação.

Tais moléculas incluem, sem limitação, proteínas que se ligam a células cancerosas, células endoteliais, células estromais e similares. Tais ligantes incluem fatores de crescimento e citocinas. Muitos fatores de crescimento e famílias de fatores de crescimento compartilham características estruturais e funcionais e podem ser de utilidade
35 na presente invenção. Famílias de fatores de crescimento incluem fatores de crescimento de fibroblastos FGF-1 até FGF-15, e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Outros fatores de crescimento, tais como PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF-

α , HB-EGF, angiotensina, bombesina, eritropoietina, fator de célula-tronco, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, e endoglin também se ligam aos receptores identificados específicos sobre as superfícies celulares e podem ser usados na presente invenção. Citocinas, incluindo interleucinas, CSFs (fatores estimuladores de colônias), e interferonas, têm receptores específicos, e podem ser usados conforme descrição aqui.

Por exemplo, ligantes e pares de ligante/receptor incluem uroquinase/receptor de uroquinase (GenBank N^{os} de Acesso X02760/X74309); α -1,3 fucosil transferase, α 1-antitripsina/E-selectina (GenBank N^{os} de Acesso M98825, D38257/M87862); ligante de P-selectina glicoproteína, ligante de P-selectina/P-selectina (GenBank N^{os} de Acesso U25955, U02297/L23088), VCAM1/VLA-4 (GenBank N^{os} de Acesso X53051/X16983); antígeno E9 (Blann et al., *Atherosclerosis* 120:221, 1996)/receptor de TGF β ; Fibronectina (GenBank N^o de Acesso X02761); α 1-colágeno tipo I (GenBank N^o Z74615), β 2-colágeno tipo I (GenBank N^o de Acesso Z74616), ácido hialurônico/CD44 (GenBank N^o de Acesso M59040); ligante de CD40 (GenBank N^o de Acesso L07414)/CD40 (GenBank N^o de Acesso L07414)/CD40 (GenBank N^o de Acesso M83312); EFL-3, ligantes LERTK-2 (GenBank N^{os} de Acesso L37361, U09304) para elk-1 (GenBank N^o de Acesso M25269); VE-caderina (GenBank N^o de Acesso X79981); ligante para cateninas; ICAM-3 (GenBank N^o de Acesso X669819) ligante para LFA-1, e Fator de von Willebrand (GenBank N^o de Acesso X04385), fibrinogênio e fibronectina (GenBank N^o de Acesso X92461), ligantes para α v β 3 integrina GenBank N^{os} de Acesso U07375, L28832).

Outros ligantes incluem CSF-1 (GenBank N^{os} de Acesso M11038, M37435); GM-CSF (GenBank N^o de Acesso X03021); INF- α (interferon) (GenBank N^o de Acesso A02076; WO 8502862-A); IFN- γ (GenBank N^o de Acesso A02137; WO 8502624-A); IL-1- β (interleucina 1 alfa) (GenBank N^o de Acesso X02531, M15329); IL-1- β (interleucina 1 beta) (GenBank N^o de Acesso X02532, M15330, M15840); IL-1 (GenBank N^o de Acesso K02770, M54933, M38756); IL-2 (GenBank N^o de Acesso A14844, A21785, X00695, X00200, X00201, X00202); IL-3 (GenBank N^o de Acesso M14743, M20137); IL-4 (GenBank N^o de Acesso M13982); IL-5 (GenBank N^o de Acesso X04688, J03478); IL-6 (GenBank N^o de Acesso Y00081, X04602, M54894, M38669, M14584); IL-7 (GenBank N^o de Acesso J04156); IL-8 (GenBank N^o de Acesso Z11686); IL-10 (GenBank N^o de Acesso X78437, M57627); IL-11 (GenBank N^o de Acesso M57765 M37006); IL-13 (GenBank N^o de Acesso X69079, U10307); TNF- α (Fator de necrose tumoral) (GenBank N^o de Acesso A21522); TNF- β (GenBank N^o de Acesso D12614); ligante GP30 (S68256) para erbB2; e transferrina (GenBank N^o de Acesso DQ923758) para o receptor de transferrina.

Ainda outros ligantes incluem PDGF (GenBank N^{os} de Acesso X03795, X02811), angiotensina (GenBank N^o de Acesso K02215), e peptídeos contendo RGD e proteínas, tais como ICAM-1 (GenBank N^o de Acesso X06990) e VCAM-1 (GenBank N^o de Acesso X53051)

que se ligam aos receptores de integrina. Outros ligantes incluem TNF- α (GenBank N° de Acesso A21522, X01394), IFN- γ (GenBank N° de Acesso A11033, A11034), IGF-I (GenBank Accession No. A29117, X56773, S61841, X56774, S61860), IGF-II (GenBank N° de Acesso. A00738, X06159, Y00693), peptídeo natúriético atrial (GenBank N° de Acesso X54669),
 5 endotelina-1 (GenBank N° de Acesso Y00749), fator de coagulação Xa (GenBank N° de Acesso L00395, L00396, L29433, N00045, M14327), TGF- β 1 (GenBank N° de Acesso A23751), IL-1 β (GenBank N° de Acesso X03833), IL-1 β (GenBank N° de Acesso M15330), e endogлина (GenBank N° de Acesso X72012).

A família de proteínas de FGF inclui presentemente FGF-1 (FGF ácido ou aFGF),
 10 FGF-2 (FGF básico ou bFGF), FGF-3 (int-2), FGF-4 (hst-1/K-FGF), FGF-5, FGF-6 (hst-2), FGF-7 (fator de crescimento de queratinócito ou KGF), FGF-8, FGF-9, FGF-11 (WO 96/39507), FGF-13 (WO 96/39508), FGF-14 (WO 96/39506), e FGF-15 (WO 96/39509). Outros polipeptídeos que são reativos com um receptor de FGF, que é qualquer polipeptídeo que interage especificamente com um receptor de FGF, preferivelmente o
 15 receptor de FGF de alta afinidade, e é transportado por meio de endossomas para a célula em virtude de sua interação com o receptor de FGF, são adequados na presente invenção. Os ligantes também incluem 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 ou mais fragmentos de aminoácidos dos ligantes identificados aqui.

Também contempladas como frações alvejadoras são anticorpos e fragmentos
 20 destes. Fragmentos de anticorpos monoclonais podem ser usados para distribuição alvo a órgãos específicos nos animais incluindo o cérebro, coração, pulmões ou fígado. Um método exemplar para alvejar as partículas virais nas células que carecem de um marcador específico de célula simples está descrito (Patente US 5.849.718). Por exemplo, o anticorpo A pode ter uma especificidade para tumor, mas também para tecido normal do coração e
 25 pulmão, enquanto que o anticorpo B tem especificidade para tumor, mas também para células do fígado normal. Claramente, o uso de anticorpo A ou anticorpo B sozinho para distribuir um ácido nucléico anti-proliferativo ao tumor resultaria possivelmente em dano não desejado às células do coração, do pulmão e do fígado. Contudo, o anticorpo A e o anticorpo B podem ser usados juntos para alvejamento das células aperfeiçoado. Assim, o
 30 anticorpo A é acoplado a um gene de codifica um ácido nucléico anti-proliferativo e é distribuído, via um sistema de absorção mediado por receptor, ao tumor, bem como ao tecido do coração e do pulmão. Contudo, o gene não é transcrito ou ativo nessas células. O anticorpo B pode ser acoplado a um ativador ou a um gene universalmente ativo que codifica um fator necessário para a transcrição ou ativação do ácido nucléico anti-
 35 proliferativo e é distribuído às células tumorais e do fígado. Portanto, em células do coração e do fígado, somente o ácido nucléico anti-proliferativo inativo é distribuído, onde ele não está descrito, não acarretando efeitos adversos. Nas células do fígado, o gene que codifica

o fator de ativação é distribuído, mas não tem efeito porque nenhum gene de ácido nucléico anti-proliferativo está presente. Contudo, em células tumorais, ambos os genes são distribuídos e o fator de ativação pode ativar o ácido nucléico anti-proliferativo, acarretando efeitos tóxicos específicos do tumor.

5 Anticorpos para moléculas expressas sobre a superfície das células são úteis no contexto da presente invenção. Tais anticorpos incluem, mas sem limitação, anticorpos para receptores de FGF, receptores de VEGF, receptor de uroquinase, E- e P-selectinas, VCAM-1, receptor de PDGF, receptor de TGF, endossialina, $\alpha_v\beta_3$ integrina, LFA-1, antígeno E9, CD40, caderinas, e elk-1. Os anticorpos que são específicos para moléculas da superfície
10 celular expressas por células são prontamente gerados como anti-soro monoclonal ou policlonal. Muitos de tais anticorpos estão disponíveis (por exemplo, da American Type Culture Collection, Rockville, Md.). Alternativamente, os anticorpos para ligantes que ligam/inernalizam podem ser também usados. Em tal estratégia, as partículas de fago terão anticorpo em sua superfície, que serão então complexados ao ligante.

15 Muitos outros ligantes podem ser empregados para a etapa alvejadora de preparações de AAVP, dependendo do sítio alvejado para distribuição de AAVP. Em certas modalidades, é contemplado que AAVPs são alvejados para tipos específicos de células por endocitose mediada por receptor. Por exemplo, lactosil ceramida, e peptídeos que alvejam as proteínas relacionadas ao receptor de LDL, tal como apoliproteína E3 ("Apo E") têm sido
20 úteis para alvejar lipossomas no fígado (Spanjer e Scherphof, 1983; WO 98/0748). A asialoglicoproteína, asialofetuína, que contém resíduos de galactosila terminais, também demonstrou alvejar lipossoma no fígado (Spanjer e Scherphof, 1983; Hara et al., 1995). Os açúcares manosil, fucosil ou N-acetil glicosamina, quando acoplados à cadeia principal de um polipeptídeo, se ligam a receptor de manose com alta afinidade (Patente US 5.432.260,
25 especificamente aqui incorporada a título de referência em sua totalidade). Assim, essas glicoproteínas podem ser conjugadas ao AAVP da presente invenção e são contempladas como úteis para alvejar células específicas (por exemplo, macrófagos).

Folato e o receptor de folato foram também descritos como úteis para alvejamento celular (Patente US 5.871.727). Nesse exemplo, a vitamina folato é acoplada à(s)
30 proteína(s) do capsídeo. O receptor de folato tem afinidade alta para seu ligante e é superexpresso na superfície de várias linhagens de células malignas, incluindo tumores do pulmão, da mama e do cérebro. Os sistemas de distribuição mediada por transferina alvejam uma ampla faixa de células replicadoras que expressam o receptor de transferrina (Gilliland et al., 1980).

35 A adição de ligantes alvejantes para distribuição de gene no tratamento de doenças hiperproliferativas permite a distribuição de genes cujos produtos gênicos são mais tóxicos que os dos sistemas não alvejados. Exemplos dos genes mais tóxicos que podem ser

distribuídos incluem genes pró-apoptóticos tais como Bax e Bak mais genes derivados de vírus e outros patógenos tais como E4orf4 adenoviral e a purina nucleosídeo fosforilase de *E. coli*, um assim chamado “gene suicida”, que converte o pró-fármaco 6-metilpurina desoxirribosídeo na purina 6-metil purina tóxica. Outros exemplos de genes suicidas usados com terapia de pró-fármaco são o gene citosina desaminase da *E. coli* e o gene timidina quinase de HSV.

Em certos aspectos, AAVP pode ser usado para alvejar a vasculatura do tumor alvo. O endotélio tumoral é um alvo importante na terapia do câncer. Alvejar um gene terapêutico de interesse ao endotélio tumoral com toxicidade mínima em outros tecidos permanece a meta primária da terapia gênica antivascular. Recentemente, AAVP alvejando endotélio tumoral foi descrito. Os inventores estudaram a capacidade desse vetor de distribuir um agente antivascular potente, fator- α de necrose tumoral humano (TNF- α) para melanomas humanos. Melanoma resistente ao TNF- α foi tornado sensível ao tratamento de TNF- α por distribuição de monócito endotelial que ativa o polipeptídeo-II (EMAP-II) via AAVP.

Vetores de AAVP transportando dois genes, TNF- α e EMAP-II foram avaliados *in vitro* e *in vivo*. Células de melanoma humano (M21) foram estudadas para internalização de AAVP e expressão do gene de TNF- α *in vivo*. Tumores crescidos subcutaneamente, M21/Pmel, em camundongos sem pelagem (*nude*) foram tratados sistemicamente através de injeções na veia da cauda. A localização do AAVP alvejado para a vasculatura tumoral, a expressão do gene de TNF- α e a apoptose foram examinadas usando coloração com imunofluorescência, análise TaqMan RT-PCR e imunoistoquímica.

A internalização do AAVP alvejado foi observada em células M21, resultando em níveis altos de TNF- α funcionalmente ativo no sobrenadante da cultura. Nenhuma internalização do vetor não alvejado foi observada nessas células. A injeção sistêmica de AAVP mostrou a distribuição de vírus alvejado no tumor com localização de vírus mínima em órgãos normais. A distribuição de AAVP resultou na expressão do produto gênico de TNF- α . A expressão de TNF- α induziu a apoptose nos vasos sanguíneos e células tumorais circundantes resultando em regressão significativa do tumor. Adicionalmente, a distribuição alvejada de AAVP expressando EMPA-II sensibilizou um melanoma humano resistente a TNF- α a um tratamento com TNF- α . Os vetores de AAVP podem ser usados para distribuir agentes antivasculares especificamente para a vasculatura tumoral, reduzindo, assim, a toxicidade sistêmica.

O AAVP da invenção pode ser alvejado a regiões específicas do corpo por ligação de ligantes alvejadores específicos para proporcionar acumulo rápido e concentração de AAVP e, por conseguinte, de moléculas de ácido nucléico, em um tecido designado. Os ligantes contemplados para uso na presente invenção podem ser conjugados ao AAVP por

uma variedade de métodos. Várias composições e métodos para acoplar um ligante alveador a uma proteína do capsídeo são conhecidos da técnica.

II. ÁCIDOS NUCLEÍCOS

O AAVP da presente invenção tem a capacidade de distribuir um ou mais transgenes para o núcleo da célula alvo, intensificando, assim, a expressão do transgene na célula alvo. Um AAVP pode também render uma vantagem na expressão gênica por meio de um destino alterado do cassete de transgene através da formação de concatâmeros do cassete de transgene, levando assim a uma expressão do gene aumentada.

O termo “transgene”, como usado aqui, refere-se a um gene ou material genético que foi transferido de um organismo para outro. Um transgene pode compreender um ou mais genes e/ou um ou mais oligonucleotídeos. Por exemplo, um transgene pode compreender um gene repórter, um gene suicida, uma enzima conversora de pró-fármaco, e/ou um ou mais genes terapêuticos. Como usado aqui, “oligonucleotídeo” refere-se a uma seqüência curta de ácidos nucleicos com vinte ou menos pares de base. O termo “gene terapêutico”, como usado aqui, é definido como uma região de ácido nucleico, que proporciona um efeito terapêutico em uma doença, condição médica, órgão, tecido, célula ou característica fisiológica de um organismo. Como usado, o termo “cassete” como usado é um ácido nucleico que pode expressar uma proteína, polipeptídeo, ou RNA de interesse.

Além dos ligantes, um AAVP pode conter um transgene compreendendo um gene repórter cujo produto pode ser selecionado ou detectado. Como referido aqui, um “gene repórter” é uma região de ácido nucleico que codifica um produto que pode ser detectado, tal como por fluorescência, atividade enzimática, em um composto detectavelmente marcado ou substrato cromogênico, ou substrato fluorescente, e similar; ou selecionado por meio das condições de crescimento. Tais genes repórter incluem, sem limitação, proteína fluorescente verde (GFP), β -galactosidase, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), luciferase, neomicina fosfotransferase, fosfatase alcalina secretada (SEAP), hormônio do crescimento humano (HGH), timidina quinase, e similares. Marcadores selecionáveis incluem resistentes a fármacos, tais como neomicina (G418), higromicina, e similares. Em certas modalidades, um gene repórter que codifica uma proteína secretada que pode ser detectada no sangue, outros fluidos corpóreos, ou tecidos, pode ser usado para medir a expressão de nível do gene repórter.

Além de um gene repórter, o transgene pode compreender também um gene terapêutico. AAVPs transportando tais transgenes podem possibilitar, entre outras coisas, o imageamento de um paciente (por exemplo, um humano), tanto *in vitro* como *in vivo*. Imageamento *in vitro* pode permitir o imageamento não invasivo do paciente todo ou de áreas alvo do paciente. Depois da introdução desses transgenes, a expressão pode ser submetida ao imageamento usando técnicas de imageamento conhecidas da tecnologia (por

exemplo, imageamento por BLI, imageamento por PET, imageamento fluorescente, e similar). Um “paciente”, como usado aqui, refere-se a qualquer entidade mamífera, por exemplo, um paciente pode ser um humano que necessite de terapia gênica ou de outro tratamento.

5 Em outras modalidades, o AAVP pode conter um gene suicida. O termo “gene suicida”, como usado aqui, é definido como um ácido nucléico que, mediante administração de um pró-fármaco, efetua a transição de um produto gênico para um composto que mata sua célula hospedeira. Exemplos de combinações de gene suicida/pró-fármaco, que podem ser usados são Vírus do Herpes Simples-timidina quinase (HSV-tk) e ganciclovir, aciclovir ou
10 FIAU; oxidorreductase e cicloeximida; citosina desaminase e 5-fluorocitosina; timidina quinase timidilato quinase (Tdk::Tmk) e AZT; e desoxicitidina quinase e citosina arabinosídeo. Em certas modalidades, um gene suicida por agir no modo de um gene terapêutico por proporcionar um efeito terapêutico em uma doença ou condição médica como resultado da destruição de sua célula hospedeira.

15 O termo “ácido nucléico” é bem conhecido da técnica. Um “ácido nucléico”, como usado aqui, irá se referir a uma molécula (i.e., uma fita) de DNA, RNA ou um derivado ou análogo destes, compreendendo uma nucleobase. Uma nucleobase inclui, por exemplo, base purina ou pirimidina, naturais, encontradas no DNA (por exemplo, uma adenina “A”, uma guanina “G”, uma timina “T” ou uma citosina “C”) ou no RNA (por exemplo, uma A, uma
20 G, um uracil “U” ou uma C). O termo “ácido nucléico” engloba os termos “oligonucleotídeo” e “polinucleotídeo”, cada um como um subgênero do termo “ácido nucléico”. O termo “oligonucleotídeo” refere-se a uma molécula tendo um comprimento de entre cerca de 8 e cerca de 100 nucleobases. O termo “polinucleotídeo” refere-se a pelo menos uma molécula maior que cerca de 100 nucleobases de comprimento.

25 Aqui, em certas modalidades, um “gene” refere-se a um ácido nucléico que é transcrito. Em certos aspectos, o gene inclui seqüências envolvidas na transcrição, ou na produção de mensagem ou composição. Como será entendido por aqueles versados na técnica, esse termo funcional “gene” inclui ambas as seqüências genômicas, seqüências de RNA ou de cDNA ou segmentos de ácido nucléico engenheirados, menores, inclusive
30 segmentos de ácido nucléico de uma parte não transcrita de um gene, incluindo, mas sem limitação, o promotor não transcrito ou as regiões intensificadoras de um gene. Segmentos de ácido nucléico de gene engenheirado, menores, podem expressar, ou podem ser adaptados para expressarem tecnologia de manipulação de ácido nucléico, proteínas, polipeptídeos, domínios, peptídeos, proteínas de fusão, mutantes e/ou similares.

35 Um polinucleotídeo da invenção pode formar um “cassete de expressão”. Um “cassete de expressão” é um polinucleotídeo que proporciona a expressão de uma unidade de transcrição particular. Ou seja, ele inclui elementos de promotor e outros vários

elementos que funcionam na transcrição de um gene ou unidade de transcrição. Um cassete de expressão pode ser também parte de um polinucleotídeo de replicação maior ou vetor de expressão ou construção.

Essas definições referem-se em geral a uma molécula de fita simples, mas em modalidades específicas, também englobarão um fita adicional que é parcial, substancial ou inteiramente complementar à molécula de fita simples. Assim, um ácido nucléico pode englobar uma molécula de dupla fita que compreende uma ou mais fitas complementares ou “complemento(s)” de uma sequência particular que compreende uma molécula.

“Substancialmente isolados de outras seqüências de codificação” significa que o gene de interesse forma a parte significativa da região de codificação do ácido nucléico, ou que o ácido nucléico não contém grandes porções de ácidos nucléicos codificadores naturais, tais como fragmentos cromossômicos grandes, outros genes funcionais, regiões de codificação de RNA ou de cDNA. Naturalmente, isso se refere ao ácido nucléico como originalmente isolado, e não exclui genes ou regiões de codificação adicionadas ao ácido nucléico pelo homem.

Como usada aqui, uma “nucleobase” refere-se a uma base heterocíclica, tal como uma nucleobase natural (i.e., A, T, G, C ou U), encontrada em pelo menos um ácido nucléico natural (i.e., DNA e RNA), e derivado(s) natural(naturais) ou não naturais e análogos de tal nucleobase. Uma nucleobase geralmente pode formar uma ou mais ligações de hidrogênio (“anelar” ou “hibridizar”) com pelo menos uma nucleobase natural de modo que pode substituir o pareamento de nucleobases, natural (por exemplo, a ponte de hidrogênio entre A e T, G e C, e A e U).

Como usado aqui, um “nucleotídeo” refere-se a um nucleosídeo que compreende ainda uma fração de “cadeia principal”. Uma fração da cadeia principal liga geralmente, de modo covalente, um nucleotídeo a uma outra molécula que compreende um nucleotídeo, ou a um outro nucleotídeo para formar um ácido nucléico. A “fração de estrutura principal” em nucleotídeos naturais compreende tipicamente compreende uma fração de fósforo, que é covalentemente ligada a um açúcar de 5 carbonos. A ligação da fração de cadeia principal ocorre tipicamente tanto na posição 3’ como na posição 5’ do açúcar de 5 carbonos. Contudo, outros tipos de ligações são conhecidos na técnica, particularmente quando um nucleotídeo compreende derivados ou análogos de açúcar natural de 5 carbonos ou fração de fósforo.

A. Construções de Expressão

As construções de expressão da invenção podem incluir ácidos nucléicos que codificam um ácido nucléico terapêutico e/ou uma proteína para imageamento. Em outros aspectos, a construção de expressão pode ser uma construção de expressão terapêutica que pode ser usada em composições terapêuticas e nos métodos da invenção. Em certas

modalidades, o material genético pode ser manipulado para produzir cassetes de expressão e/ou construções de expressão que codificam proteínas de imageamento, proteínas alvejadoras e/ou genes terapêuticos.

As modalidades da invenção podem incluir dois tipos separados do cassete de expressão ou da construção de expressão compreendendo um cassete de expressão. Um cassete é usado na expressão de uma proteína de imageamento, i.e., uma proteína que é diretamente detectável ou tem uma atividade da propriedade que é indiretamente detectável. Um outro cassete de expressão pode codificar um gene terapêutico. No contexto de um vetor terapêutico, um gene terapêutico pode ser um gene terapêutico discutido aqui útil no tratamento profilático ou terapêutico de uma condição de doença. No contexto da terapia gênica, o gene pode ser um DNA heterólogo, com o significado de incluir DNA derivado de uma fonte diferente do genoma viral que proporciona a cadeia principal do vetor. O gene pode ser derivado de uma fonte procariótica ou eucariótica tais como bactéria, vírus, levedura, parasita, planta, ou mesmo um animal. O DNA heterólogo pode ser também derivado de mais que uma fonte, i.e., uma construção multigênica ou uma proteína de fusão. O DNA heterólogo pode incluir também uma sequência reguladora que pode ser derivada de uma fonte e o gene de uma fonte diferente.

B. Regiões de Controle

Cassetes e/ou construções de expressão da invenção, se codificam uma proteína de imageamento ou gene(s) terapêutico(s), incluirão tipicamente várias regiões de controle. Essas regiões de controle modulam tipicamente a expressão do gene de interesse.

1. Promotores

Por todo o relatório descritivo, o termo "construção de expressão" é para ser entendido como incluindo qualquer tipo de construção genética contendo um ácido nucléico que codifica produtos gênicos, onde parte ou toda a sequência de codificação de ácidos nucléicos é capaz de ser transcrita, por exemplo, toda ou parte de uma proteína de imageamento ou proteína terapêutica. O transcrito pode ser traduzido em uma proteína, mas não é necessário. Em certas modalidades, a expressão inclui tanto a expressão de um gene como a tradução de mRNA em um produto gênico. Em outras modalidades, a expressão inclui somente a transcrição de um ácido nucléico terapêutico tais como RNAs ou DNAs inibidores.

O ácido nucléico que codifica um produto gênico está sob controle transcricional de um promotor. Um "promotor" refere-se a uma sequência de DNA reconhecida pelo maquinário da célula, ou introduzida no maquinário introduzido, requerido para iniciar a transcrição específica de um gene. Em aspectos particulares, a transcrição pode ser constitutiva, induzível e/ou repressível. A frase "sob controle transcricional" significa que o promotor está na localização e na orientação corretas em relação ao ácido nucléico para

controla a iniciação de RNA polimerase e a expressão do gene.

O termo promotor será usado aqui para referir-se a um grupo de módulos de controle transcricional que são agrupados em torno do sítio de iniciação para RNA polimerase II. Muito do que se pensa sobre como os promotores são organizados deriva de análises de promotores virais severos, inclusive aqueles para vários promotores retrovirais, a HSV timidina quinase (tk) e as unidades de transcrição precoce de SV40.

Elementos de promotores adicionais regulam a frequência da iniciação transcricional. Tipicamente, esses estão localizados na região 30-110 bp a montante do sítio de iniciação, embora vários promotores tenham, também, sido mostrados recentemente como contendo elementos funcionais a jusante do sítio de iniciação. O espaçamento entre os elementos de promotores é freqüentemente flexível, de modo que a função do promotor é conservada quando os elementos são invertidos ou movidos com relação um ao outro. Dependendo do promotor, parece que elementos individuais podem funcionar ou cooperativamente ou independentemente para ativar a transcrição.

Não se acredita que o promotor particular empregado para controlar a expressão de uma seqüência de ácidos nucleicos de interesse seja importante, desde que ele seja capaz de direcionar a expressão do ácido na célula alvejada. Assim, quando uma célula humana é alvejada, é preferível posicionar a região de codificação de ácido nucleico adjacente ao e sob o controle de um promotor que é capaz de ser expresso em uma célula humana alvejada. Falando de modo geral, tal promotor pode incluir tanto um promotor humano, viral ou uma combinação deles.

Em várias modalidades, o promotor de gene precoce imediato do citomegalovírus humano (CMVIE), o promotor precoce de SV40, a repetição terminal longa do vírus de sarcoma de Rous, β -actina, promotor de insulina de rato e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase podem ser usados para obter alto nível de expressão da seqüência de codificação de interesse. O uso de outros promotores virais, retrovirais ou celulares mamíferos ou de fago bacteriano, que são bem conhecidos na técnica para obtenção de expressão de uma seqüência de codificação de interesse é também contemplado, desde que os níveis de expressão sejam suficientes para um determinado propósito. Ao se empregar um promotor com propriedades bem conhecidas, o nível e o padrão da expressão da proteína de interesse seguinte à transfecção ou transformação podem ser otimizados.

A seleção de um promotor que é regulado em resposta a sinais fisiológicos específicos ou sintéticos pode possibilitar a expressão induzível do produto gênico em comparação com a célula sob condições não induzíveis. Por exemplo, no caso onde a expressão de um transgene, ou de transgenes quando um vetor multicistrônico é utilizado é tóxica para as células onde o vetor é produzido, pode ser desejável proibir ou reduzir a expressão de um ou mais dos transgenes. Exemplos de transgenes que podem ser tóxicos

para a linhagem de célula produtora são genes pró-apoptóticos ou de citocina. Vários sistemas de promotores induzíveis estão disponíveis para a produção de vetores virais onde o produto transgênico pode ser tóxico.

O sistema de ecdisona (Invitrogen, Carlsbad, CA) é um desses sistemas. Esse sistema é projetado para permitir a expressão regulada de um gene de interesse em células mamíferas. Ele consiste em um mecanismo de expressão rigorosamente regulado que virtualmente não permite a expressão em nível basal do transgene, mas acima de 200 vezes de capacidade de indução. Um outro sistema induzível que seria útil é o sistema Tet-Off™ ou Tet-On™ (Clontech, Palo Alto, CA) desenvolvido originalmente por Gossen e Bujard (Gossen e Bujard, 1992; Gossen et al., 1995). Esse sistema também permite que altos níveis de expressão de gene sejam regulados em resposta à tetraciclina ou aos derivados de tetraciclina tal como doxíciclina.

Em algumas circunstâncias, pode ser desejável regular a expressão de um transgene em um vetor de expressão terapêutica. Por exemplo, promotores virais diferentes com resistências variáveis de atividade podem ser utilizados dependendo do nível de expressão desejado. Em células mamíferas, o promotor precoce imediato de CMV é freqüentemente usado para proporcionar ativação transcrricional forte. Versões modificadas do promotor de CMV que são menos potentes têm sido também usadas quando níveis reduzidos de expressão de transgene são desejados. Quando se quer a expressão de um transgene em células hematopoiéticas, os promotores retrovirais, tais como LTRs de MLV ou de MMTV, são usados freqüentemente. Outros promotores virais que podem ser usados dependendo do efeito desejado incluem SV40, RSV LTR, HIV-1 e HIV-2 LTR, promotores de adenovírus tais como E1A, E2A, ou região de MLP, AAV LTR, vírus do mosaico da couve-flor, HSV-TK, e vírus do sarcoma aviário.

Similarmente, promotores específicos e seletivos podem ser usados para efetuar a transcrição em tecidos ou células específicas de modo a reduzir a toxidez potencial ou efeitos indesejáveis para tecidos não alvejados. Por exemplo, promotores tais como PSA, probasina, ácido prostático fosfatase ou calicreína glandular específica da próstata (hK2) podem ser usados para alvejar a expressão do gene alvo na próstata. Similarmente, os seguintes promotores podem ser usados para alvejar a expressão do gene alvo em outros tecidos (Tabela 1).

Em certas indicações, pode ser desejável ativar a transcrição em tempos específicos depois da administração do vetor da terapia gênica. Isso pode ser feito com tais promotores como aqueles que são reguláveis por hormônio ou por citocina. Por exemplo, em aplicações terapêuticas onde a indicação é um tecido gonadal onde esteróides específicos são produzidos ou enviados, o uso de promotores de androgênio ou estrogênio pode ser vantajoso. Tais promotores que são reguláveis por hormônios incluem MMTV, MT-

1, esdisona e RuBisco. É esperado que outros promotores regulados por hormônios, tais como aqueles responsivos aos hormônios da tireóide, pituitários e adrenais, sejam úteis na presente invenção. Os promotores responsivos à citocina e proteína inflamatória que poderiam ser usados incluem K e T Cininogênio (Kageyama et al., 1987), c-fos, TNF-alfa, proteína reativa C (Arcone et al., 1988), haptoglobina (Oliviero et al., 1987), amiloide A 2 sérico, C/EBP alfa, IL-1, IL-5 (Poli e Cortese, 1989), Complemento C3 (Wislon et al., 1990), IL-8, glicoproteína ácido alfa-1 (Prowse e Baumann, 1988), alfa-1-antitripsina, lipoproteína lípase (Zechner et al., 1988), angiotensinogênio (Ron et al., 1990), fibrinogênio, c-jun (induzível por éster de forbol, TNF-alfa, radiação UV, ácido retinóico, e peróxido de hidrogênio), collagenase (induzida por ésteres de forbol e ácido retinóico), metalotioneína (induzível por metal pesado e glicocorticóide), Estromelisina (induzível por éster de forbol, interleucina-1 e EGF), alfa-2 macroglobulina e alfa-1 antitripsina. Promotores específicos de tumor, tais como osteocalcina, elemento responsivo à hipoxia (HRE), MAGE-4, CEA, alfa-fetoproteína, GRP78/BiP e tirosinase podem ser também usados para regular a expressão gênica em células tumorais.

É contemplado que qualquer dos promotores acima sozinhos ou em combinação um com o outro podem ser úteis de acordo com a presente invenção, dependendo da ação desejada. Além disso, essa lista de promotores não deve ser interpretada como sendo exaustiva ou limitativa. Aqueles versados na técnica terão conhecimento de outros promotores que podem ser usados em conjunto com os promotores e métodos descritos aqui.

TABELA 1. PROMOTORES ESPECÍFICOS DE TECIDO

TECIDO	Promotor
Pâncreas	Insulina
	Elastina
	Amilase
	pdr-1 pdx-1
	glicocinase
Fígado	Albumina PEPCK
	Intensificador de HBV
	α fetoproteína
	apolipoproteína C
	α -1 antitripsina
	vitelogenina, NF-AB
Músculo esquelético	Transtiretina
	Cadeia de Miosina H
	Creatina cinase do músculo

	Distrofina
	Calpaína p94
	Alfa-actina esquelética
	Fast troponina 1
Pele	Queratina K6
	Queratina K1
Pulmão	CFTR
	Citoqueratina humana 18 (K18)
	Proteínas A, B e C tensoativas pulmonares
	CC-10
	P1
Musculatura lisa	sm22 α
	SM-alfa-actina
Endotélio	Endotelina-1
	E-selectina
	Fator de von Willebrand
	TIE (Korhonen <i>et al.</i> , 1995)
	KDR/flk-1
Melanócitos	Tirosinase
Tecido adiposo	Lipoproteína lipase (Zechner <i>et al.</i> , 1988)
	Adipsina (Spiegelman <i>et al.</i> , 1989)
	acetil-CoA carboxilase (Pape e Kim, 1989)
	glicerofosfato desidrogenase (Dani <i>et al.</i> , 1989)
	adipócito P2 (Hunt <i>et al.</i> , 1986)
Sangue	β -globina

2. Intensificadores

Os intensificadores são elementos genéticos que aumentam a transcrição de um promotor localizado em uma posição distante na mesma molécula de DNA. Os intensificadores são organizados de modo bastante similar aos promotores. Ou seja, eles são compostos de muitos elementos individuais, cada um dos quais se liga a uma ou mais proteínas transcrpcionais. A distinção básica entre intensificadores e promotores é operacional. Uma região intensificadora deve ser, como um todo, capaz de estimular a transcrição em uma distância; isso não precisa ser verdadeiro para uma região de promotor ou seus elementos componentes. Por outro lado, um promotor deve ter um ou mais elementos que direcionam a iniciação da síntese de RNA em um sítio particular e em uma orientação particular, ao passo que os intensificadores carecem dessas especificidades.

Promotores e intensificadores estão freqüentemente se sobrepondo e contíguos, freqüentemente parecendo ter uma organização modular muito similar.

Embaixo está uma lista de promotores adicionais para os promotores específicos para tecidos, listados acima, promotores/intensificadores celulares e promotores/intensificadores induzíveis que poderiam ser usados em combinação com o ácido nucléico que codifica um gene de interesse em uma construção de expressão (Tabela 2 e Tabela 3). Adicionalmente, qualquer combinação de promotor/intensificador (como a Base de Dados de Promotores Eucarióticos EPDB) poderia ser usada também para acionar a expressão do gene. Células eucarióticas podem suportar a transcrição citoplásmica de certos promotores bacterianos se a polimerase bacteriana apropriada é provida ou como parte do complexo de distribuição ou como uma construção de expressão genética adicional.

Em modalidades preferidas da invenção, uma construção de expressão terapêutica compreende um vírus ou construção engenheirada derivada de um genoma viral. A capacidade de certos vírus de entrarem nas células via endocitose mediada por receptor e para se integrarem ao genoma da célula hospedeira e expressarem os genes virais estáveis e eficientemente fez com que eles se tornassem candidatos atraentes para a transferência de genes estranhos para as células mamíferas (Ridgeway, 1988; Nicolas e Rubenstein, 1988; Baichwal e Sugden, 1986; Temin, 1986).

TABELA 2

INTENSIFICADOR
Cadeia Pesada da Imunoglobulina
Cadeia Leve da Imunoglobulina
Receptor de Células T
HLA DQ α and DQ β
β -Interferon
Interleucina-2
Receptor de Interleucina-2
MHC Classe II 5
MHC Classe II HLA-DR
β -Actina
Creatina Cinase do Músculo
Prealbumina (Transtiretina)
Elastase /
Metalotioneína
Colagenase

INTENSIFICADOR
Gene de Albumina
α -Fetoproteína
τ -Globina
β -Globina
e-fos
c-HA-ras
Insulina
Molécula de Adesão à Célula Neural (NCAM)
α 1-Antitripsina
H2B (TH2B) Histona
Colágeno de camundongo ou do Tipo I
Proteínas Reguladas por Glicose (GRP94 e GRP78)
Hormônio de Crescimento do Rato
Amilóide A Sérico Humano A (SAA)
Troponina I (TN I)
Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
Distrofia Muscular de Duchene
SV40
Polioma
Retrovírus
Papilomavírus
Vírus da Hepatite B
Vírus da Imunodeficiência Humana
Citomegalovírus
Vírus da Leucemia do Macaco Gibbon

TABELA 3

Elemento	Indutor
MT II	Éster Forbol (TPA) Metais Pesados
MMTV (virus de tumor mamário do camundongo)	Glucocorticoids

β-Interferon	Poli(rl)X Poli(rc)
Adenovírus 5 E2	Ela
c-jun	Éster Forbol (TPA), H ₂ O ₂
Colagenase	Éster Forbol (TPA)
Estromelisina	Éster Forbol (TPA), IL-1
SV40	Éster Forbol (TPA)
Gene de Murino MX	Interferon, Vírus da Doença Newcastle
Gene GRP78	A23187
α-2-Macroglobulina	IL-6
Vimentina	Soro
Gene H-2kB de Classe I de MHC	Interferon
HSP70	Ela, Antígeno T Grande de SV40
Proliferina	Éster Forbol-TPA
Fator de Necrose Tumoral	FMA
Gene do Hormônio Estimulador da Tireóide α	Hormônio da Tireóide
Insulina E Box	Glicose

C. Sinais de Poliadenilação

Os sinais de poliadenilação podem ser usados em vetores terapêuticos e/ou de imageamento. Quando uma inserção de cDNA é empregada, será tipicamente desejado incluir um sinal de poliadenilação para efetuar a poliadenilação própria do transcrito do gene.

- 5 Não se acredita que a natureza do sinal de poliadenilação seja crucial para o sucesso da prática da invenção, e qualquer de tal seqüência pode ser empregada tais como sinais de poliadenilação do hormônio de crescimento humano ou bovino e de SV40. Também contemplado como um elemento do cassete de expressão é um terminador. Esses elementos podem servir para intensificar os níveis de mensagem e minimizar a leitura
- 10 através do cassete em outros processos.

D. Genes Terapêuticos

Partículas de AAVP da invenção podem ser usadas para distribuir uma variedade de agentes terapêuticos ou de imageamento, incluindo vetores de expressão terapêutica. A presente invenção contempla o uso de uma variedade de genes terapêuticos diferentes. Por

15 exemplo, genes que codificam enzimas, hormônios, citocinas, oncogenes, receptores, canais de íons, supressores de tumor, fatores de transcrição, marcadores selecionáveis de fármacos, toxinas e vários antígenos são contemplados como genes adequados para uso de acordo com a presente invenção. Além disso, construções de RNA anti-sentido ou inibidor,

derivadas de oncogenes, são outros "genes" de interesse de acordo com a presente invenção.

De acordo com a presente invenção, um gene ou polipeptídeo selecionado pode se referir a qualquer proteína, polipeptídeo, ou peptídeo. Um gene ou polipeptídeo terapêutico é um gene ou polipeptídeo que pode ser administrado a um paciente com a finalidade de tratar ou prevenir uma doença. Por exemplo, um gene terapêutico por ser um gene administrado a um paciente para tratamento ou prevenção de câncer. Exemplos de genes terapêuticos incluem, mas sem limitação, Rb, CFTR, p16, p21, p27, p57, p73, C-CAM, APC, CTS-1, zac1, scFV *ras*, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, MMAC1, FCC, MCC, BRCA2, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 IL-12, GM-CSF, G-CSF, timidina quinase, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri, Fas-L, mda-7, fus, interferon α , interferon β , interferon γ , p53, ABLI, BLC1, BLC6, CBFA1, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ETS1, ETS2, ETV6, FGR, FOX, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TCL3, YES, MADH4, RB1, TP53, WT1, TNF, BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, ApoA1, ApoAIV, ApoE, Rap1A, citosina desaminase, Fab, ScFv, BRCA2, zac1, ATM, HIC-1, DPC-4, FHIT, PTEN, ING1, NOEY1, NOEY2, OVCA1, MADR2, 53BP2, IRF-1, zac1, DBCCR-1, rks-3, COX-1, TFPI, PGS, Dp, E2F, *ras*, *myc*, *neu*, *raf*, *erb*, *fms*, *trk*, *ret*, *gsp*, *hst*, *abl*, E1A, p300, VEGF, FGF, trombospondina, BAI-1, GDAIF, ou MCC.

Outros exemplos de genes terapêuticos incluem genes que codificam enzimas. Exemplos incluem, mas sem limitação, ACP dessaturase, uma ACP hidroxilase, uma ADP-glicose piroforilase, uma ATPase, uma álcool desidrogenase, uma amilase, uma amiloglicosidase, uma catalase, uma celulase, uma ciclooxygenase, uma descarboxilase, uma dextrinase, uma esterase, uma DNA polimerase, uma RNA polimerase, uma hialuron-sintase, uma galactosidase, uma glucanase, uma glicose oxidase, uma GTPase, uma helicase, uma hemicelulase, uma hialuronidase, uma integrase, uma invertase, uma isomerase, uma quinase, uma lactase, uma lipase, uma lipoxigenase, uma liase, uma lisozima, uma pectinaesterase, uma peroxidase, uma fosfatase, uma fosfolipase, uma fosforilase, uma poligalacturonase, uma proteinase, uma peptidase, uma pulanase, uma recombinase, uma transcriptase reversa, uma topoisomerase, uma xilanase, um gene repórter, uma interleucina, ou uma citocina.

Outros exemplos de genes terapêuticos incluem o gene que codifica carbamoil sintetase I, ornitina transcarbamilase, arginossuccinato sintetase, arginossuccinato liase, arginase, fumarilacetoacetato hidrolase, fenilalanine hidroxilase, alfa-1 antitripsina, glicose-6-fosfatase, receptor de lipoproteína de baixa densidade, porfobilinogênio desaminase, fator VIII, fator IX, cistationa beta.-sintase, cetoácido de cadeia ramificada descarboxilase, albumina, isovaleril-CoA desidrogenase, propionil CoA carboxilase, metil malonil CoA

mutase, glutaril CoA desidrogenase, insulina, -glicosidase, piruvato carboxilase, fosforilase hepática, fosforilase quinase, glicina descarboxilase, H-proteína, T-proteína, ATPase transportadora de cobre da doença de Menkes, ATPase transportadora de cobre da doença de Wilson, citosina desaminase, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, galactose-1-fosfato uridiltransferase, fenilalanina hidroxilase, glicocerbrosidase, esfingomielinase, -L-iduronidase, glicose-6-fosfato desidrogenase, HSV timidina quinase, ou timidina quinase humana.

Genes terapêuticos incluem também hormônios que codificam genes. Exemplos incluem, mas sem limitação, genes que codificam o hormônio do crescimento, prolactina, lactogênio placentário, hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante, gonadotropina coriônica, hormônio estimulador da tireóide, leptina, adrenocorticotropina, angiotensina I, angiotensina II, β -endorfina, hormônio estimulador de β -melanócito, colecistocinina, endotelina I, galanina, peptídeo inibidor gástrico, glucagon, insulina, lipotropinas, neurofisinas, somatostatina, calcitonina, peptídeo relacionado ao gene de calcitonina, peptídeo relacionado ao gene de β -calcitonina, hipercalcemia do fator de malignidade, proteína relacionada ao hormônio paratireóide, peptídeo similar ao glucagon, pancreastatina, peptídeo pancreático, peptídeo YY, PHM, secretina, peptídeo intestinal vasoativo, oxitocina, vasopressina, vasotocina, encefalinamida, metorfinamida, hormônio estimulador de alfa melanócito, fator natriurético atrial, amilina, componente de amilóide P, hormônio liberador de corticotropina, fator liberador do hormônio de crescimento, hormônio liberador do hormônio luteinizante, neuropeptídeo Y, substância K, substância P, ou hormônio liberador de tiotropina

Em ainda uma outra modalidade, o gene heterólogo pode incluir um anticorpo de cadeia simples. Métodos para a produção de anticorpos de cadeia simples são bem conhecidos daqueles versados na técnica. O técnico no assunto deve se referir à Patente US 5.359.046 (aqui incorporada a título de referência) para tais métodos. Um anticorpo de cadeia simples é criado para se fundir juntamente com os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves usando um ligante de peptídeo curto, reconstituindo, assim, um sítio de ligação de antígeno em uma molécula simples.

E. Construções Multigênicas e IRES

Em certas modalidades da invenção, o uso de elementos de sítios de ligação de ribossomos internos (IRES) é para criar mensagens policistrônicas multigênicas (Pelletier e Sonenberg, 1988). Elementos de IRES de dois membros da família do picanovírus (pólio e encefalomiocardite) foram descritos (Pelletier e Sonenberg, 1988), bem como um IRES de uma mensagem mamífera (Macejak e Sarnow, 1991). Os elementos de IRES podem ser ligados a quadros de leitura aberta heterólogos. Quadros de leitura aberta múltiplos podem ser transcritos juntos, em que cada um é separado por um IRES, criando mensagens

policistrônicas. Em virtude do elemento de IRES, cada quadro de leitura aberta é acessível aos ribossomos para tradução eficiente. Genes múltiplos podem ser eficientemente expressos usando um promotor/intensificador simples para transcrever uma mensagem simples. Qualquer quadro de leitura aberta heterólogo pode ser ligado aos elementos de IRES. Isso inclui genes para proteínas secretadas, proteínas de subunidades múltiplas, codificadas por genes independentes, proteínas intracelulares ou ligadas à membrana e marcadores selecionáveis. Desse modo, a expressão de várias proteínas pode ser simultaneamente engenheirada em uma célula com uma construção simples e um marcador selecionável simples.

F. Preparação dos Ácidos Nucléicos

Um ácido nucléico pode ser preparado por qualquer técnica conhecida por aquele com conhecimento ordinário da técnica, tal como, por exemplo, síntese química, produção enzimática ou produção biológica. Um exemplo não limitativo de um ácido nucléico produzido enzimaticamente inclui aquele produzido por enzimas em reações de ampliação tal como PCRTM (vide, por exemplo, a Patente US 4.683.202 e a Patente US 4.682.195, cada uma aqui incorporada a título de referência), ou pela síntese de um oligonucleotídeo descrito na Patente US 5.645.897, aqui incorporada a título de referência. Um exemplo não limitativo de um ácido nucléico produzido biologicamente inclui um ácido nucléico recombinante produzido (i.e., replicado) em uma célula viva, tal como um vetor de DNA recombinante replicado em bactérias (vide, por exemplo, Sambrook et al., 2001, aqui incorporado a título de referência).

III. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

Quando aplicações clínicas são contempladas, será necessário preparar composições farmacêuticas das composições de AAVP (composições terapêuticas) em uma forma apropriada para a aplicação pretendida. Geralmente, isso permitirá preparar composições que são essencialmente isenta de pirogênios, bem como de outras impurezas que poderiam ser prejudiciais aos humanos ou animais.

Geralmente, será desejado empregar sais e tampões apropriados para tornar as composições adequadas para a introdução em um paciente. As composições aquosas da presente invenção compreendem uma quantidade eficaz do AAVP ou de outro agente dissolvido ou disperso em um veículo ou meio aquoso farmacêuticamente aceitável. A frase "farmacêutica ou farmacologicamente aceitável" refere-se a entidades moleculares e composições que não produzem reações adversas, alérgicas, ou outras reações impróprias quando da administração a um animal ou a um humano.

Como usado aqui, "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos ou antifúngicos, agentes isotônicos ou retardadores de absorção e similares. O uso de tais meios e agentes

para substâncias farmacologicamente ativas em bem conhecido da técnica. Excetuando-se até onde qualquer meio ou agente convencional for incompatível com as composições de AAVP da presente invenção, seu uso como um reagente de imageamento ou em composições terapêuticas é contemplado. Ingredientes suplementarmente ativos, tais como outros agentes anticâncer, podem ser incorporados às composições. Sob condições ordinárias de armazenagem e uso, essas preparações contêm um conservante para impedir o crescimento de microrganismos. Veículos intravenosos incluem repositores de fluido e de nutrientes. Conservantes incluem agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e gases inertes. O pH e a concentração exata dos vários componentes no produto farmacêutico são ajustados de acordo com parâmetros bem conhecidos.

Uma quantidade eficaz da composição é determinada com base na meta pretendida, tais como imageamento e/ou atenuação de uma condição ou doença, tal como câncer. O termo "dose unitária" refere-se a uma unidade fisicamente separada e adequada para uso em um paciente, em que cada unidade contém uma quantidade predeterminada da composição terapêutica calculada para produzir a resposta desejada em associação com sua administração, i.e., a via apropriada e o regime de tratamento. A quantidade a ser administrada, tanto de acordo o número de tratamentos como da dose unitária, depende de o paciente a ser tratado, o estado do paciente, e a proteção desejada. Quantidades precisas da composição terapêutica dependem também do critério do clínico e são peculiares para cada indivíduo.

São também contempladas composições em combinação que contêm dois ingredientes ativos. Em particular, a presente invenção proporciona composições que contêm composições de AAVP e pelo menos um segundo fármaco terapêutico, por exemplo, um fármaco anti-neoplásico.

A. Administração Parenteral

As composições ativas da presente invenção podem ser formuladas para administração parenteral, por exemplo, formuladas para injeção via intravenosa, intramuscular, subcutânea, e ainda vias intraperitoneais. A preparação de uma composição aquosa que contem um ou mais segundos agentes, como ingredientes ativos, será conhecida daqueles versados na técnica à luz da presente descrição. Tipicamente, tais composições podem ser preparadas como injetáveis, sejam na forma de soluções líquidas sejam na forma de suspensões; podem ser também preparadas formas sólidas adequadas ao uso na preparação de soluções ou suspensões, mediante a adição de um líquido antes da injeção; e as preparações podem ser também emulsificadas.

As formas farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis; formulações incluindo óleo de gergelim, óleo de amendoim ou propileno glicol aquoso; e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou

dispersões injetáveis estéreis. Em todos os casos, a forma deve ser estéril e deve ser fluida até onde existir fácil seringabilidade.

O veículo pode ser também um meio solvente ou de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e similar), misturas adequadas destes, e óleos vegetais. A fluidez própria pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. A prevenção da ação de microrganismos pode ser obtida por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e similares. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio. Absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida pelo uso nas composições de agentes retardadores de absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

Soluções injetáveis estéreis são preparadas pela incorporação dos compostos ativos na quantidade requerida no solvente apropriado com vários dos outros ingredientes enumerados acima, conforme requerido, seguido por esterilização filtrada. Em geral, as dispersões são preparadas por incorporação dos vários ingredientes ativos esterilizados em um veículo estéril que contém o meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos para preparação, em particular, são técnicas de secagem a vácuo e liofilização, que rendem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução previamente filtrada e estéril deste.

Para administração parenteral em uma solução aquosa, por exemplo, a solução deve ser adequadamente tamponada, se necessário e o diluente líquido inicialmente tornado isotônico com solução salina ou glicose suficiente. Essas soluções aquosas particulares são especificamente adequadas para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, e intraperitoneal. Nesse contexto, meios aquosos estéreis que podem ser empregados serão bem conhecidos daqueles versados na técnica à luz da presente exposição. Por exemplo, uma dosagem poderia ser dissolvida em 1 mL de solução de NaCl isotônico e adicionada a 1.000 mL de fluido hipodermóclise ou injetada no sítio de infusão proposto (vide, por exemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª Edição, páginas 1035-1038 e 1570-1580). Alguma variação na dosagem ocorrerá necessariamente dependendo da condição do paciente que está sendo tratado. Aquele responsável pela administração determinará, em qualquer caso, a dose apropriada para o paciente individual.

Para proporcionar uma melhor compreensão da presente invenção, os seguintes exemplos são dados. Os exemplos não devem, de nenhum modo, ser entendidos como limitando ou definindo o inteiro escopo da invenção.

IV. EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são fornecidos com a finalidade de ilustrar várias modalidades da invenção e não devem, de nenhum modo, serem considerados como limitativos da invenção. Aquele versado na técnica apreciará que a presente invenção está bem adaptada para realizar outros objetivos e atingir as finalidades e as vantagens mencionadas, bem como aqueles objetivos, propósitos e vantagens inerentes a ela. Os presentes exemplos, juntamente com os métodos descritos aqui, são presentemente representativos das modalidades preferidas, são exemplificativos, e não têm o propósito de limitar o escopo da invenção. Alterações neles e outros usos que estão englobados pelo espírito da invenção, conforme definida pelo escopo das reivindicações deverão ocorrer àqueles versados na técnica.

EXEMPLO 1

ALVEJANDO O AAVP

A. Procedimentos Experimentais

Desenho, Construção, e Geração de Partículas de AAVP alvejado. O fago RGD-4C e o RGD-4C AAVP foram engenheirados em processo de duas etapas: geração de um intermediário (RGD-4C fUSE5-MCS) e produção subsequente da construção do fago RGD-4C e RGD-4C AAVP. RGD-4C fUSE5-MCS continha a inserção de oligonucleotídeo que codifica o peptídeo alvejador específico RGD-4C e um fragmento do plasmídeo fMCS que tinha um sítio de multiclonagem (MCS) para inserção do cassete de expressão eucariótica. O fUSE5DNA derivado do fago RGD-4C e o fMCS DNA derivado do fago foram purificados de lisados de *E. coli hospedeira* (MC1061). Obtivemos o intermediário RGD-4C fUSE5-MCS por ligação de um fragmento BamHISacII de 5,4 kb do plasmídeo RGD-4C FUSE5 ao fragmento BamHI/SacII de 4,1 kb do plasmídeo fMCS. A seguir, criamos uma AAVP-GFP por clonagem do fragmento PacI (2,8 kb) do plasmídeo pAAV-eGFP (GFP intensificada; Stratagene) de ITR para ITR para o sítio PstI do RGD-4C fUSE5-MCS. Em resumo, o pAAV foi digerido com PacI para liberar um fragmento de 2,8 kb, que foi "blunted" com DNA polimerase e clonado no sítio PstI "blunted" do RGD-4C fUSE5-MCS. Para gerar as construções de fago alvejado sem ITRs, um fragmento de 2,3 kb localizado entre as ITRs de pAAV-eGFP e contendo pCMV-GFP e SV40 poliA foi liberado por digestão em EcoRI, "blunted" com DNA polimerase, então clonado no MCS de RGD-4C fUSE5-MCS. Para selecionar células que expressam GFP, o fragmento BamHI-Sac 1 do promotor de pQBI fosfoglicerato cinase-1 (PGK; QBIogene) e contendo um sequência de fusão de GFPneo foi clonado no sítio de NotI de AAVP ou nas construções de fago de controle para assegurar que a células expressando GFP fossem resistentes a G418. O fragmento de GFPneo de pQBI PGK foi liberado por digestão com BamHI e SacI, e "blunted" com DNA polimerase; então os ligantes fosforilados para NotI foram adicionados. Depois da digestão com NotI, o

fragmento de GFPneo de 1,57 kb foi clonado no sítio NotI de AAVP ou na construção de fago não quimérico. Finalmente, para gerar uma partícula de AAVP transportando o gene para HSVtk ou Luc, o fragmento de BamHI-NotI contendo a HSVtk foi subclonado no sítio BamHI-NotI do plasmídeo pAAV para repor a GFP. A ITR-HSVtk-ITR ou os fragmentos de ITR-Luc-ITR foram removidos de pAAV-HSVtk e pAAV-Luc foi então inserida no RGD-4C fUSE5-MCS. As construções foram verificadas por seqüenciamento de DNA e análise de restrição, purificadas do sobrenadante da cultura de *E. coli* hospedeira (MC1061), re-suspensas em PBS e re-centrifugadas. Os sobrenadantes resultantes foram titulados em *E. Coli* (k91Kan). Diluições em série foram plaqueadas em placa de ágar Luria-Bertani contendo tetraciclina e canamicina, e as unidades de transdução (TU) foram determinadas por contagem das colônias.

Ensaio de Ligação na Superfície da Célula Mamífera e Internalização. Os inventores usaram o método de seleção ("biopanning") e análise rápida de ligantes interativos seletivos (denominado BRASIL) (Giordano et al., 2001) para avaliar a ligação de fagos às células intactas. Em resumo, as células KS1767 foram desprendidas com etilenodiaminatetraacetato (EDTA) e re-suspensas em meios de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo BSA a 1% em 4×10^6 células por mL. A suspensão de células (50 μ L) foi incubada com 10^9 TU de ou clones de RGD-4C AAVP ou de AAVP exibindo versões misturadas (*scrambled*) de RGD-4C (CDCFGDCRC (SEQ ID NO:2), CDCGFDCRC (SEQ ID NO:3), CRCGFDC (SEQ ID NO:40), peptídeo RGE-4C mutante, ou controle não alvejado. Depois de 2 horas, a mistura de AAVP/célula (fase aquosa) foi transferida para o topo de uma fase orgânica imiscível (solução de 200 μ L em um tubo Eppendorf de 400 μ L) consistindo em ftalato de dibutila:cicloexano (9:1 [v:v], D = 1,03 g/mL) e centrifugada a 10.000 g por 10 minutos, a 4°C. O tubo foi então congelado rapidamente em nitrogênio líquido, o fundo do tubo foi cortado, e o precipitado de célula-AAVP foi isolado e o AAVP ligado à membrana foi recuperado (Giordano et al., 2001).

Para internalização nas células, células KS1767 foram crescidas em lâminas de câmara de tecido (Sistema de Lâmina de Câmara Lab-Tek II; Nalge Nunc International Corp.), lavadas duas vezes com PBS, incubadas com 10^9 TU de RGD-4C AAVP ou de AAVP de controle exibindo versões misturadas (*scrambled*) de RGD-4C ou de RGE-4C em DMEM contendo BSA a 1% a 37°C, e lavadas com PBS para remover AAVP ligado, depois de 4 horas de incubação. Os clones ligados às membranas celulares foram eluídos quimicamente por rinsagem das células com glicina 20mM (pH 2,3). A seguir, as células foram lavadas três vezes com PBS, fixadas com PBS contendo paraformaldeído (PFA) a 4%, à temperatura ambiente, por 15 minutos, lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2%, lavadas com PBS, e bloqueadas com PBS contendo BSA a 1%. As células foram então incubadas com uma diluição 1:2000 do anticorpo de bacteriófago anti-M13

primário (Amersham) em PBS contendo BSA a 1% à temperatura ambiente, por 2 horas, lavadas com PBS, e incubadas com uma diluição 1:2000 de um anticorpo secundário anti-coelho conjugado a Cy3 em PBS contendo BSA a 1%, por 1 hora, à temperatura ambiente. Finalmente, as células foram lavadas com PBS, fixadas com PBS contendo PFA a 4%,
5 montadas, e visualizadas em um microscópio óptico de fluorescência.

Resgate do AAV Recombinante de Células Transduzidas por Partículas de AAVP. Células 293 humanas foram infectadas com RGD-4C AAVP-GFPneo ou RGD-4C fago-GFPneo. Quatro dias depois da infecção, as células foram transfectadas com plasmídeo de expressão de AAV rep e cap (pXX2) (Xiao et al., 1998) e superinfectadas com adenovírus
10 tipo 5 do tipo selvagem (Ad.). Assim, os genes de AAV rep e cap foram supridos por transfecção, e as funções auxiliaadoras do adenovírus foram supridas por superinfecção. As células foram colhidas 72 horas após infecção adenoviral e os sobrenadantes foram então usados para infectar novas células 293. A expressão GFP foi analisada usando FACS, 48 horas depois. Nesse ensaio, um AAV recombinante funcional foi gerado das células
15 transduzidas com a quimera de RGD 4C AAVP-GFP somente, mas não das células transduzidas com a GFP do fago não quimérico ou de vários controles. Resultados similares foram também obtidos com todos os clones de RG-4C AAVP, mas com nenhum dos clones do fago.

Geração de Linhagens de Células Mamíferas Clonais. Células 293 humanas foram infectadas com RGD-4C AAVP-GFPneo ou RGD-4C fago-GFPneo (a 10^6 TU por célula em
20 cada caso). Clones simples ($n = 9$ por grupo) foram isolados sob seleção de G418 e analisados quanto à expressão de GFP por FACS nas 12 semanas depois da seleção. OS clones estáveis foram denominados clones de fago #1 – 9 para fago-GFPneo e clones de AAVP #1 – 9 para AAVP-GFPneo.

Modelos de Tumor. A experimentação com animal foi revisada e aprovada pelo Institutional Animal Research Committee. Camundongos contendo tumor foram estabelecidos conforme descrito (Pasqualini et al., 1997; Arap et al.; Ellerby et al., 1999; Hajitou et al., 2001; Arap et al. 2004; Marchib et al., 2004). Os camundongos foram anestesiados por administração intraperitoneal de AvertinB ou por inalação de gás
30 (isoflurano a 2% e oxigênio a 98%). Construções alvejadas ou de controle foram intravenosamente administradas. As células tumorais foram tripsinizadas, contadas, centrifugadas, e re-suspensas em meio isento de soro. Um total de 10^6 células de linhagens de sarcoma de Kaposi (KS 1767), carcinoma da bexiga (UC3) ou carcinoma da próstata (DU145) foi implantado subcutaneamente em camundongos sem pelagem (*nude*),
35 imunodeficientes, de 6 semanas de idade. As células de tumor mamário de camundongo EF43-FGF4 (5×10^4) foram implantadas subcutaneamente em camundongos fêmeas BALB/c, imunocompetentes, de 6 semanas de idade. Os volumes tumorais foram calculados

conforme descrito (Pasqualini et al., 1997; Arap et al., 1998; Ellerby et al., 1999; Hajitou et al., 2001; Arap et al., 2004; Marchib et al., 2004) e expressos como volume tumoral médio * desvio padrão (DP). Quando os tumores alcançaram um volume de xenoenxerto derivados de DU145 de -50 mm^2 (considerado pequeno) ou 150 mm^2 (considerado grande) (dia 0), os camundongos contendo tumor receberam uma dose intravenosa única de RGD-4C AAVP-HSVtk ou de controles. O tratamento com GVC (80 mg/kg por dia, via intraperitoneal) foi iniciado dois dias mais tarde nas coortes de camundongos contendo tumor correspondendo ao tamanho maior.

Imageamento Molecular-Genético em Camundongos Contendo Tumor. Para imageamento molecular não invasivo, usamos um modelo de câncer da próstata com base na linhagem de células humanas DU145 onde os camundongos sem pelagem (*nude*), machos, contendo xenoenxertos de tumor na área subcutânea do ombro direito foram usados. Para imagear a expressão de gene de Luc de vagalume, os camundongos contendo tumor receberam uma dose única (150 mg/kg) do substrato D-luciferina (Xenogen) por administração intraperitoneal. A emissão fotônica foi submetida ao imageamento usando o Sistema de Imageamento *In Vivo* 200 (IVIS200; Xenogen, CA) depois da administração na veia da cauda do RGD-4C AAVP alvejado transportando o gene de Luc ou controles (AAVP-Luc não alvejada não, ou RGD-4C AAVPLuc misturadas (*scrambled*)). Parâmetros de imageamento: tempo de aquisição da imagem, 1 minuto; binning, 2; sem filtro; fstop, 1; campo de vista, 10 cm. As Regiões de Interesse (ROI) foram definidas manualmente sobre os tumores para medir as intensidades de sinal, expressas como fótons/s/cm²/sr.

Embora BLI possa avaliar a viabilidade da célula de expressar o transgene em sistemas experimentais, ele não é clinicamente aplicável. Assim, para avaliar a viabilidade dos xenoenxertos de tumor estabelecidos, os camundongos foram submetidos ao imageamento com escaneador microPET (Concorde Microsystems, TN), 2 horas depois da administração intravenosa de [¹⁸F]-FDG 100 µCi/camundongo. [¹⁸F]-FDG foi adquirido comercialmente (PETNet, Houston, TX). Para submeter a expressão do gene de HSVtk ao imageamento, o imageamento por PET foi realizado de 1 a 2 horas depois da administração intravenosa do análogo de nucleosídeo radiomarcado [¹⁸F]-FEAU. O imageamento por PET foi realizado em microPET R4 (Concorde Microsystems, Inc.) equipado com um leito de posicionamento controlado por computador, tem um campo de vista (FOV) transaxial de 10,8 cm e axial de 8 cm, não tem septos e opera exclusivamente em modo de listagem tridimensional. Os dados do modo de listagem integralmente tridimensional foram coletados usando uma janela de energia de 350-750 keV e uma janela de tempo de 6 ns. Todos os dados brutos foram inicialmente classificados em sinogramas tridimensionais, seguido por *re-binnig* de Fourier e reconstrução de imagem OSEM usando o software ASIPRO VM

(Concord Microsystems, TN). Tamanho de pixel de imagem foi de aproximadamente 1 mm transaxialmente, com uma espessura de lâmina de 1,2 mm.

[¹⁸F]-FEAU radiomarcado foi sintetizado para pureza radioquímica maior que 99% pelo uso de éter 5-etiluracil-2,5-bis-trimetilsilílico como a base de pirimidina para condensação com 1-bromo-2-desóxi-2-[¹⁸F]-flúor-3,5-di-O-benzoil- α -D-arabinofuranose, como originalmente descrito por Alauddin et al. (2003). Para quantificar a concentração de radioatividade derivada de [¹⁸F]-FEAU ou de [¹⁸F]-FDG em tumores e em outros órgãos e tecidos, as regiões de interesse foram colocadas sobre imagens e os valores medidos convertidos de nCi/mm² para a % de dose injetada por grama (% de ID/g; Tjuvajev et al., 1998). Imageamento por PET, repetitivo, com [¹⁸F]-FEAU, foi realizado nos dias 3, 5, 10 e 16 depois da administração do AAVP transportando o gene de HSVtk ou o AAVP não alvejado de controle, conforme descrição acima; o tratamento com GCV foi administrado entre os dias 11 e 19. Deve ser esclarecido que o imageamento com PET no dia 1 foi realizado 24 horas depois da dosagem de GCV para permitir que a eliminação de GCV fosse suficiente, o que, do contrário, competiria com FEAU para fosforilado pela enzima HSVtk. Imageamento por PET com [¹⁸F]-FDG foi repetido no dia 17 depois da administração do AAVP para avaliar a viabilidade do tumor residual, se algum.

Imunoistoquímica. Camundongos anestesiados foram mortos e perfundidos com PBS contendo PFA a 4%. A vascularização do tumor foi avaliada em secções congeladas usando um anticorpo CD31 anti-camundongo (BD Biosciences). A análise da apoptose foi realizada nas secções embutidas em parafina com um kit TUNEL (Promega). Para imunodeteção de fago nos tecidos, as secções de parafina foram incubadas com um anticorpo primário anti-fago de coelho (Sigma) seguido por um anticorpo secundário anti-coelho conjugado à peroxidase (Dako). Lâminas foram desenvolvidas com o substrato-cromógeno 3,3'-diaminobenzidina e contra-colorido com hematoxilina. Para imunocoloração da GFP, os órgãos e tumores foram fixados por 2 horas em PBS contendo PFA a 2% e equilibrados por 48 horas em PBS contendo sacarose a 15%. As crio-secções foram pós-fixadas em PBS contendo PFA a 4%, por 20 minutos, e bloqueadas com soro de cabra a 5% em PBS contendo BSA a 1% e Triton X-100 (PBS-T) a 0,1%. A seguir, as secções de tecido foram incubadas com anticorpo de GFP purificados por afinidade com coelho (Sondas Moleculares) em soro de cabra a 2% e BSA a 1%. As secções foram então coloridas com o anti-coelho de cabra conjugado com o anticorpo secundário Alexa Flour 488 (Molecular Probes) em PBS-T e BSA a 1%. Imunocolorações com α v integrina foram realizadas sobre secções congeladas fixadas em acetona de tumores removidos de animais perfundidos com PBS. As secções foram incubadas por 1 hora com o anticorpo primário monoclonal anti- α v integrina de rato (Chemicon), seguido pelo anticorpo secundário anti-rato de cabra conjugado com Cy3 (Jackson ImmunoResearch).

Partículas Direcionadas A Ligantes São Funcionais em Células Mamíferas. Foram
 construídos um vírus quimérico alvejado compreendendo AAV recombinante e um clone de
 fago fd-tet exibindo o peptídeo cíclico duplo CDCRGDCFC (SEQ ID NO:2) (denominado
 fago RGD-4C (Pasqualini et al., 1997; Arap et al., 1998). O peptídeo de RGD-4C se liga às
 5 α_v integrinas, um receptor de superfície de célula superexpresso em ambas as células
 tumorais e no endotélio neo-angiogênico de vasos sanguíneos de tumor (Brooks et al.,
 1994; Pasqualini et al., 1997; Arap et al., 1998; Sipkins et al., 1998; Ellerby et al., 1999;
 Hood et al., 2002). Para obtenção de vírus quiméricos (ainda referidos como AAV/fago;
 AAVP), os inventores inseriram um cassete de gene eucariótico de AAV recombinante em
 10 uma região intergenômica de fago RGD-4C (RGD-4C AAVP), fago sem inserção (AAVP não
 alvejado), ou fago que exhibe peptídeos de controle, tal como RGD-4C AAVP misturado
 (*scrambled*) ou AAVP mutante D a E (denominado RGE-4C) e acondicionado com o DNA do
 fago no capsídeo do fago (Figura 7). De modo a mostrar que os elementos cis do vírus
 quimérico alvejado com α_v integrina, resultantes, permanecem funcionais, os inventores
 15 avaliaram as propriedades do ligante do peptídeo de RGD-4C e as propriedades resultantes
 das repetições terminais invertidas (ITRs) no contexto do AAVP. Inicialmente, para avaliar a
 especificidade de peptídeo, foi mostrado que o RGD-4C AAVP se liga às células mamíferas
 expressando α_v integrinas, em contraste com o AAVP não alvejado ou AAVP exibindo
 peptídeos de controle negativo tal como RGE-4C ou várias versões misturadas (*scrambled*)
 20 da sequência de RGD-4C (Figura 1A), que não se liga nem infecta as células mamíferas. Foi
 também demonstrado que o RGD-4C AAVP transportando genes repórter pode mediar a
 internalização direcionada por ligante (Figura 1B) e a transdução das células mamíferas
 (Figura 1C) com relação aos controles. Para experimentos de internalização em células, os
 controles negativos incluíram AAVP não alvejado, vários RGD-4C-AAVP misturados
 25 (*scrambled*), ou RGE-4C AAVP (Figura 1B); para experimentos de transdução de células,
 AAVP não alvejado (Figura 1C), RGD-4C AAVP misturados (*scrambled*), ou RGE-4C AAVP
 serviram como controles negativos. Consistente com esses resultados, os inventores
 demonstraram previamente que o peptídeo RGD-4C sintético inibe especificamente a
 ligação celular e a internalização de várias construções com base no fago RGD-4C
 30 (Giordano et al., 2001; Chen et al., 2004, e resultados não publicados). Finalmente, foi
 mostrado que a transdução de células mamíferas podem sofrer também de competição
 específica pelo peptídeo RGD-4C sintético com relação aos controles negativos tal como
 AAVP não alvejado (Figura 1D), RGD-4C misturado (*scrambled*), ou RGE-4C. Para excluir a
 possibilidade de que alguns desses resultados (Figuras 1A e 1B) pudessem representar um
 35 artefato resultante da falha seletiva da etapa de lavagem de glicina (pH baixo) para remover
 AAVP de membranas celulares, experimentos de controle de temperatura (gelado) foram
 realizados (Giordano et al., 2001) onde a ligação das células foi observada, mas sem

internalização mediada por RGD-4C AAVP.

A seguir, para avaliar se as ITRs são ainda funcionais na partícula de AAVP, experimentos de resgate foram realizados. Mostramos que partículas de AAV recombinante funcional são geradas de células mamíferas transduzidas somente com o RGD 4C AAVP, mas não das células transduzidas com construções de controle negativo (Figura 1E). Esses dados estabelecem que a quimerização genética resultante em uma partícula de RGD-4C AAVP não altera fundamentalmente (i) as propriedades alvejadoras do peptídeo do fago RGD-4C direcionado a ligante ou (ii) a capacidade de resgatar as partículas de AAV recombinante de células mamíferas transduzidas por RGD-4C AAVP. Um curso de tempo, lado a lado, de uma expressão de transgene repórter revelou que a transdução de RGD-4C AAVP era detectável por muito mais tempo em comparação aquela do RGD-4C fago (Tabela 4).

Tabela 4. Expressão de transgene *in vitro*.

Dias depois da infecção	0	5	10	15	20	30	35	40	45	50	55	60
Fago RGD-4C	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RGD-4C AAVP	-	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+

Dois observadores independentes calcularam a expressão de GFP semi-quantitativamente em poços em triplicata de células 293 por ponto de tempo.

Mecanismos Moleculares da Expressão de Transgene. Para se ter uma idéia dos mecanismos moleculares de expressão de transgene mediada por partículas de AAVP, os inventores investigaram o destino do genoma transduzido em células mamíferas. Inicialmente, linhagens de células transduzidas estavelmente foram geradas pelo uso de AAVP que expressam GFP-neo para possibilitar a seleção dos clones de células transduzidas, individuais. Tanto RGD-4C AAVP-GFPneo como fago RGD-4C-GFPneo carecendo de ITRs de AAV foram usados para transduzir células 293 que expressam α v integrinas (Nakamura et al., 2002), e os clones foram isolados sob a seleção de G418. Experimentos de resgate mostraram AAV-GFPneo recombinante funcional gerado de todos os clones de células 293 RGD-4C AAVP-GFPneo, mas nenhum gerado dos clones fago RGD-4C-GFPneo, confirmando assim que os clones individuais quiméricos contêm ITRs funcionais. Embora as células transduzidas com o fago RGD-4C-GFPneo não quimérico retivesse resistência a G418, a expressão de GFP era geralmente mais fraca que aquela dos clones RGD-4C AAVP-GFPneo (Figura 2A). Os inventores resolveram determinar o destino do cassete de transgene GFPneo em clones transduzidos instavelmente por uma digestão de enzima de restrição compreensiva de DNA genômico seguido por análise com base em Southern blotting e em reação em cadeia de polimerase (PCR) (Figura 2, Figura 8, e Tabela 5). Para provar a persistência do cassete de transgene, o DNA genômico foi

digerido com AflII e XhoI para detectar a liberação de cassetes de transgenes de tamanho natural antes da análise. Tal liberação foi observada em 100% dos clones transduzidos por RGD-4C AAVP (n = 9 de 9 clones), em comparação com somente em 33% dos clones (n = 3 de 9 clones) transduzidos pela construção de fago RGD-4C não quimérico (Figura 2B).

Um outro digestor de transição de DNA genômico foi desenhado para detectar formas concataméricas potenciais do cassete de transgene (Lieber et al., 1999; Hsiao et al. 2001).

A presença de concatâmeros de cabeça à cauda do cassete de transgene foi detectada em 67% dos clones transduzidos por RGD-4C AAVP (n = 6 de 9 clones), embora nenhum de tais concatâmeros tenha sido detectado em clones transduzidos pela construção de fago

RGD-4C não quimérico (Figura 2C). Para identificar formas concataméricas adicionais do cassete de transgene, PCR multiplex foi realizada usando iniciadores que flanqueiam as extremidades 5' e 3' das construções. Novamente, nenhum concatâmero foi encontrado em

clones transduzidos por construção do fago RDG-4C quimérico, ao passo que 100% dos clones transduzidos por RGD-4C AAVP continham formas concataméricas (n = 9 de 9 clones), todos eles encontrados na orientação cabeça à cauda (Figura 8B). Além disso, a

clonagem topo de produtos de PCR menores revelou a orientação de cabeça à cauda do cassete de transgene com deleções de ITR (Figura 8C) (Yang et al., 1997). Finalmente,

embora os produtos grandes de PCR não pudessem ser seqüenciados, seus tamanhos sugerem a presença de concatâmeros com ITRs intactas no sítio de junção. Uma análise de

DNA para cada clone simples está também detalhada (Tabela 5). Não desejando está ligado a qualquer teoria ou mecanismo, esses dados sugerem que o AAVP pode render a vantagem na expressão de gene por meios de um destino alterado do cassete de transgene

através da manutenção do cassete de transgene mamífero, inteiro, melhor persistência de DNA epissômico, formação de concatâmeros do cassete de transgene, ou talvez por uma

combinação destes mecanismos não mutuamente exclusivos. Essas observações são consistentes com os recentes desenvolvimentos no entendimento do AAV (McCarty et al., 2004).

Tabela 5. Destino do vetor DNA em clones de células 293 transduzidas estavelmente por RGD-4C AAVP-GFneo ou fago RGD-4C-GFneo.

Fago RGD-4C ou RGD-4C AAVP (denominação de clones estavelmente transcritos)	Contém formas integradas de construto	Contém formas episomais de construto	Contém formas concataméricas de cassete transgene	Cassete transgene preservado	Comentários e interpretação
Fago 1	Sim	Não	Não	Não	
Fago 2	Sim	Sim	Não	Sim (episomal)	Forma episomal do vetor fago de comprimento total
Fago 3	Sim	Não	Não	Sim	
Fago 4	Sim	Não	Não	Não	
Fago 5	Sim	Não	Não	Não	

Fago 6	Sim	Sim	Não	Sim (episomal)	Forma episomal do vetor fago de comprimento total
Fago 7	Sim	Não	Não	Não	
Fago 8	Sim	Não	Não	Não	
Fago 9	Sim	Não	Não	Não	
AAVP 1	Sim	Sim	Sim	Sim	Forma episomal não concatemérica de vetor AAVVP de comprimento total detectada. A forma integrada concatemérica com sítio StoiI deletado.
AAVP 2	Sim	Não	Sim	Sim	A forma concatemérica é cabeça a cauda com ITRs deletados no sítio de junção. ITRs flanqueando as seqüências concateméricas e adjacentes são preservados.
AAVP 3	Sim	Sim	Sim	Sim	Forma episomal não concatemérica de vetor AAVVP de comprimento total. Pelo menos uma forma integrada contém concateméricos de cabeça a cauda e ITRs flanqueando o concatemérico, assim as seqüências de AAVP adjacentes são preservadas. Pelo menos uma forma integrada contém concateméricos de cabeça a cauda com ITRs deletados no sítio de junção.
AAVP 4	Sim	Sim	Sim	Sim	Forma episomal não concatemérica de vetor AAVVP de comprimento total. Pelo menos uma forma integrada contém concateméricos de cabeça a cauda e ITRs flanqueando o concatemérico, assim as seqüências de AAVP adjacentes são preservadas.

					Pelo menos uma forma integrada contém concatêmicos de cabeça a cauda com ITRs deletados no sítio de junção.
AAVP 5	Sim	Sim	Sim	Sim	Forma episomal não concatêmica de vetor AAVP de comprimento total. Pelo menos uma forma integrada contém concatêmicos de cabeça a cauda e ITRs flanqueando o concatêmico, assim as seqüências de AAVP adjacentes são preservadas. Pelo menos uma forma integrada contém concatêmicos de cabeça a cauda com ITRs deletados no sítio de junção.
AAVP 6	Sim	Não	Sim	Sim	Os concatêmicos são cabeça a cauda com ITRs deletados e sítios Stiol. Os ITRs flanqueando o cassete transgene (concatêmico) assim como as seqüências adjacentes de AAVP são preservados.
AAVP 7	Sim	Não	Sim	Sim	Concatêmicos são cabeça a cauda com ITRs preservados. Concatêmicos adicionais com ITRs deletados.
AAVP 8	Sim	Não	Sim	Sim	Pelo menos uma forma integrada contém concatêmicos de cabeça a cauda e ITRs flanqueando o concatêmico, assim as seqüências de AAVP adjacentes são preservadas. Pelo menos uma forma integrada contém

					concateméricos de cabeça a cauda com ITRs deletados no sítio de junção.
AAVP 9	Sim	Sim	Sim	Sim	Forma episomal não concatemérica de vetor AAVVP de comprimento total. Pelo menos uma forma integrada contém concateméricos de cabeça a cauda e ITRs flanqueando o concatemérico, assim as seqüências de AAVP adjacentes são preservadas. Pelo menos uma forma integrada contém concateméricos de cabeça a cauda com ITRs deletados no sítio de junção.

Alvejando Tumor In Vivo e Imageamento Molecular-Genético. Depois de demonstrar que os elementos centrais da partícula viral quimérica alvejada (i.e., o peptídeo RGD-4C e as ITRs de AAV) estão intactos e funcionais e depois da elucidação dos mecanismos moleculares da expressão de gene mediada por AAVP em células mamíferas, a especificidade e eficácia de distribuição de genes para o tumores depois da administração sistêmica de AAVP foi avaliada. Como um modelo pré-clínico inicial foi feito uso de camundongos sem pelagem (*nude*) contendo xenoenxertos tumorais subcutâneos derivados de sarcoma de Kaposi humano KS 1767 (Arap et al., 1998; Ellerby et al, 1999). Primeiramente, para verificar que a construção viral alveja os xenoenxertos derivados de KS1767 em camundongos, RGD-4C AAVP ou um de vários controles negativos (AAVP não alvejado, RGD-4C AAVP misturado (*scrambled*), ou RGE-4C AAVP) foram administrados intravenosamente. Depois de um tempo de circulação de 3 a 5 minutos, uma coloração anti-AAVP forte na musculatura do tumor foi observada nos camundongos que receberam RGD-4C AAVP-HSV, mas não nos camundongos de controle (Figura 3A). Uma variante de RGD-4C AAVP que codifica o gene da proteína fluorescente verde (GFP) foi usada como um repórter para determinar, pelo uso de imageamento microscópico de imunofluorescência *in situ*, se este vetor (RGD-4C AAVP-GFP) pode transduzir xenoenxertos derivados de KS 1767. Imunocoloração contra GFP em tumores e em diferentes órgãos foi realizada sete dias depois da administração sistêmica de ou RGD-4C AAVP-GFP ou construções de controles negativos em camundongos contendo tumor. A imuofluorescência revelou a expressão de GFP largamente nos vasos sangüíneos tumorais e células tumorais

circundantes em camundongos que receberam RGD-4C AAVP-GFP. Em contraste, não foi detectada coloração de GFP em tumores de camundongos de controle que receberam AAVP-GFP não alvejada, misturada (*scrambled*), ou mutante (Figura 3B). Seu padrão de coloração sugere que a transdução direcionada por ligante é mediada por alvejamento de α integrinas no endotélio vascular de tumores (Brooks et al., 1994; Pasqualini et al., 1997; Arap et al., 1998; Sipkins et al., 1998; Ellerby et al., 1999; Giordano et al., 2001; Hood et al., 2002; Chen et al., 2004). Consistentemente, vários órgãos de controle não-alvo (cérebro, fígado, pâncreas e rim) careciam de expressão tecidual de GFP (Figura 9). Juntamente, esses resultados indicam que as partículas de RGD-4C AAVP podem alvejar especificamente xenoenxertos de tumor por um mecanismo direcionado a ligante e transduzir os mesmos depois da administração sistêmica *in vivo*.

A seguir, os inventores avaliaram a eficácia de imageamento por bioluminescência pré-clínica (BLI) e imageamento por PET molecular-genético clinicamente aplicável com [^{18}F]-FEAU para monitoramento não invasivo da dinâmica temporal e heterogeneidade espacial da luciferase de vagalume (Luc) e da expressão do gene repórter de HSVtk, respectivamente, em camundongos, vivos, contendo tumor seguinte à administração sistêmica do RGD-4C AAVP. Esses estudos de imageamento molecular-genético foram conduzidos em um modelo pré-clínico de câncer da próstata humano já que este tumor particularmente prevalente permanece um desafio para imageamento apropriado em pacientes. Inicialmente, os inventores usaram uma configuração experimental padrão para imageamento *in vivo* dos repórteres de transgene da Luciferase (Luc) de vagalume em camundongos contendo tumor (Figura 4A). Os inventores selecionaram BLI de expressão de Luc porque é um método bastante sensível para imageamento de gene repórter em camundongos e não tem virtualmente nenhuma atividade residual não específica nas imagens (Gross e Piwnica-Worms, 2005/ Gelovani e Blasberg, 2003/ Uhrbom et al., 2004/ Walensky et al., 2004). Uma expressão muito específica de tumor de Luc foi preparada em tumores DU145 em camundongos recebendo RGD-4C AAVP-Luc. Em contraste, sinais de bioluminescência associadas ao tumor não puderam ser observados em camundongos de controle recebendo AAVP-Luc não alvejada ou RGD-4C AAVP-Luc misturada (*scrambled*). Com todos os tipos de vetores de AAVP (AAVP-Luc não alvejada, RGD-4C AAVP-Luc misturada (*scrambled*), RGE-4C AAVP-Luc ou RGD-4C AAVP-Luc) nenhuma bioluminescência foi observada em órgãos normais tais como fígado, baço, ou rins. Esses dados confirmam a especificidade de tumor de alvejamento mediada por RGD-4C AAVP e a expressão de transgene observada com estudos de imageamento com microscopia de imunofluorescência com RGD-4C AAVP-GFP. Consistente com os resultados anteriores apresentados aqui (Figura 9), a cinética de distribuição sugere que apesar da depuração das partículas de fago (Geier et al., 1973; Pasqualini et al., 1998; Barbas et al., 2001), tal

fenômeno não resulta em transdução de gene indesejável do fígado. Essas observações estão em forte contraste com a transdução não específica bem documentada dos órgãos normais (tal como o fígado) pelos vetores de distribuição de gene virais mamíferos (Shayakhmetov et al., 2005). Pelo uso de BLI *in vivo*, a expressão de transgene repórter de Luc dentro de tumores foi claramente detectada no dia 3 depois da administração de AAVP e aumentada gradualmente para alcançar os níveis máximos no dia 10. BLI bidimensional repetitiva da expressão de gene repórter de Luc foi realizada um dia sim um dia não e proporcionou uma estratégia de custo efetivo inicial para estudar a especificidade, dinâmica temporal, e heterogeneidade espacial da expressão de transgene repórter mediada por AAVP. Contudo, devido ao fato da BLI da expressão do gene repórter Luc não ser clinicamente aplicável, inventores introduziram, a seguir, no vetor de AAVP o gene de HSVtk, que podem ambos servir como um gene suicida (quando em combinação com ganciclovir; GCV) e como um transgene repórter para imageamento por PET clinicamente aplicável com análogos de nucleosídeos, radiomarcados, específicos de HSVtk (por exemplo, [^{124}I]-FAIU, [^{18}F]-FHBG, e [^{18}F]-FEAU).

Estudos anteriores estabeleceram que o imageamento por PET da expressão de HSVtk proporciona a capacidade de definir a localização, magnitude e duração da expressão do transgene (Tjuvajev et al., 1998; Tjuvajev et al., 1999; Ray et al., 2001; Massoud e Gambhir, 2003). Foi também previamente determinado que a magnitude de traçadores radiomarcados acumulados em linhagens de células transduzidas com HSVtk e tumores *in vivo* se correlaciona com o nível de expressão de HSVtk (Blasberg e Tjuvajev, 2003; Gross e Piwnica-Worms, 2005a; Tai and Laforest, 2005). Nos estudos apresentados aqui, os inventores selecionaram, sintetizaram e usaram o análogo de nucleosídeo radiomarcado 2'-[^{18}F]-flúor-2'-desóxi-1- β -D-arabino-furanosil-5-etil-uracil ([^{18}F]-FEAU), que é um substrato radiomarcado melhor para a enzima HSVtk que outros análogos de nucleosídeo de considerações farmacocinéticas (uma atividade residual muito baixa em todos os órgãos e tecidos normais) (Kang et al., 2005). Ao se usar o imageamento de PET repetitivo com ([^{18}F]-FEAU (nos dias 0, 3, 5, 10 e 16), os inventores visualizaram e quantificaram a dinâmica temporal e a heterogeneidade de expressão do gene de HSVtk depois de uma administração sistêmica única de RGD-4C AAVP-HSVtk ou AAVP-HSVtk não alvejada em xenoinxertos de tumor derivado de DU145 e de outros órgãos e tecidos em camundongos sem pelagem (*nude*) (Figura 4B). Os tamanhos dos xenoinxertos de tumor (aproximadamente 150 mm²) antes, bem como taxas de crescimento de tumor depois da administração de ou RGD-4C AAVP-HSVtk ou AAVP-HSVtk não alvejada foram similares em ambas as coortes de camundongos (Figura 4C). Imageamento com PET com ([^{18}F]-FEAU revelou um aumento gradual do nível da expressão de transgene de HSVtk em tumores (aumento em % da dose, administrada, intravenosa, por grama) durante os cinco

dias iniciais depois da administração de RGD-4C AAVP-HSVtk, seguido por estabilização gradual dos níveis da expressão de HSVtk no dia 10 depois da administração do vetor. Em contraste, em camundongos contendo tumor de controle que estavam recebendo AAVP-HSVtk não alvejada, somente uma menor quantidade de acúmulo tumoral de [^{18}F]-FEAU foi observada no dia 3, que rapidamente diminuiu para o nível residual (Figura 4D). Consistente com os experimentos de BLI precedentes, nenhuma expressão de HSVtk detectável por PET com [^{18}F]-FEAU foi observada nos órgãos ou tecidos não alvo (Figura 4B). Certamente, a atividade heterogênea de baixo nível nas imagens de PET representa uma atividade residual normal, que foi intencionalmente intensificada em imagens para demonstrar que nenhum truncamento de baixos níveis de radioatividade foi feito para “aperfeiçoar” artificialmente a expressão de HSVtk em tumores versus tecidos não alvo. Quando os tumores cresceram para tamanhos confiavelmente palpáveis (aproximadamente 350-400 mm²), e o platô de expressão de HSVtk foi alcançado em tumores, o tratamento com GCV foi iniciado em todas as coortes de animais (Figura 4C). Imageamento por PET com [^{18}F]-fluordesoxiglicose ([^{18}F]-FDG) serviu para monitorar o metabolismo da glicose e as alterações induzidas por GCV. Dois dias antes de iniciar a terapia com GCV (dia 9 depois da administração do vetor), os tumores DU145 em ambos os grupos de camundongos estavam viáveis e acumularam [^{18}F]-FDG ativamente (Figura 4E). Depois da terapia com GCV, o volume dos tumores em camundongos que receberam RGD-4C AAVP-HSVtk estava significativamente menor que nos camundongos que receberam AAVP-HSVtk não alvejada ($p < 0,05$, Figura 4C). Além disso, xenoenxertos de tumores foram também metabolicamente suprimidos como evidenciado por uma redução do acúmulo de [^{18}F]-FDG (Figura 4E). Os níveis de expressão de HSVtk nos tumores dos camundongos administrados com RGD-4C AAVP-HSVtk foram também significativamente reduzidos depois da terapia com GCV, conforme evidenciado por uma redução acentuada do acúmulo de [^{18}F]-FEAU nas imagens por PET (Figura 4D), que foram obtidas 24 horas antes da última dose de GCV (para evitar competição com FEAU). Esses estudos confirmam a especificidade do alvejamento do tumor por RGD-4C AAVP e demonstram que o nível de expressão de transgene de HSVtk é adequadamente alto para ativação eficaz dos pró-fármacos de GCV.

De modo a avaliar a eficácia horizontalmente em outros modelos pré-clínicos, montamos um painel de linhagens de células tumorais de diferentes espécies e origens histológicas e tumores gerados em camundongos imunossuprimidos ou imunocompetentes. Coortes de camundongos contendo tumores derivados de sarcoma de Kaposi (KS1767) receberam sistemicamente uma dose intravenosa única de ou RGD-4C AAVP-HSVtk ou de AAVP-HSVtk não alvejada (controle), seguido por tratamento com GCV em todos os grupos. A supressão acentuada de crescimento de tumor foi observada em camundongos contendo tumor que receberam RGD-4C AAVP-HSVtk, em comparação com camundongos tratados

com veículo ou camundongos que receberam AAVP não alvejado (Figura 5A). Efeitos supressivos de crescimento de tumor similares foram observados em carcinomas da bexiga derivados de UC3 (Figura 5B) e carcinomas da próstata derivados de DU145 (Figura 5C) em camundongos sem pelagem (*nude*), mesmo quando xenoenxertos tumorais foram tratados (Figura 5D) e consistentes com os resultados de imageamento apresentados (Figura 4). Para excluir a possibilidade de que os efeitos antitumor observados fossem ou específicos da espécie ou específicos dos xenoenxertos, procuramos analisar a eficácia da RGD-4C AAVP-HSVtk em um modelo de tumor de camundongo padrão. Escolhemos um tumor isogênico ao qual células mamárias de camundongo EF43-FGF4 são administradas subcutaneamente para induzir crescimento rápido dos tumores altamente vascularizados em camundongos imunocompetentes (Hajitou et al., 2001). Inicialmente, mostramos “homing” direcionado a ligante de RGD-4C AAVP para tumores derivados de EF43 FGF4 por imunocoloração anti-fago (Figura 10). RGD-4C AAVP-GFP ou RGD-4C AAVP não alvejado foi administrado intravenosamente aos camundongos contendo tumores mamários isogênicos por um tempo de circulação de 3 a 5 minutos. Diferentemente, o AAVP-GFP não alvejado, RGD-4C AAVP produziram uma forte coloração anti-fago em tumores (Figura 10A). A seguir, foi realizada imunofluorescência com um anticorpo anti-GFP em sete dias depois da administração intravenosa para revelar forte expressão de GFP nos tumores em camundongos que receberam RGD-4C AAVP-GFP; em contraste, a coloração de GFP foi detectada em tumores de camundongos que receberam AAVP-GFP; consistentemente, um anticorpo anti- αv integrina detectou forte expressão em tumores EF43-FGF4 (Figura 10B). Novamente, uma dose sistêmica única de RGD-4C AAVP-HSVtk seguida por GCV inibiu acentuadamente o crescimento de tumores EF43-FGF-4 (Figuras 5E-G e Figura 6). Além disso, quando os tumores voltaram a crescer depois do término da terapia, administrações repetidas de RGD-4C AAVP-HSVtk inibiram novamente o crescimento do tumor EF43-FGF4 e aperfeiçoaram a sobrevivência dos camundongos contendo tumor (Figura 5F). Partículas com base em fago são conhecidas por serem imunogênicas, mas esta característica pode ser modulada através do próprio alvejamento (Trepel et al., 2001). De fato, RGD-4C AAVP-HSVtk mais GCV permaneceram surpreendentemente eficazes em camundongos imunocompetentes vacinados com fago apesar dos títulos muito altos de IgG anti-fago circulante (Figura 5G). Em experimentos seletivos, foi usado um painel compreensivo de controles experimentais negativos incluindo apenas veículo, veículo mais GCV, AAVP não alvejado, e RGD-4C AAVP-GFP alvejada mais GCV (transdução simulada (*mock*)) (Figura 6A).

Para verificar os efeitos pós-tratamento, os inventores obtiveram análise histopatológica detalhada dos tumores EF43 FGF4 recuperados sete dias depois da terapia. Destruição extensiva do tumor causada pela dose sistêmica única de RGD-4C AAVP-HSVtk

mais GCV foi observada. Especificamente, a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) revelou a destruição uniforme da área central do tumor e somente uma pequena borda externa viável; em contraste, AAVP-HSVtk não teve tal efeito (Figura 6B). Coloração com um anticorpo anti-CD31 confirmou tanto os vasos sangüíneos de tumor rompidos dentro da região central do tumor como a vasculatura conservada em relação à borda externa, ao passo que nenhum dano foi observado nos tumores tratados com AAVP-HSVtk não alvejado (Figura 6B). Os inventores também avaliaram os tumores para coloração de marcação de extremidade por clivagem de dUTP biotina mediada por desoxinucleotidil transferase terminal (TUNEL), que marca células apoptóticas, porque a estratégia de HSVtk/GCV está associada à morte apoptótica das células (Hamel et al., 1996). Em tumores tratados com RGD-4C AAVP-HSVtk e GCV, coloração com TUNEL detectou apoptose na região central do tumor, mas não dentro da borda externa, embora nenhuma apoptose tenha sido observada em tumores de camundongos que receberam quimera de AAVP-HSVtk na alvejada (Figura 6B). Órgãos de controle removidos dos camundongos contendo tumor tratado pelo mesmo protocolo não revelaram anormalidades histopatológicas (Figura 11). Juntos, esses resultados mostram que a manutenção de uma única dose sistêmica de RGD-4C AAVP-HSVtk mais GCV pode suprimir o crescimento do tumor.

A contribuição relativa do alvejamento de cada compartimento de tumor (i.e., células tumorais versus endotélio vascular tumoral e/ou estroma) dependerá do sistema de ligante-receptor e do(s) modelo(s) usados. Por exemplo, a expressão do alvo de membrana (i.e., α_v integrina) em células tumorais variará de baixa (EF43 FGF4) a forte (KS1767). Além disso, com exceção da dose ótima específica para transdução de cada modelo (e aplicação) usada, há também um tempo ótimo para examinar a expressão do transgene. Em outras palavras, a estequiometria da expressão do gene repórter depende não somente dos níveis e padrões da expressão de repórter em células individuais, mas também do número relativo das células que expressam o transgene que estão proliferando versus as células que expressam o transgene que estão morrendo. Assim, enquanto os inventores usavam parâmetros fixos para estes exemplos, posterior determinação das doses ótimas de AAVP alvejado e os horários em uma base caso a caso ainda se aplicam.

Os inventores contemplam que uma ampla faixa de questões biológicas correntemente não tratáveis bem além da oncologia molecular pode ser abordada usando AAVP alvejado, especialmente em combinação com diferentes configurações de imageamento molecular-genético, pré-clínico e clínico. Por exemplo, a distribuição sistêmica direcionada por ligante das construções com tecido e/ou promotores específicos de doença (em vez do promotor CMV) para sítios alvo permitirá monitorar a expressão de seus genes correspondentes *in vivo*; tal transcrição acionada por promotor da atividade de repórter permitirá o estudo do tráfego e enxerto de células. Várias aplicações de imageamento não

invasivo podem ser empregadas, tais como monitoramento experimental da degradação específica de substrato, interações de proteína-proteína e outros eventos moleculares via transativação do repórter, complementação, ou estratégias de reconstituição (Luker et al., 2004; De e Gambhir, 2005; Gross e Piwnica-Worms 2005b) em células e em animais inteiros. Os inventores descreveram recentemente redes de nanopartículas de ouro e bacteriófago como sensores biológicos e agentes alvejadores de células (Souza et al., 2006), tal tecnologia pode se combinada com AAVP direcionada por ligante para adicionalmente aperfeiçoar o imageamento molecular-genético. Em uma outra observação, o próprio AAVP pode proporcionar reagentes para estudar o papel mecânico das estruturas de ITR na persistência do transgene e integração cromossômica, pois (em contraste com vetores de AAV) as construções com base em fago sem ITRs podem servir como controles experimentais negativos. Assim, muitas outras aplicações de alvejamento sistêmico e imageamento molecular *in tandem* são possíveis em um espaço de tempo relativamente curto com esta nova plataforma e suas ferramentas derivadas.

EXEMPLO 2

USO DE AAVP PARA ALVEJAR TNF- α EM VASCULATURA DO TUMOR

A. Métodos

Cultura de Células. Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foram obtidas da Cambrex (Walkersville, Maryland) e cultivadas em Meio-2 de Crescimento de Células Endoteliais conforme descrição prévia (Tandle et al., 2005). Todos os experimentos foram conduzidos com HUVEC na passagem 3-5. Células de melanoma humano M21 foram crescidas em meio RPMI 1640 contendo soro a 10%, glutamina 2mM, 100 μ /mL de penicidila, 100 μ /mL de estreptomicina, 100 μ /mL de gentamicina e fungizona. Células Pmel foram crescidas em meio DMEM contendo soro a 10%, glutamina 2mM, 100 μ /mL de penicilina, 100 μ /mL de estreptomicina, 100 μ /mL de gentamicina e fungizona.

Construção de um AAVP Alvejado Expressando TNF- α /EMAP-II. O desenho geral e construção da cadeia principal de AAVP foi descrita por Hajitou et al. (2006). Uma construção de AAVP expressando TNF- α foi criada em duas etapas. Inicialmente, um fragmento de 880 bp de NotI/HindIII do pG1SiTNF foi digerido e ligado a um vetor de pAAV-eGFP/NotI/HindIII repondo as seqüências de gene de GFP (Hwu et al., 1993). Na segunda etapa, fMCS/RGMCS e AAV-TNF foram digeridos por PvuII. Então AAV-TNF- α com repetições terminais invertidas (ITRs) foi re-ligado ao sítio de fMCS-/RGDMCS PvuII para obter um vetor de AAVP. Assim, pfdTNF- α é um vetor não alvejado, ao passo que pRGDTNF é um vetor alvejado com afinidade de ligação com os receptores de α_v integrina na superfície celular.

Uma construção de AAVP expressando EPMAP-II foi criada em três etapas. O plasmídeo pET-20b, expressando EMPA-II maduro foi um presente generoso de Paul

Schimmel do The Scripps Research Institute, La Jolla, CA. Na primeira etapa, seqüências de EMAP-II foram ampliadas de pET-20bEMAP-II, usando 3 iniciadores para incorporar sítios de enzima de restrição e a seqüência de sinal secretável no produto de PCR. O iniciador 1 é um iniciador de avanço de 132 bp com o sítio de enzima de restrição NotI na extremidade 5' seguido por uma seqüência de sinal (desenhada a partir do vetor pSecTag2, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) para secreção extracelular de produto gênico e seqüências de EMAP-II. O iniciador 2 é uma versão mais curta do iniciador 1 para facilitar a ampliação do produto de PCR. O iniciador 3 é um iniciador reverso com um sítio de enzima de restrição HindIII na extremidade 3'. A ampliação de PCR gerou um produto de 667 bp com sítios de enzima NotI e HindIII e seqüência de sinal. Na segunda etapa, o produto de PCR de EMAP-II foi clonado no vetor de clonagem pCRII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia). Os clones resultantes foram seqüenciados, e então o fragmento de NotI/HindIII de 667 bp foi ligado a um vetor de pAAV-eGFP/NotI/HindIII conforme explanação acima. Na terceira etapa, fMCS/RGDMCS e AAV-EMAP-II foram digeridos por PvuII e ligados para obtenção do vetor AAVP. Assim, pfdEMAP-II é um vetor não alvejado, ao passo que pRGDEMAP-II é um vetor alvejado com afinidade de ligação para receptores de αv integrina de células. O iniciador 1: 5'ATTTGCGGCCGCTTTACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGC TCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGCGGCCAGCCGGCCAGGCGCGCCGTAATGT CTAAGCCAATAGATGTT 3' (SEQ ID NO:4); Iniciador 2: 5'ATTTGCGGCCGCTTTACCACCATGG 3' (SEQ ID NO:5); Iniciador 3: 5'CCCAAGCTTGGGTTATTTGATTCCACTGTTGC 3' (SEQ ID NO:6).

Purificação das Partículas de AAVP. Para obter partículas de AAVP não alvejado e alvejado, DNA foi eletroporado em MC1061 *E. coli*. Células e partículas de vírus foram purificadas do sobrenadante da cultura. Partículas de AAVP em grande escala foram purificadas de células k91Kan permissivas. De modo a determinar o número de unidades de transdução bacteriana (TU), células k91 foram infectadas com diluições em série de partículas de fago e plaqueadas em placas de ágar de Luria-Bertani contendo tetraciclina e canamicina. Tu foi então determinado por contagem do número de colônias bacterianas.

Ensaio de Internalização de Fago *In Vitro*. Células M21 foram deixadas crescerem durante a noite em placas de tecidos de 6 poços. Para estudar a internalização do vetor, as células foram lavadas com o meio e então infectadas com partículas virais a 37°C, por 3 horas. Depois da incubação, as placas foram colocadas sobre gelo, por 5 minutos, de modo a interromper a internalização viral. As partículas não ligadas foram removidas por lavagem extensiva das células na solução salina balanceada de Hank (HBSS). Partículas virais extracelulares foram inativadas por tratamento com Subtilisina (3 mg/mL de subtilisina, Tris 20mM pH 7,5, EDTA 2mM pH 8,0 em HBSS sem cálcio e sem magnésio) por 1 hora sobre gelo (Ivanenkov et al., 1999). Então, as células foram desprendidas com pipetagem

cuidadosa e a subtilisina foi inativada com EDTA 2mM sobre gelo, por 15 minutos. As células foram lisadas pelo uso de tampão de lise (Tris 10mM pH 7,5, EDTA 2mM pH 8,0 e ortovanidato de sódio a 2%) para liberar as partículas de AAVP internalizadas. A concentração de AAVP internalizado foi então determinada como TU, conforme descrição acima.

Ensaio de Imunofluorescência (IF). IF foi usada para observar as partículas virais internalizadas em células M21. Em resumo, as células crescidas em lâminas de vidro de câmara Lab-Tek de oito poços (Nunc, Rochester, Nova Iorque) foram infectadas com partículas de AAVP usando DEMEM contendo soro a 10%, a 37°C, por 16 horas. Depois da infecção, as células foram lavadas com PBS, as câmaras foram removidas e as células foram fixadas em formaldeído a 3,7% por 10 minutos. As células foram permeabilizadas com saponina a 0,1% (Sigma, St. Louis, Missouri) em PBS, e bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS contendo BSA a 1%, azida sódica a 0,025%, e saponina a 0,1%) por 15 minutos. Depois da lavagem com tampão de permeabilização, as células foram incubadas com anticorpo anti-bacteriófago de camundongo, por 1 hora, seguido por um anticorpo IgG anti-camundongo conjugado com FITC, por 1 hora. Gaxetas foram destacadas e as células foram montadas usando Antifade (MP Biomedicals, Solon, Ohio) e examinadas sob um microscópio fluorescente Zeiss Axiovert.

Expressão de Gene por Fago. As células M21 foram infectadas com partículas de AAVP como no ensaio de internalização. O meio foi repostado em 48 horas. No dia 4 e no dia 12, o sobrenadante da cultura foi coletado para medir os níveis de citocina secretável por ELISA (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia).

Ensaio do Fator Tecidual (FT). Para examinar se TNF- α /EMPA-II é funcional, examinamos sua capacidade de induzir a síntese de TF em células endoteliais ECs. Em resumo, 2×10^5 HUVEC foram plaqueadas em placas de cultura de tecido de 6 poços, por poço. No dia seguinte, as células foram tratadas com os sobrenadantes de cultura de M21 por 6 horas em meio RPMI isento de soro. As células foram lavadas com PBS e incubadas com Tris 25 mM pH 7,5, por 10 minutos, à temperatura ambiente. As placas de cultura foram então incubadas a -80°C, por 2 horas. Os lisados de células totais foram preparados em tampão de ensaio de fator tecidual (Tris 20mM pH 7,5, NaCl 150mM e BSA a 0,1%). Os lisados foram clareados por centrifugação a 13.000 rpm, por 10 minutos. O lisado de 100 μ L foi analisado quanto à presença de fator tecidual por medição do tempo requerido para coagulação do plasma deficiente em Fator VIII (Geroche King Biomedical Inc., Overland Park, Kansas) em presença de CaCl_2 (Sigma, St. Louis, Missouri) em um Analisador de Micro-Coagulação Amelung KC 4A (Sigma, St. Louis, Missouri). O tempo requerido para coagular plasma deficiente em Fator VIII foi convertido em unidades de fator tecidual usando uma curva de calibração padrão plotada com concentrações conhecidas de fator tecidual.

Distribuição de AAVP *in vivo* e Detecção por Coloração com Imunofluorescência.

Todos os experimentos em animais foram conduzidos de acordo com protocolos aprovados pelo NIH Animal Care and Use Committee. Camundongos sem pelagem (*nude*), fêmeas, atímicos, foram obtidos de Jackson Laboratories e alojados na unidade para animais, no National Cancer Institutes. Células de melanoma humano (4×10^6) foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito dos camundongos sem pelagem (*nude*). O volume tumoral (mm^3) foi medido em três dimensões e calculado como comprimento x largura x altura x 0,52. Quando os volumes tumorais alcançaram em torno de 100 – 150 mm^3 , 1×10^{11} partículas de AAVP foram injetadas intravenosamente (via veia da cauda). Os animais foram eutanizados em vários intervalos de tempo. Tecidos de tumores e tecidos de controle resecionados (rim e fígado) foram congelados para análise posterior.

Para detectar a presença de AAVP, secções congeladas, espessas, $5\mu\text{M}$ foram coloridas usando coloração por IF dual. Em resumo, as secções foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 5 minutos, seguido de 2 lavagens em PBS por 10 minutos. A permeabilização foi efetuada em PBS contendo Triton-X-100 a 1%, por 10 minutos. As secções foram incubadas com intensificador de sinal Image-iT FX por 30 minutos, à temperatura ambiente (T.amb), seguido por três lavagens em PBS contendo Triton-X-100 a 1%. Ligação não específica foi bloqueada usando soro de cabra a 5%, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram aplicados durante a noite, a 4°C : diluição de 1:2.000 do anticorpo de bacteriófago anti-fd (Sigma Louis, Missouri) e diluição de 1:50 de CD31 anti-camundongo (BD Biosciences, San Jose, Califórnia). As secções foram lavadas três vezes em PBS contendo Triton-X-100 a 1% por 10 minutos, então incubadas com os anticorpos secundários (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia): diluições 1:400, cada uma de Alexa Flour 594 anti-coelho de cabra e Alexa Flour 488 de anti-rato de cabra por 30 minutos, no escuro. As secções foram lavadas três vezes em PBS contendo Triton-X-100 a 1%, por 10 minutos e uma vez com PBS, seguido por montagem em um meio de montagem Vectashield com DAPI (Vector Labs, Burlingame, Califórnia).

Expressão de $\text{TNF-}\alpha$ *in vivo*. Para detectar expressão da proteína $\text{TNF-}\alpha$, o lisado de célula total foi preparado de secções de tecidos congelados de $5\mu\text{M}$ usando tampão de lise (Tri 50mM pH 7,4, NaCl 140mM, SDS a 0,1%, NP40 a 1% e desoxicolato de sódio a 0,5%) contendo coquetel de inibidor de protease (Roche, Branchburg, New Jersey). Os lisados foram clareados por centrifugação a 13.000 rpm, por 10 minutos. A quantidade de proteína foi quantificada usando reagente de ensaio de proteína da BioRAD. A quantidade de lisado equivalente a 50 μg da proteína total foi ensaiada quanto ao $\text{TNF-}\alpha$ humano por ELISA (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia).

Para examinar a localização da expressão de $\text{TNF-}\alpha$, tecidos congelados de $5\mu\text{M}$ foram coloridos como a seguir. Em resumo, as secções foram fixadas em PBS contendo

paraformaldeído a 4% por 20 minutos, lavadas com PBS três vezes por cinco minutos cada e ligação não específica foi bloqueada com soro de cabra a 5%, por 20 minutos. As secções foram incubadas ou com anticorpo anti-fd diluído 1:200 (Sigma, St. Louis, Missouri) ou anticorpo de TNF- α diluído 1:10 (Novus Biologicals, Littleton, Colorado), ou CD31 de anti-camundongo de rato (BD Biosciences, San Diego, Califórnia), por 1 hora, seguido por três lavagens de 5 minutos cada, em tampão de lavagem (PBVS contendo Tris 50mM pH 7,6 e Tween-20 a 0,02%). Peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3%, por cinco minutos, seguido de lavagem e incubação com diluição 1:200 do HRP anti-camundongo secundário ou anticorpo anti-rato de burro biotinilado, por 30 minutos. As secções foram reveladas com o substrato de tetracloridrato de diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, Califórnia) por 5 minutos e contra-coloridas com hematoxicilina por 30 segundos, lavadas em água da bica, desidratadas, clareadas e montadas.

Ensaio de Apoptose. A apoptose foi detectada usando o kit de Detecção de Apoptose *In Situ*, TACS TdT (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota), de acordo com as recomendações do fabricante.

Análise do Crescimento de Tumor. Células de melanoma humano (3×10^6) foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito dos camundongos sem pelagem (*nude*). Quando os volumes tumorais alcançaram aproximadamente 100 mm^3 , 1×10^{11} partículas de AAVP foram administradas via a veia da cauda. A administração de partículas de AAVP foi repetida uma vez mais depois de 7 dias. Os camundongos contendo tumor foram seguidos depois disso por medição dos volumes tumorais a cada três dias em um modo cego.

Análise Estatística. Os grupos foram comparados usando-se Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de comparação de Tukey (GraphPad InStat Software, Inc., San Diego, Califórnia). Os valores $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

B. Resultados

Partículas de AAVP são Internalizadas por Células Mamíferas. Estudos prévios mostraram que partículas de fago podem ser internalizadas por internalização de receptor mediada por integrina (Hajitou et al., 2006). Células M21 expressam receptores $\alpha v \beta$ sobre sua superfície celular (dados não mostrados). De modo a examinar se as células M21 podem internalizar as partículas de AAVP, infectamos células com partículas de AAVP e então fago internalizado contado. Depois da infecção, o vírus extracelular inteiro foi inativado por tratamento de subsilisina, células foram lisadas e o fago internalizado foi recuperado no lisado. A concentração de AAVP internalizada foi medida como TU (Tabela 6). Houve internalização mínima do AAVP pelas células M21 infectadas com ou vírus null (fd) não alvejado ou vírus não alvejado (fdTNF- α) expressando TNF- α em contraste com as células infectadas com AAVP (RGD) expressando null alvejado (RGD) ou TNF- α (RGDTNF- α) alvejado.

Tabela 6: Ensaio de Internalização do Fago

Agente	pfu/ μ l	Número Total de partículas de fago (10^2)
PBS	0	0
Fd	3×10^2	1.500
RGD	140×10^2	70.000
fdTNF- α	6×10^2	3000
RGDTNF- α	215×10^2	107.500

IF foi usada para visualizar a localização de partículas de AAVP internalizadas dentro das células M21. As células infectadas com AAVP (fdTNF- α) expressando TNF- α não alvejado não mostraram a localização do fago (Figura 12A, painel superior). Em contraste, as células infectadas com AAVP expressando TNF- α (RGDTNF- α) mostraram a localização intensificada dentro das células M21 (Figura 12A, painel inferior).

Expressão de Gene Mediada por AAVP. Depois de determinar que o AAVP alvejado pode infectar e se localizar dentro das células mamíferas, investigamos se a infecção com vírus poderia levar à expressão do produto gênico. As células M21 foram infectadas com AAVP expressando TNF- α , em duplicata, e a produção do produto gênico de TNF- α foi medida por ELISA. O produto gênico é secretável e pode ser detectado nos sobrenadantes de cultura (Figura 12B). O sobrenadante testado depois de 5 dias de infecção mostrou níveis de TNF- α de 800 pg/mL. O produto gênico testado no dia 12 foi maior que no dia 4. O controle diluente (PBS), o vírus vazio (fd), não alvejado, expressando TNF- α (fdTNF- α) e AAVP *null* alvejado (RGD) não tinham níveis detectáveis de secreção de TNF- α (Figura 12B).

Para examinar se o TNF- α secretado por células M21 infectadas com AAVP era funcional, testamos sua capacidade de induzir a síntese do fator tecidual (TF) em ECs. O TNF- α secretado foi capaz de induzir a expressão de TF em ECs (Figura 12C). O TNF- α recombinante foi usado como um controle positivo. A indução por TF poderia ser bloqueada por incubação do sobrenadante monoclonal de TNF- α . O sobrenadante da cultura analisado 23 dias depois da infecção também mostrou secreção de TNF- α funcional (Figura 12C). Assim, uma infecção única com AAVP resultou na produção do produto gênico funcional até 23 dias depois da infecção.

Alvejando Tumor *In Vivo* por AAVP. Observamos a infecção com AAVP de células mamárias e a expressão de gene de TNF- α *in vitro*. De modo a avaliar o alvejamento *in vivo* de AAVP, o vírus foi injetado sistemicamente via a veia da cauda em camundongos sem pelagem (*nude*) contendo tumor.

Os camundongos injetados com ou um diluente (PBS) ou RGDTNF- α AAVP foram eutanizados aos 15 minutos, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 8 dias e 10 dias depois da injeção. As secções congeladas de tecidos tumorais foram analisadas quanto à presença das partículas virais como coloração com IF dual. Como mostrado na Figura 13, as partículas de AAVP coloridas de vermelho (Alexa Flour 594, vasos sangüíneos de verde (Alexa Flour 488) e DAPI mostraram coloração nuclear. Nenhum dos animais injetados com PBS mostrou presença de AAVP em nenhum ponto. Uma secção de tumor representativa de um animal injetado com PBS por 15 minutos é mostrada (Figura 13A). Os animais injetados com AAVP expressando RGDTNF- α mostraram a co-localização de partículas de vírus nos vasos sangüíneos (Figura 13B-H). O maior acúmulo de partículas de vírus foi detectado em animais injetados depois de 15 minutos (Figura 13B). A presença de AAVP foi detectada em todos os pontos de tempo, dia 1 (Figura 13C), dia 2 (Figura 13D), dia 3 (Figura 13E), dia 4 (Figura 13F), dia 8 (Figura 13G), e dia 10 (Figura 13H). Contudo, observamos um decréscimo gradual das partículas de vírus com o tempo.

AAVP não Alveja Tecidos Normais *In Vivo*. De modo a examinar a especificidade do AAVP alvejando vasos sangüíneos *in vivo*, examinamos dois tecidos de controle de camundongos sem pelagem (*nude*) injetados com ou PBS ou AAVP expressando RGDTNF- α em pontos de tempo diferentes (Figura 14 e Figura 15). A presença do vírus foi detectada usando coloração com IL dual conforme descrição anterior.

Como mostrado na Figura 14, observamos alguma coloração das partículas de vírus no dia 1 (Figura 14A) no tecido do fígado. Contudo, a coloração do vírus foi reduzida para níveis mínimos no dia 2 (Figura 14B) sem coloração de vírus observada no dia 3 (Figura 14C), dia 8 (Figura 14D) e no dia 10 (Figura 14E). A Figura 15 mostra secções de rim coloridas para verificação da presença de partículas de vírus. As partículas de AAVP não foram detectadas no rim em nenhum dos pontos de tempo testados, dia 1 (Figura 15A), dia 2 (Figura 15B), dia 3 (Figura 15C), dia 8 (Figura 15D) e dia 10 (Figura 15E). No entanto, todos os tecidos de rim, em diferentes pontos de tempo, mostraram boa coloração dos vasos.

Expressão *in vivo* do Produto Gênico Funcional por AAVP. Para examinar se as partículas de AAVP alvejado para a vasculatura tumoral podem expressar o produto gênico, analisamos, em duplicata, dia 3, dia 4, dia 8 e dia 10, tecidos tumorais quanto aos níveis de proteína TNF- α por ELISA (Figura 16). Observamos níveis endógenos basais da expressão de TNF- α em todos os tecidos testados. Os animais injetados com PBS não mostraram nenhum aumento dos níveis endógenos em nenhum dos pontos de tempo testados. Os camundongos injetados com RGDTNF- α AAVP mostraram expressão de TNF- α começando no dia 4 e aumentando gradualmente até o dia 10 (Figura 16).

Para determinar o tipo de célula onde o produto gênico estava sendo produzido,

colorimos secções de tecido usando um anticorpo específico para TNF- α . Observamos a presença de coloração do TNF- α em volta dos vasos sangüíneos (Figura 17A). Para observar o efeito da expressão de TNF- α , colorimos secções de tumor para apoptose. A fragmentação do DNA foi detectada usando marcador azul de TACS. As células apoptóticas se coloriram de azul (Figura 17B, painel esquerdo). Para discriminar as células apoptóticas das células necróticas, as amostras foram contra-coloridas com vermelho rápido nuclear para auxiliar a verificação morfológica da apoptose. Observamos vasos sangüíneos e células de tumor circundantes passando por apoptose. O painel direito mostra vasos sangüíneos coloridos com um anticorpo específico CD31 (Figura 17B, painel direito).

10 Análise do Crescimento do Tumor. Analisamos o efeito do AAVP em xenoenxertos de tumor crescidos em camundongos sem pelagem (*nude*) em dois modelos diferentes de tumor, sensível a TNF- α (M21) e resistente a TNF- α (Pmel), para examinar a eficácia de tratamento de AAVP expressando TNF- α . Tumores M21 de melanoma humano, que são sensíveis ao TNF- α , foram crescidos subcutaneamente em camundongos sem pelagem
15 (*nude*). Depois do desenvolvimento do tumor, os camundongos foram tratados sistemicamente via injeções na veia da cauda com várias construções de AAVP ou PBS. Os animais foram acompanhados por 27 dias. O tratamento dos tumores M21 com AAVP alvejado expressando TNF- α (RGDTNF- α) mostrou necrose do tumoral central e encolhimento do tumor. No dia 27, o ponto de tempo medido final para as coortes diferentes,
20 o grupo tratado com PBS tinha um volume de tumor médio de 743 ± 155 ($\pm$ DP) mm³, o grupo de fdTNF não alvejado tinha um volume de tumor médio de 613 ± 141 ($\pm$ DP) mm³, o fago RGD alvejado *null* tinha um volume de tumor médio de 622 ± 141 ($\pm$ DP) mm³ e grupo que expressa TNF- α alvejado tinha um valor médio de 358 ± 98 ($\pm$ DP) mm³ ($p < 0,048$) (Figura 18A). A redução em volume tumoral no grupo RGDTNF- α foi estatisticamente significativa,
25 começando no dia 20.

Em um modelo de tumor resistente ao TNF- α , tumores Pmel de melanoma humano foram sensibilizados para o efeito de TNF- α por pré-tratamento deles com AAVP expressando EMAP-II antes da administração de TNF- α . Em um estudo prévio, demonstramos que a distribuição do vetor viral de EMAP-II pode sensibilizar tumores
30 resistentes aos efeitos de TNF- α distribuído sistemicamente. Os tumores crescidos subcutaneamente em camundongos sem pelagem (*nude*) foram tratados sistemicamente com AAVP expressando EMAP-II, seguido por tratamento sistêmico com TNF- α recombinante (rTNF- α). Os tumores foram acompanhados por 2 semanas depois do tratamento. Como mostrado na Figura 18B, os camundongos tratados com AAVP não
35 alvejado expressando EMAP-II (fdEMAP) mostraram crescimento de tumor similar em comparação com camundongos tratados com PBS sozinho. Os camundongos tratados com

ou rTNF- α ou AAVP alvejado expressando EMPA-II (RGDEMAP-II) sozinho mostraram pouco efeito, e não foram significativamente diferentes do vírus RGD-EMAP-II, e rTNF- α mostrou redução significativa do volume do tumor ($p = 0,007$).

EXEMPLO 3

5 PETÍDEO DE TRANSFERRINA HUMANA ALVEJA O SISTEMA DE TRANSFERRINA/RECEPTOR DE TRANSFERRINA

10 A transdução de células de glioma humano em cultura por CRTIGPSVC (SEQ IND NO:1) – células de glioma derivadas de humanos de Luc U87 foram semeadas em uma placa com 24 poços na concentração de 40.000 células/poço e cultivadas O.N a 37°C. No dia seguinte, as células foram incubadas com AAVP, de acordo com o protocolo do Nature Method. RGD-4C AAVP GFP e RGD-4C AAVP Luc foram usadas como controle positivo para eficácia de transdução. As imagens foram tomadas no dia 7. A absorção de fago está baixa, mas aumenta dramaticamente quando as células são cultivadas em hidrogel de Ferro AAVP (última coluna da placa e gráfico) (Figuras 19A-19B). Avaliamos a especificidade e

15 eficácia do CRTIGPSVC (SEQ ID NO:1) AAVP – Luc depois da administração sistêmica em animais contendo U87 humano – a atividade foi medida depois de 7 dias da injeção de fago.

REFERÊNCIAS

As seguintes referências, na medida em que elas fornecem detalhes de procedimento ou outros detalhes suplementares àqueles estabelecidos aqui, são especificamente incorporadas aqui a título de referência.

- 5 Alauddin *et al.*, J. Labelled Compds. Radiopharm. 46,285-289, (2003).
Arap *et al.*, Science 279, 377-380, (1998).
Arap *et al.*, Cancer Cell 6,275-284, (2004).
Arcone *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 16(8):3195-3207, 1988.
Baichwal e Sugden, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), NY, Plenum Press, 117-
10 148, 1986.
Barbas *et al.*, *Phage Display: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Press), (2001).
Barrow e Soothill, *Trends Microbiol.* 5,268-271, (1997).
Blasberg e Tjuvajev, J. Clin. Invest. 111, 1620-1629, (2003).
15 Brooks *et al.*, Cell 79, 1157-1164, (1994).
Chen *et al.*, Chem. Biol. 11, 1081-1091, (2004).
De e Gambhir, FASEB J. 19, 2017-2019, (2005).
Ellerby *et al.*, Nature Med. 5, 1032-1038, (1999).
Geier *et al.*, Nature 246,221-223, (1973).
20 Gelovani e Blasberg, Cancer Cell 3, 327-332, (2003).
Gilliland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(8):4539-4543, 1980.
Giordano *et al.*, Nature Med. 11, 1249-1253, (2001).
Gossen e Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(12):5547-5551, 1992.
Gross e Piwnica-Worms, Cancer Cell 7,5-15, (2005a).
25 Gross e Piwnica-Worms, Methods Enzymol. 399,5 12-530, (2005b).
Hajitou *et al.*, Cancer Res. 61,3450-3457, (2001).
Hajitou *et al.*, Trends Cardiovasc. Med. In press, (2006).
Hamel *et al.*, Cancer Res. 56,2697-2702, (1996).
Hara *et al.*, Gene Ther. Dec;2(10):784-8, (1995)
30 Hermonat e Muzyczka, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81 :6466-6470, (1984).
Hood *et al.*, Science 296,2404-2407, (2002).
Hsiao *et al.*, Dev. Dyn. 220,323-336, (2001).
Hwu *et al.*, J Immunol 151:4104-15, (1993)
Ivanenkov *et al.*, Targeted delivery of multivalent phage display vectors into
35 mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta 1448, 463- 472, (1999).
Kageyama *et al.*, J. Biol. Chem., 262(5):2345-2351, 1987.
Kootstra e Verma, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 43,413-439, (2003).

- Larocca *et al.*, FASEB J. 13, 727-734., (1999).
- Lebkowski *et al.*, Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996, (1988).
- Lieber *et al.*, J. Virol. 73,93 14-9324, (1999).
- Luker *et al.*, PNAS 10 1, 12288-12293, (2004).
- 5 Macejak e Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Machida, *Viral Vectors for Gene Therapy* (Totowa, NJ: Humana Press), (2003).
- Marchib *et al.*, *Cancer Cell* 5, 15 1-162, (2004).
- Massoud e Gambhir, *Genes Dev.* 17, 545-580, (2003).
- McCarty *et al.*, *Annu. Rev. Genet.* 38, 819-845, (2004).
- 10 Miller *et al.*, *Nature Biotechnol.* 21, 1040-1046, (2003).
- Mizuguchi e Hayakawa, *Hum. Gene Ther.* 15, 1034-1044, (2004).
- Muzyczka, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:97-129, (1992).
- Nakamura *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 13, 613-626, (2002).
- Nicolas e Rubenstein, *In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their*
 15 *uses*, Rodriguez e Denhardt (Eds.), Stoneham: Butterworth, 493-513, 1988.
- Oliviero *et al.*, *EMBO J.*, 6(7):1905-1912, 1987.
- Pasqualini *et al.*, *Nature Biotechnol.* 15, 542-546, (1997).
- Pelletier e Sonenberg, *Nature*, 334:320-325, 1988.
- Piersanti *et al.*, *J. Mol. Med.* 82,467-476, (2004).
- 20 Poul e Marks, *J. Mol. Biol.* 288,203-21 1, (1999).
- Prowse e Baumann, *Mol. Cell Biol.*, 8(1):42-51, 1988.
- Ray *et al.*, *Semin. Nucl. Med.* 3 1, 3 12-320, (2001).
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 1035-1038 e 1570-1580, Mack
 Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- 25 Ridgeway, *In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*,
 Stoneham: Butterworth, 467-492, 1988.
- Ron *et al.*, *Mol Cell Endocrinol.* 21;74(3):C97-104,1990.
- Sambrook *et al.*, *In: Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold
 Spring Harbor, NY, 2001.
- 30 Spanjer e Scherphof, *Biochim Biophys Acta.*;734(1):40-7, 1983
- Shayakhmetov *et al.*, *J. Virol.* 79,7478-749 1, (2005).
- Sipkins *et al.*, *Nature Med.* 4,623-626, (1998).
- Souza *et al.*, *PNAS* 103, 1215-1220,2006, (2006).
- Tai and Laforest, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 7,255-285, (2005).
- 35 Tandle *et al.*, *Cytokine* 30:347-58, (2005)
- Temin, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
- Tjuvajev *et al.*, *Cancer Res.* 58,4333-4341, (1998).

- Tjuvajev *et al.*, *Cancer Res.* 59,5 186-5193, (1999).
- Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5(11):3251-3260, (1985).
- Trepel *et al.*, *Cancer Res.* 61, 8 1 10-8 1 12, (2001).
- Uhrbom *et al.*, *Nature Med.* 10, 1257-1 260, (2004).
- 5 Wagner *et al.*, *PNAS* 89:7934-7938, (1992).
- Walensky *et al.*, *Science* 305, 14 1 1 - 14 13, (2004).
- White *et al.*, *Circulation* 109, 5 13-5 19, (2004).
- Wilson *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10(12):6181-6191, 1990.
- Xiao *et al.*, *J. Virol.* 72, 2224-2232, (1998).
- 10 Yang *et al.*, *J. Virol.* 7 1, 923 1-9247, (1997).
- Zacher *et al.*, *Gene* 9, 127-140, (1980).
- Zechner *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 8(6):2394-2401, 1988.



PI0710671-8

REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratamento de um sujeito, **CHARACTERIZADO** pelo fato de compreender:

(a) administrar um AAVP terapêutico codificando um repórter a um paciente tendo, suspeito de ter ou em risco de desenvolver uma condição patológica ou doença; e

(b) calcular a expressão *in situ* do AAVP em um tecido ou célula marcada para tratamento pela detecção do repórter codificado ou atividade do repórter.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreende administrar um tratamento de câncer ao paciente, baseado na expressão de um nível terapêutico suficiente de um gene terapêutico expresso pelo ácido nucléico do AAVP no órgão alvo, tecido ou célula.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que um segundo AAVP é administrado se a expressão do primeiro AAVP terapêutico não é expressas em um nível terapeuticamente efetivo.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o cálculo da expressão do AAVP é por uma detecção não invasiva do repórter ou de uma atividade do repórter.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o repórter é uma proteína terapêutica.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína terapêutica é um pró-medicação convertendo enzima.

7. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o repórter é uma enzima.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a enzima é uma quinase.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a quinase é uma timidina quinase.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a quinase modifica um composto detectável.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o composto marcado detectável é detectável por fluorescência, químio-luminescência, espectroscopia raman intensificada pela superfície (SERS), imagem de ressonância magnética (MRI), tomografia computadorizada (CT), e tomografia por emissão de pósitrons (PET).

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o composto marcado detectável é um análogo de nucleosídeo.

13. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o composto marcado detectável é: fluorodeoxiglicose (FDG); 2'-flúor-2'-deoxi-beta-D-

arabionofuranosil-5-etil-uracil (FEAU); 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodo-l-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-T-2'-flúor-5-iodo-l-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodo-l-β-D-arabinofuranosil-uracil, 5-[¹⁸F]-2'-flúor-5-flúor-l-β-D-arabinofuranosil-uracil; 2-[¹¹I] e 5-([¹¹C]-metil)-2'-flúor-5-etil-l-β-D-arabinofuranosil-uracil; 2-[¹¹C]-2'-flúor-5-etil-l-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-([¹¹C]-etil)-2'-flúor-5-etil-l-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-(2-[¹⁸F]-etil)-2'-flúor-5-(2-flúor-etil)-1-β-D-arabinofuranosil-uracil, 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodovinil-l-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodovinil-l-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodovinil-l-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodo-l-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodo-l-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodo-l-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodovinil-l-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodovinil-l-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodovinil-l-β-D-ribofuranosil-uracil; ou 9-4-[¹⁸F]flúor-3-(hidroximetil)butilguanina.

14. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o composto marcado detectável compreende um ¹⁸F, ²⁷⁷Ac, ²¹¹At, ¹²⁸Ba, ¹³¹Ba, ⁷Be, ²⁰⁴Bi, ²⁰⁵Bi, ²⁰⁶Bi, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ⁸²Br, ¹⁰⁹Cd, ⁴⁷Ca, ¹¹C, ¹⁴C, ³⁶Cl, ⁴⁸Cr, ⁵¹Cr, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁶⁵Dy, ¹⁵⁵Eu, ¹⁵³Gd, ⁶⁶Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²Ga, ¹⁹⁸Au, ³H, ¹⁶⁶Ho, ¹¹¹In, ¹¹³In, ¹¹⁵In, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁹Ir, ¹⁹¹Ir, ¹⁹²Ir, ¹⁹⁴Ir, ⁵²Fe, ⁵⁵Fe, ⁵⁹Fe, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵O, ¹⁹¹Os, ¹⁰⁹Pd, ³²P, ³³P, ⁴²K, ²²⁶Ra, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁸²Rb, ¹⁵³Sm, ⁴⁶Sc, ⁴⁷Sc, ⁷²Se, ⁷⁵Se, ¹⁰⁵Ag, ²²Na, ²⁴Na, ⁸⁹Sr, ³⁵S, ³⁸S, ¹⁷⁷Ta, ⁹⁶Tc, ^{99m}Tc, ²⁰¹Tl, ²⁰²Tl, ¹¹³Sn, ^{117m}Sn, ¹²¹Sn, ¹⁶⁶Yb, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ⁶²Zn ou ⁶⁵Zn.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o composto marcado detectável é ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹¹¹I, ^{99m}Tc, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ³²P, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Ga, ²⁰¹Tl, ⁷⁷Br ou ¹⁸F marcado.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o AAVP compreende uma porção que seletivamente atinge um tecido ou célula alvo para tratamento.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a porção é codificada por uma proteína capsulada do AAVP.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato da proteína da superfície ser proteína capsulada recombinante.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato da proteína capsulada recombinante compreender um peptídeo alvo.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato do peptídeo alvo ser um peptídeo cíclico.

21. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato do peptídeo alvo ser um peptídeo linear.

22. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato do peptídeo alvo se ligar seletivamente à célula expressando um integrin sobre a superfície da

célula.

23. Método, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o integrin é um integrin $\alpha\beta3$ ou $\alpha\beta5$.

24. Método, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato do
5 peptídeo compreender um RGD modificado.

25. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato do peptídeo se ligar seletivamente à célula expressando um receptor de transferência.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato do peptídeo compreender uma seqüência de aminoácido compreendendo CRTIGPSVC.

10 27. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do paciente possuir, ser suspeito de possuir, ou em risco desenvolver uma doença hiperproliferativa.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença hiperproliferativa é fibrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rhabdomyosarcoma, câncer gástrico cancer, câncer esofágico, câncer retal, câncer pancreático, câncer ovariano, câncer de próstata, câncer uterino, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pele, câncer do cérebro, carcinoma de células escamosas, carcinoma da glândula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de célula renal, hepatoma, carcinoma do duto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrional, tumor de Wilm, câncer cervical, câncer testicular, carcinoma de pequenas células do pulmão, carcinoma de células pulmonares não pequenas, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, ou sarcoma Kaposi.

29. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que gene repórter é operativamente acoplado a um promotor seletivo de tecido ou célula, ou um
30 promotor específico de tecido ou célula.

30. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a expressão avaliada compreende a administração de um marcador que está seletivamente metabolizado por uma expressão celular de ácido nucléico AAVP.

31. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que
35 o terapêutico AAVP codifica um segundo agente terapêutico.

32. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o um segundo agente terapêutico é enzima de conversão supressora de tumor, inibidora de

RNA, inibidora de DNA ou prodroga.

33. Ácido nucléico AAVP terapêutico, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um segmento de ácido nucléico compreendendo RNA inibitório e DNA inibitório.

34. Ácido nucléico, de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o RNA inibitório é um siRNA, miRNA ou RNA anti-sentido.

35. Partícula de fago, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende ácido nucléico AAVP, conforme definido na reivindicação 33.

36. Partícula de fago, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente um ligante almejado.

37. Método para modulação da expressão de um gene, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a administração de um ácido nucléico AAVP, de acordo com a reivindicação 26.

38. Método de detecção de transferência de gene e expressão de um tecido almejado de um paciente hospedeiro, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) distribuir ao tecido almejado do paciente hospedeiro um vetor AAVP contendo gene repórter presente não naturalmente no paciente hospedeiro, em que o gene repórter é selecionado do grupo que consiste em tipo selvagem, mutante ou gene quinase vírus-timidina de herpes geneticamente modificado, ou quinase timidina tipo 2, e onde o vetor de transferência é introduzido às células do tecido desejado, e o gene repórter é expresso nas células do tecido almejado, de modo a gerar um produto de gene repórter (proteína) a qual acumula somente nas células efetivamente transfectadas pelo vetor AAVP;

(b) administrar ao paciente hospedeiro um substrato repórter marcado onde células expressando o gene o produto do gene repórter da etapa (a) metabolizam o substrato repórter marcado para produzir um metabólito repórter marcado onde o substrato repórter marcado compreende um análogo de nucleosídeo radiomarcado; e

(c) visualizar não-invasivamente o tecido ou célula marcada contendo o metabólito do substrato repórter depois da liberação do substrato repórter residual não metabolizado pelo produto do gene repórter do referido paciente hospedeiro de modo a prover detecção da transferência de gene e expressão do tecido almejado.

39. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente um tempo de espera após o passo (b) suficiente para permitir pelo menos 67% de marcadores não específicos derivados de substrato repórter residual não metabolizado pelo produto de gene repórter para retirá-lo do paciente.

40. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente um tempo de espera após o passo (b) suficiente para permitir pelo menos 80% de marcadores não específicos derivados de substrato repórter residual não metabolizado pelo produto de gene repórter para retirá-lo do paciente.

41. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente um tempo de espera após o passo (b) suficiente para permitir pelo menos 90% de marcadores não específicos derivados de substrato repórter residual não metabolizado pelo produto de gene repórter para retirá-lo do paciente.

5 42. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor AAVP é introduzido às células do tecido almejado por transfecção(ou transdução) in vitro ou in vivo.

43. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o substrato repórter é marcado com um radioisótopo adequado para visualização por tomografia de emissão de pósitron, câmera gama, ou tomografia computadorizada de única emissão de fóton.

44. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o substrato repórter e metabólito do substrato repórter são compostos contendo nuclídeo isótopo-estável selecionado do grupo que consiste em ^2H , ^{13}C , ^{15}N e ^{19}F .

15 45. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o metabólito do substrato repórter marcado é visualizado por tomografia de emissão de pósitron.

46. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o metabólito do substrato repórter marcado é visualizado por câmera gama ou tomografia computadorizada de única emissão de fóton.

47. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o metabólito do substrato repórter marcado é visualizado por ressonância magnética.

25 48. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor AAVP incorpora o gene repórter e o promotor de transcrição adequado e elementos melhoradores, certificando-se de que o tecido específico, fator específico de transcrição, ou transdução-específica de sinal sofrerão ativação transcricional do repórter e co- expressão do gene terapêutico.

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que através do uso do vetor AAVP as células (ou a célula) são transfectadas com o gene repórter e o promotor de transcrição adequado e os elementos melhoradores ex vivo (in vitro) antes da administração das células (ou da célula) ao paciente hospedeiro.

50. Método, de acordo com a reivindicação 38, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o análogo de 2'-flúor-nucleosídeo marcado é 5- ^{123}I -2'-flúor-5-iodo-l- β -D-arabinofuranosil-uracil; 5- ^{124}I -T-2'-flúor-5-iodo-l- β -D-arabinofuranosil-uracil; 5- ^{131}I -2'-flúor-5-iodo-l- β -D-arabinofuranosil-uracil, 5- ^{18}F -2'-flúor-5-flúor-l- β -D-arabinofuranosil-uracil; 2- ^{11}I e 5- ^{11}C -metil)-2'-flúor-5-metil-l- β -D-arabinofuranosil-uracil; 2- ^{11}C -2'-flúor-5-etil-l- β -D-arabinofuranosil-uracil; 5- ^{11}C -etil)-2'-flúor-5-etil-l- β -D-arabinofuranosil-uracil; 5-(2- ^{18}F -etil)-

- 2'-flúor-5-(2-flúor-etil)-1- β -D-arabinofuranosil-uracil, 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodovinil-l- β -D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodovinil-l- β -D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodovinil-l- β -D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodo-l- β -D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodo-l- β -D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodo-l- β -D-ribofuranosil-uracil;
- 5 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodovinil-l- β -D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodovinil-l- β -D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodovinil-l- β -D-ribofuranosil-uracil; ou 9-4-[¹⁸F] flúor-3-(hidroximetil)butilguanina.

FIG. 1A

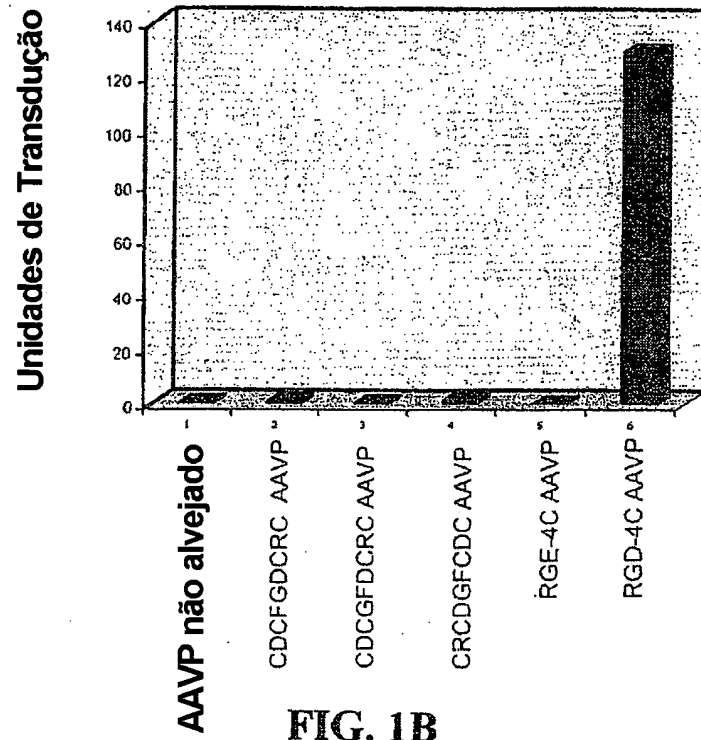


FIG. 1B

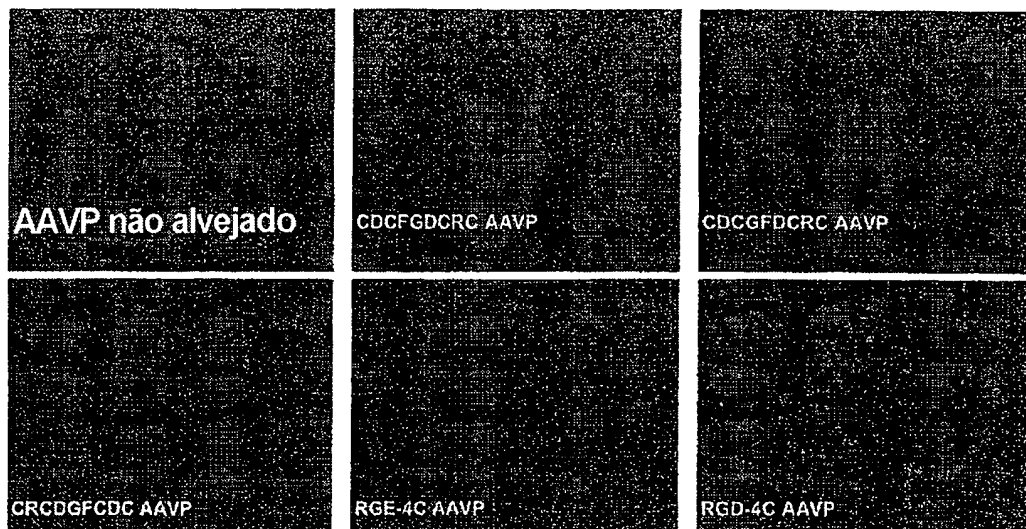


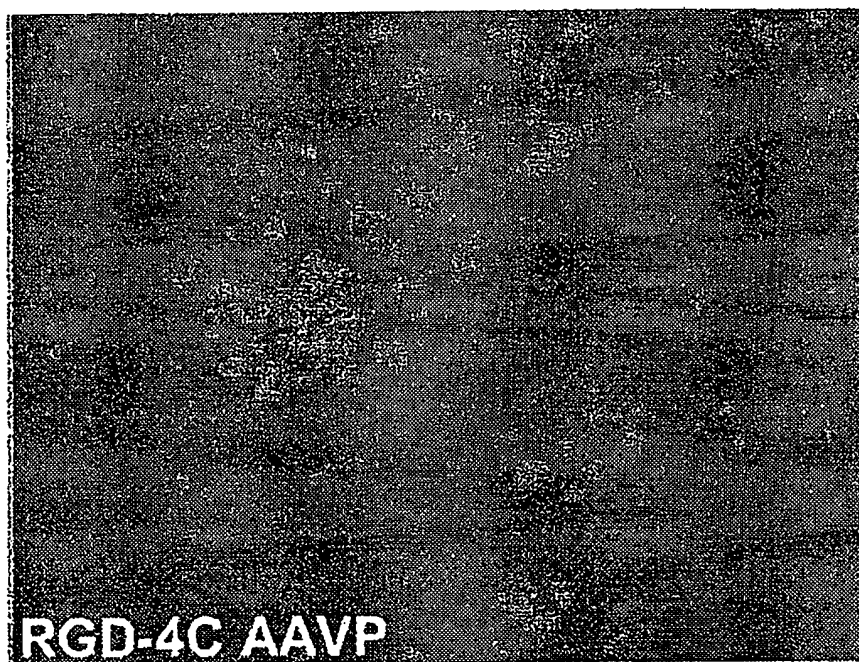
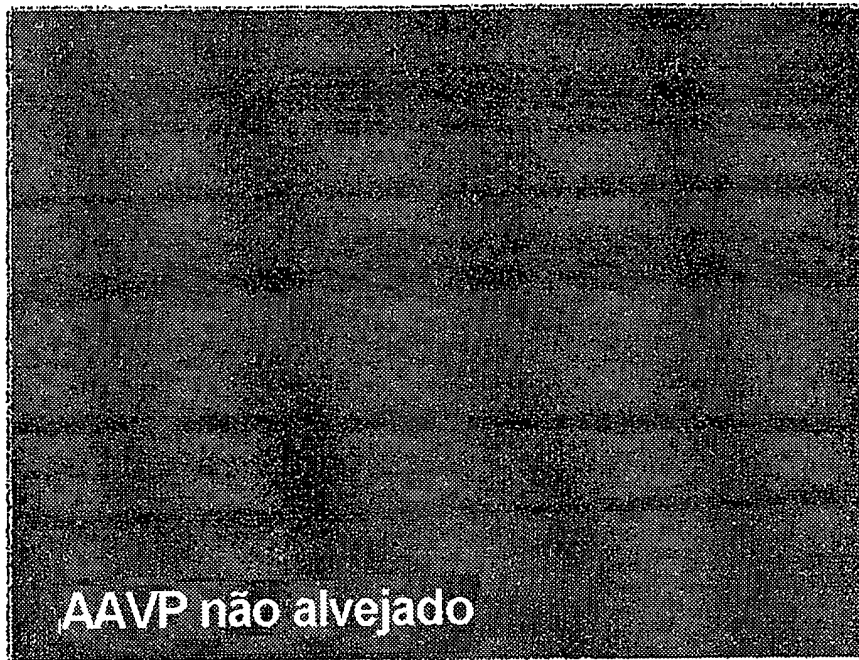
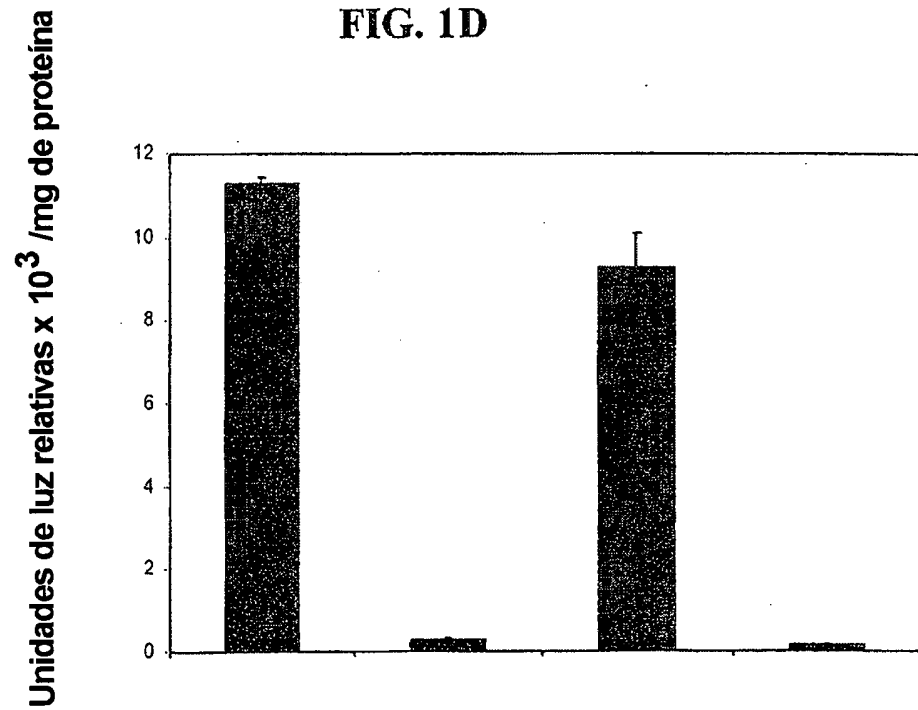
FIG. 1C

FIG. 1D



AAVP não alvejado	-	-	-	+
RGD-4C AAVP	+	+	+	-
Peptídeo de RGD-4C	-	+	-	-
Peptídeo de Controle	-	-	+	-

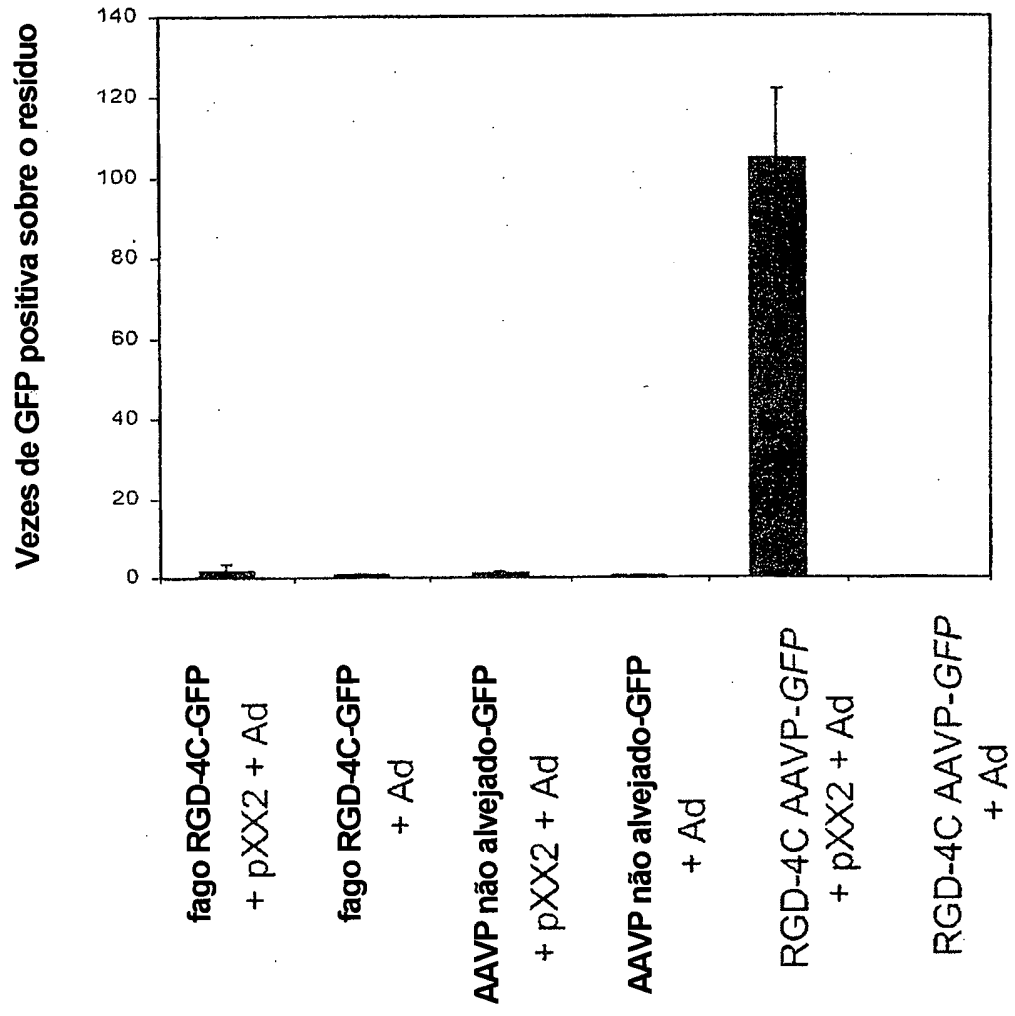
**FIG. 1E**

FIG. 2A

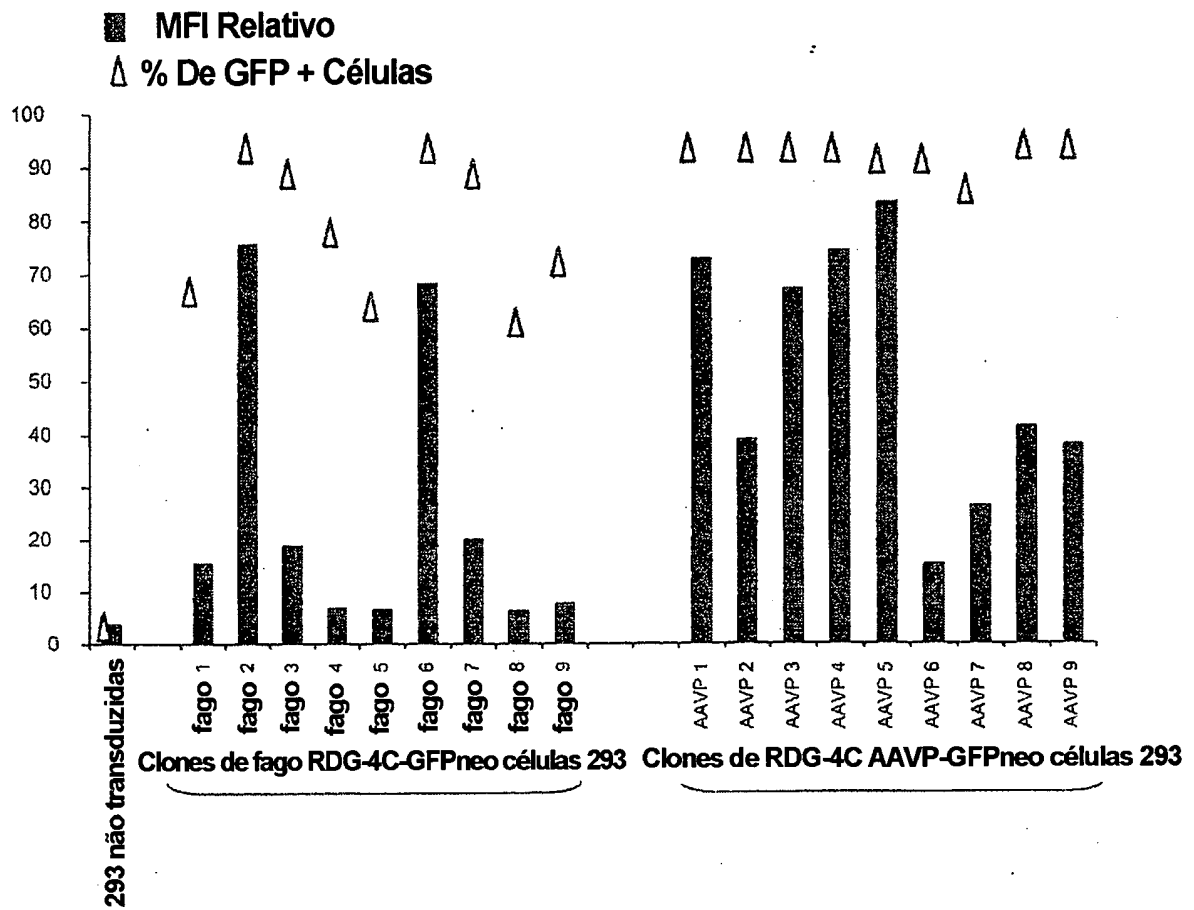


FIG. 2B

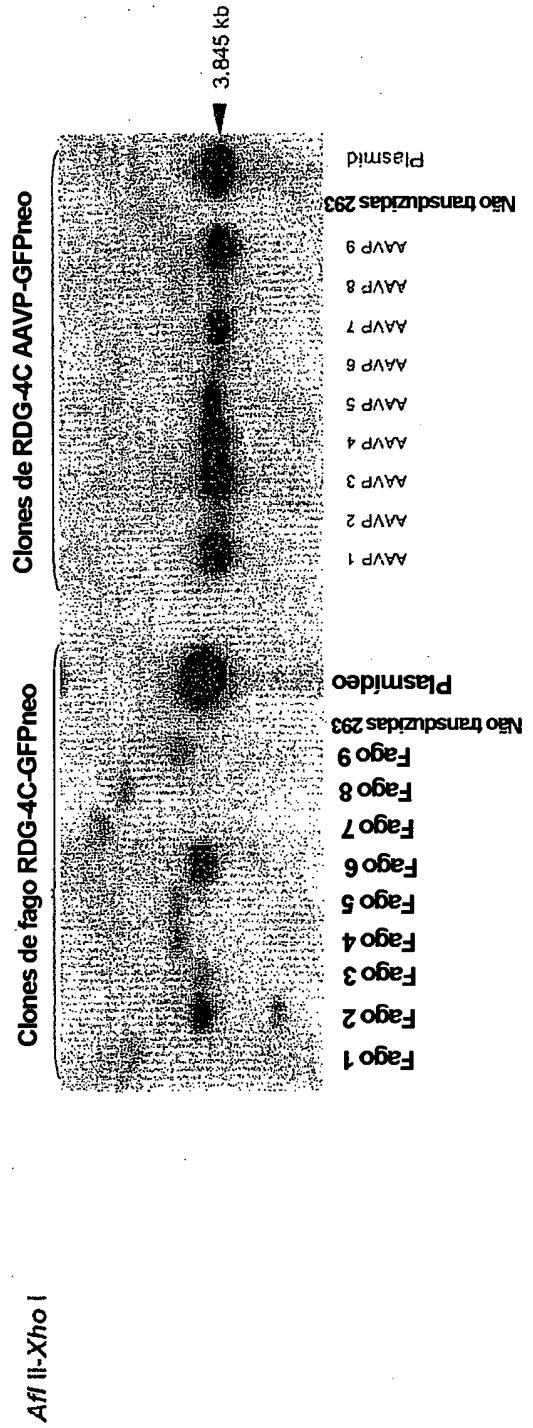
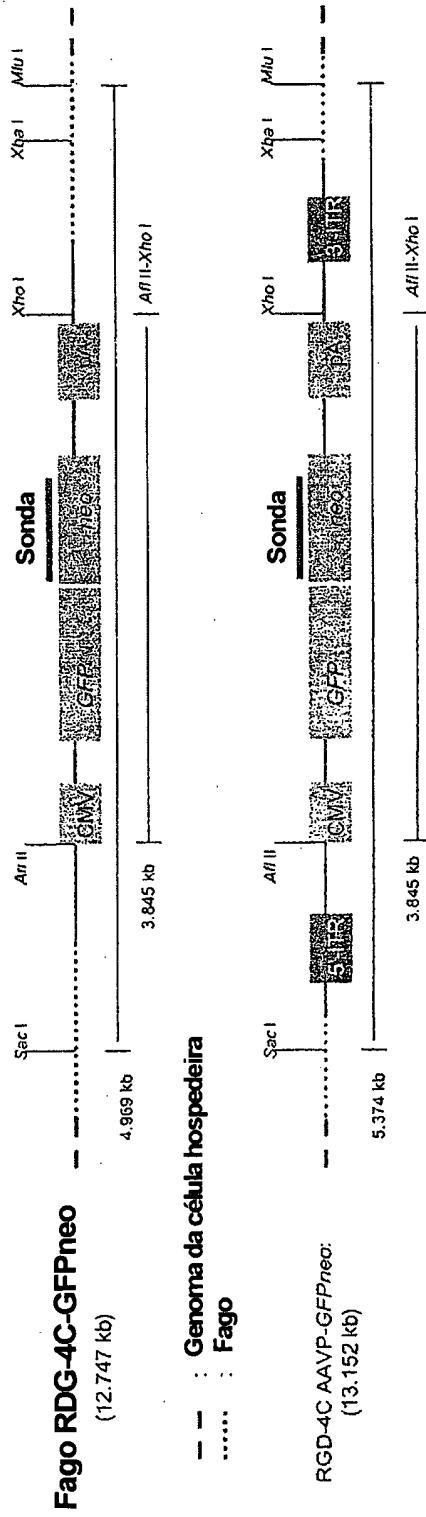


FIG. 2C

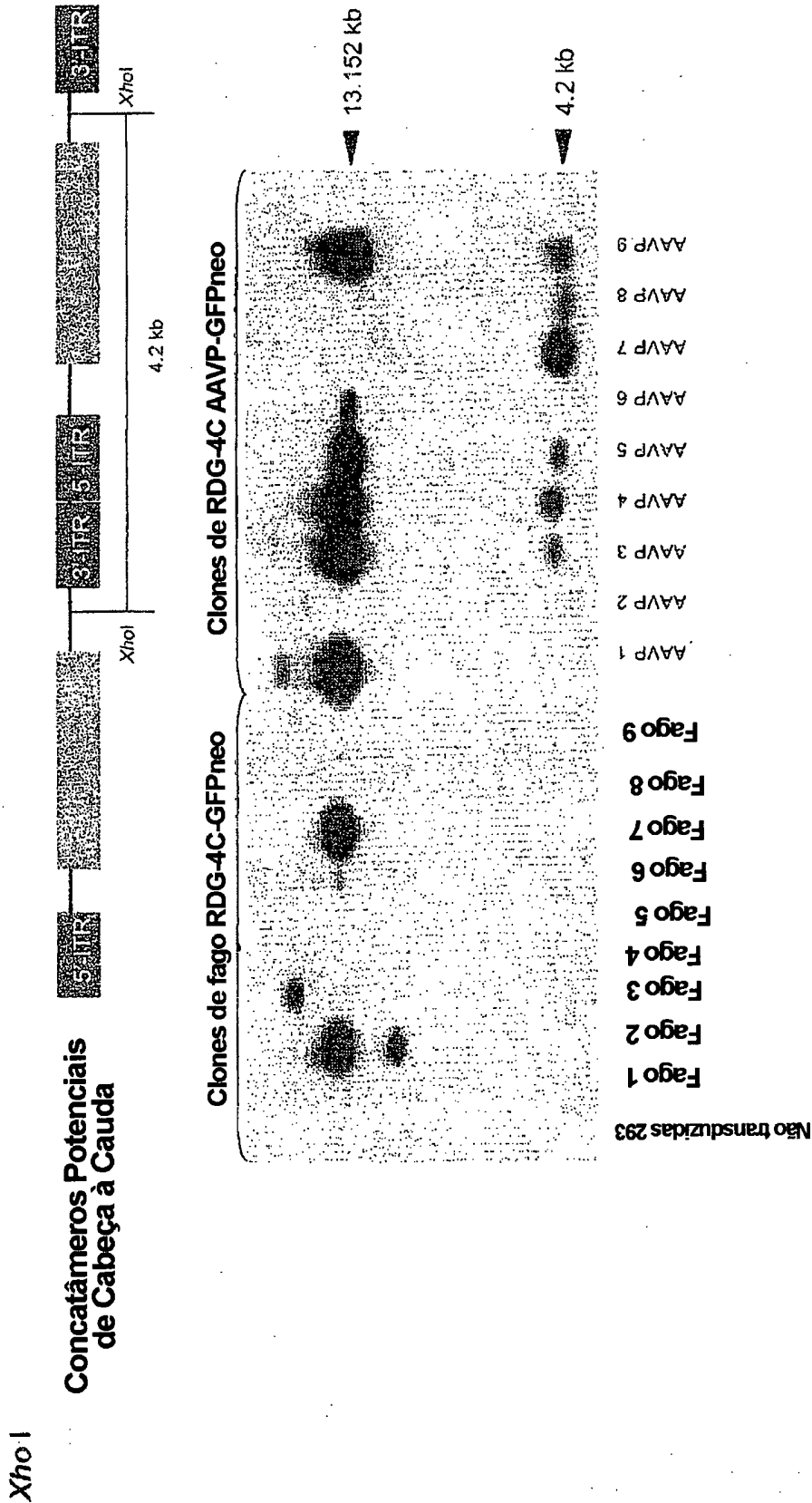


FIG. 3A

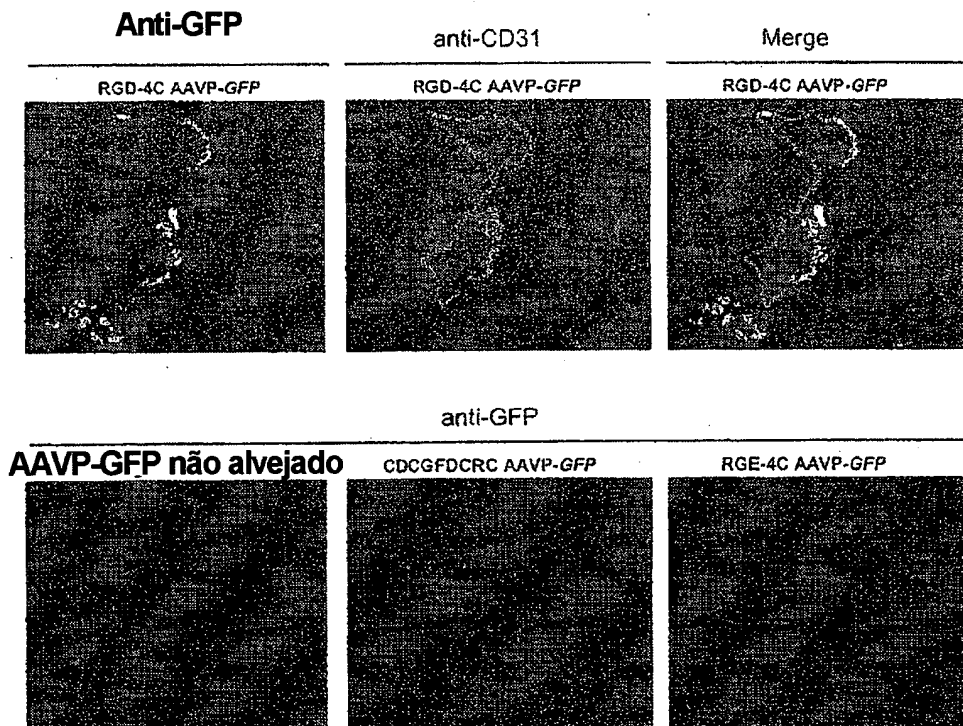
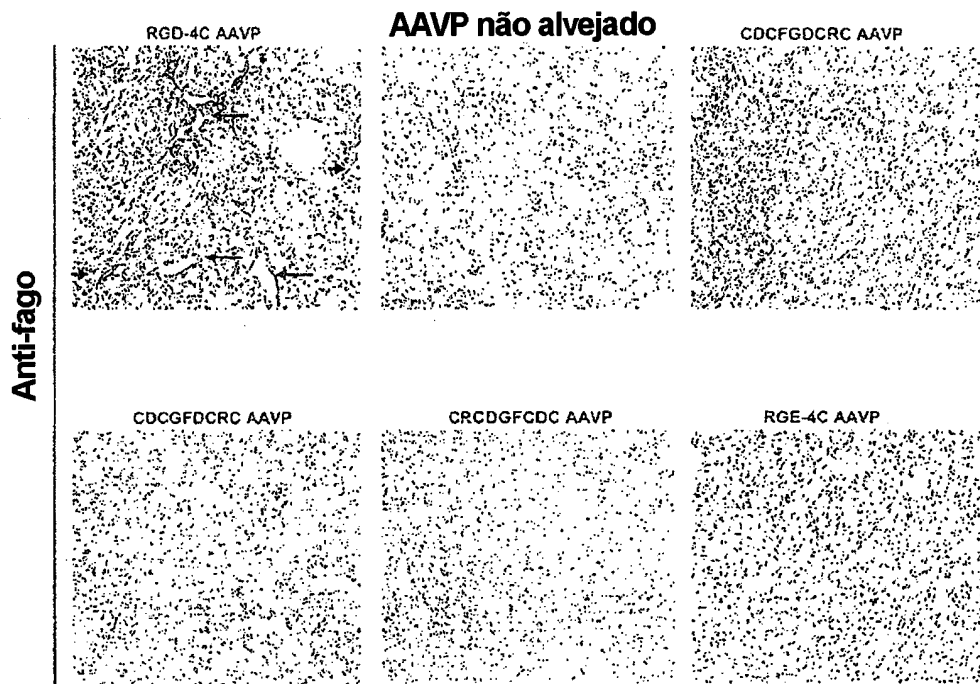


FIG. 3B

FIG. 4A

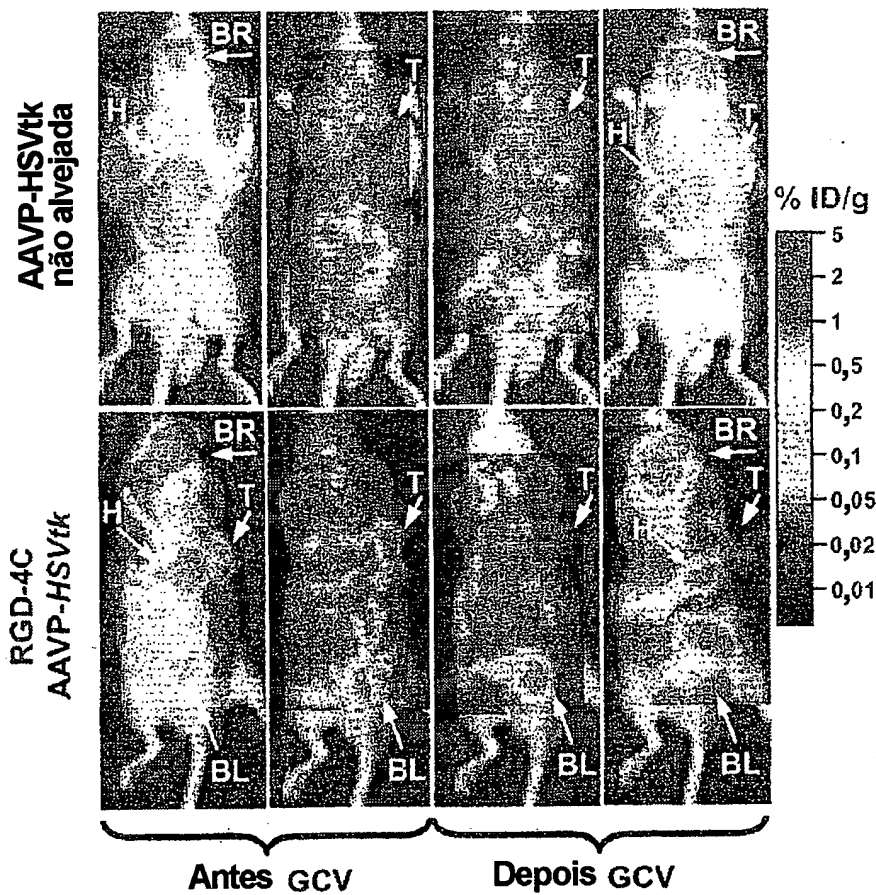
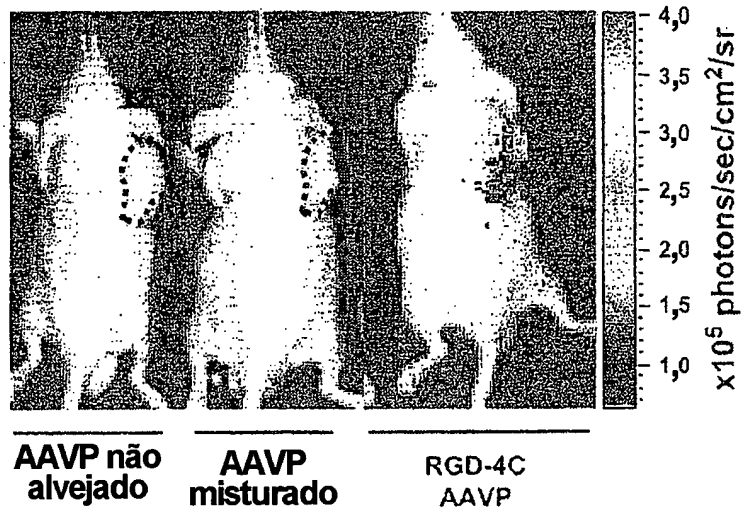


FIG. 4B

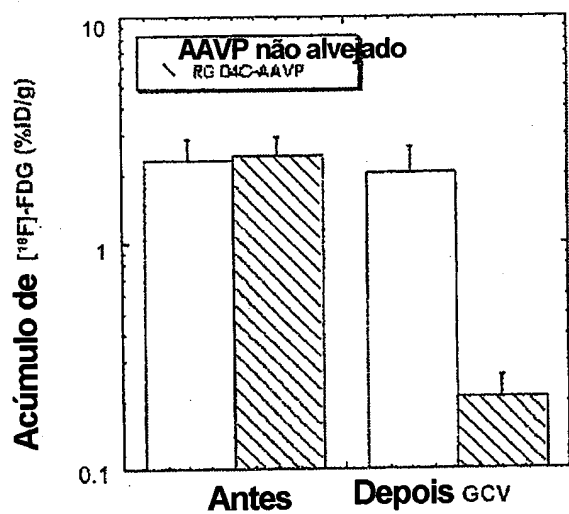
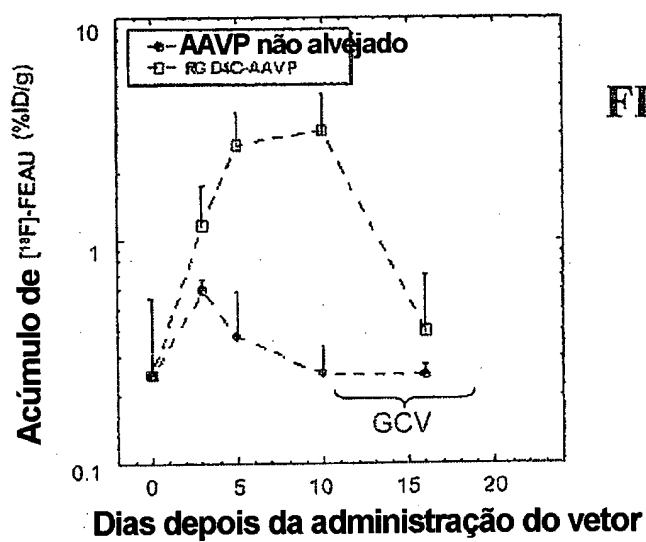
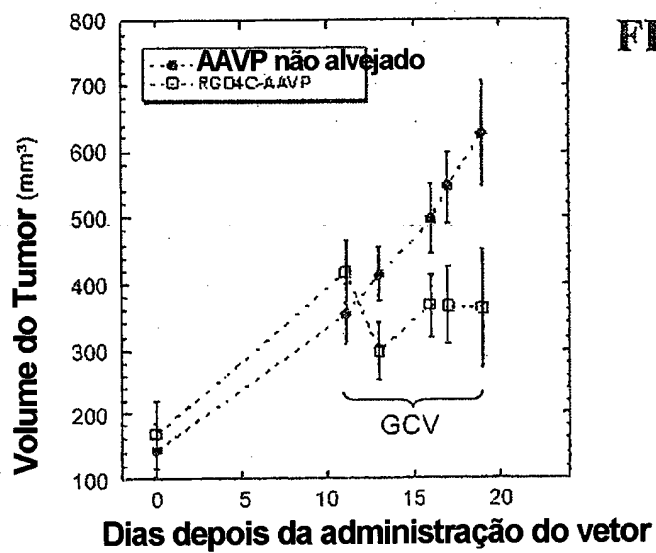


FIG. 5A

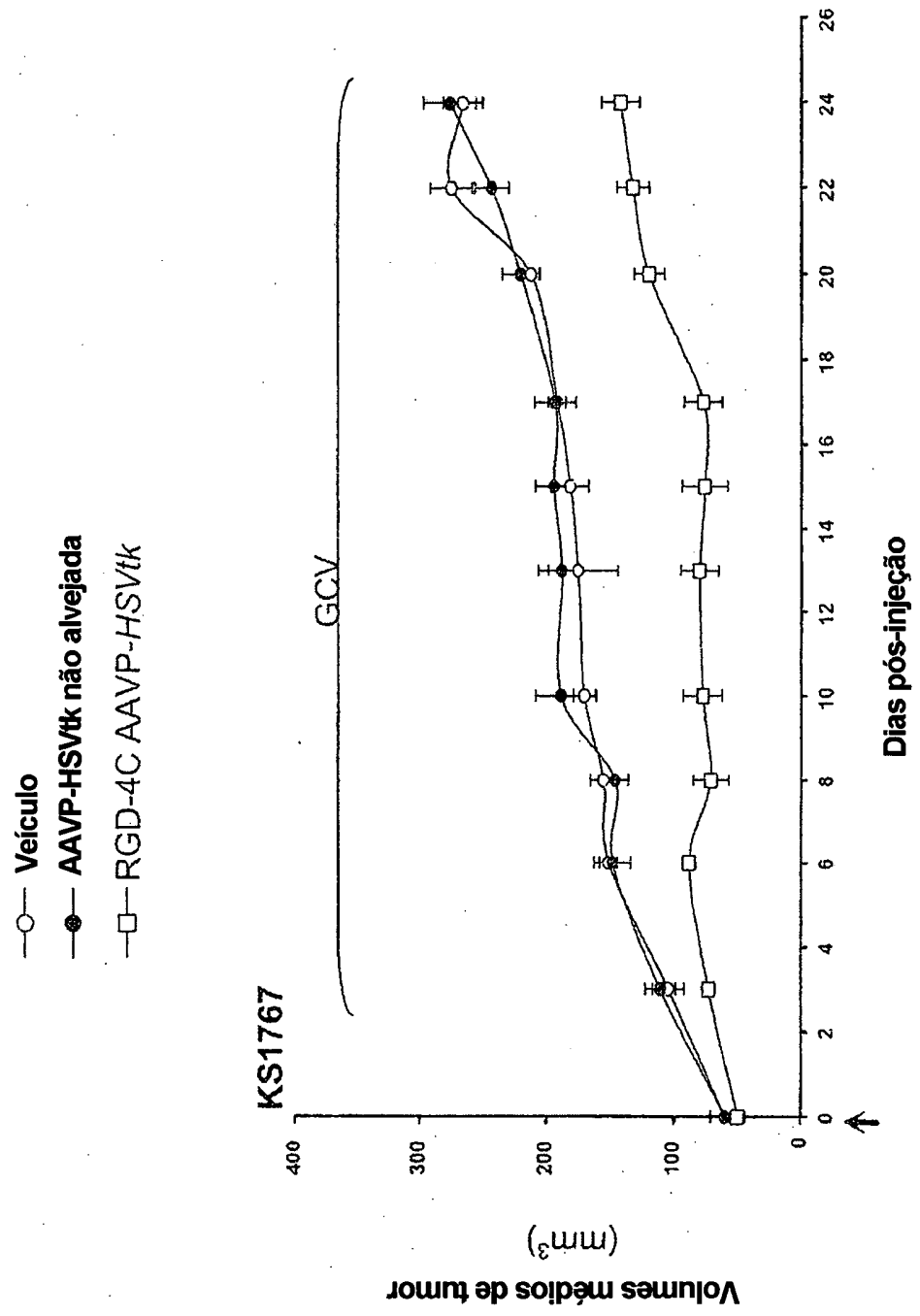


FIG. 5B

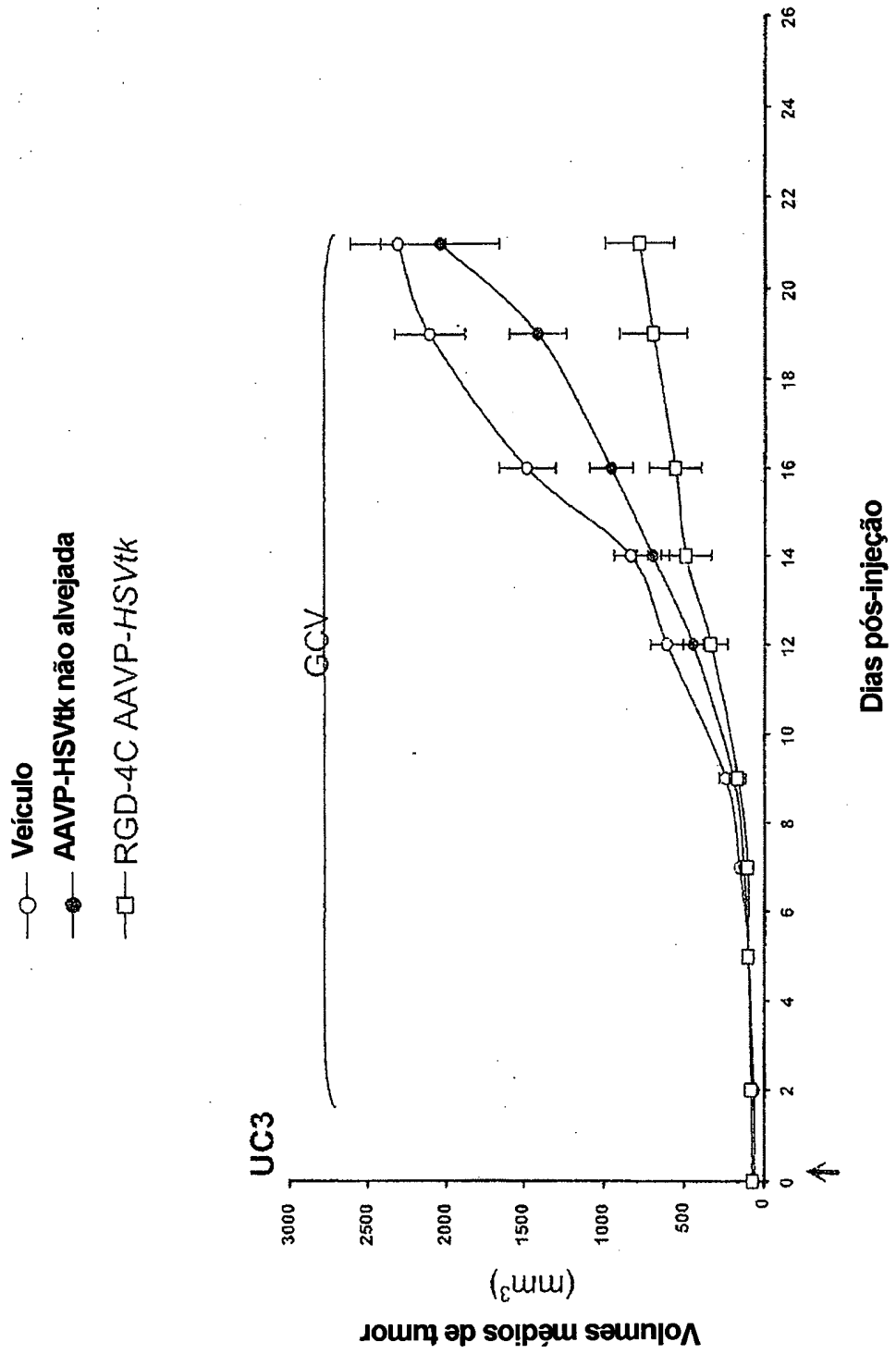


FIG. 5C

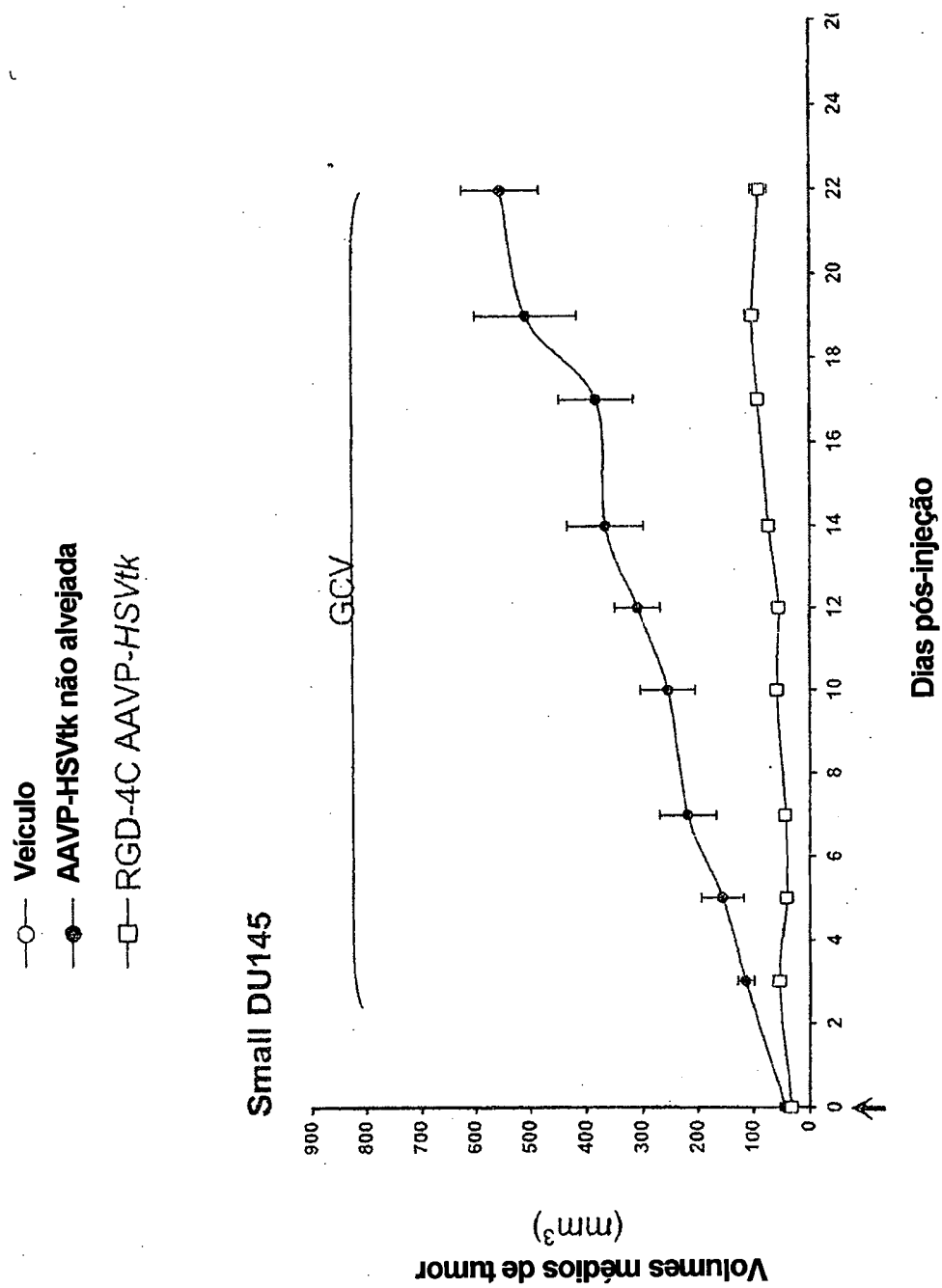


FIG. 5D

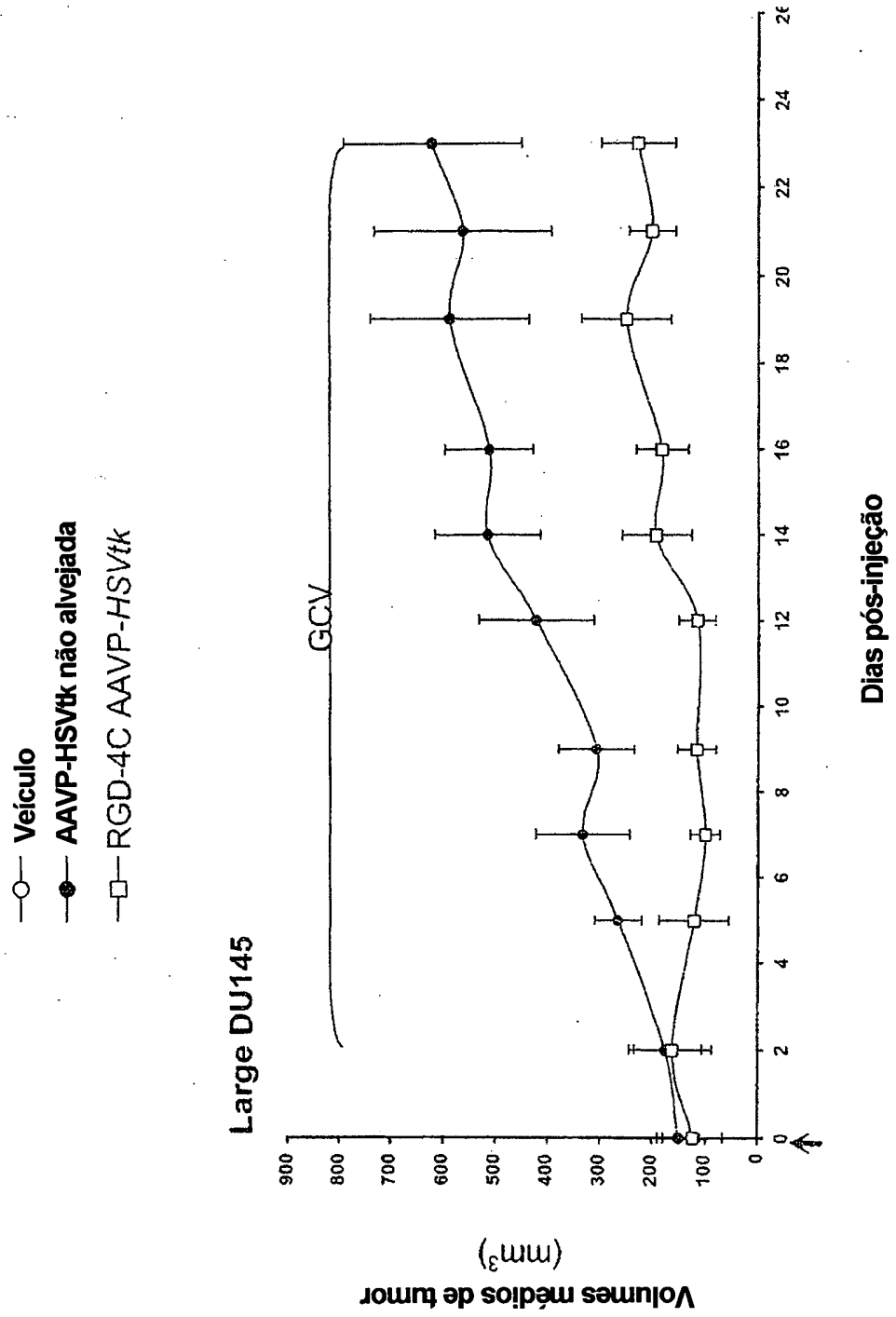


FIG. 5E

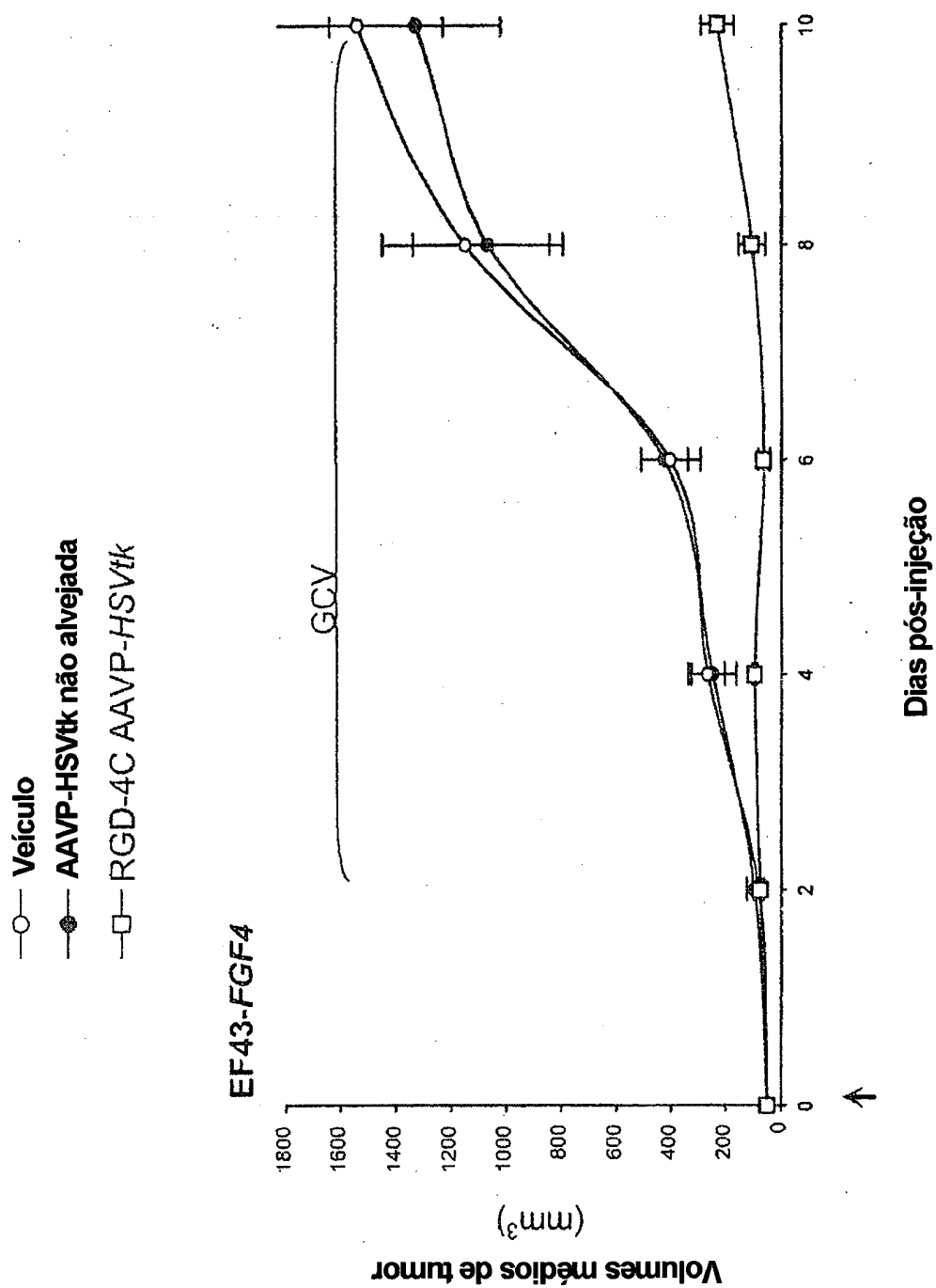


FIG. 5F

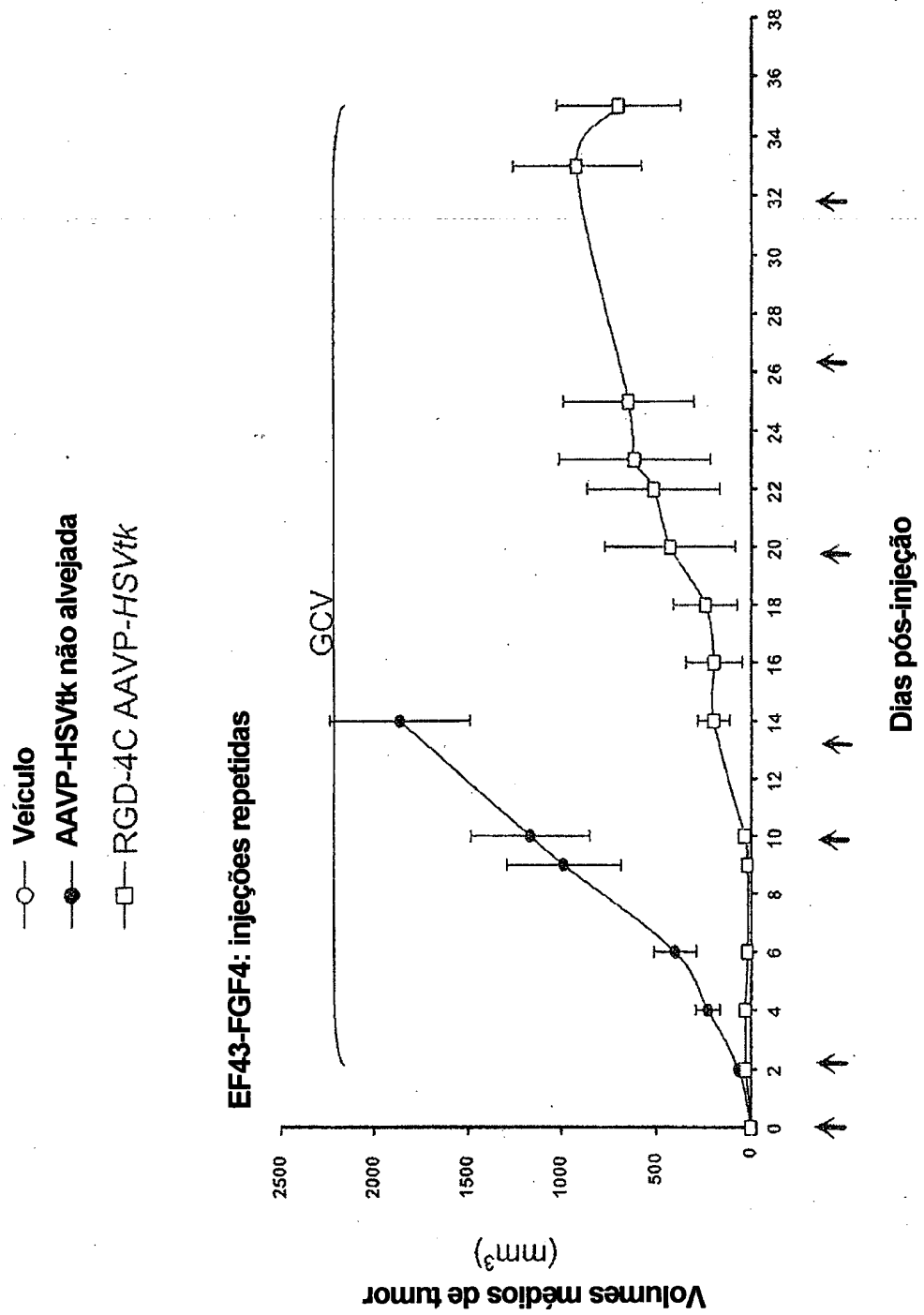


FIG. 5G

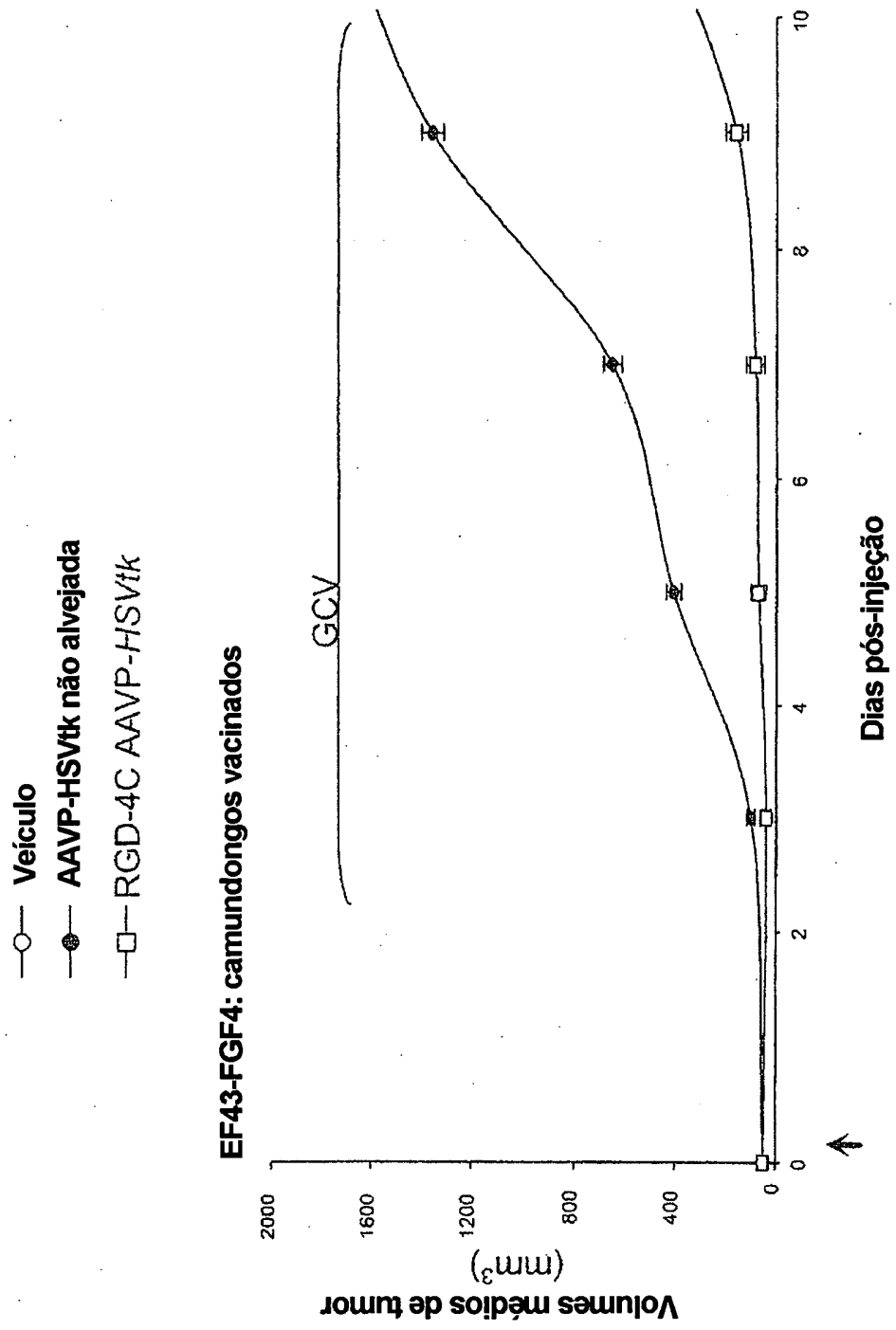


FIG. 6A

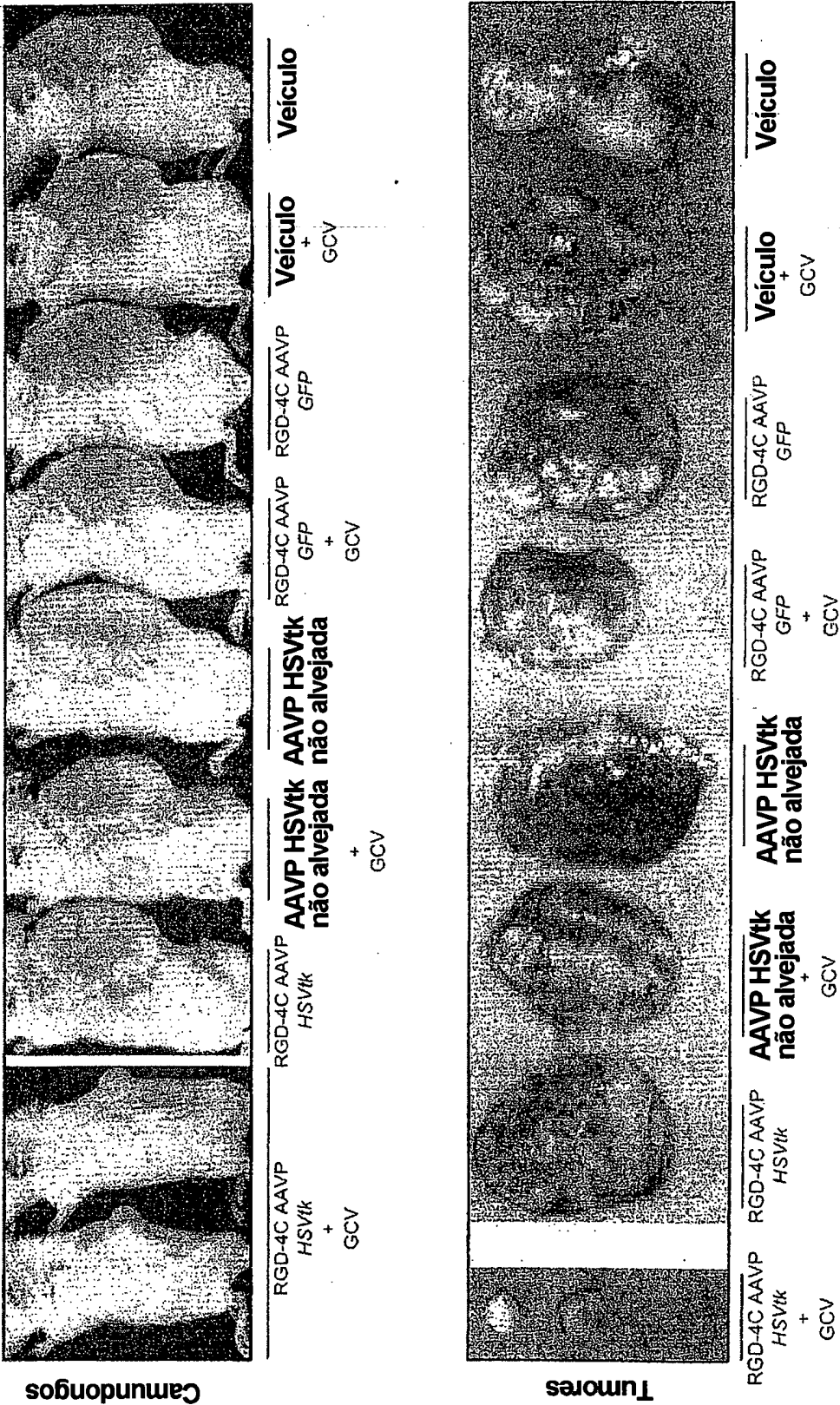


FIG. 6B

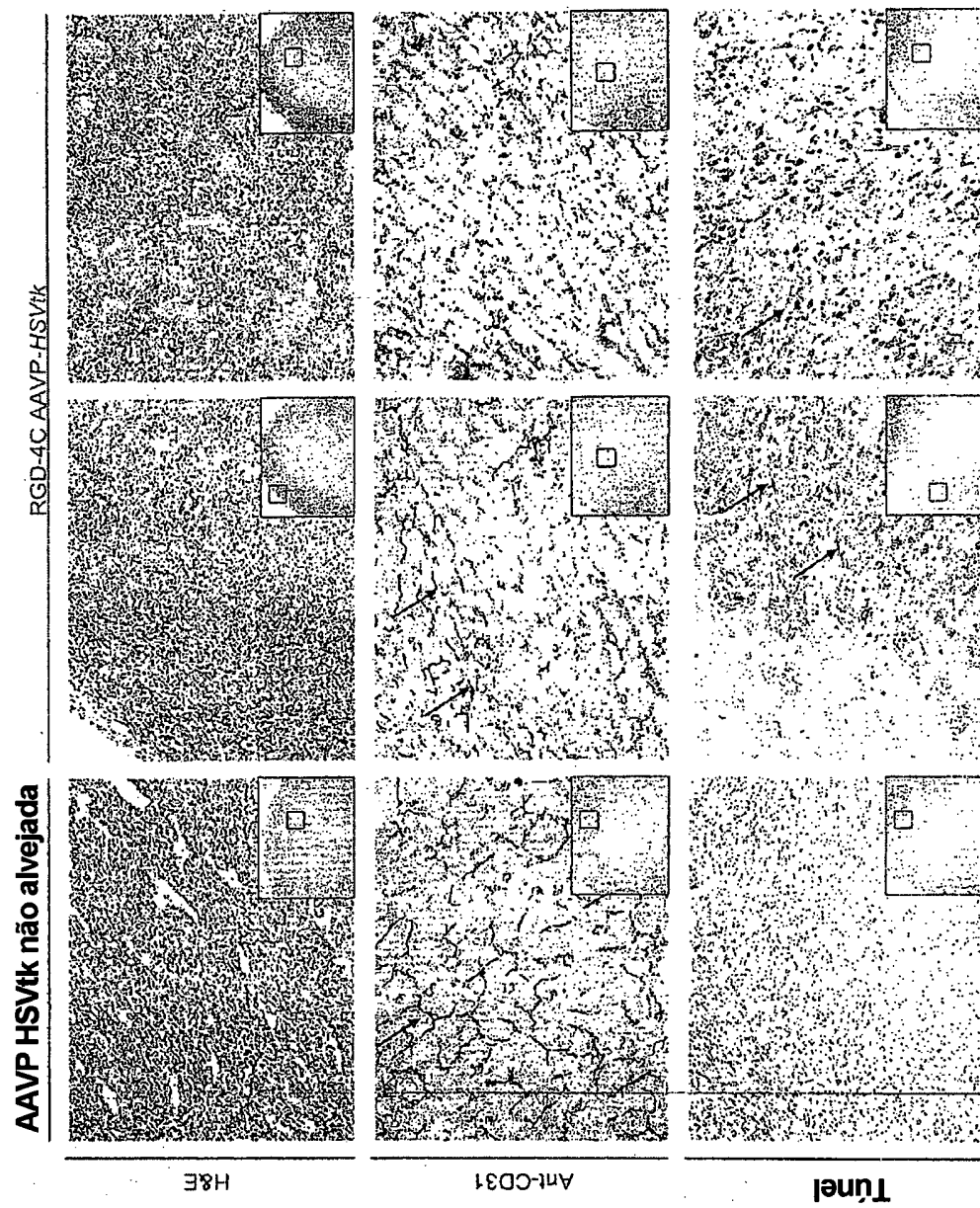
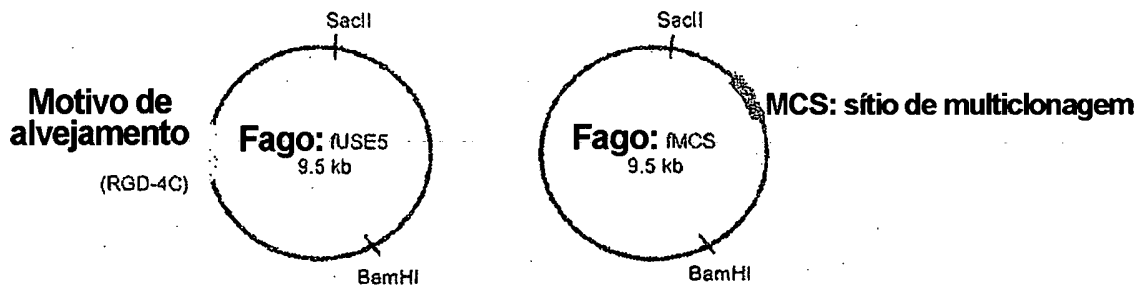
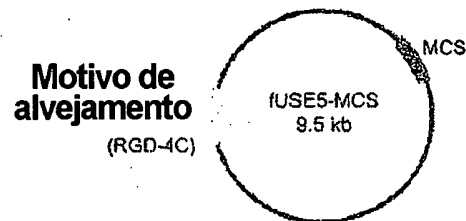


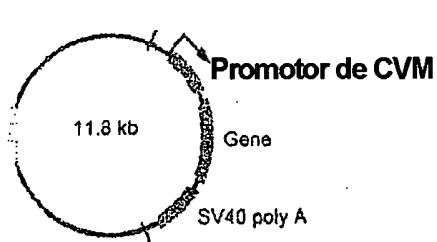
FIG. 7



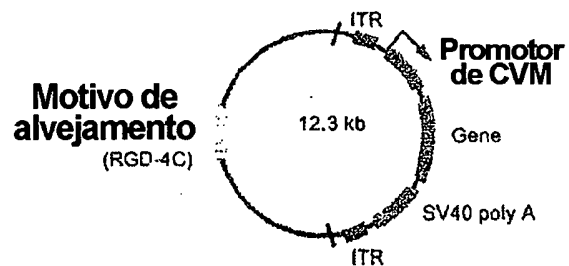
Digestão com SacII/BamHI e fragmentos de ligad



Inserção de cassete de transgene de CMV ou rAAV no MCS



Construção do fago RGD-4C



Construção do RGD-4C AAVP

FIG. 8A

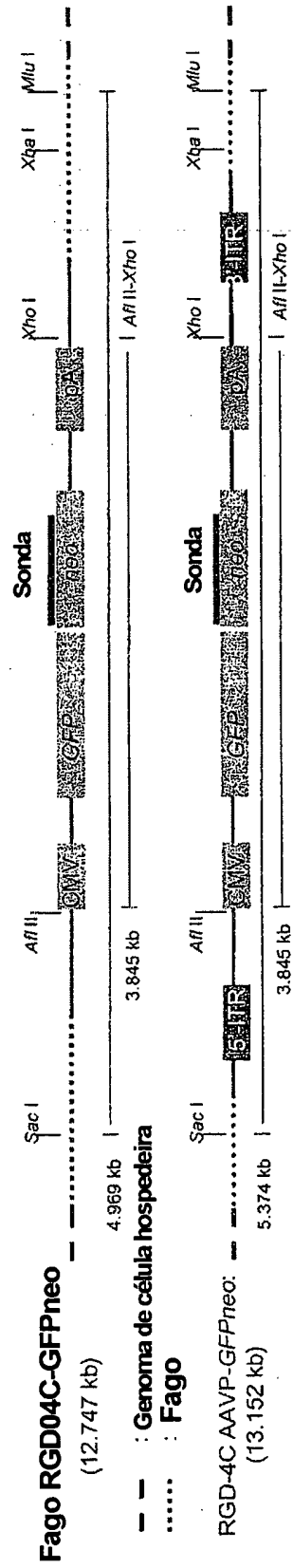


FIG. 8A (CONT.)

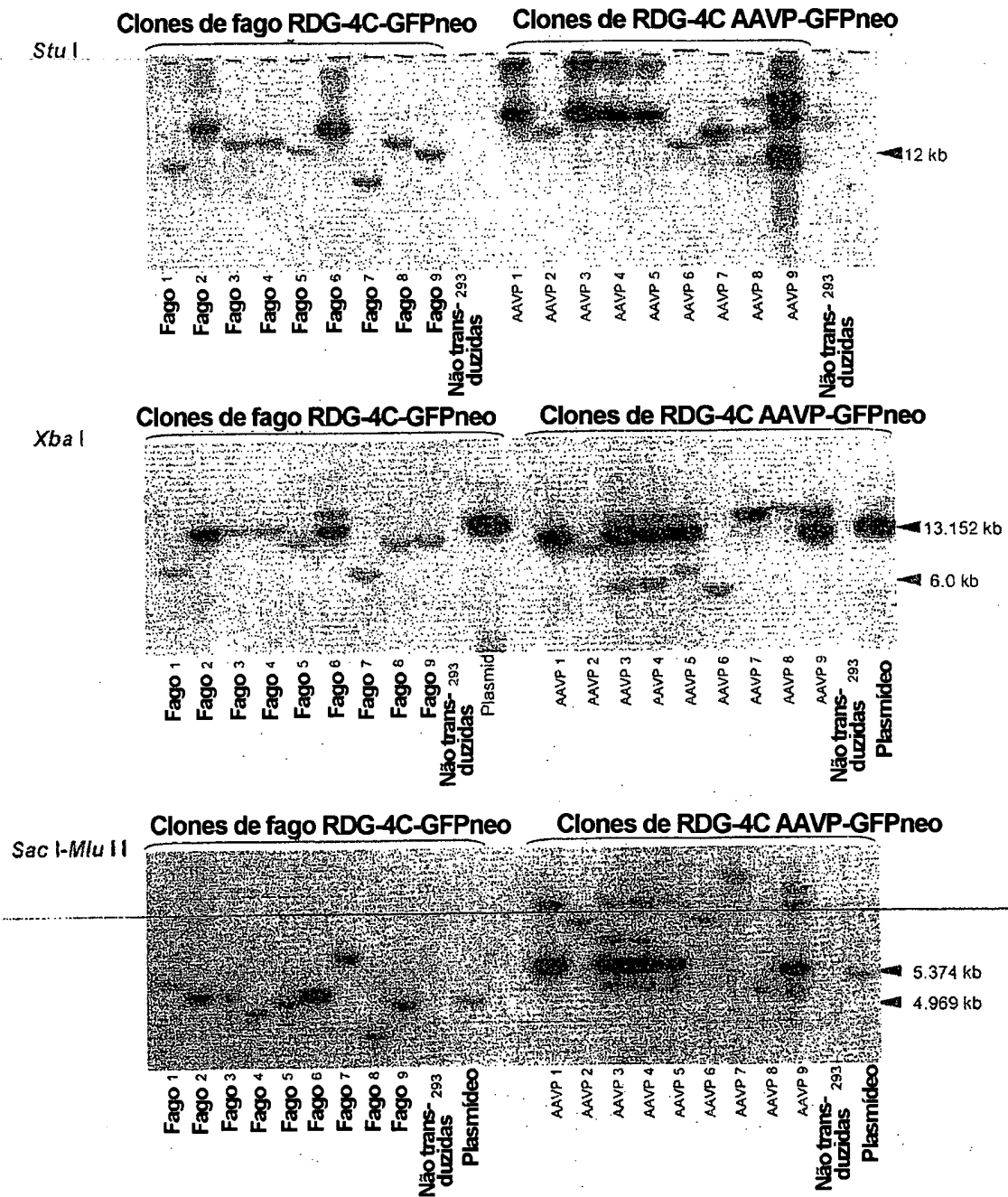


FIG. 8B

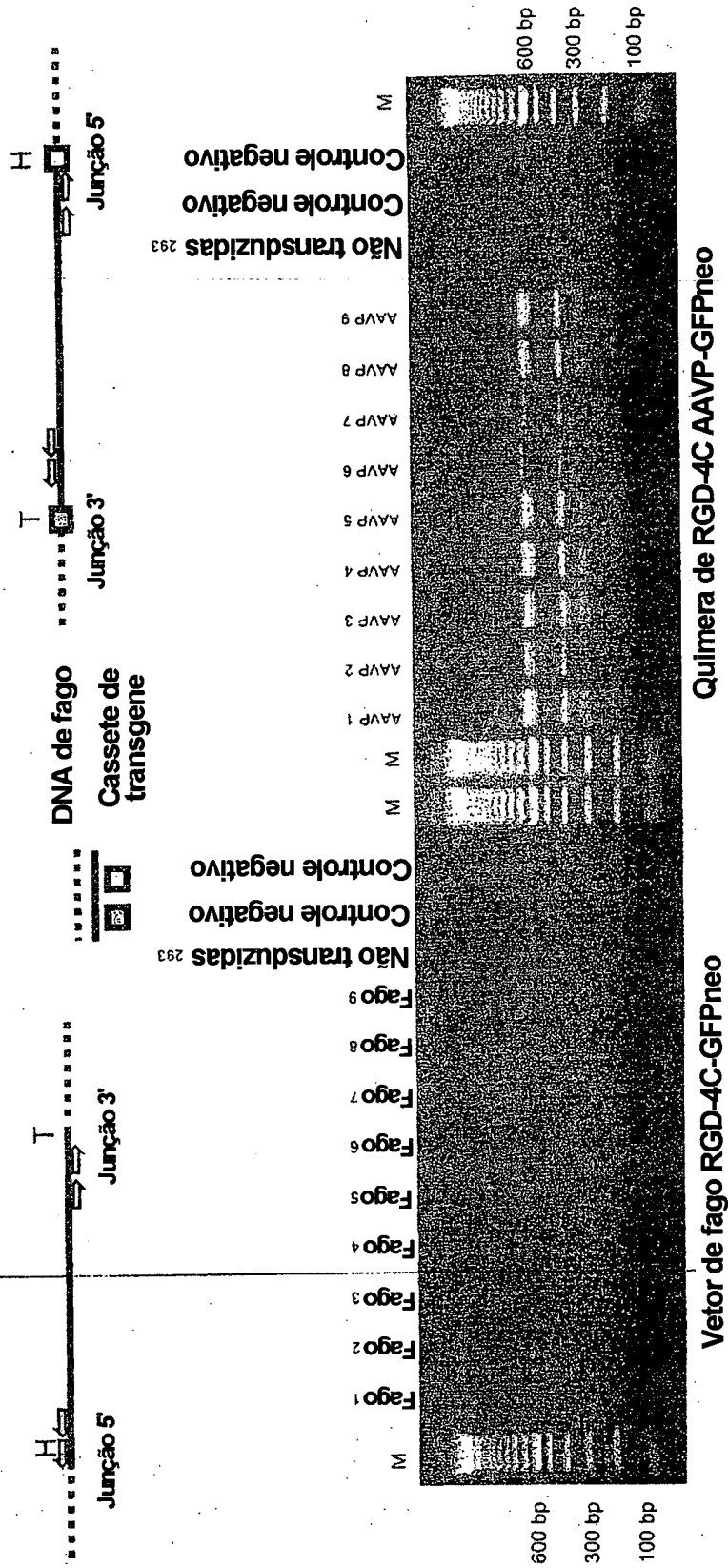
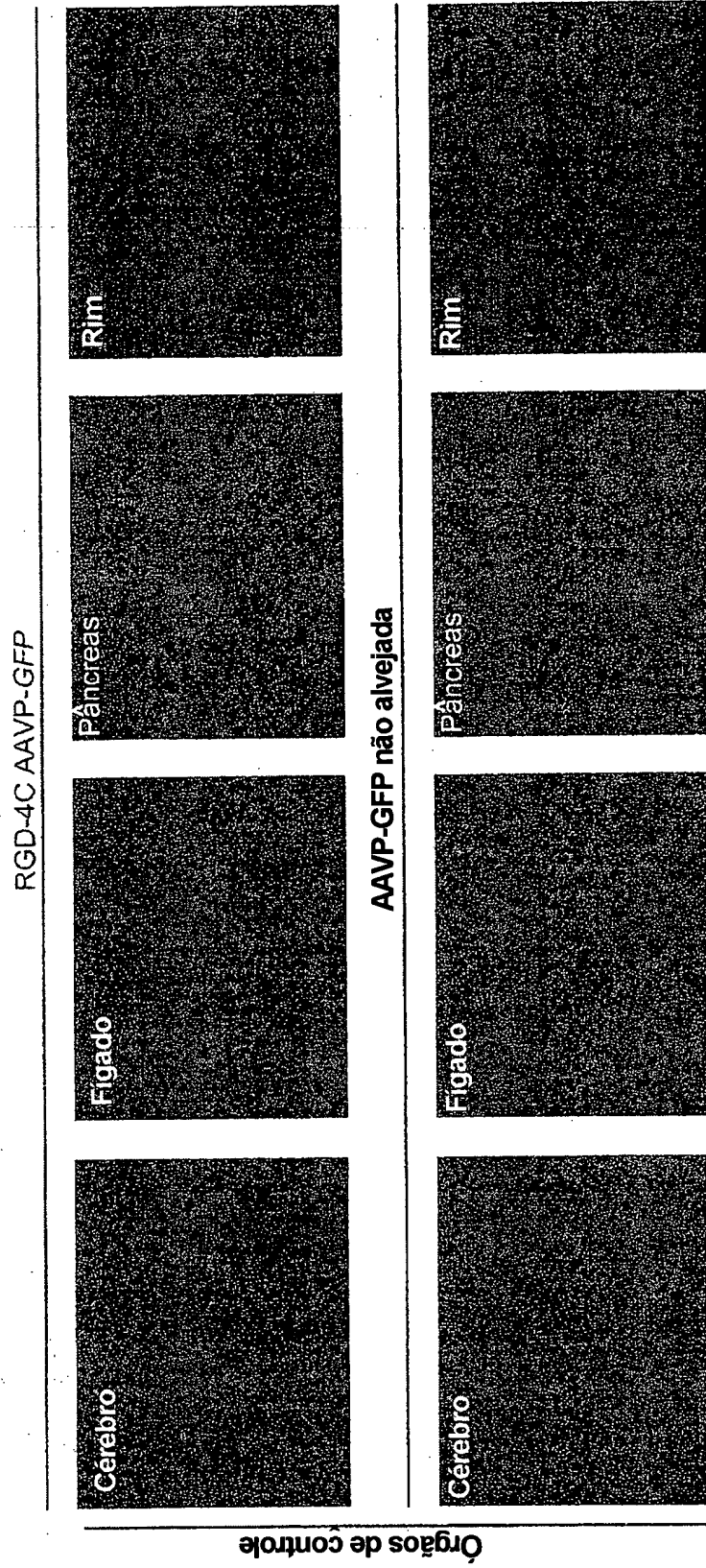


FIG. 8C

Seq No	Fonte	Sequência	3' → 5'	Perda	Comprimento
A9 múltiplo x2	Vetor de AAV-ITR de fago multi- plex, conca- tâmérico	ACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAATGAGGAAATTG CATCGCATTGTCTGAGTAGGTTCATCTATTCTGGG GGGTGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATT GGGAAGACAATAGCAIGCCATGCTCTAGGAAGATCGGA ATTGCGCCCTTAAGCTAGCTAGTTAATAATCAATTA CGGGGTCAATTAGTT...//...AATAATGACGTATGTTCCCATTA GTACGCCAA	Vetor parte 3'-I-vetor parte 5'	120 bp	322
A10 múltiplo x2	Vetor de AAV-ITR de fago multi- plex, conca- tâmérico	ACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAATGAGGAAATTG CATCGCATTGTCTGA...//...GGACTCGAGTTAAGGGC GAATTCCCGATAAGGATCTTCTCTAGAGCATGGCTACG TAGATAAGTAGCCCAITGGCTCTAGGAAGATCGGAATTCCG CCCTTAGGCTAGCTAGTTAATAATCAATTAACGGG GTCATTAGTT...//...AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAA CGCCAA	Vetor parte 3'-I-vetor parte 5'	46 bp	396

FIG. 9



Órgãos de controle

FIG. 10

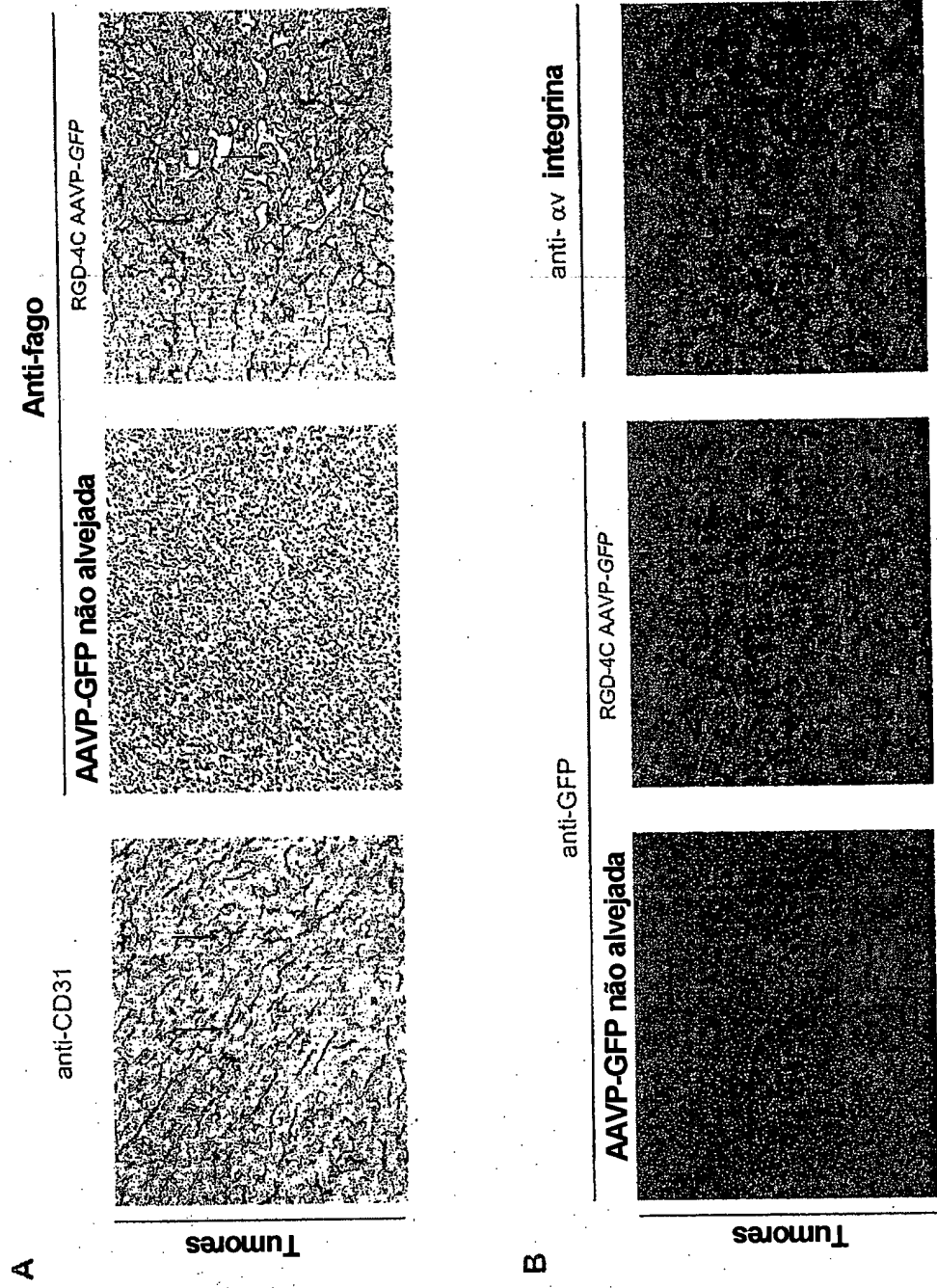
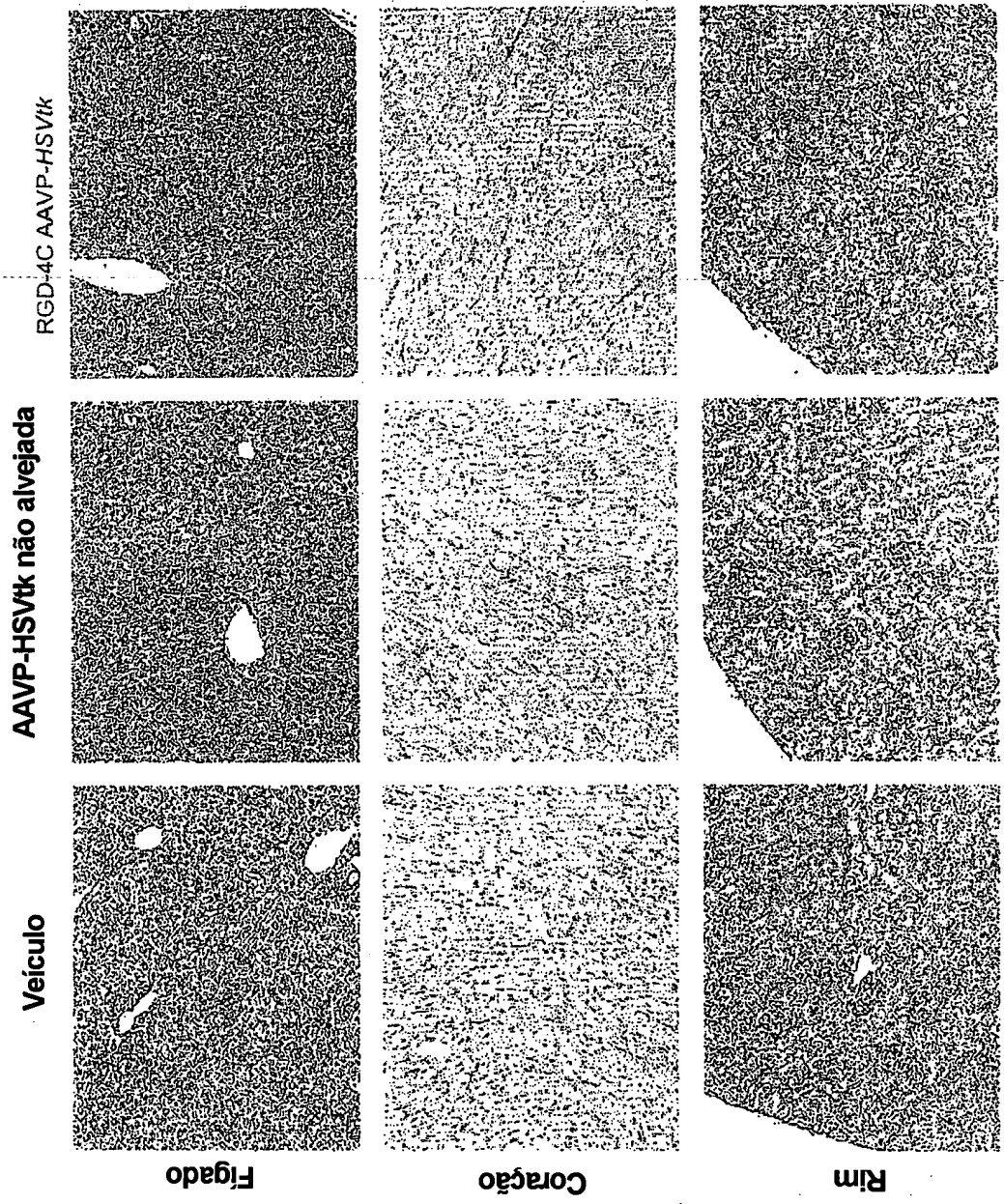


FIG. 11



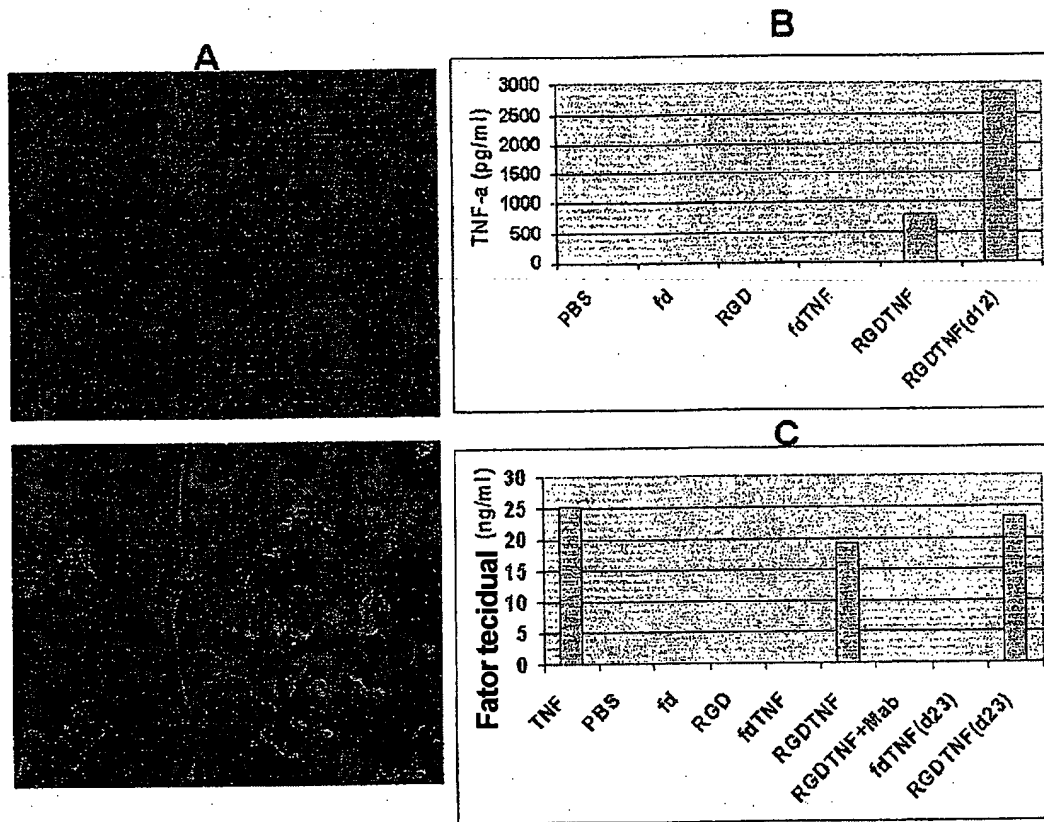
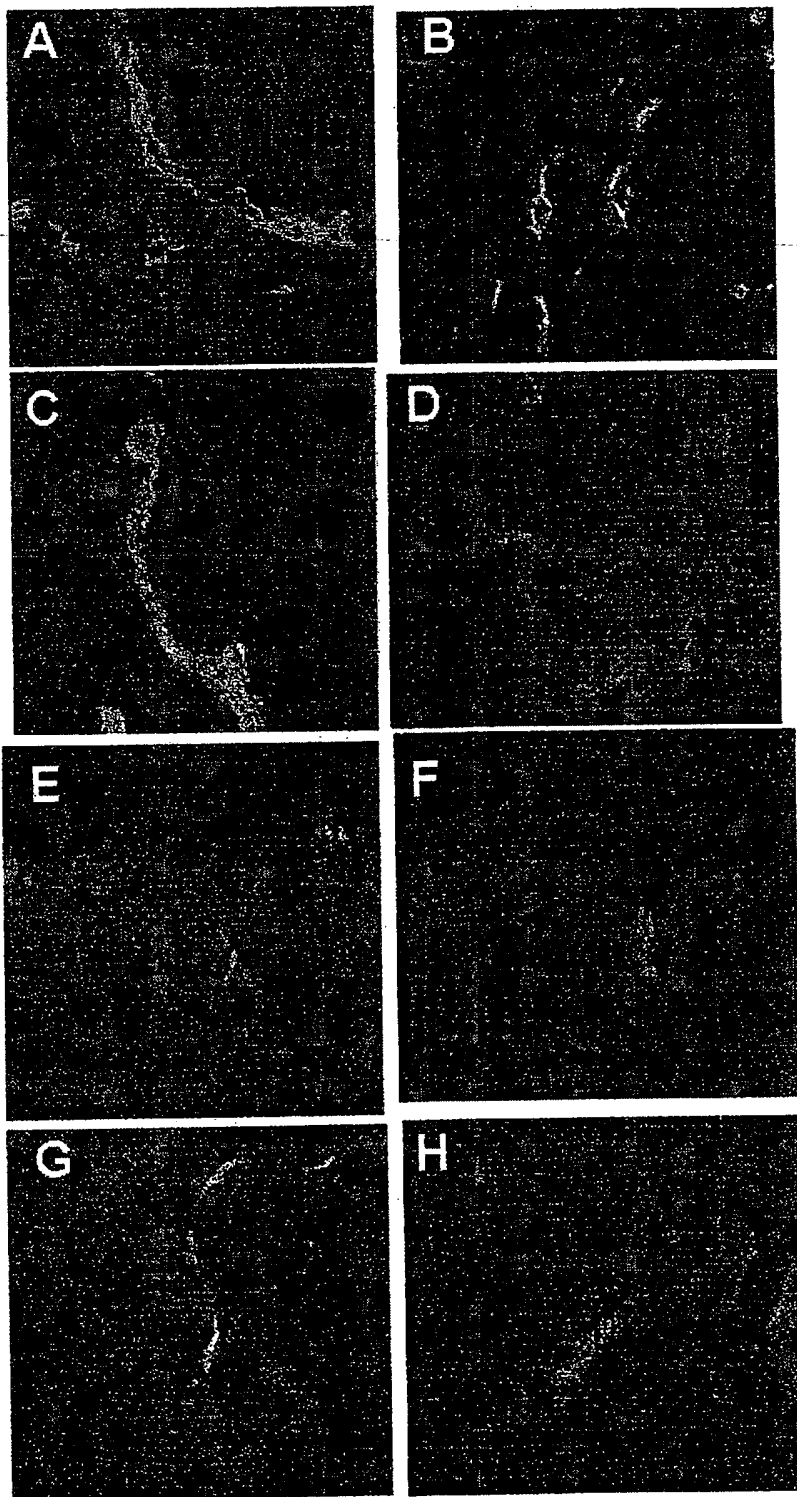
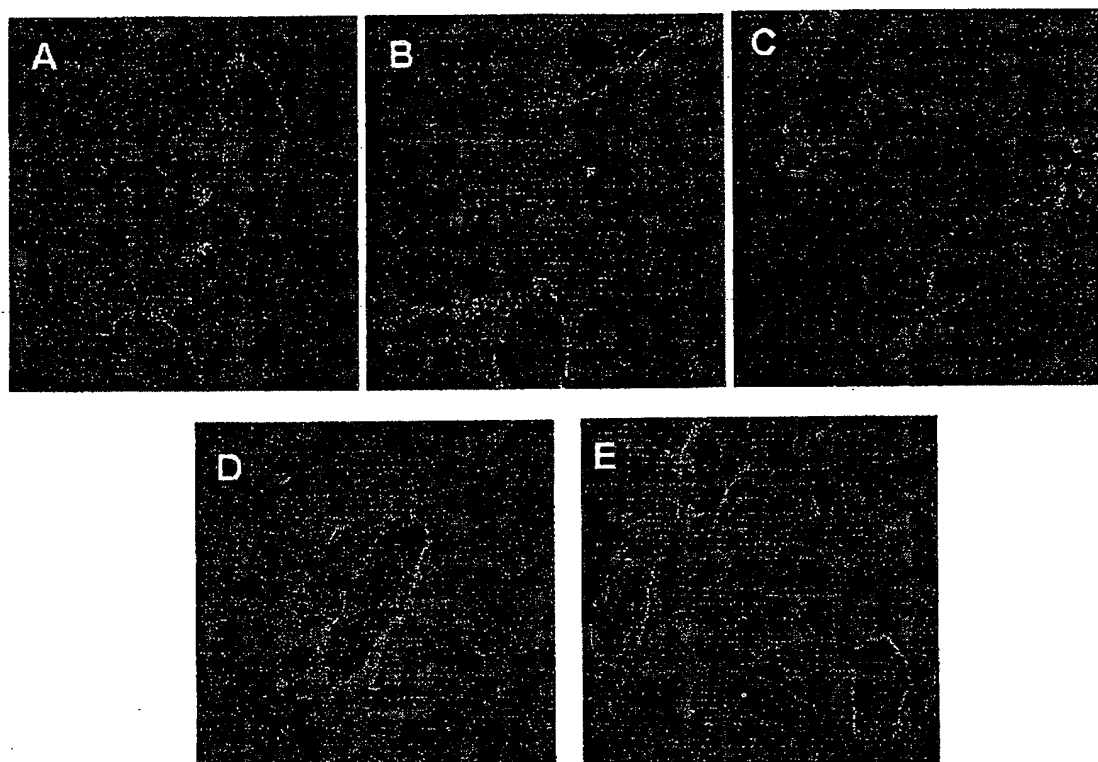
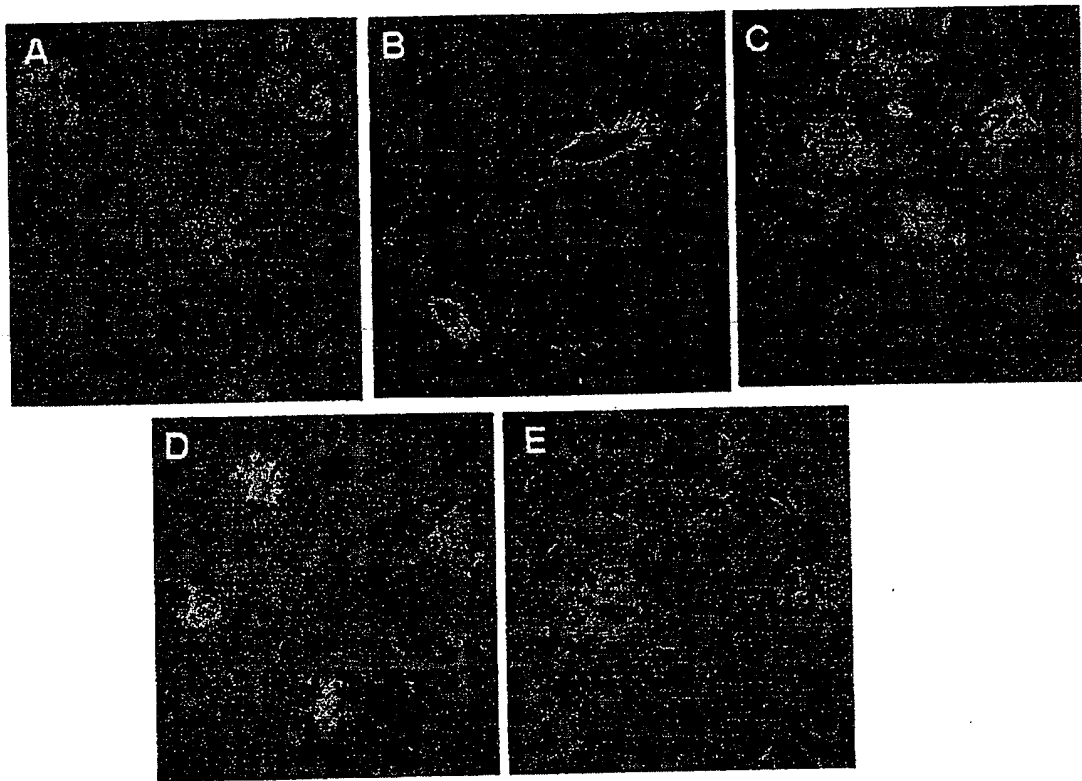


FIG. 12

**FIG. 13**

**FIG. 14**

**FIG. 15**

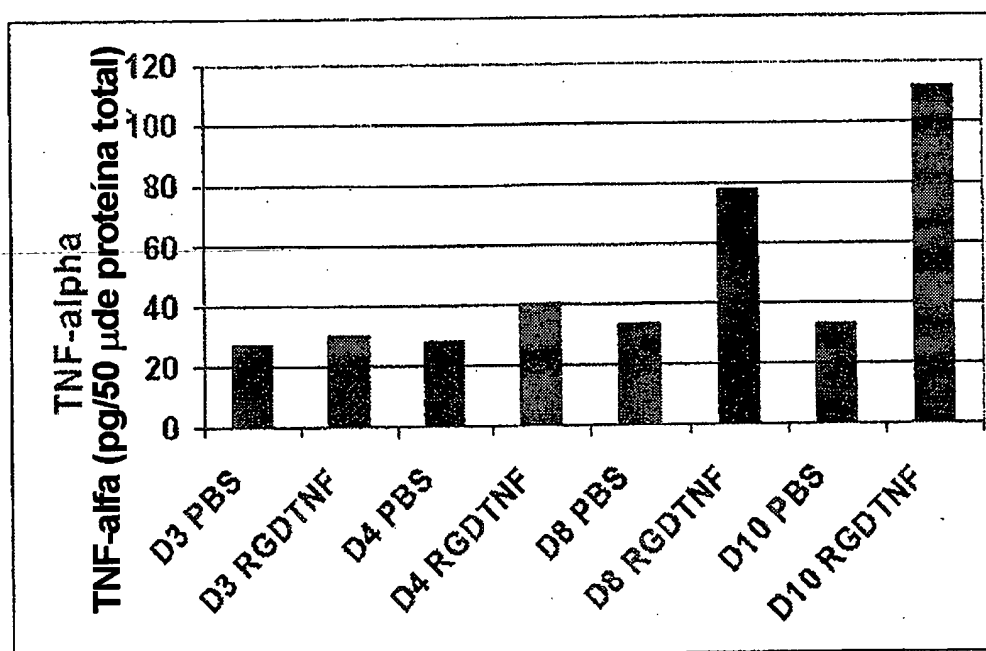


FIG. 16

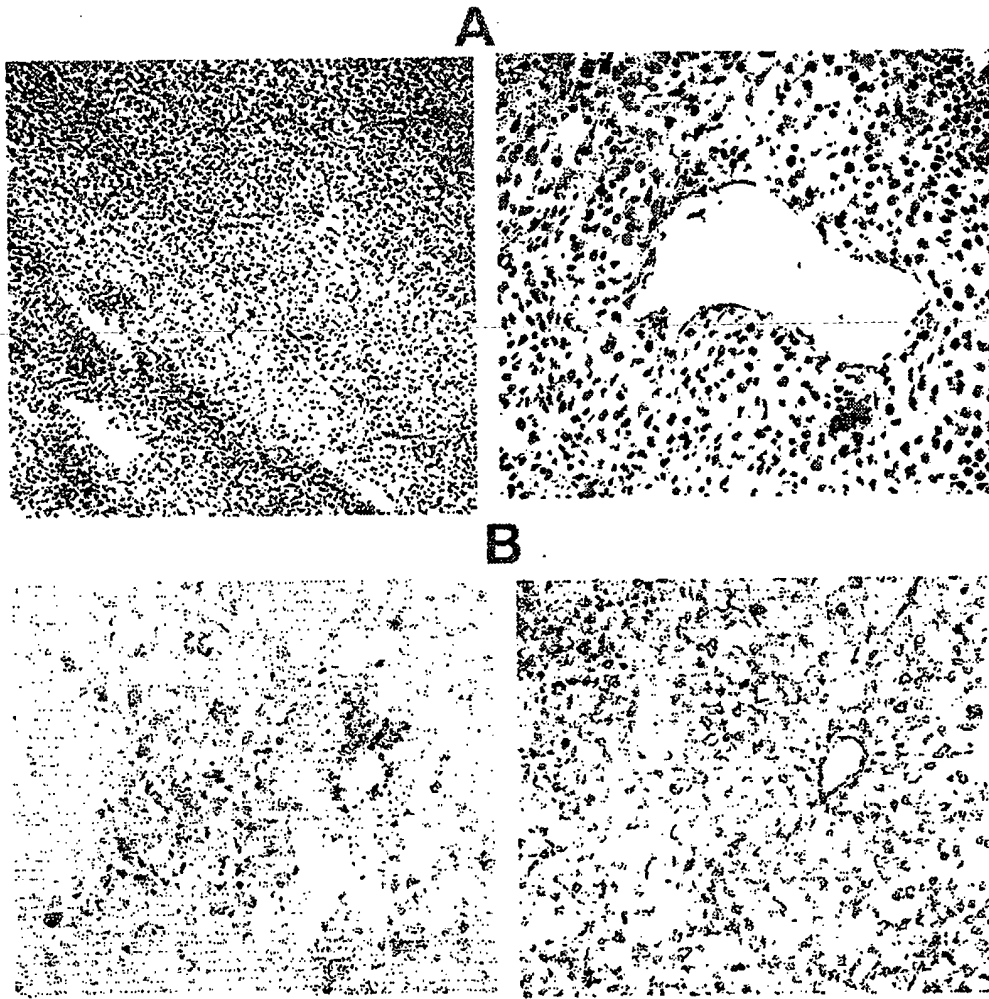


FIG. 17

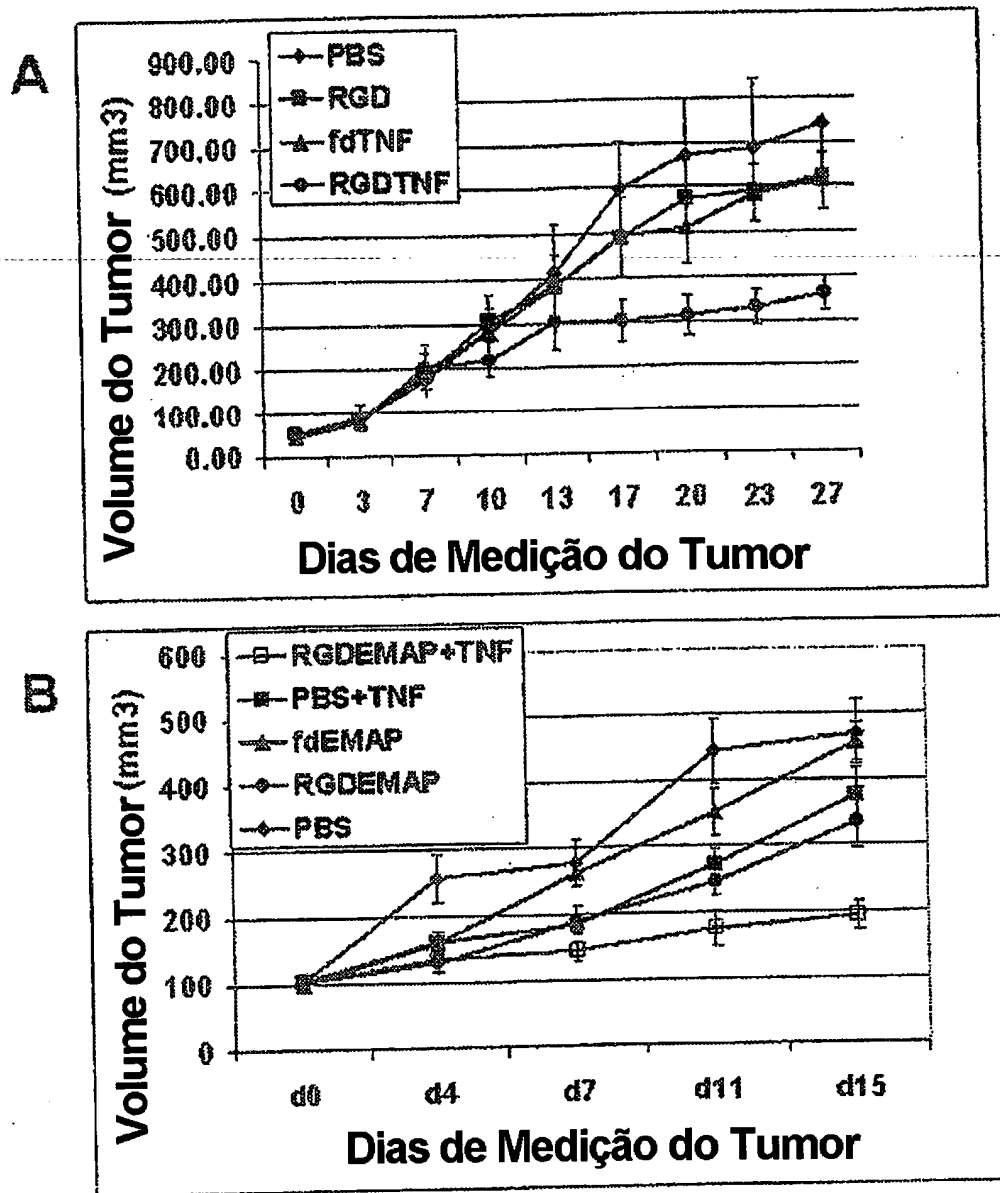


FIG. 18

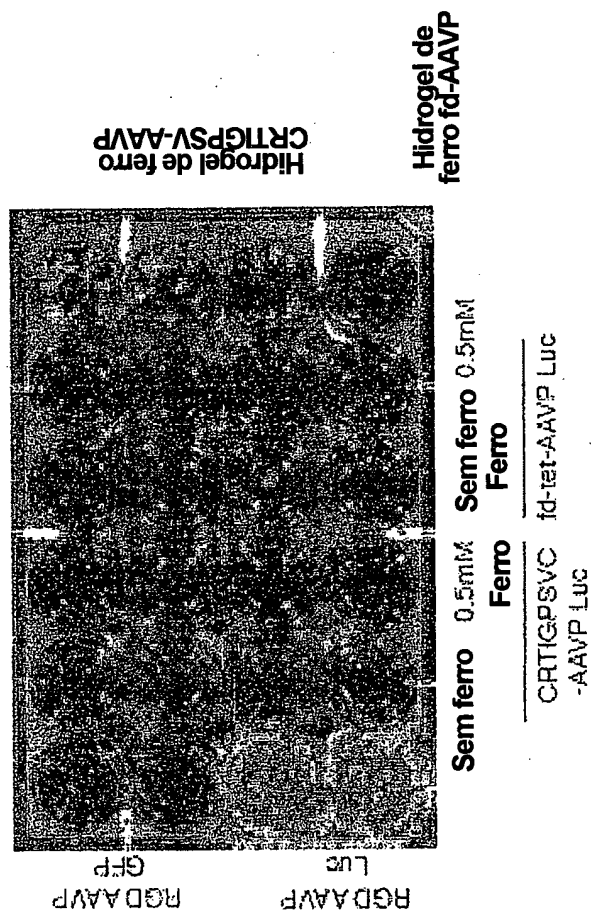
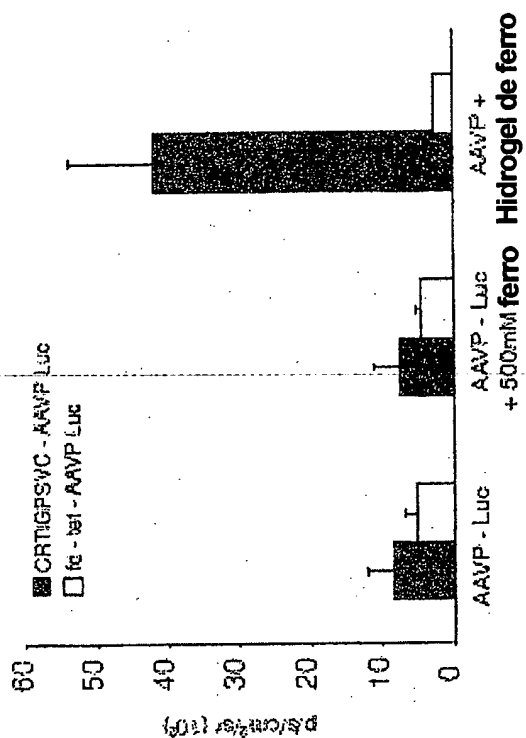


FIG. 19

RESUMO

"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES RELACIONADAS À PARTÍCULAS DE VÍRUS FAGO ADENOASSOCIADAS"

- Modalidades da invenção são geralmente direcionadas a composições e métodos
- 5 de liberação de um ou mais transgenes em uma célula alvo, tal como uma célula de tumor, em um sítio específico de maneira a alcançar expressão aprimorada e para constructo e composições úteis em tais composições. Em certos aspectos, a expressão de um ácido nucléico terapêutico pode ser acessada antes da administração de um tratamento ou procedimento de diagnóstico em um paciente.
-

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um AAVP terapêutico codificando um repórter **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratar uma condição patológica ou doença, em que a expressão, *in situ*, do AAVP terapêutico é calculada em um tecido ou célula
5 alvo de um indivíduo por detecção do repórter codificado ou atividade do repórter.
2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o medicamento compreende um segundo AAVP se a expressão do primeiro AAVP terapêutico não é expressa em um nível terapeuticamente eficaz.
3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o
10 cálculo da expressão do AAVP é por uma detecção não invasiva do repórter ou de uma atividade do repórter.
4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o repórter é uma proteína terapêutica.
5. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a
15 proteína terapêutica é uma enzima conversora de pró-medicamento.
6. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o repórter é uma enzima.
7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a enzima é uma quinase.
8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a
20 quinase é uma timidina quinase.
9. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a quinase modifica um composto detectável.
10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a
25 marca detectável é detectada por fluorescência, químio-luminescência, espectroscopia Raman intensificada pela superfície (SERS), imagem por ressonância magnética (MRI), tomografia computadorizada (CT), e tomografia por emissão de pósitrons (PET).
11. Uso, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o composto marcado detectável é um análogo de nucleosídeo.
12. Uso, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o
30 composto marcado detectável é: fluorodeoxiglicose (FDG); 2'-flúor-2'-deoxi-1beta-D-arabionofuranosil-5-etil-uracil (FEAU); 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodo-1β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodo-1β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodo-1β-D-arabinofuranosil-uracil, 5-[¹⁸F]-2'-flúor-5-flúor-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 2-[¹¹I] e 5-([¹¹C]-metil)-2'-flúor-5-
35 metil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 2-[¹¹C]-2'-flúor-5-etil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-([¹¹C]-etil)-2'-flúor-5-etil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-(2-[¹⁸F]-etil)-2'-flúor-5-(2-flúor-etil)-1-β-D-arabinofuranosil-uracil, 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-

flúor-5-iodovinil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodo-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodo-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodo-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-ribofuranosil-uracil; ou 9-4-[¹⁸F]flúor-3-(hidroximetil)butil]guanina.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o marcação detectável compreende um ¹⁸F, ²⁷⁷Ac, ²¹¹At, ¹²⁸Ba, ¹³¹Ba, ⁷Be, ²⁰⁴Bi, ²⁰⁵Bi, ²⁰⁶Bi, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ⁸²Br, ¹⁰⁹Cd, ⁴⁷Ca, ¹¹C, ¹⁴C, ³⁶Cl, ⁴⁸Cr, ⁵¹Cr, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁶⁵Dy, ¹⁵⁵Eu, ¹⁵³Gd, ⁶⁶Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²Ga, ¹⁹⁸Au, ³H, ¹⁶⁶Ho, ¹¹¹In, ¹¹³In, ¹¹⁵In, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁹Ir, ¹⁹¹Ir, ¹⁹²Ir, ¹⁹⁴Ir, ⁵²Fe, ⁵⁵Fe, ⁵⁹Fe, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵O, ¹⁹¹Os, ¹⁰⁹Pd, ³²P, ³³P, ⁴²K, ²²⁶Ra, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁸²Rb, ¹⁵³Sm, ⁴⁶Sc, ⁴⁷Sc, ⁷²Se, ⁷⁵Se, ¹⁰⁵Ag, ²²Na, ²⁴Na, ⁸⁹Sr, ³⁵S, ³⁸S, ¹⁷⁷Ta, ⁹⁶Tc, ^{99m}Tc, ²⁰¹Tl, ²⁰²Tl, ¹¹³Sn, ^{117m}Sn, ¹²¹Sn, ¹⁶⁶Yb, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ⁶²Zn ou ⁶⁵Zn.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a marcação detectável é uma marcação de ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹¹¹I, ^{99m}Tc, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ³²P, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Ga, ²⁰¹Tl, ⁷⁷Br ou ¹⁸F.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o AAVP compreende uma porção que seletivamente atinge um tecido ou célula alvo para tratamento.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a porção é codificada por uma proteína de capsídeo do AAVP.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato da proteína da superfície ser proteína de capsídeo recombinante.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato da proteína de capsídeo recombinante compreender um peptídeo alvo.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato do peptídeo alvo ser um peptídeo cíclico.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato do peptídeo alvo ser um peptídeo linear.

21. Uso, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato do peptídeo alvo se ligar seletivamente à célula expressando uma integrina sobre a superfície da célula.

22. Uso, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a integrina é uma integrina αvβ3 ou αvβ5.

23. Uso, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADO** pelo fato do peptídeo compreender um motivo RGD.

24. Uso, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato do peptí-

deo se ligar seletivamente à célula expressando um receptor de transferrina.

25. Uso, de acordo com a reivindicação 24, **CHARACTERIZADO** pelo fato do peptídeo compreender uma sequência de aminoácido compreendendo CRTIGPSVC.

26. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato do indivíduo possuir, ser suspeito de possuir, ou em risco desenvolver uma doença hiperproliferativa.

27. Uso, de acordo com a reivindicação 26, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a doença hiperproliferativa é fibrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, câncer gástrico, câncer esofágico, câncer retal, câncer pancreático, câncer ovariano, câncer de próstata, câncer uterino, câncer na cabeça e pescoço, câncer de pele, câncer no cérebro, carcinoma de células escamosas, carcinoma da glândula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de célula renal, hepatoma, carcinoma do ducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrional, tumor de Wilm, câncer cervical, câncer testicular, carcinoma de pequenas células do pulmão, carcinoma de células pulmonares não pequenas, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, ou sarcoma Kaposi.

28. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que gene repórter é operativamente acoplado a um promotor seletivo de tecido ou célula, ou um promotor específico de tecido ou célula.

29. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a expressão avaliada compreende a administração de uma marcação que está seletivamente metabolizada por uma expressão celular de ácido nucléico AAVP.

30. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o AAVP terapêutico codifica um segundo agente terapêutico.

31. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o segundo agente terapêutico é enzima de conversão supressora de tumor, inibidora de RNA, inibidora de DNA ou enzima conversora de pró-medicação.

32. Ácido nucléico de AAVP terapêutico, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um segmento de ácido nucléico compreendendo RNA inibitório e DNA inibitório.

33. Ácido nucléico, de acordo com a reivindicação 32, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o RNA inibitório é um siRNA, miRNA ou RNA anti-senso.

34. Partícula de fago, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende ácido nucléico de AAVP, conforme definido na reivindicação 32.

35. Partícula de fago, de acordo com a reivindicação 34, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende adicionalmente um ligante alvo.

36. Método para modulação da expressão de um gene, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a administração de um ácido nucleico AAVP, conforme definido na reivindicação 25.

37. Método de detecção de transferência de gene e expressão em um tecido alvo de um indivíduo hospedeiro, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) levar ao tecido alvo do indivíduo hospedeiro um vetor AAVP contendo gene repórter presente não naturalmente no indivíduo hospedeiro, em que o gene repórter é selecionado a partir do grupo que consiste em tipo selvagem, mutante ou gene do Vírus do Herpes Simples-timidina quinase (HSV) geneticamente modificado, ou timidina quinase tipo 2, e onde o vetor de transferência é introduzido às células do tecido alvo, e o gene repórter é expresso nas células do tecido alvo, de modo a gerar um produto de gene repórter (proteína) a qual acumula somente nas células efetivamente transfectadas pelo vetor AAVP;

(b) administrar ao indivíduo hospedeiro um substrato repórter marcado onde células expressando o produto do gene repórter da etapa (a) metabolizam o substrato repórter marcado para produzir um metabólito repórter marcado onde o substrato repórter marcado compreende um análogo de nucleosídeo radiomarcado; e

(c) visualizar não-invasivamente o tecido ou célula alvos marcados contendo o metabólito marcado do substrato repórter depois da liberação do substrato repórter residual não metabolizado pelo produto do gene repórter a partir do referido indivíduo hospedeiro de modo a prover detecção da transferência de gene e expressão no tecido alvo.

38. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor AAVP é introduzido às células do tecido alvo por transfecção (ou transdução) in vitro ou in vivo.

39. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o substrato repórter é marcado com um radioisótopo adequado para visualização por tomografia de emissão de pósitron, câmera gama, ou tomografia computadorizada por emissão de fóton único.

40. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o substrato e metabólito repórteres do substrato repórter são compostos contendo nuclídeo isótopo-estável selecionado a partir do grupo que consiste em ^2H , ^{13}C , ^{15}N e ^{19}F .

41. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o metabólito do substrato repórter marcado é visualizado por tomografia por emissão de pósitron.

42. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o metabólito do substrato repórter marcado é visualizado por câmera gama ou tomografia

computadorizada por emissão de fóton único.

43. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o metabólito do substrato repórter marcado é visualizado por imagens por ressonância magnética.

5 44. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor AAVP incorpora o gene repórter e o promotor de transcrição adequado e elementos potenciadores, certificando-se de que o tecido específico, fator específico de transcrição, ou transdução-específica de sinal sofrerão ativação transcricional do repórter e co- expressão do gene terapêutico.

10 45. Uso, de acordo com a reivindicação 44, **CARACTERIZADO** pelo fato de que, através do uso do vetor AAVP, as células (ou a célula) são transfectadas com o gene repórter e o promotor de transcrição adequado e os elementos potenciadores *ex vivo* (*in vitro*) antes da administração das células (ou da célula) ao indivíduo hospedeiro.

15 46. Método, de acordo com a reivindicação 37, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o análogo de 2'-flúor-nucleosídeo marcado é 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodo-1β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodo-1β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodo-1β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹⁸F]-2'-flúor-5-flúor-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 2-[¹¹I]- e 5-([¹¹C]-metil)-2'-flúor-5-metil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 2-[¹¹C]-2'-flúor-5-etil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-([¹¹C]-etil)-2'-flúor-5-etil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-(2-[¹⁸F]-etil)-2'-flúor-5-(2-flúor-etil)-1-β-D-arabinofuranosil-uracil, 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-arabinofuranosil-uracil; 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodo-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodo-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodo-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²³I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹²⁴I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-ribofuranosil-uracil; 5-[¹³¹I]-2'-flúor-5-iodovinil-1-β-D-ribofuranosil-uracil; ou 9-4-[¹⁸F] flúor-3-(hidroximetil)butil]guanina.

20

25

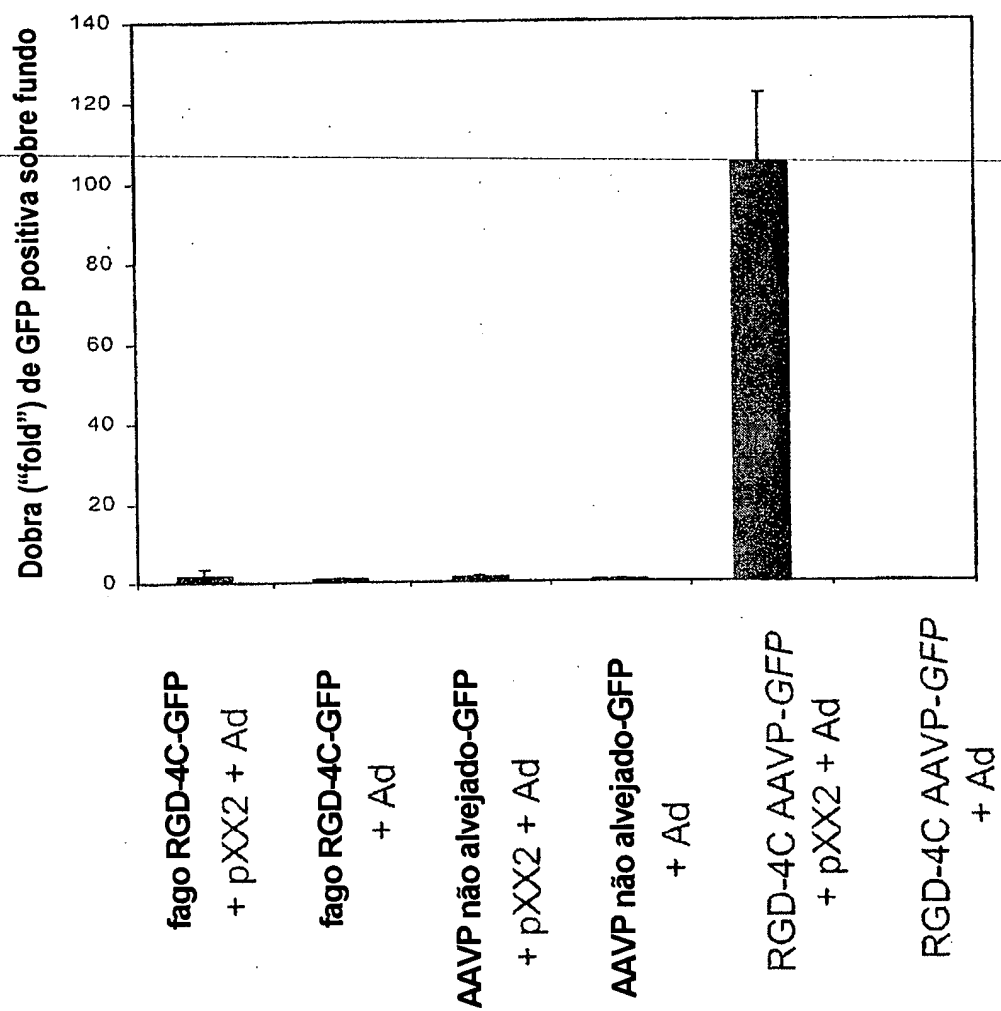


FIG. 1E

FIG. 3A

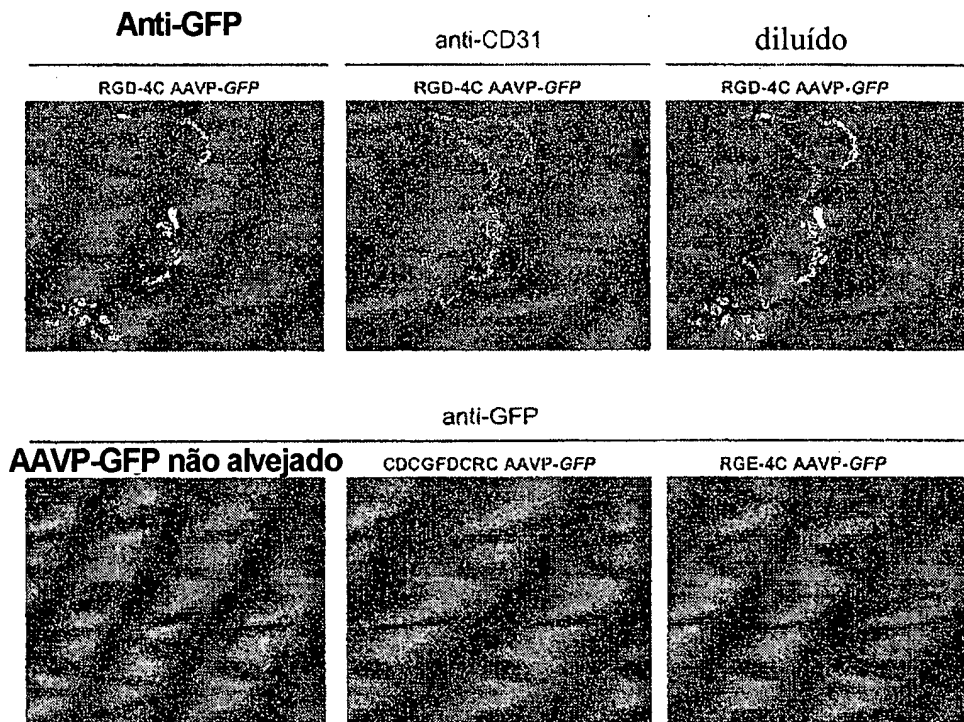
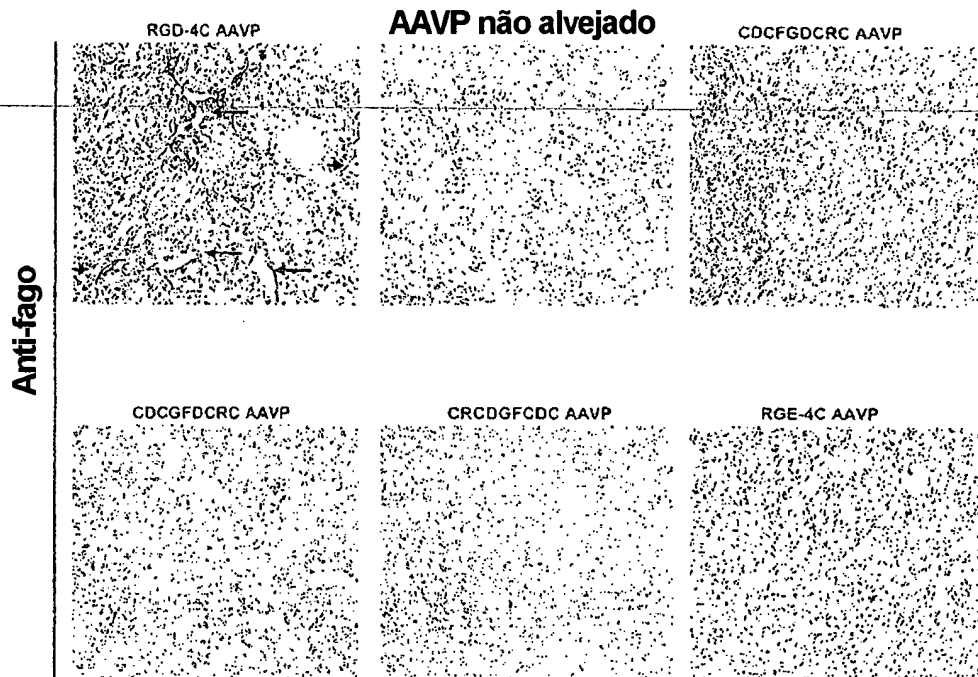
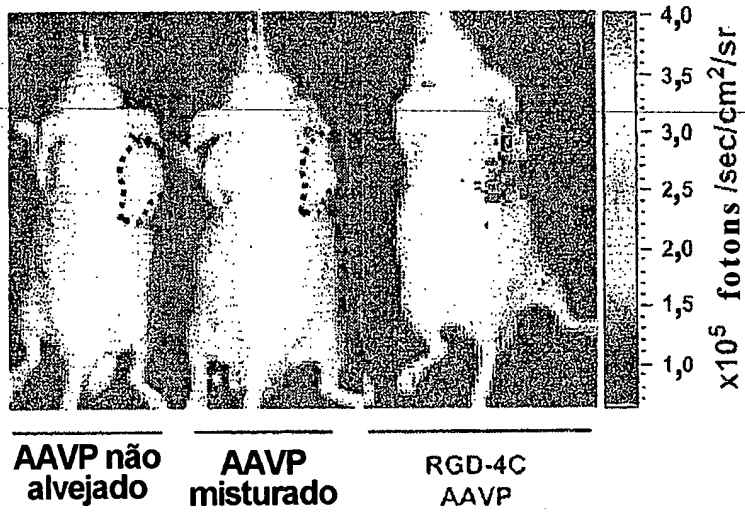


FIG. 3B

FIG. 4A



FDG

FEAU

FEAU

FDG

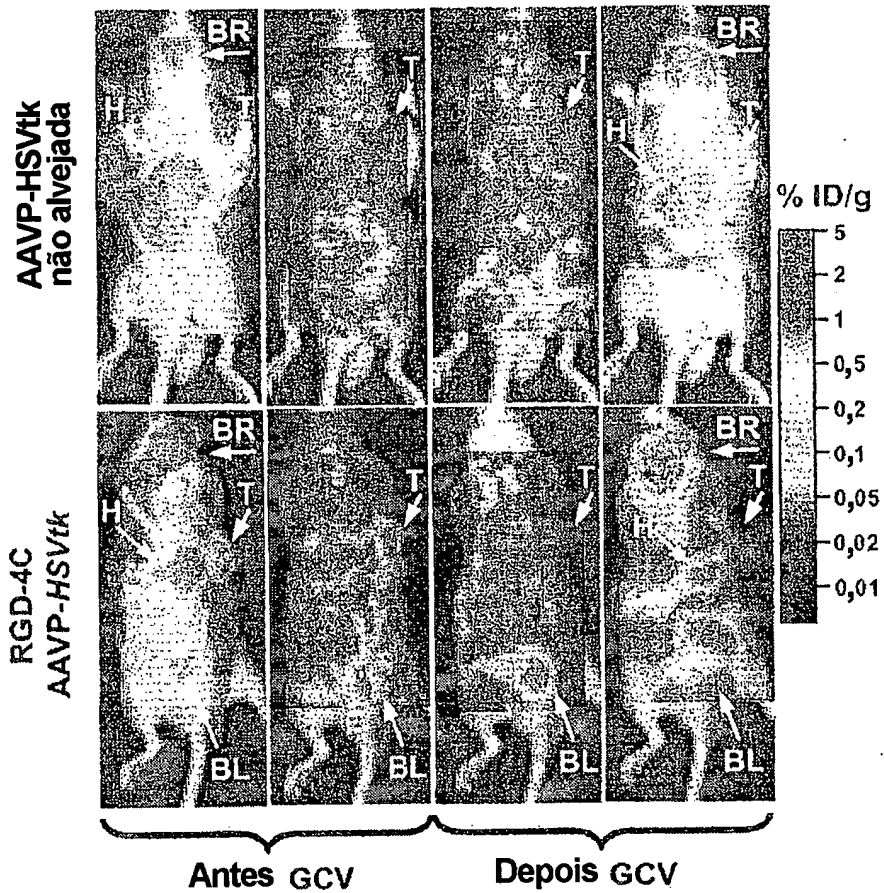


FIG. 4B

FIG. 5A

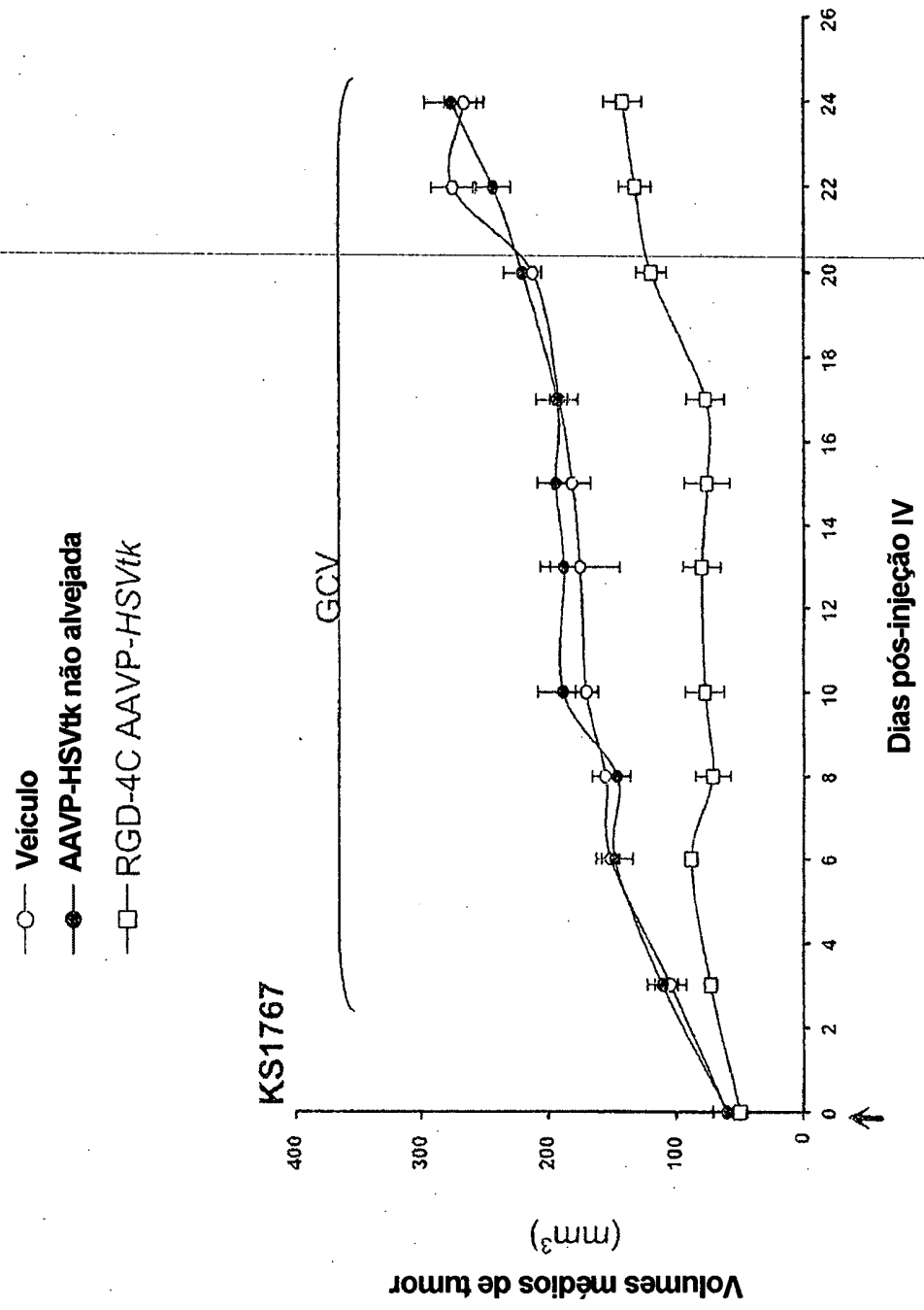


FIG. 5B

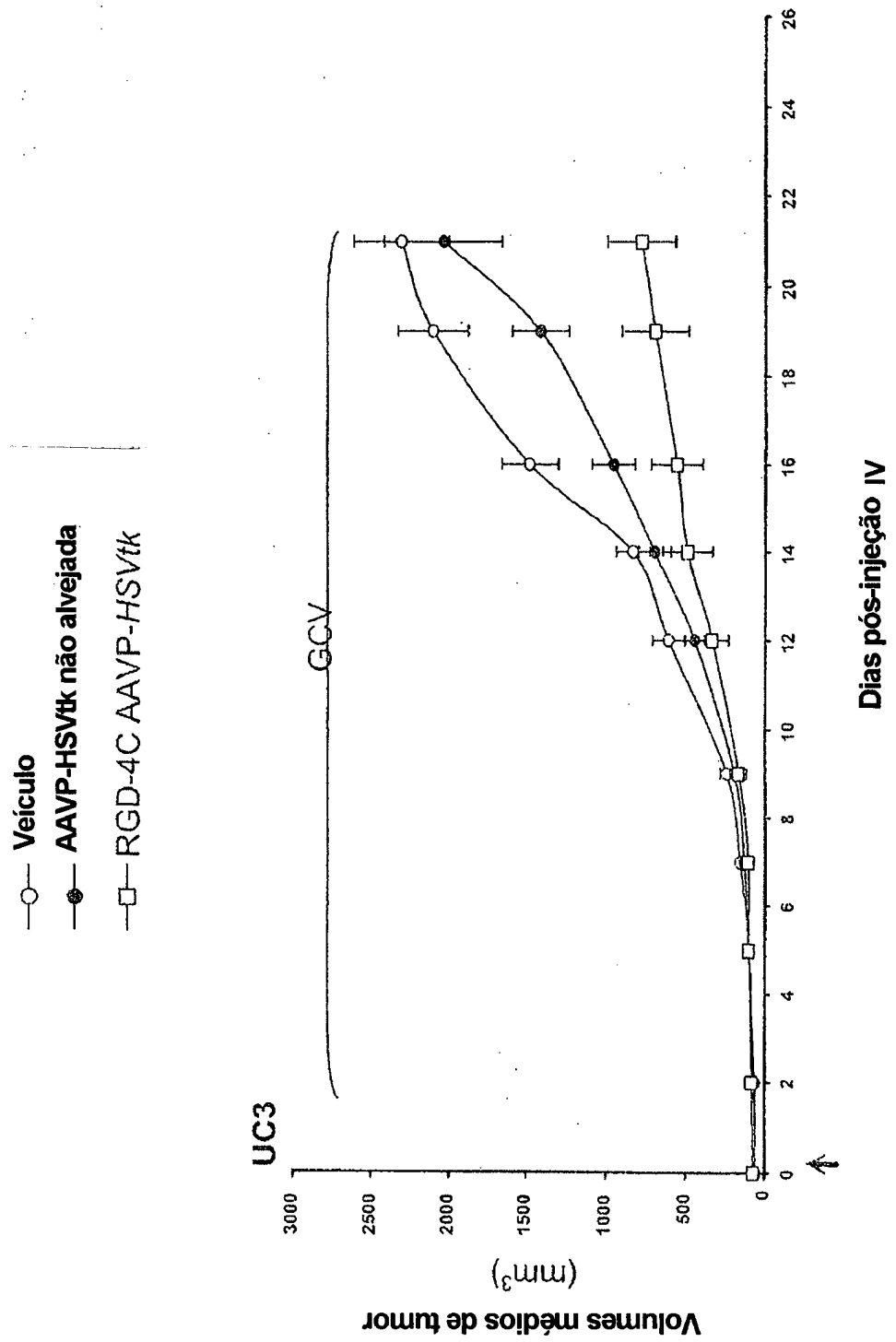


FIG. 5C

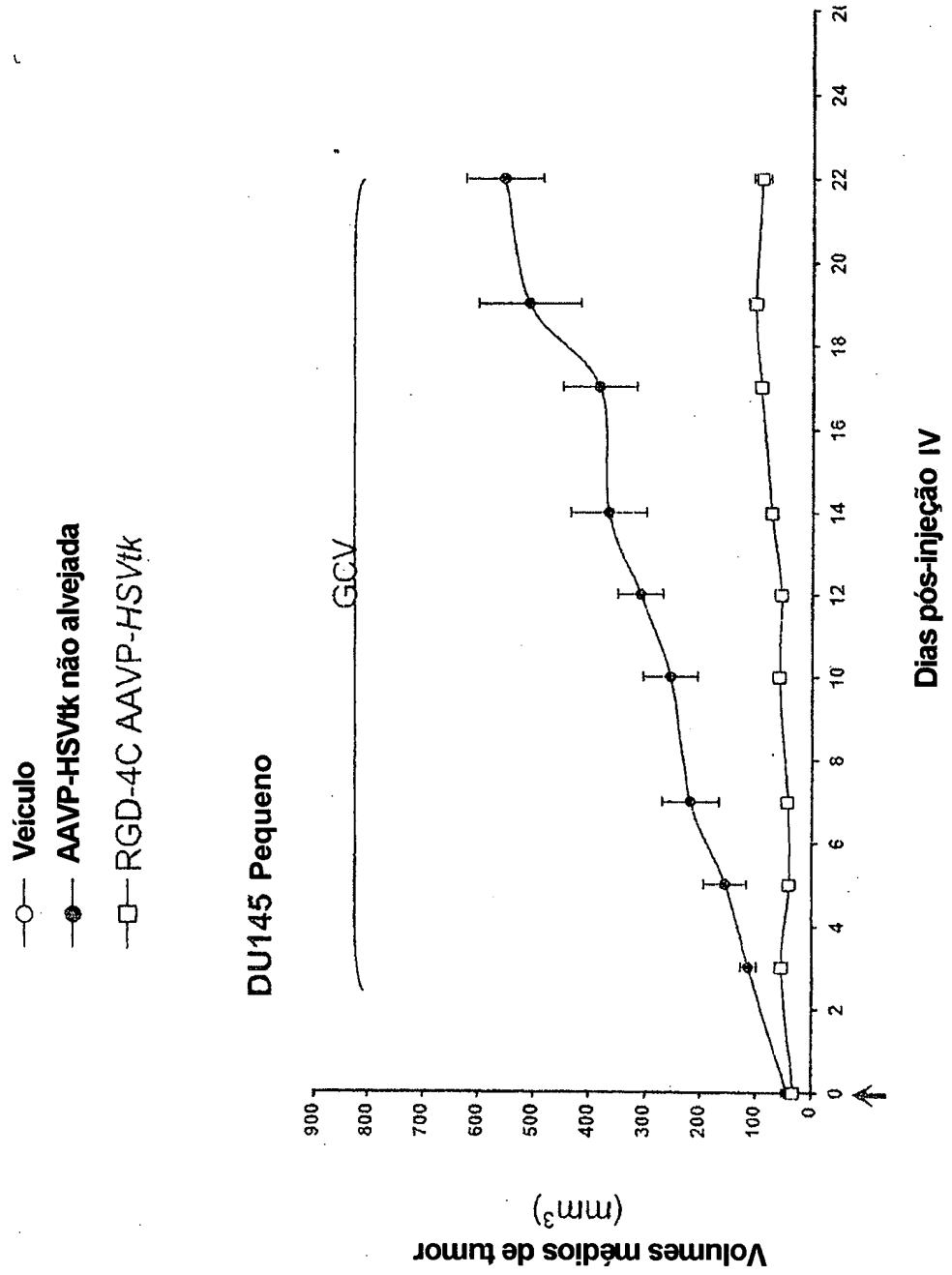


FIG. 5D

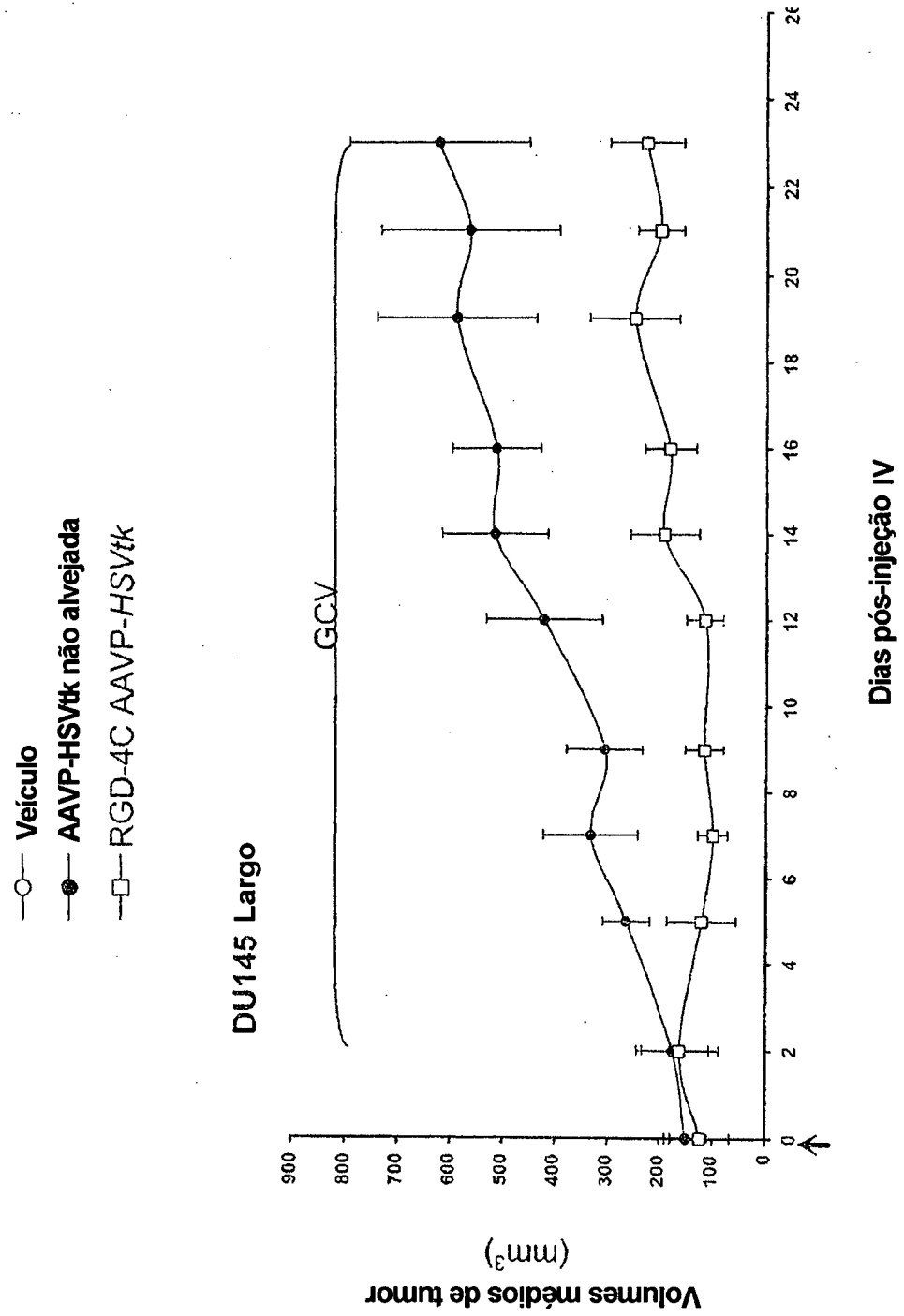


FIG. 5E

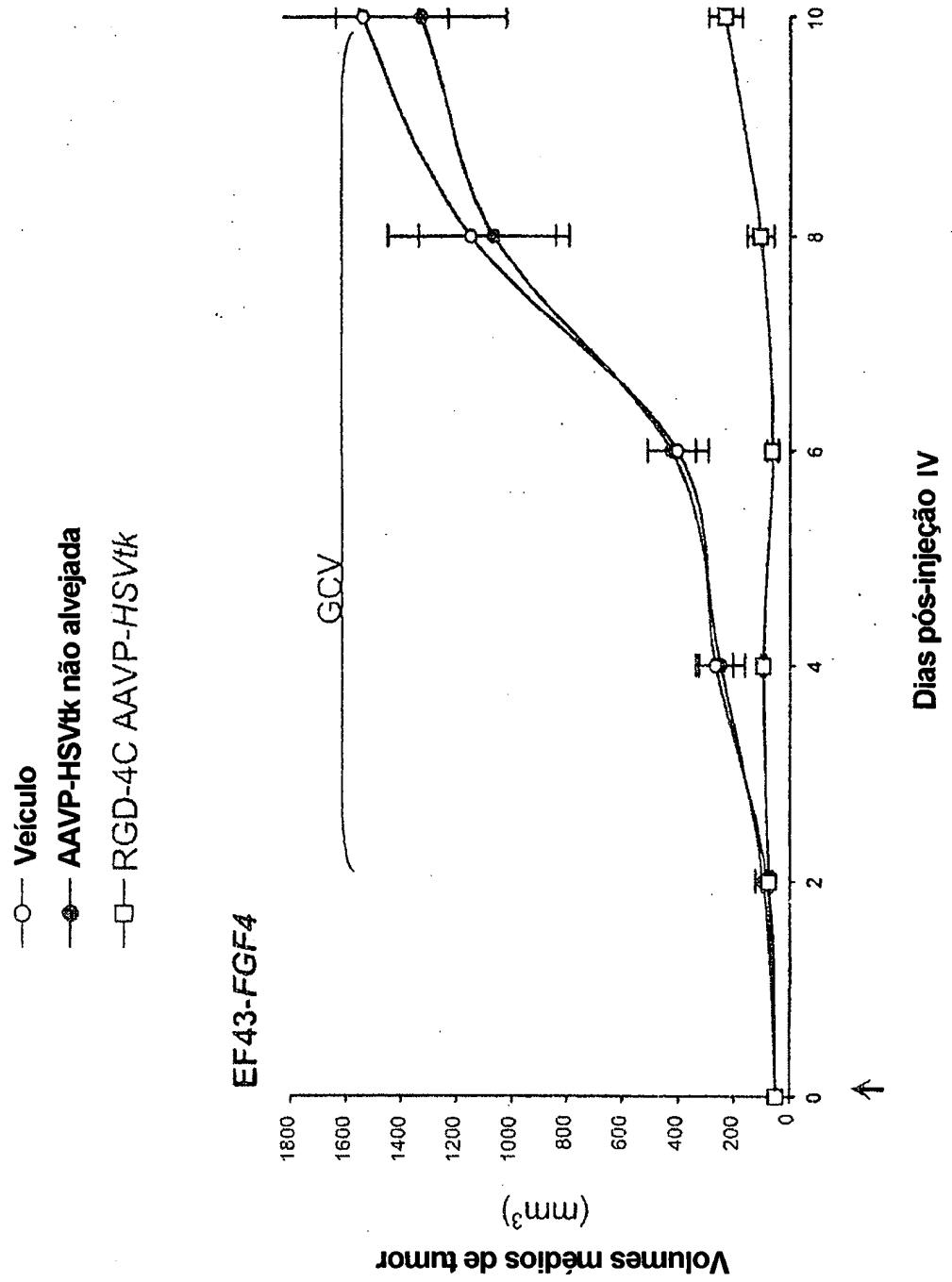


FIG. 5F

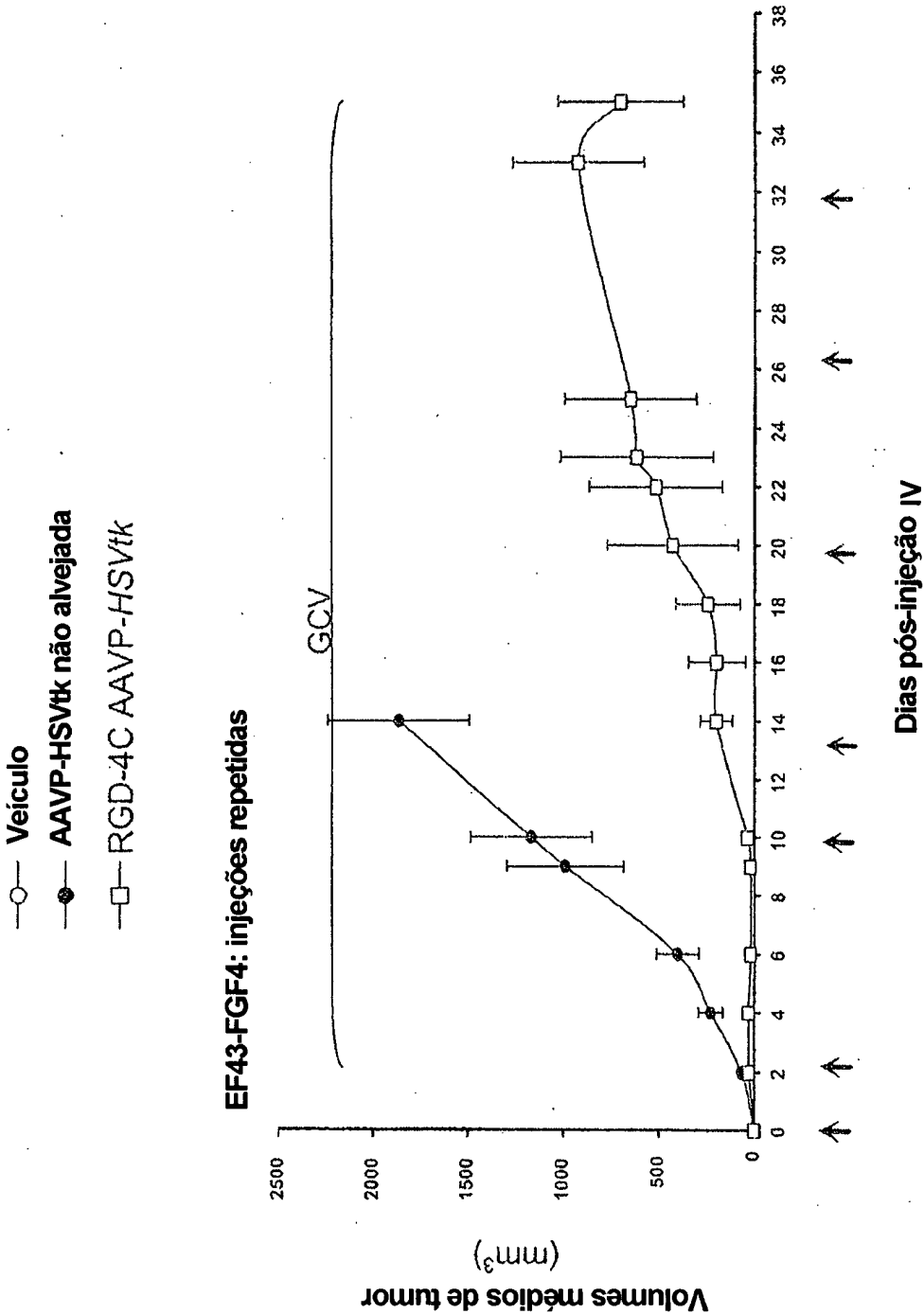


FIG. 5G

- Veículo
- AAVP-HSVtk não alvejada
- RGD-4C AAVP-HSVtk

EF43-FGF4: camundongos vacinados

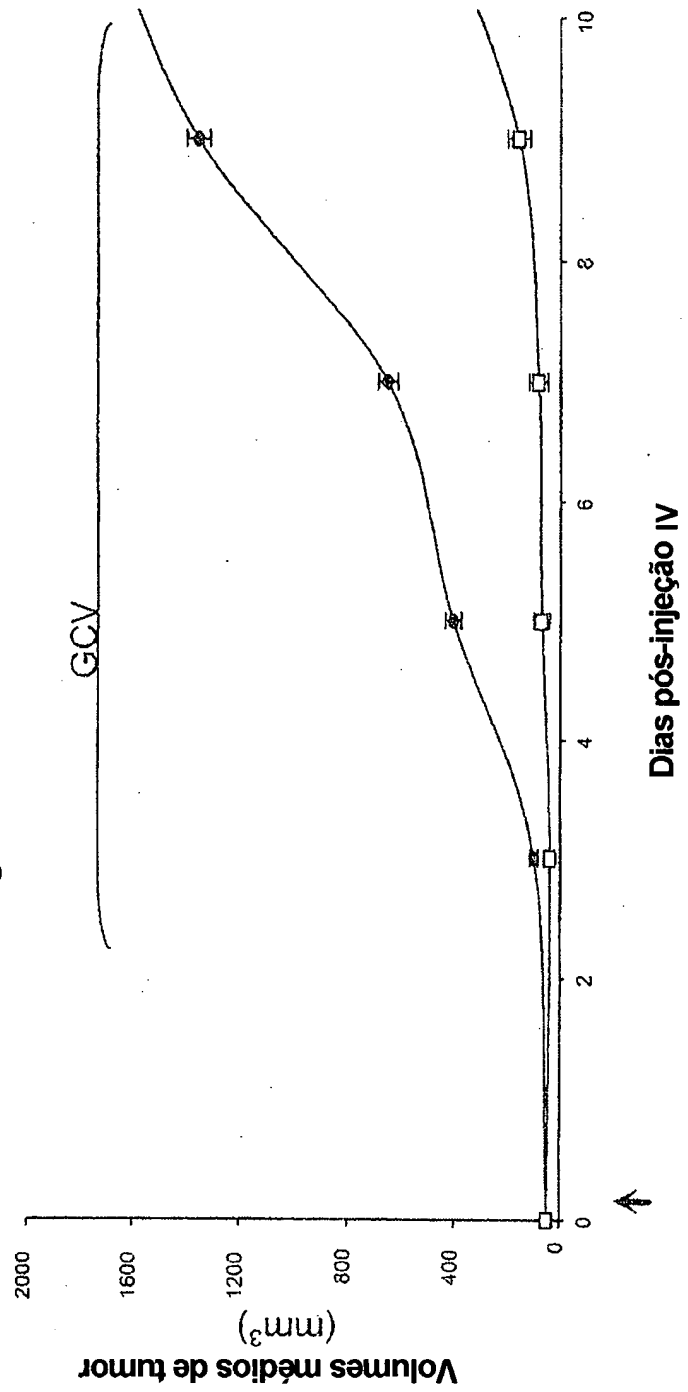
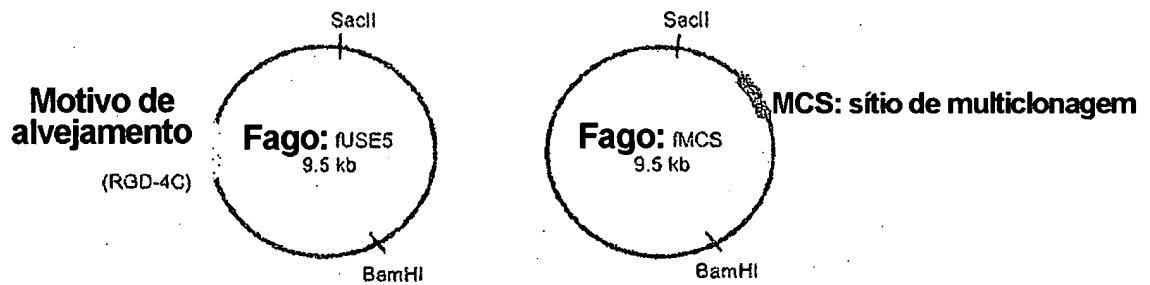
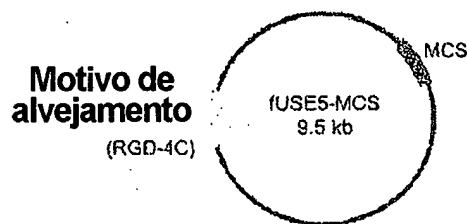


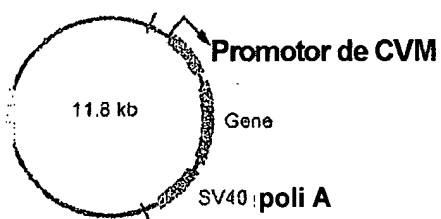
FIG. 7



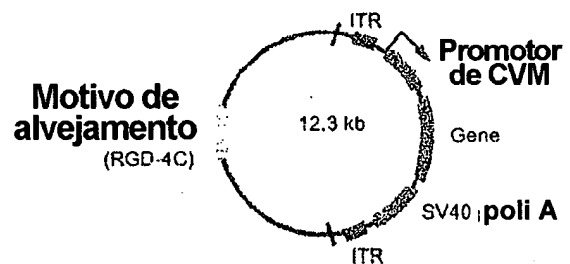
Digestão com SacII/BamHI e fragmentos de ligadura



Inserção de cassete de transgene de CMV ou rAAV no MCS



Construção do fago RGD-4C



Construção do RGD-4C AAVP

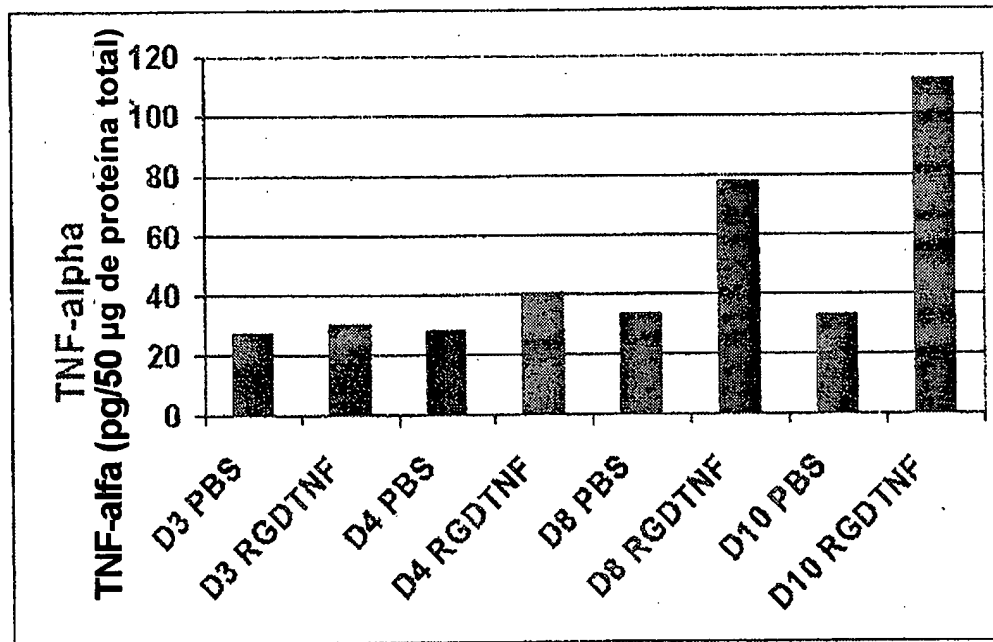


FIG. 16

RESUMO**"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES RELACIONADAS À PARTÍCULAS DE VÍRUS FAGO ADENOASSOCIADAS"**

Modalidades da invenção são geralmente direcionadas a composições e métodos de liberação de um ou mais transgenes a uma célula alvo, tal como uma célula de tumor, em um sítio específico de maneira a alcançar expressão aprimorada e para construções e composições úteis em tais aplicações. A invenção refere-se também ao uso para preparar medicamentos. Em certos aspectos, a expressão de um ácido nucléico terapêutico pode ser acessada antes da administração de um tratamento ou procedimento de diagnóstico em um indivíduo.