



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

(21) BR 112019017697-7 A2



(22) Data do Depósito: 27/02/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 07/04/2020

(54) **Título:** VACINAS CONTRA INFLUENZA BASEADAS EM VETORES DE VÍRUS ADENOASSOCIADO (AAV)

(51) **Int. Cl.:** C07K 16/10; C12N 7/00; C12N 15/86.

(30) **Prioridade Unionista:** 10/05/2017 US 62/504,293; 17/01/2018 US 62/618,443; 20/09/2017 US 62/560,834; 28/02/2017 US 62/464,753.

(71) **Depositante(es):** THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA; JANSSEN BIOTECH, INC..

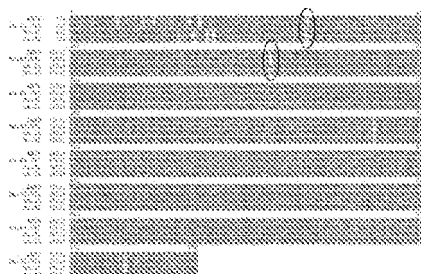
(72) **Inventor(es):** MARIA P. LIMBERIS; ANNA P. TREIAKOVA; JAMES M. WILSON; MICHAEL NASO; JOOST KOLKMAN; ROBERT FRIESEN; QIANG WANG.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018019974 de 27/02/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/160573 de 07/09/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 26/08/2019

(57) **Resumo:** São fornecidos vírus associados a adenoassociados recombinantes não replicantes (rAAV) tendo um capsídeo de AAV que tem empacotado nele um genoma do vetor que compreende sequências de repetição terminal invertidas do AAV e pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica quatro regiões de imunoglobulina diferentes (a), (b), (c) e (d). As imunoglobulinas expressas pelo rAAV são úteis para proporcionar imunização passiva contra influenza A e influenza B. Também são descritas neste documento composições que contêm o rAAV. São fornecidos métodos de vacinação de pacientes contra influenza.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**VACINAS CONTRA INFLUENZA BASEADAS EM VETORES DE VÍRUS ADENOASSOCIADO (AAV)**".

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[001] As infecções por influenza são a sétima principal causa de morte nos EUA, o que equivale a aproximadamente 49.000 mortes por ano, uma proporção significativa das quase 500.000 mortes no mundo. As vacinas nem sempre são eficazes para proteger os seres humanos da influenza. Além disso, o surgimento de uma nova pandemia de influenza continua a ser uma ameaça que pode resultar em perda substancial de vidas e perturbações econômicas em todo o mundo. O vasto reservatório de vírus influenza A em aves aquáticas representa uma ameaça pandêmica contínua, como exemplificado pelo surgimento da influenza aviária altamente patogênica H5N1 em 1997 e H7N9 em 2013 na população humana (J. Liu et al., Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science* 309, 1206 (2005); H. Chen et al., Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* 436, 191-192 (2005); e R. Gao et al., Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N. Engl. J. Med.* 368, 1888-1897 (2013)). A carga econômica das epidemias anuais de influenza é estimada em aproximadamente US\$ 87 bilhões. Mais da metade desse custo cobre os cuidados hospitalares necessários para quase 1 milhão de pacientes, dos quais 70% são idosos (> 65 anos de idade).

[002] O vírus adenoassociado (AAV) é um vírus de DNA de cadeia simples, não envelopado, icosaédrico, com 20-26 nm de diâmetro. Desde a primeira manipulação genética do AAV do tipo selvagem como vetor de distribuição de genes no início dos anos 80, o AAV recombinante tornou-se um veículo promissor de distribuição de genes para aplicações clínicas eficazes e seguras em terapia gênica para doenças crônicas. O sorotipo 2 do AAV (AAV2) foi o primeiro AAV

vetorizado para aplicações de transferência de genes. Surgiram várias limitações dos vetores de AAV2, incluindo baixa eficiência de transdução, alta soroprevalência de anticorpos neutralizantes (NABs) em seres humanos e respostas potencialmente destrutivas de células T a capsídeos.

[003] O capsídeo AAV ideal para a distribuição de anticorpo contra influenza teria baixa soroprevalência em humanos, seria capaz de conferir expressão transgênica alta e estável, biodistribuir minimamente ao sistema nervoso central ou às gônadas e ter um perfil imunológico favorável. O capsídeo selecionado deve ser fácil de fabricar com alto rendimento e ter um histórico de segurança clínica. Os capsídeos AAV a serem considerados na seleção incluem aqueles capsídeos AAV que foram testados em ensaios clínicos de terapia gênica: AAV1, 2, 6, 8, 9 e rh10. Trabalhos anteriores demonstraram que o AAV9 tem como alvo efetivo as vias aéreas e pode ser efetivamente readministrado na definição de NAb específico para AAV9 preexistente (Limberis e Wilson, 2006, Proc Natl Acad Sci USA, 103, 35, 12993-12998 (2006)). Mais recentemente, demonstramos que o vetor AAV9 que expressa o anticorpo FI6 protegia camundongos e furões contra o desafio letal no ar com vários isolados clínicos de cepas de influenza H1N1 e H5N1 (Limberis et al., Sci Transl Med. 29 de maio de 2013; 5 (187): 187ra72).

[004] Ainda são necessárias vacinas com influenza alterada adequadas, com perfis de desempenho aprimorados.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[005] A FIGURA. 1A fornece um alinhamento mostrando a sequência de aminoácidos da proteína de capsídeo vp1 de AAVhu68 (SEQ ID NO: 16, marcado como hu.68.VP1 em alinhamento), com AAV9 (SEQ ID NO: 17), AAVhu31 (SEQ ID NO: 34, marcado hu.31 em alinhamento) e AAVhu32 (SEQ ID NO: 35, marcado hu.32 em alinhamento). Comparadas a AAV9, AAVhu31 e AAVhu32, duas

mutações (A67E e A157V) foram consideradas críticas no AAVhu68 e circuladas na FIGURA. 1A.

[006] As FIGURAS 1B-1D fornecem um alinhamento da sequência de ácido nucleico que codifica o capsídeo vp1 de AAVhu68 (SEQ ID NO: 18 marcado hu.68.VP1 em alinhamento), com AAV9 (SEQ ID NO: 36), AAVhu31 (SEQ ID NO: 37 marcado hu.31 em alinhamento) e AAVhu32 (SEQ ID NO: 38, marcado hu.32 em alinhamento).

[007] As FIGURAS 2A - 2B mostram resultados de uma avaliação da eficácia protetora dos vetores AAV1, AAV9 e AAVhu68 que expressam hJAb contra desafio letal com influenza A (PR8) adaptada a camundongos. Na FIGURA 2A, camundongos BALB/c fêmeas com 6 semanas de idade receberam intranasalmente  $10^9$  cópias do genoma (GC) de vetores AAV1, AAV9 ou AAVhu68 que expressam hJAb (AAV1.hJAb, quadrado; AAV9.hJAb, círculo; círculo; AAVhu68.hJAB, triângulo vertical; e Naïve, triângulo invertido) sob o controle transcricional do promotor CB7 (ou seja AAV.CB7.hJAb, etc). Os camundongos foram desafiados sete dias depois (anotados neste documento como dia 0) com  $5LD_{50}$  de PR8 e pesados diariamente. A perda de peso percentual foi calculada com base no peso do camundongo no dia do desafio. Na FIGURA 2B, os camundongos foram sacrificados quando pareceram estar em sofrimento ou seu peso corporal declinou  $>30\%$ , como representado no gráfico de Kaplan-Meier.

[008] As FIGURAS 3A - 3B mostram resultados de uma avaliação da eficácia protetora dos vetores AAV1, AAV9 e AAVhu68 que expressam hJAb contra desafio letal com influenza B adaptada a camundongo (B/Lee/40). A FIGURA 3A mostra resultados de camundongos BALB/c fêmeas com 6 semanas de idade que receberam intranasalmente  $10^9$  GC de vetores AAV que expressam hJAb (AAV1.hJAb, quadrado; AAV9.hJAb, círculo; AAVhu68.hJAb, triângulo



vertical; e Naïve, triângulo invertido) foram desafiados sete dias depois (anotados neste documento como dia 0) com 5LD<sub>50</sub> de B/Lee/40 e pesados diariamente. A perda de peso percentual foi calculada com base no peso do camundongo no dia do desafio. A FIGURA 3B mostra que os resultados dos camundongos foram sacrificados quando eles pareceram estar em perigo ou seu peso corporal declinou >30%, como representado nas parcelas de Kaplan-Meier.

[009] A FIGURA 4 fornece o perfil da expressão de hJAb mediada por AAVhu68 no líquido de lavagem bronco-alveolar (BALF). Camundongos BALB/c fêmeas com seis semanas de idade foram administrados intranasalmente (IN) com vetor AAVhu68 que expressa hJAb em doses variando de 10<sup>9</sup> GC a 10<sup>11</sup> GC. Os camundongos foram sacrificados sete dias depois e o BALF coletado para determinação da concentração de hJAb por ELISA da proteína A.

[0010] As FIGURAS 5A e 5B mostram a determinação do MED de AAVhu68.CB7.JAb210a para profilaxia eficaz contra influenza A (PR8). Camundongos BALB/c fêmeas com seis semanas de idade foram administrados IN em AAVhu68.CB7. Vetor JAb210a em doses variando de 3x10<sup>8</sup> GC to 10<sup>10</sup> GC e desafiado sete dias depois (observado neste documento como dia 0) com 5LD<sub>50</sub> de PR8 e pesado diariamente. A porcentagem de perda de peso foi calculada com base no peso do camundongo no dia do desafio e plotada na FIGURA 5A. A FIGURA 5B representa graficamente a porcentagem de sobrevivência. Todos os camundongos sobreviveram ao desafio, independentemente da dose do vetor.

[0011] As FIGURAS 6A e 6B mostram a determinação do MED de AAVhu68.CB7.JAb210a para profilaxia eficaz contra influenza B (B/Lee/40). Camundongos BALB/c fêmeas com seis semanas de idade foram administrados IN em AAVhu68.CB7. Vetor JAb210a em doses variando de 3x10<sup>8</sup> GC a 10<sup>10</sup> GC e desafiado sete dias depois

(observado neste documento como dia 0) com 5LD<sub>50</sub> de B/Lee/40 e pesado diariamente. A porcentagem de perda de peso foi calculada com base no peso do camundongo no dia do desafio e plotada na FIGURA 6A. A FIGURA 6B representa graficamente a porcentagem de sobrevivência. Todos os camundongos sobreviveram ao desafio, independentemente da dose do vetor.

[0012] As FIGURAS 7A - 7C mostram o início rápido de profilaxia mediada por AAVhu68.CB7.CI.JAb210a contra influenza A (PR8). A FIGURA 7A fornece uma linha do tempo mostrando que os camundongos BALB/c fêmeas com 6 semanas de idade receberam 10<sup>10</sup> GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a e grupos de camundongos tratados com vetor foram desafiados um dia, dois dias, três dias ou sete dias depois, com 5LD<sub>50</sub> de PR8. A FIGURA 7B é um gráfico de linhas que mostra a alteração percentual (%) no peso para animais desafiados nos vários momentos no tempo após a administração do vetor. Os animais desafiados foram pesados diariamente, conforme representados pelos pontos de dados no eixo x. A porcentagem de perda de peso foi calculada com base no peso do camundongo no dia do desafio. A FIGURA 7C representa graficamente a porcentagem de sobrevivência após o desafio PR8. Estes dados mostram que todos os camundongos que receberam o vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a sobreviveram ao desafio, independentemente do intervalo de tempo entre a dosagem do vetor e o desafio com 5LD<sub>50</sub> de PR8.

[0013] As FIGURAS 8A-8D ilustram o início rápido de profilaxia mediada por AAVhu68.CB7.CI.JAb210a contra influenza B (B/Lee/40). A FIGURA 8A é uma linha do tempo, mostrando que camundongos BALB/c fêmeas com 6 semanas de idade receberam 10<sup>9</sup> ou 10<sup>10</sup> GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a e grupos de camundongos foram desafiados um dia, dois dias, três dias ou sete dias depois, com 5LD<sub>50</sub> de B/Lee/40 e pesados diariamente. A FIGURA 8B representa a porcentagem de

perda de peso de camundongos que receberam  $10^9$  GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a foi calculada com base no peso do camundongo no dia do desafio. A FIGURA 8C mostra que todos os camundongos sobreviveram ao desafio, independentemente do intervalo de tempo entre a dosagem do vetor e o desafio com B/Lee/40. A FIGURA 8D mostra a porcentagem de perda de peso de para camundongos que receberam  $10^{10}$  GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a foi calculada com base no peso do camundongo no dia do desafio. Todos os camundongos sobreviveram ao desafio, independentemente do intervalo de tempo entre a dosagem do vetor e o desafio com B/Lee/40.

[0014] As FIGURAS 9A - 9F mostram o impacto do anticorpo neutralizante de AAVhu68 que circula no soro (NAb) na eficácia de profilaxia mediada por AAVhu68.CB7CI.JAb210a contra desafio letal com PR8. Grupos de camundongos BALB/c fêmeas com 6 semanas de idade com níveis variados de NAb específico para AAVhu68 que circula no soro preexistente receberam IN  $10^9$  GC (FIGURA 9A),  $3 \times 10^9$  GC (FIGURA 9B), e  $10^{10}$  GC (FIGURAS 9C-9F) de vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a aproximadamente 30 dias após a exposição inicial ao vetor AAVhu68.CB.LacZ (dado para induzir NAb a AAVhu68). Os camundongos foram desafiados sete dias depois (anotados neste documento como dia 0) com  $5LD_{50}$  de PR8 e pesados diariamente. O percentual de peso foi calculado com base no peso no dia da infecção.

[0015] As FIGURAS 10A - 10C mostram o impacto do NAb específico para AAVhu68 que circula no soro na eficácia da profilaxia mediada por AAVhu68.CB7.CI.JAb210a contra desafio letal com PR8 (dia 90). Grupos de camundongos BALB/c fêmeas com níveis variados de NAb específico para AAVhu68 que circula no soro preexistente receberam  $10^9$  GC (FIGURA 10A),  $3 \times 10^9$  GC (FIGURA 10B), ou  $10^{10}$  GC (FIGURAS 10C) IN de vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 90 dias

após a exposição inicial ao vetor AAVhu68. CB.LacZ (dado para induzir NAb a AAVhu68). Os camundongos foram desafiados sete dias depois (anotados neste documento como dia 0) com 5LD<sub>50</sub> de PR8 e pesados diariamente. O percentual de perda de peso foi calculado com base no peso no dia da infecção.

[0016] A FIGURA 11 representa o perfil de biodistribuição do vetor AAVhu68 que expressa hJAb em camundongos. Camundongos BALB/c fêmeas com seis semanas de idade foram administrados IN com vetor AAVhu68.CB7.hJAb em doses variando de 10<sup>11</sup> GC (alto) a 10<sup>9</sup> GC (baixo) e sete dias depois necropsiado. Os tecidos (pulmão, fígado, baço, coração e cérebro) foram coletados para análise de biodistribuição. A linha pontilhada representa o fundo do ensaio. Para cada tecido, cinco barras da esquerda para a direita representam dados coletados de camundongos tratados com 10<sup>11</sup> GC, 3x10<sup>10</sup> GC, 10<sup>10</sup> GC, 3x10<sup>9</sup> GC, e 10<sup>9</sup> GC, respectivamente. Quando se utilizam doses elevadas do vetor AAVhu68 (FIGURAS 11 e 12), os genomas do vetor AAVhu68 foram detectados em outros tecidos que não o pulmão.

[0017] As FIGURAS 12A e 12B fornecem um perfil de biodistribuição do vetor AAVhu68 que expressa JAb210a em camundongos. Camundongos BALB/c fêmeas com seis semanas de idade foram administrados IN com vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a em dose alta, 10<sup>11</sup> GC. Trinta dias depois, os camundongos foram necropsiados. Os tecidos (pulmão, baço, traqueia, rim, fígado, coração, cérebro, ovário e olho) foram coletados para análise de biodistribuição. A linha pontilhada representa o fundo do ensaio. A FIGURA 12A mostra os dados como GC por célula diploide, enquanto a FIGURA 12B mostra os dados como GC por µg de DNA. Quando se utilizam altas doses do vetor AAVhu68 (FIGURAS 11 e 12), os genomas AAVhu68 foram detectados em outros tecidos que não o pulmão. A FIGURA 12A mostra que a maioria da deposição do genoma do vetor ocorreu no pulmão,

seguido pelo baço. Níveis muito baixos do genoma do vetor AAVhu68 estavam presentes no rim, fígado e coração (FIGURA 12A). Além disso, o nível de genomas de AAVhu68 no cérebro, ovário ou olho estava muito próximo do fundo para permitir uma interpretação precisa dos dados (FIGURA 12A). Na FIGURA 12B, para pulmão e baço (esquerda), a escala que representa o DNA de GC/μg é de  $10^0$ - $10^6$ , em oposição à escala do gráfico de barras que apresenta traqueia, rim, fígado, coração, cérebro, ovário, olho e nervo óptico, que é  $10^0$ - $10^4$ .

[0018] As FIGURAS 13A e 13B demonstram o perfil protetor de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a em camundongos velhos (9-18 meses de idade). Os camundongos BALB/c receberam  $10^9$  GC ou  $3 \times 10^9$  GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a e sete dias depois desafiado com 5LD<sub>50</sub> de PR8. A FIGURA 13A é um gráfico de linhas que mostra a alteração percentual (%) em peso para camundongos velhos desafiados sete dias após a administração do vetor. Os animais foram pesados diariamente, conforme representados pelos pontos de dados no eixo x. A perda de peso percentual foi calculada com base no peso no dia do desafio de influenza. A FIGURA 13B representa graficamente a porcentagem de sobrevivência após o desafio PR8. Estes dados mostram que todos os camundongos que recebem AAVhu68.CB7.CI.JAb210a sobreviveu ao desafio com 5LD<sub>50</sub> de PR8. Camundongos naive foram sacrificados no dia 8.

[0019] As FIGURAS 14A a 14C mostram eficácia profilática do MD3606 expresso por AAV em camundongos desafiados com o vírus influenza. Curvas de sobrevivência (superior) e perda de peso (inferior) de camundongos BALB/c tratados intranasalmente com as doses indicadas de Vetor AAV9.MD3606 [expresso como cópias do genoma (GC)] 7 dias antes do desafio com uma dose letal (5LD<sub>50</sub>) de H1N1 adaptado ao camundongo (A/Puerto Rico/8/34-MA) (FIGURA 14A), H3N2 adaptado ao camundongo (A/Hong Kong/1/68-MA) (FIGURA

14B) ou vírus B (B/Lee/40-MA) adaptado a camundongo (FIGURA 14C).

[0020] A FIGURA 15 fornece uma representação esquemática do genoma do vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG.

[0021] A FIGURA 16 fornece uma representação esquemática do plasmídeo do genoma do vetor como descrito no Exemplo 16.

[0022] As FIGURAS 17A a 17B fornecem representações esquemáticas do plasmídeo trans AAV. A FIGURA 17A fornece uma representação linear do plasmídeo de empacotamento AAV2/hu68 trans pAAV2/hu68. Na FIGURA 17B, o gene de resistência à ampicilina em pAAV2/hu68 (p0065) foi substituído pelo gene de resistência à canamicina para dar pAAV2/hu68.KanR (p0068).

[0023] As FIGURAS 18A a 18B fornecem representações esquemáticas do plasmídeo auxiliar de adenovírus. A FIGURA 18A fornece uma derivação do plasmídeo auxiliar pAdΔF6 do plasmídeo parental pBHG10 através dos intermediários pAdΔF1 e pAdΔF5. Na FIGURA 18B, o gene de resistência à ampicilina em pAdΔF6 foi substituído pelo gene de resistência à canamicina para dar pAdΔF6 (Kan). As identidades desses três genes de adenovírus foram confirmadas por sequenciamento de plasmídeo de DNA realizado pela Qiagen Genomic Services. A análise de DNA revelou 100% de homologia com as três regiões gênicas do adenovírus tipo 5 (número de acesso ao GenBank AF369965).

[0024] As FIGURAS 19A a 19B fornecem um diagrama de fluxo do processo de fabricação, como descrito no Exemplo 16.

[0025] A FIGURA 20 mostra profilaxia mediada por AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG de camundongos Rag KO contra desafio com Influenza A. Camundongos Rag KO receberam  $10^{10}$  GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG (observado em círculos) e camundongos foram desafiados sete dias depois com 5LD<sub>50</sub> de PR8 e pesados diariamente. Camundongos naive (triângulos invertidos) foram

sacrificados devido à perda progressiva de peso no dia 8.

[0026] As FIGURAS 21A a 21B mostram profilaxia mediada por AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG de camundongos Rag KO contra o segundo desafio com Influenza. Os camundongos Rag KO tratados com vetor que sobreviveram a um desafio com 5LDL<sub>50</sub> de PR8 foram novamente desafiados com 5LD<sub>50</sub> de B/Lee/40 e pesados diariamente. Camundongos naive (triângulos) foram sacrificados devido à perda progressiva de peso no dia 8. Camundongos de controle positivo (círculos) foram camundongos que receberam vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG e desafiados sete dias depois com 5LD<sub>50</sub> de B/Lee/40; todos os camundongos sobreviveram ao desafio. Em quadrados são representados camundongos tratados com vetor que foram submetidos ao desafio B/Lee/40 após exposição prévia à influenza A (PR8, FIGURA 20).

[0027] A FIGURA. 22 fornece um perfil de biodistribuição do vetor AAV9 que expressa a alfa-fetoproteína rhesus (rhAFP) em Macacos. Os animais receberam uma dose total de  $2 \times 10^{13}$  GC de AAV9.CB7.rhAFP como uma instilação líquida direta (círculos) ou através do Mad Nasal™ (quadrados azuis) e necropsiado 99 dias depois. Os tecidos foram coletados para análise de biodistribuição. O fundo do ensaio foi de 25 cópias do genoma/DNA de 500 ng de tecido.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0028] É fornecido um vírus associado adenoassociado recombinante não replicante (rAAV) que codifica um construto anti-influenza. O rAAV possui um genoma de vetor empacotado em um capsídeo AAV. As composições fornecidas neste documento compreendem sequências codificadoras de genomas vetoriais para uma combinação das seguintes regiões de imunoglobulina anti-influenza expressas a partir do rAAV. Uma primeira região de imunoglobulina possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1:

(Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ile Ser Ile Phe Asp Ile Tyr Ala Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Val Ser Phe Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Val Ser Leu Tyr Arg Asp Pro Leu Gly Val Ala Gly Gly Ile Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser). Em certas modalidades, no lugar da SEQ ID NO: 1, uma região de imunoglobulina alternativa com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 com uma mutação I110M, que é reproduzida como aa 24 a aa 147 da SEQ ID NO: 30, pode ser selecionada para uso. Uma segunda região de imunoglobulina possui uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2: Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Ala Leu Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala Gln Gly Gln Trp Arg Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Glu Tyr Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser). Uma terceira região de imunoglobulina possui uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3: (Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Asn Lys Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Leu Cys Ile Ser Lys Ser Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Thr Ala Gly Gly Gly Leu Cys Trp Asp Gly Thr Thr Phe Ser Arg Leu Ala Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser). Uma quarta região de imunoglobulina tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:4: (Glu Val Gln Leu Val Glu



Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Asn Thr Asp Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Trp Gly Gly Pro Glu Pro Thr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser).

[0029] Em certas modalidades, mais de uma região de imunoglobulina descrita neste documento está em um construto de fusão que compreende ainda uma região Fc, em que existe opcionalmente uma sequência de ligação que une as quatro regiões de imunoglobulina e a região Fc.

[0030] Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 31 e SEQ ID NO: 32. Em certas modalidades, é fornecida uma composição que compreende um veículo, diluente ou excipiente e um estoque de pelo menos o rAAV não replicante, como descrito neste documento. A composição pode ser formulada para administração intranasal, intramuscular ou intravenosa.

[0031] Em certas modalidades, é fornecido um método para imunizar pacientes humanos contra influenza, que envolve a administração de uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo o rAAV.JAb, rAAV.hJAb ou rAAV.JAb210a, conforme descrito neste documento. A composição pode compreender uma dose de cerca de  $10^9$  GC a cerca de  $7 \times 10^{13}$  GC do rAAV.JAb, rAAV.hJAb ou rAAV.JAb210a. Em certas modalidades, um capsídeo AAVhu68 é selecionado. Em outras modalidades, é fornecido um produto que compreende um recipiente e uma composição compreendendo o

rAAV.JAb, rAAV.hJAb ou rAAV.JAb210a como descrito neste documento, opcionalmente com um diluente e instruções para administração.

[0032] Nas versões atualmente preferidas das modalidades acima, o rAAV tem um capsídeo AAVhu68. Em outra modalidade, o rAAV tem um capsídeo AAV9. Em ainda outra modalidade, o rAAV tem um capsídeo AAV1.

[0033] Em certas modalidades, o rAAV.JAb fornecido neste documento e as composições que os contêm são úteis para vacinar ou imunizar pacientes humanos contra influenza.

[0034] Em certas modalidades, o uso do rAAV.JAb ou composição contendo o mesmo é fornecido para vacinar ou imunizar pacientes humanos contra influenza.

[0035] Estas e outras vantagens da invenção serão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada da invenção.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0036] São fornecidos pela presente invenção os vetores recombinantes que expressam construtos de anticorpos anti-influenza *in vivo* e são úteis para fornecer imunidade passiva contra infecção por influenza A e/ou infecção por influenza B. Em certas modalidades, os vetores são vírus adeno-associados recombinantes defeituosos na replicação (rAAV) com um novo capsídeo clade F, denominado AAVhu68 neste documento.

[0037] Em certas modalidades, os construtos de anticorpo (Ab) expressos em rAAV exibem atividade de neutralização contra vírus influenza A e/ou B. Em certa modalidade, os construtos Ab da invenção impedem que um vírus influenza A ou B infecte as células hospedeiras em pelo menos 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, pelo menos 50%, pelo menos 45%, pelo menos 40%, pelo menos

45%, pelo menos 35%, pelo menos 30%, pelo menos 25%, pelo menos 20% ou pelo menos 10% em relação à infecção de células hospedeiras pelo referido vírus influenza na ausência dos construtos Ab. A atividade neutralizante mediada por anticorpos pode, por exemplo, ser medida como descrito neste documento. Ensaios alternativos para medir a atividade neutralizante são descritos, por exemplo, no WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, Geneva: World Health Organisation, 2005, versão 2002.5. Tipicamente, as moléculas de ligação de acordo com a invenção têm uma atividade neutralizante de 1000 nM ou menos, preferencialmente 100 nM ou menos, mais preferencialmente uma atividade neutralizante de 10 nM ou menos, ainda mais preferencialmente 1 nM ou menos, conforme determinado em um ensaio de neutralização de vírus *in vitro* (VNA).

[0038] Em certas modalidades preferidas, são fornecidas composições nas quais os vetores adeno-associados defeituosos na replicação expressam cada um dos quatro domínios da imunoglobulina anti-influenza que são desenhados para fornecer imunidade contra as cepas de influenza A e influenza B. Em certas modalidades, todos os quatro domínios de imunoglobulina são expressos a partir de um único estoque de vetor de rAAV. Nesta modalidade, o estoque de vetor único de rAAV pode conter um cassete de expressão monocistrônico ou um cassete de expressão bicistrônico. Em outras modalidades, os domínios de imunoglobulina são expressos a partir de mais de um estoque de vetores de rAAV. Nesta modalidade, o rAAV pode ter cassetes de expressão monocistrônica ou bicistrônica.

[0039] Em uma modalidade, um estoque de vetores de rAAV contém um genoma de vetor no qual um, dois, três ou quatro dos domínios de imunoglobulina, como descrito neste documento, são expressos como uma proteína de fusão. Uma tal proteína de fusão pode incluir uma região Fc de imunoglobulina e/ou uma região de dobradiça,

em que existe opcionalmente uma sequência de ligação que une duas ou mais das quatro regiões de imunoglobulina. Opcionalmente, uma sequência de ligação pode estar presente entre um domínio de imunoglobulina e a região Fc e/ou região de dobradiça. A sequência de ligação pode ser imediatamente adjacente ao terminal C de um primeiro domínio (região) e ao terminal N de um segundo domínio (região), sendo utilizada para separar dois, três ou quatro dos domínios ou regiões. Qualquer sequência adequada de cerca de 1 a 20 aminoácidos de comprimento pode ser selecionada, mas é de preferência 3 a 18 aminoácidos, ou cerca de 5 a cerca de 12 aminoácidos de comprimento. Múltiplas sequências de ligação podem estar presentes em uma única sequência de proteína codificada e estas podem ser selecionadas independentemente. Em uma modalidade, pelo menos uma sequência de ligação é GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 7).

[0040] Em certas modalidades, as imunoglobulinas expressas ou as proteínas de fusão de imunoglobulina contêm um peptídeo sinal que direciona a proteína expressa dentro da célula hospedeira. Opcionalmente, o peptídeo sinal pode ser de uma fonte exógena para a imunoglobulina. Os exemplos abaixo ilustram o uso de um peptídeo sinal de interleucina-2 humana. No entanto, outro peptídeo sinal adequado, por exemplo, humano ou viral, pode ser selecionado. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos do peptídeo sinal é reproduzida na SEQ ID NO: 6.

[0041] Em certas modalidades, duas das regiões da imunoglobulina são ligadas a um primeiro Fc para formar uma primeira cadeia e as outras duas regiões da imunoglobulina são ligadas a um segundo Fc para formar uma segunda cadeia. Tal construto de cassete de expressão conterá tipicamente um F2A ou IRES entre as sequências de codificação para as duas cadeias.

[0042] Em certas modalidades, quatro das regiões de

imunoglobulina estão ligadas a uma região Fc em um único quadro de leitura aberto. Em uma modalidade, um construto de fusão compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

[0043] Estas e outras configurações dos quatro domínios de imunoglobulina fornecidos neste documento serão evidentes para um versado na técnica, tendo em vista a seguinte descrição dos domínios.

[0044] Um anticorpo "região Fc" refere-se ao fragmento cristalizável que é a região de um anticorpo que interage com os receptores da superfície celular (receptores Fc). Em uma modalidade, a região Fc é uma Fc IgG1 humana. Em uma modalidade, a região Fc é uma Fc IgG2 humana. Em uma modalidade, a região Fc é uma Fc IgG4 humana. Em uma modalidade, a região Fc é um fragmento Fc manipulado. Ver, por exemplo, Lobner, Elisabeth, et al. "Engineered IgG1-Fc—one fragment to bind them all." *Immunological reviews* 270.1 (2016): 113-131; Saxena, Abhishek, e Donghui Wu. "Advances in therapeutic Fc engineering—modulation of IgG-Associated effector functions and serum half-life." *Frontiers in immunology* 7 (2016); Irani, Vashti, et al. "Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases." *Molecular immunology* 67.2 (2015): 171-182; Rath, Timo, et al. "Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics." *Critical reviews in biotechnology* 35.2 (2015): 235-254; e Invivogen, IgG-Fc Engineering For Therapeutic Use, [www.invivogen.com/docs/Insight200605.pdf](http://www.invivogen.com/docs/Insight200605.pdf), abril de 2006; cada um dos quais é incorporado por referência neste documento. Em uma modalidade adicional, a região Fc tem uma sequência de aminoácidos reproduzida na SEQ ID NO: 11. Em certas modalidades, a região Fc é capaz de induzir citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) na questão alvo. Em certa modalidade, a região Fc é capaz de induzir citotoxicidade dependente do complemento (CDC).

[0045] Uma "região de dobradiça" do anticorpo é uma porção flexível de aminoácidos das cadeias pesadas das classes de imunoglobulina IgG e IgA, que liga essas duas cadeias por ligações dissulfeto. Em uma modalidade, a dobradiça tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

[0046] Uma "molécula de imunoglobulina" é uma proteína que contém as porções imunologicamente ativas de uma cadeia pesada de imunoglobulina e cadeia leve de imunoglobulina acopladas covalentemente e capazes de combinar especificamente com o antígeno. As moléculas de imunoglobulina são de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse. Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" podem ser usados de forma intercambiável neste documento.

[0047] Uma "cadeia pesada de imunoglobulina" é um polipeptídeo que contém pelo menos uma porção do domínio de ligação ao antígeno de uma imunoglobulina e pelo menos uma porção de uma região variável de uma cadeia pesada de imunoglobulina ou pelo menos uma porção de uma região constante de uma imunoglobulina pesada cadeia. Assim, a cadeia pesada derivada de imunoglobulina possui regiões significativas da homologia da sequência de aminoácidos com um membro da superfamília do gene da imunoglobulina. Por exemplo, a cadeia pesada em um fragmento Fab é uma cadeia pesada derivada de imunoglobulina.

[0048] Uma "cadeia leve de imunoglobulina" é um polipeptídeo que contém pelo menos uma porção do domínio de ligação ao antígeno de uma imunoglobulina e pelo menos uma porção da região variável ou pelo menos uma porção de uma região constante de uma cadeia leve de imunoglobulina. Assim, a cadeia leve derivada de imunoglobulina possui regiões significativas de homologia de aminoácidos com um

membro da superfamília do gene da imunoglobulina.

[0049] Uma "imunoadesina" é uma molécula quimérica semelhante a anticorpo que combina o domínio funcional de uma proteína de ligação, geralmente um receptor, ligando, fragmento de anticorpo scFv ou molécula de adesão celular, com domínios constantes de imunoglobulina, geralmente incluindo as regiões de dobradiça e Fc.

[0050] Um "fragmento de ligação ao antígeno" (Fab) "é uma região em um anticorpo que se liga a antígenos. É composto por um domínio constante e um variável de cada uma das cadeias pesada e cadeia leve.

[0051] Como utilizado neste documento, um anticorpo de domínio único (sdAb) é uma molécula de ligação que consiste em um único domínio de anticorpo monomérico variável que se liga especificamente a um antígeno ou epítopo independentemente de outras regiões ou domínios V. Os anticorpos de domínio único (sdAbs) são conhecidos na técnica e são geralmente derivados de anticorpos "apenas na cadeia pesada" de ocorrência natural, ou seja, anticorpos na cadeia pesada desprovidos de cadeias leves. Tais anticorpos apenas de cadeia pesada podem ser obtidos de espécies de Camelidae, por exemplo, camelo, lhama, dromedário ou alpaca (também referidos como anticorpos camelídeos). A região variável derivada do referido anticorpo apenas para cadeia pesada é geralmente conhecida como domínio VHH ou sdAb. Um sdAb como utilizado neste documento também se refere a um domínio variável único isolado (VL ou VH) de uma imunoglobulina convencional compreendendo duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Esta imunoglobulina pode conter sequências humanizadas ou regiões de outras fontes não camelídeas.

[0052] Como utilizado neste documento, os termos "anticorpo de múltiplos domínios" referem-se a uma molécula de ligação compreendendo pelo menos dois anticorpos VHH humanizados, ligados um ao outro diretamente ou por uma sequência de ligação.

[0053] Conforme usado neste documento, o termo "título de NAb" mede a quantidade de anticorpos neutralizantes (por exemplo, NAB anti-AAV) que é produzida que neutraliza o efeito fisiológico do seu epítopo alvo (por exemplo, um AAV). Os títulos de NAb anti-AAV podem ser medidos conforme descrito em, por exemplo, Calcedo, R., et al., Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 2009. 199(3): p. 381-390, que é incorporado neste documento por referência.

[0054] A abreviatura "sc" refere-se à auto-complementaridade. "AAV auto-complementar" refere-se a um construto em que uma região de codificação transportada por uma sequência de ácidos nucleicos de AAV recombinante foi concebida para formar um molde de DNA de cadeia dupla intra-molecular. Após a infecção, em vez de esperar pela síntese mediada por células da segunda fita, as duas metades complementares de scAAV irão se associar para formar uma unidade de DNA de fita dupla (dsDNA) que está pronta para replicação e transcrição imediatas. Ver, por exemplo, DM McCarty et al. "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis, *Gene Therapy*, (agosto de 2001), vol. 8, número 16, páginas 1248-1254. Os AAVs auto-complementares são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. Nºs 6.596.535; 7.125.717; e 7.456.683, cada uma delas sendo incorporadas neste documento por referência em sua totalidade.

[0055] Tal como utilizado neste documento, o termo "operacionalmente ligadas" refere-se às sequências de controle de expressão que são contíguas ao gene de interesse e as sequências de controle de expressão que atuam em trans ou a uma distância para controlar o gene de interesse.

[0056] Como usado neste documento, "especificidades diferentes" indicam que os construtos de imunoglobulina referenciadas (por



exemplo, um anticorpo de comprimento completo, uma cadeia pesada ou outro construto capaz de ligar um alvo específico) se ligam a diferentes sítios alvo. Estes podem se referir a alvos diferentes no mesmo antígeno, cepas diferentes do mesmo patógeno (por exemplo, cepas virais diferentes) ou a antígenos diferentes.

[0057] A "mesma especificidade" refere-se à capacidade da imunoglobulina de se ligar ao sítio alvo específico que pode estar presente em várias cepas de um patógeno (por exemplo, vírus influenza) ou para uma única ou subconjunto de cepas do vírus ou outro patógeno. Adequadamente, essas especificidades são tais que não há ligação significativa ou mensurável a sítios não alvo.

[0058] O termo "heterólogo", quando usado com referência a uma proteína ou um ácido nucleico, indica que a proteína ou o ácido nucleico compreende duas ou mais sequências ou subsequências que não são encontradas na mesma relação entre si na natureza. Por exemplo, o ácido nucleico geralmente é produzido de forma recombinante, possuindo duas ou mais sequências de genes não relacionados dispostos para produzir um novo ácido nucleico funcional. Por exemplo, em uma modalidade, o ácido nucleico tem um promotor de um gene disposto para direcionar a expressão de uma sequência de codificação de um gene diferente. Assim, com referência à sequência de codificação, o promotor é heterólogo. O termo "cadeia leve heteróloga" é uma cadeia leve contendo um domínio variável e/ou domínio constante de um anticorpo que possui uma especificidade de alvo diferente da especificidade da cadeia pesada.

[0059] Um "vírus com replicação defeituosa" ou "vetor viral" refere-se a uma partícula viral sintética ou artificial na qual um cassete de expressão contendo um gene de interesse é empacotado em um capsídeo ou envelope viral, onde quaisquer sequências genômicas virais também empacotadas dentro do capsídeo ou envelope viral são

deficientes em replicação; ou seja, elas não podem gerar vírions de progênie, mas retêm a capacidade de infectar células-alvo. Em uma modalidade, o genoma do vetor viral não inclui os genes de codificação das enzimas necessários para replicar (o genoma pode ser manipulado para ser "sem soro" - contendo apenas o transgene de interesse flanqueado pelos sinais necessários para amplificação e empacotamento do genoma artificial), mas esses genes podem ser fornecidos durante a produção. Por conseguinte, considera-se seguro para uso em terapia gênica, uma vez que a replicação e a infecção por vírions de progênie não podem ocorrer, exceto na presença da enzima viral necessária para a replicação.

[0060] Um "AAV recombinante" ou "rAAV" é uma partícula viral resistente a DNase contendo dois elementos, um capsídeo AAV e um genoma de vetor contendo pelo menos sequências de codificação não-AAV empacotadas dentro do capsídeo AAV. Em certas modalidades, o capsídeo contém cerca de 60 proteínas compostas por proteínas vp1, proteínas vp2 e proteínas vp3, que se auto-montam para formar o capsídeo. A menos que especificado de outra forma, "AAV recombinante" ou "rAAV" podem ser usados de forma intercambiável com a frase "vetor rAAV". O rAAV é um "vírus deficiente na replicação" ou "vetor viral", uma vez que não possui qualquer gene AAV rep funcional ou gene AAV cap funcional e não pode gerar progênie. Em certas modalidades, as únicas sequências de AAV são as sequências repetidas terminais invertidas (ITRs) de AAV, tipicamente localizadas nas extremidades 5' e 3' extremas do genoma do vetor, a fim de permitir que as sequências reguladoras e de genes localizadas entre as ITRs sejam empacotadas dentro do capsídeo AAV.

[0061] O termo "resistentes às nucleases" indica que o capsídeo de AAV foi montado em torno do cassete de expressão, que é desenhado para distribuir um transgene a uma célula hospedeira e protege essas

sequências genômicas de degradação (digestão) empacotadas durante as etapas de incubação de nuclease desenhadas para remover ácidos nucleicos que possam estar presentes no processo de produção.

[0062] Conforme utilizado neste documento, um "genoma de vetor" refere-se à sequência de ácido nucleico empacotada dentro do capsídeo rAAV que forma uma partícula viral. Tal sequência de ácido nucleico contém sequências repetidas terminais invertidas AAV (ITRs). Nos exemplos apresentados neste documento, um genoma de vetor contém, no mínimo, de 5' a 3', uma AAV 5' ITR, sequência(s) de codificação e uma AAV 3' ITR. Podem ser selecionadas ITRs do AAV2, um AAV de origem diferente do capsídeo ou que não sejam as ITRs de comprimento completo. Em certas modalidades, as ITRs são da mesma origem de AAV que o AAV, que fornece a função rep durante a produção ou um AAV transcomplementar. Além disso, outras ITRs podem ser utilizadas. Além disso, o genoma do vetor contém sequências reguladoras que direcionam a expressão dos produtos gênicos. Os componentes adequados de um genoma de vetor são discutidos em mais detalhes neste documento.

[0063] Em certas modalidades, os elementos genéticos não virais usados na fabricação de um rAAV serão referidos como vetores (por exemplo, vetores de produção). Em certas modalidades, esses vetores são plasmídeos, mas é contemplada a utilização de outros elementos genéticos adequados. Tais plasmídeos de produção podem codificar sequências expressas durante a produção de rAAV, por exemplo, capsídeo AAV ou proteínas rep necessárias para a produção de um rAAV, que não são empacotadas no rAAV. Alternativamente, esse plasmídeo de produção pode carrear o genoma do vetor que é empacotado no rAAV.

[0064] Como usado neste documento, uma "cassete de expressão" refere-se a uma molécula de ácido nucleico que compreende uma

sequência de codificação, promotor e pode incluir outras sequências reguladoras para a mesma. Em certas modalidades, um genoma de vetor pode conter duas ou mais cassetes de expressão. Noutras modalidades, o termo "transgene" pode ser usado de forma intercambiável com "cassete de expressão".

[0065] O termo "tradução" no contexto da presente invenção refere-se a um processo no ribossoma, em que uma cadeia de mRNA controla a montagem de uma sequência de aminoácidos para gerar uma proteína ou um peptídeo.

[0066] O termo "subtipo do vírus influenza" em relação aos vírus influenza A refere-se a cepas do vírus influenza A que são caracterizadas por várias combinações das proteínas da superfície viral da hemaglutinina (H) e neuraminidase (N). Os subtipos de vírus da influenza A podem ser referidos pelo número H, como por exemplo "vírus da influenza compreendendo HA do subtipo H1 ou H3" ou "vírus da influenza H1" "vírus da influenza H3" ou por uma combinação de um número H e um número N, como por exemplo "subtipo de vírus da influenza" H3N2 "ou" H5N1 ". O termo "subtipo" do vírus influenza inclui especificamente todas as "cepas" individuais do vírus influenza dentro desse subtipo, que geralmente resultam de mutações e mostram perfis patogênicos diferentes e incluem isolados naturais, bem como mutantes ou recombinantes sintéticos ou semelhantes. Tais cepas também podem ser referidas como vários "isolados" de um subtipo viral. Por conseguinte, como utilizado neste documento, os termos "cepas" e "isolados" podem ser utilizados de forma intercambiável.

[0067] Como utilizado neste documento, o termo "influenza" ou "doença do vírus influenza" refere-se à condição patológica resultante de uma infecção de uma célula ou de um sujeito por um vírus influenza A ou B. Em modalidades específicas, o termo refere-se a uma doença respiratória causada por um vírus influenza A ou B. Como utilizado neste

documento, o termo "infecção pelo vírus influenza" significa a invasão, multiplicação e/ou presença de um vírus influenza em uma célula ou sujeito.

[0068] O vetor descrito neste documento expressa um novo construto de anticorpo anti-influenza que fornece imunidade passiva e é terapeuticamente eficaz se protege contra a infecção por uma ou mais cepas de influenza A e/ou infecção por influenza B em uma população humana após a administração e/ou reduz os sintomas associados à infecção por influenza. Esses sintomas podem incluir, sem limitação, febre (calafrios), tosse, garganta inflamada, coriza ou nariz entupido, dores musculares ou corporais, dores de cabeça, fadiga (cansaço) e o risco de infecções bacterianas secundárias, como bronquite e pneumonia.

[0069] Conforme usado neste documento, "construto(s) de imunoglobulina", "construto(s) de anticorpo" ou "construto(s) aAb", que são usados de forma intercambiável, referem-se a um construto capaz de se ligar a um sítio alvo. Em uma modalidade, o sítio alvo é um epítopo de um antígeno ou um sítio de um patógeno. Em uma modalidade adicional, o sítio alvo é um epítopo de um vírus influenza. Em uma modalidade, o construto Ab é selecionado a partir de, sem limitação, uma molécula de imunoglobulina, uma imunoadesina, um anticorpo de domínio único, um anticorpo dos múltiplos domínios, um anticorpo de comprimento completo, uma cadeia pesada de imunoglobulina e uma cadeia leve de imunoglobulina.

[0070] O termo "expressão" é utilizado neste documento no seu sentido mais amplo e compreende a produção de RNA ou de RNA e proteína. No que diz respeito ao RNA, o termo "expressão" ou "tradução" refere-se em particular à produção de peptídeos ou proteínas. A expressão pode ser transitória ou estável.

[0071] Como utilizado neste documento, uma "quantidade eficaz"

refere-se à quantidade da composição de rAAV que distribui e expressa nas células alvo uma quantidade de anticorpos anti-influenza suficientes para reduzir ou prevenir a infecção por influenza. Uma quantidade eficaz pode ser determinada com base em um modelo animal, em vez de um paciente humano. Exemplos de um modelo murino adequado são descritos neste documento.

[0072] Como usado neste documento, o termo "tecido alvo" refere-se a um tecido, um órgão ou um tipo de célula, que uma modalidade, um regime ou uma composição como descrito neste documento tem como alvo. Em uma modalidade, o tecido alvo é um órgão respiratório ou um tecido respiratório. Em uma modalidade alternativa ou adicional, o tecido alvo é o pulmão. Em uma modalidade alternativa ou adicional, o tecido alvo é o nariz. Em uma modalidade alternativa ou adicional, o tecido alvo é a nasofaringe. Em uma modalidade alternativa ou adicional, o tecido alvo é o epitélio respiratório. Em uma modalidade alternativa ou adicional, o tecido alvo é o epitélio das vias aéreas nasais. Em uma modalidade alternativa ou adicional, o tecido alvo são as células nasais. Em uma modalidade alternativa ou adicional, o tecido alvo são as células nasofaríngeas. Em uma modalidade alternativa ou adicional, o tecido alvo são células epiteliais nasais, que podem ser células epiteliais nasais ciliadas, células epiteliais colunares, células caliciformes (que secretam muco na superfície da cavidade nasal que é composta pelas células epiteliais ciliadas) e células epiteliais nasais escamosas estratificadas que revestem a superfície da nasofaringe. Em uma modalidade alternativa ou adicional, o tecido alvo são as células epiteliais do pulmão. Ainda em outras modalidades, o tecido alvo é músculo, por exemplo, músculo esquelético.

[0073] Como descrito acima, o termo "cerca de" quando usado para modificar um valor numérico significa uma variação de  $\pm 10\%$ , a menos que especificado de outra forma.

[0074] Conforme usado ao longo deste relatório descritivo e das reivindicações, os termos "compreender" e "conter" e suas variantes, incluindo "compreende", "compreendendo", "contém" e "contendo", entre outras variantes, incluem outros componentes, elementos, números inteiros, etapas e similares. O termo "consiste em" ou "consistindo em" é exclusivo de outros componentes, elementos, números inteiros, etapas e similares.

[0075] Deve-se notar que o termo "um" ou "uma", refere-se a um ou mais, por exemplo, "um intensificador", é entendido como representando um ou mais intensificadores. Assim, os termos "um" (ou "uma"), "um ou mais" e "pelo menos um" podem ser usados neste documento de forma intercambiável.

[0076] No que diz respeito à descrição destas invenções, pretende-se que cada uma das composições descritas neste documento seja útil, em outra modalidade, nos métodos da invenção. Além disso, também se pretende que cada uma das composições descritas neste documento como úteis nos métodos seja, em outra modalidade, uma modalidade da invenção.

[0077] Salvo definido em contrário neste relatório descritivo, os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado que aquele versado na técnica a que esta invenção pertence e por referência a textos publicados, que fornecem àqueles versados na técnica uma orientação geral para vários dos termos usados no presente pedido.

#### I. Transgenes de Anticorpo Anti-Influenza

[0078] As composições descritas neste documento são desenhadas para expressar quatro regiões anti-imunoglobulinas, que são opcionalmente expressas como uma ou mais proteínas de fusão. Será entendido que as seguintes referências a "primeiro", "segundo", "terceiro" e "quarto" são usadas para esclarecer qual região está sendo

referenciada. No entanto, isso não está limitado à ordem em que estes são expressos do (s) genoma (s) do vetor ou à ordem em que estes aparecem em uma proteína de fusão. Assim, uma proteína de fusão pode conter a "terceira" região localizada a montante ou a jusante da primeira região ou da segunda região e/ou a "primeira" região pode estar localizada a jusante da "segunda", "terceira" ou "quarta " região.

[0079] Em certas modalidades, a primeira região de imunoglobulina possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 é selecionada: Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ile Ser Ile Phe Asp Ile Tyr Ala Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Val Ser Phe Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Val Ser Leu Tyr Arg Asp Pro Leu Gly Val Ala Gly Gly Ile Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser. Em certas modalidades, é permitida alguma variação nessa sequência de aminoácidos, ou seja, sequências de cerca de 95% a cerca de 99% idênticas a esta sequência são englobadas pela invenção. Por outras palavras, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 aminoácidos da SEQ ID NO: 1 podem ser modificados. Em uma modalidade, uma primeira região alternativa de imunoglobulina refere-se a uma região de imunoglobulina com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 com uma mutação I110M, que é reproduzida como aa 24 a aa 147 da SEQ ID NO: 30. Em certas modalidades, essas sequências de aminoácidos são alterações conservadas. No entanto, resíduos não conservados podem ser selecionados. Conforme usado neste documento, o termo "alteração conservada" refere-se à alteração de um aminoácido em outro aminoácido com propriedades bioquímicas semelhantes (por exemplo, carga, hidrofobicidade e tamanho).

[0080] Em certas modalidades, a segunda região de imunoglobulina



possui uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2: Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Ala Leu Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala Gln Gly Gln Trp Arg Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Glu Tyr Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser. Em certas modalidades, é permitida alguma variação nessa sequência de aminoácidos, ou seja, sequências de cerca de 95% a cerca de 99% idênticas a esta sequência são englobadas pela invenção. Por outras palavras, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 aminoácidos da SEQ ID NO: 2 podem ser modificados. Em certas modalidades, essas sequências de aminoácidos são alterações conservadas.

[0081] A terceira região de imunoglobulina possui uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3: Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Asn Lys Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Leu Cys Ile Ser Lys Ser Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Thr Ala Gly Gly Gly Leu Cys Trp Asp Gly Thr Thr Phe Ser Arg Leu Ala Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser. Em certas modalidades, é permitida alguma variação nessa sequência de aminoácidos, ou seja, sequências de cerca de 95% a cerca de 99% idênticas a esta sequência são englobadas pela invenção. Por outras palavras, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 aminoácidos da SEQ ID NO: 3 podem ser modificados. Em certas modalidades, essas sequências de aminoácidos são alterações conservadas.

[0082] A quarta região de imunoglobulina tendo uma sequência de

aminoácidos da SEQ ID NO:4: Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Asn Thr Asp Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Trp Gly Gly Pro Glu Pro Thr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser. Em certas modalidades, é permitida alguma variação nessa sequência de aminoácidos, ou seja, sequências de cerca de 95% a cerca de 99% idênticas a esta sequência são englobadas pela invenção. Por outras palavras, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 aminoácidos da SEQ ID NO: 4 podem ser modificados. Em certas modalidades, essas sequências de aminoácidos são alterações conservadas.

[0083] Ainda dentro do escopo da invenção estão as sequências de ácidos nucleicos que codificam as regiões de imunoglobulina e outras proteínas, peptídeos e fragmentos descritos neste documento. São fornecidos exemplos de sequências de codificação adequadas para a região de imunoglobulina com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, por exemplo, nas nt 2052 - 2423 da SEQ ID NO: 5, nt 1840 - 2211 da SEQ ID NO: 13, nt 2052 - 2423 da SEQ ID NO: 14, nt 2052 - 2423 da SEQ ID NO: 15, nt 1840 - 2111 da SEQ ID NO: 19, nt 1210-1581 da SEQ ID NO: 20, nt 55 - 486 da SEQ ID NO: 21 e nt 70 - 441 da SEQ ID NO: 32.

[0084] São fornecidos exemplos de sequências codificadoras adequadas para a região de imunoglobulina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, por exemplo, nas nt 2454 - 2822 da SEQ ID NO: 5, nt 2242 - 2160 da SEQ ID NO: 13, nt 2454 - 2822 da SEQ ID NO: 14, nt 2454 - 2822 da SEQ ID NO: 15, nt 2242 - 2610 da SEQ ID NO: 19, nt 1612 - 1980 da SEQ ID NO: 20, nt 517 - 885 da SEQ ID NO: 21 e nt 472 - 840 da SEQ ID NO: 32.

[0085] São fornecidos exemplos de sequências codificadoras adequadas para a região de imunoglobulina com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 3, por exemplo, nas nt 2853 - 3239 da SEQ ID NO: 5, nt 2641 - 3027 da SEQ ID NO: 13, nt 2853 - 3239 da SEQ ID NO: 14, nt 2853 - 3239 da SEQ ID NO: 15, nt 3448 - 3834 da SEQ ID NO: 19, nt 2803 - 3189 da SEQ ID NO: 20, nt 916 - 1302 da SEQ ID NO: 21 e nt 871 - 1257 da SEQ ID NO: 32.

[0086] São fornecidos exemplos de sequências codificadoras adequadas para a região de imunoglobulina que possui a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4, por exemplo, nas nt 3270 - 3617 da SEQ ID NO: 5, nt 3058 - 3405 da SEQ ID NO: 13, nt 3270 - 3617 da SEQ ID NO: 14, nt 3270 - 3617 da SEQ ID NO: 15, nt 3865 - 4212 da SEQ ID NO: 19, nt 3220 - 3567 da SEQ ID NO: 20, nt 1333 - 1680 da SEQ ID NO: 21 e nt 1288 - 1635 da SEQ ID NO: 32.

[0087] Um ácido nucleico refere-se a uma forma polimérica de nucleotídeos e inclui RNA, mRNA, cDNA, DNA genômico e formas sintéticas e polímeros mistos dos anteriores. Um nucleotídeo refere-se a um ribonucleotídeo, desoxinucleotídeo ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleotídeo. O termo também inclui formas de DNA de fita dupla ou única. O versado compreenderá que as variantes funcionais destas moléculas de ácido nucleico também se destinam a fazer parte da presente invenção. Variantes funcionais são sequências de ácidos nucleicos que podem ser traduzidas diretamente, usando o código genético padrão, para fornecer uma sequência de aminoácidos idêntica àquela traduzida das moléculas de ácido nucleico de origem. Em modalidades preferidas, as moléculas de ácido nucleico que codificam domínios de imunoglobulina, proteínas de fusão e outros construtos são englobados pela presente invenção e úteis na geração de cassetes de expressão e genomas de vetor. Estas sequências podem ser otimizadas por códon para expressão em células de levedura

ou células de mamífero, como células humanas. Os métodos de otimização de códons são conhecidos e foram descritos anteriormente (por exemplo, WO 96/09378). Uma sequência é considerada otimizada por códon se pelo menos um códon não preferido em comparação com uma sequência de tipo selvagem for substituído por um códon que é mais preferido. Aqui, um códon não preferido é um códon usado com menos frequência em um organismo do que outro códon que codifica o mesmo aminoácido, e um códon que é mais preferido é um códon usado com mais frequência em um organismo do que um códon não preferido. A frequência do uso de códons para um organismo específico pode ser encontrada em tabelas de frequência de códons, como em [www.kazusa.jp/codon](http://www.kazusa.jp/codon). De preferência, mais do que um códon não preferido, preferencialmente a maioria ou todos os códons não preferidos, são substituídos por códons que são mais preferidos. De preferência, os códons mais frequentemente utilizados em um organismo são utilizados em uma sequência otimizada por códons. A substituição por códons preferidos geralmente leva a uma expressão mais alta. Também será entendido por um versado que numerosas moléculas de ácido nucleico diferentes podem codificar o mesmo polipeptídeo como resultado da degeneração do código genético. Entende-se também que pessoas versadas podem, utilizando técnicas de rotina, fazer substituições de nucleotídeos que não afetam a sequência de aminoácidos codificada pelas moléculas de ácido nucleico para refletir o uso de códons de qualquer organismo hospedeiro em particular no qual os polipeptídeos devem ser expressos. Portanto, a menos que especificado de outra forma, uma "sequência de nucleotídeos que codifica uma sequência de aminoácidos" inclui todas as sequências de nucleotídeos que são versões degeneradas umas das outras e que codificam a mesma sequência de aminoácidos. As sequências de ácidos nucleicos podem ser clonadas usando técnicas

de biologia molecular de rotina ou geradas *de novo* pela síntese de DNA, que podem ser executadas usando procedimentos de rotina por empresas de serviços com negócios no campo da síntese de DNA e/ou clonagem molecular (por exemplo, GeneArt, GenScript, Life Technologies, Eurofins).

[0088] Em uma modalidade, um estoque de vetores de rAAV contém um genoma de vetor no qual um, dois, três ou quatro dos domínios de imunoglobulina, são expressos como uma proteína de fusão.

[0089] Em certas modalidades, os domínios de imunoglobulina podem ser ligados por ligação química, ou podem ser ligados juntos diretamente ou por ligantes polipeptídicos curtos. Essa sequência ligante pode ser uma sequência que ocorre naturalmente ou uma sequência que não ocorre naturalmente. A sequência do ligante preferencialmente fornece flexibilidade suficiente ao construto de anticorpo resultante e ao mesmo tempo é resistente à degradação proteolítica.

[0090] Opcionalmente, para a criação de homo- e hetero-dímeros, as sequências codificadoras da imunoglobulina são clonadas juntas ou o gene completo pode ser diretamente sintetizado (Genscript) e ligado a um vetor de expressão. Nos construtos de dímeros, o terminal C da primeira região de imunoglobulina pode estar ligado ao terminal da segunda região de imunoglobulina. As sequências ligantes de diferentes comprimentos (10, 15, 35 e 57 aminoácidos) consistem nos aminoácidos glicina (G) e serina (S). A sequência de ligação pode ser imediatamente adjacente ao terminal C de um primeiro domínio (região) e ao terminal N de um segundo domínio (região), sendo utilizada para separar dois, três ou quatro dos domínios ou regiões. Qualquer sequência adequada de cerca de 1 a 60 aminoácidos de comprimento pode ser selecionada, mas é de preferência 3 a 35 aminoácidos, ou

cerca de 5 a cerca de 15 aminoácidos de comprimento. Múltiplas sequências de ligação podem estar presentes em uma única sequência de proteína codificada e estas podem ser selecionadas independentemente.

[0091] Exemplos de ligantes adequados incluem:

SEQ ID NO: 7: GGGGS GGGGS;

SEQ ID NO: 23: GGGGS GGGGS GGGGS;

SEQ ID NO: 24: GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS

SEQ ID NO: 25: GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS.

[0092] Exemplos de sequências codificadoras de ligantes adequados são fornecidos em, por exemplo,

nt 2212 - 2241, nt 2611 - nt 2640, nt 3028 - 3057, nt 3406 - 3435 da SEQ ID NO: 13;

nt 2212-2241, nt 2611-2640, nt 3835 - 3864, e nt 4213 - 4242 da SEQ ID NO: 19;

nt 1582 - 1611, nt 3190 - 3219 da SEQ ID NO: 20; nt 487 - 516, nt 886 - 915, nt 1303 - 1332 da SEQ ID NO: 21; e nt 442- 471, nt 841 - 870, nt 1258 - 1287 da SEQ ID NO: 32.

[0093] Em certas modalidades, as proteínas compreendem ainda uma cauda Fc. Assim, em certas modalidades, os domínios de ligação à imunoglobulina, como descrito acima, estão ligados a um fragmento Fc de um anticorpo, preferencialmente um anticorpo humano, como o fragmento Fc de um anticorpo IgG humano, por exemplo, um IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ou IgG4. Os domínios podem ser fundidos geneticamente a um fragmento Fc, diretamente ou usando um ligante. Em certas modalidades, as moléculas de ligação estão ligadas ao fragmento Fc por uma sequência de ligação compreendendo de 1 a 100 aminoácidos, preferencialmente de 1 a 60 aminoácidos ou de 10 a 60

aminoácidos. Exemplos de ligantes incluem, mas não estão limitados a, as sequências de ligação listadas acima. Em certas modalidades, um domínio de imunoglobulina é fundido geneticamente ao terminal C de um fragmento Fc. Em outras modalidades, um domínio de imunoglobulina ou proteína de fusão é fundido ao terminal N e C de um fragmento Fc. Ver, por exemplo, WO 2016/124768, que é incorporado por referência neste documento. Em uma modalidade, o fragmento Fc tem uma sequência de aminoácidos reproduzida nos aa 551 a aa 772 da SEQ ID NO: 30. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica o fragmento Fc é a SEQ ID NO: 10.

[0094] Em certas modalidades, o genoma do vetor codifica um construto de fusão anti-influenza com as sequências de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, 2, 3 e 4. Um exemplo de tal construto é fornecido é a SEQ ID NO: 12. Em outro exemplo é a SEQ ID NO: 27. Nos dois exemplos, uma sequência líder é manipulada no genoma do vetor imediatamente a montante da região codificadora da imunoglobulina 5'. No entanto, em certas modalidades, um genoma de vetor pode conter mais de uma sequência líder, cada uma localizada a montante de uma região codificadora de imunoglobulina. Em certas modalidades, essas proteínas de fusão compreendem ainda pelo menos uma região de dobradiça de imunoglobulina e uma região Fc [por exemplo, SEQ ID NO: 12]. Além disso, cada uma destas proteínas de fusão contém múltiplas sequências de ligante. Em outras modalidades, uma região Fc pode ser incluída na proteína de fusão sem uma região de dobradiça. Em uma modalidade, o genoma do vetor é SEQ ID NO: 31.

[0095] Em certas modalidades, é apresentada neste documento uma única proteína semelhante a um anticorpo (referida como anticorpo de múltiplos domínios ou mdAb ou MDAb) com atividade anti-influenza A e B, em que a proteína é uma proteína de fusão que compreende um ou mais domínios de imunoglobulina e um ou mais ligantes, conforme

descrito neste documento. Em certa modalidade, são apresentadas neste documento composições para expressão de um MDAb como descrito neste documento.

[0096] O termo "homologia substancial" ou "similaridade substancial", quando se refere a um ácido nucleico, ou fragmento do mesmo, indica que, quando alinhado de maneira ideal com inserções ou deleções nucleotídicas apropriadas ou deleções com outro ácido nucleico (ou sua cadeia complementar), há uma sequência nucleotídica identidade em pelo menos cerca de 95 a 99% das sequências alinhadas. De preferência, a homologia é sobre a sequência completa, ou um quadro de leitura aberto da mesma, ou outro fragmento adequado que tenha pelo menos 15 nucleotídeos de comprimento. Exemplos de fragmentos adequados são descritos neste documento.

[0097] Os termos "identidade de sequência", "porcentagem de identidade de sequência" ou "porcentagem idêntica" no contexto de sequências de ácidos nucleicos referem-se aos resíduos nas duas sequências que são os mesmos quando alinhados para correspondência máxima. O comprimento da comparação de identidade de sequência pode ser ao longo do comprimento completo do genoma, o comprimento total de uma sequência de codificação de gene ou um fragmento de pelo menos cerca de 500 a 5000 nucleotídeos, é desejado. No entanto, a identidade entre fragmentos menores, por exemplo, de pelo menos cerca de nove nucleotídeos, usualmente pelo menos cerca de 20 a 24 nucleotídeos, pelo menos cerca de 28 a 32 nucleotídeos, pelo menos cerca de 36 ou mais nucleotídeos, também pode ser desejada. Da mesma forma, a "porcentagem de identidade de sequência" pode ser prontamente determinada para sequências de aminoácidos, em toda a extensão de uma proteína ou um fragmento da mesma. Adequadamente, um fragmento tem pelo menos cerca de 8 aminoácidos de comprimento e pode ter até cerca de 700 aminoácidos.



Exemplos de fragmentos adequados são descritos neste documento.

[0098] O termo "homologia substancial" ou "similaridade substancial", ao se referir a aminoácidos ou fragmentos dos mesmos, indica que, quando idealmente alinhado com inserções ou deleções de aminoácidos apropriadas com outro aminoácido (ou sua cadeia complementar), há uma sequência de aminoácidos identidade em pelo menos cerca de 95 a 99% das sequências alinhadas. De preferência, a homologia é sobre a sequência de comprimento completo, ou uma proteína da mesma, por exemplo, uma região de imunoglobulina ou domínio, uma proteína cap AAV, ou um fragmento da mesma com pelo menos 8 aminoácidos, ou mais desejável, com pelo menos 15 aminoácidos de comprimento. Exemplos de fragmentos adequados são descritos neste documento.

[0099] O termo "altamente conservado" significa pelo menos 80% de identidade, preferencialmente pelo menos 90% de identidade e, mais preferencialmente, mais de 97% de identidade. A identidade é prontamente determinada por um versado na técnica, recorrendo a algoritmos e programas de computador conhecidos por aqueles versados na técnica.

[00100] Geralmente, quando se refere a "identidade", "homologia" ou "semelhança" entre dois vírus adeno-associados diferentes, "identidade", "homologia" ou "semelhança" é determinada em referência a sequências "alinhadas". Sequências "alinhadas" ou "alinhamentos" referem-se a sequências de múltiplos ácidos nucleicos ou sequências de proteínas (aminoácidos), frequentemente contendo correções para bases ou aminoácidos ausentes ou adicionais em comparação com uma sequência de referência. Os alinhamentos são realizados usando qualquer um dos vários Programas de Alinhamento de Sequência Múltipla disponíveis publicamente ou comercialmente. Exemplos de tais programas incluem "Clustal Omega" "Clustal W", "CAP Sequence

Assembly", "MAP" e "MEME", que são acessíveis através de servidores da Web na Internet. Outras fontes para tais programas são conhecidas dos versados na técnica. Alternativamente, os utilitários vetor NTI também são usados. Existem também vários algoritmos conhecidos na técnica que podem ser utilizados para medir a identidade de sequência de nucleotídeos, incluindo os contidos nos programas descritos acima. Como outro exemplo, as sequências polinucleotídicas podem ser comparadas utilizando o Fasta™, um programa no GCG Versão 6.1. O Fasta™ fornece alinhamentos e porcentagem de identidade de sequência das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e busca. Por exemplo, a identidade de sequência percentual entre as sequências de ácido nucleico pode ser determinada usando Fasta™ com seus parâmetros padrão (um tamanho de palavra de 6 e o fator NOPAM para a matriz de pontuação) conforme fornecidos no GCG Versão 6.1, incorporado neste documento por referência. Programas de alinhamento de sequências múltiplas estão também disponíveis para sequências de aminoácidos, por exemplo, os programas "Clustal Omega", "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" e "Match-Box". Geralmente, qualquer um destes programas é usado nas configurações padrão, embora um versado na técnica possa alterar estas configurações conforme necessário. Alternativamente, um versado na técnica pode usar outro algoritmo ou programa de computador que forneça pelo menos o mesmo nível de identidade ou alinhamento que aquele fornecido pelos algoritmos e programas referenciados. Ver, por exemplo., JD Thomson et al, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

[00101] Como descrito neste documento, as sequências de ácidos nucleicos podem ser manipuladas em qualquer vetor adequado. O termo "vetor" refere-se a uma molécula de ácido nucleico na qual uma

segunda molécula de ácido nucleico pode ser inserida para introdução em uma célula hospedeira onde será replicada e, em alguns casos, expressa. Em outras palavras, um vetor é capaz de transportar uma molécula de ácido nucleico à qual foi ligada. Os vetores de clonagem e os vetores de expressão são contemplados pelo termo "vetor", como utilizado neste documento. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em um hospedeiro no qual são introduzidos (por exemplo, vetores com origem bacteriana de replicação podem replicar-se em bactérias). Outros vetores podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira e, desse modo, são replicados junto com o genoma hospedeiro. Os vetores de acordo com a invenção podem ser facilmente produzidos por métodos bem conhecidos pelo versado na técnica.

## II. Clade F AAVhu68

[00102] Conforme utilizado neste documento, o termo "clade", no que se refere a grupos de AAV, refere-se a um grupo de AAV que são filogeneticamente relacionados entre si, conforme determinado usando um algoritmo Neighbor-Joining por um valor de bootstrap de pelo menos 75% (de pelo menos 1000 réplicas) e uma medição da distância de correção de Poisson de, no máximo, 0,05, com base no alinhamento da sequência de aminoácidos vp1 de AAV. O algoritmo Neighbor-Joining foi descrito previamente na literatura. Ver, por exemplo, M. Nei e S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics* (Oxford University Press, New York (2000)). Estão disponíveis programas de computador que podem ser usados para implementar esse algoritmo. Por exemplo, o programa MEGA v2.1 implementa o método Nei-Gojobori modificado. Utilizando estas técnicas e programas de computador, e a sequência de uma proteína do capsídeo AAV vp1, um versado na técnica pode prontamente determinar se um AAV selecionado está contido em um dos clades identificados neste documento, em outro clade, ou se encontra fora destes clades. Ver, por exemplo, G Gao, *et al*, J Virol,

2004 Jun; 78(12): 6381-6388, que identifica clades A, B, C, D, E e F, e fornece sequência de ácido nucleico do novo AAV, números de acesso AY530553 a AY530629. Ver também WO 2005/033321.

[00103] Conforme utilizado neste documento, um "capsídeo AAV9" é um capsídeo AAV auto-montado composto por várias proteínas AAV9 vp. As proteínas AAV9 vp são tipicamente expressas como variantes de splice alternativas codificadas por uma sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 36 ou uma sequência pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99% idêntica a ela, que codifica a sequência de aminoácidos vp1 da SEQ ID NO: 17 (Acesso do GenBank: AAS99264). Estas variantes de splice resultam em proteínas de diferentes comprimentos da SEQ ID NO: 17. Em certas modalidades, "capsídeo AAV9" inclui um AAV com uma sequência de aminoácidos que é 99% idêntica a AAS99264 ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 17. Ver também US7906111 e WO 2005/033321. Conforme utilizado neste documento, "variantes de AAV9" incluem as descritas em, por exemplo, WO2016/049230, US 8.927.514, US 2015/0344911, e US 8.734.809.

[00104] Um rAAVhu68 é composto por um capsídeo AAVhu68 e um genoma de vetor. Um capsídeo AAVhu68 é um conjunto de uma população heterogênea de proteínas vp1, uma população heterogênea de proteínas vp2 e uma população heterogênea de proteínas vp3. Conforme utilizado neste documento, quando utilizado para se referir às proteínas do capsídeo vp, o termo "heterogêneo" ou qualquer variação gramatical dos mesmos, refere-se a uma população que consiste em elementos que não são iguais, por exemplo, possuindo monômeros vp1, vp2 ou vp3 (proteínas) com diferentes sequências de aminoácidos modificadas. A SEQ ID NO: 16 fornece a sequência de aminoácidos codificada da proteína vp1 de AAVhu68. Ver, também, os Pedidos de Patentes Provisórios dos EUA N<sup>os</sup>. 62/614.002, 62/591.002 e

62/464.748, sendo cada um dos quais intitulado "Novel Adeno-Associated Virus (AAV) Clade F Vector and Uses Therefor", e que são incorporados neste documento por referência na sua totalidade.

[00105] O capsídeo AAVhu68 contém subpopulações nas proteínas vp1, nas proteínas vp2 e nas proteínas vp3 que possuem modificações a partir dos resíduos de aminoácidos previstos na SEQ ID NO: 16. Essas subpopulações incluem, no mínimo, certos resíduos de asparagina (N ou Asn) desamidada. Por exemplo, certas subpopulações compreendem pelo menos uma, duas, três ou quatro posições de asparaginas (N) altamente desamidadas em pares asparagina-glicina na SEQ ID NO: 16 e opcionalmente compreendendo ainda outros aminoácidos desamidados, em que a desamidação resulta em uma alteração de aminoácidos e outras modificações opcionais. A SEQ ID NO: 39 fornece a sequência de aminoácidos de um capsídeo AAVhu68 modificado, ilustrando posições de resíduos que podem ser desamidadas ou modificadas de outro modo.

[00106] Conforme utilizado neste documento, uma "subpopulação" de proteínas vp refere-se a um grupo de proteínas vp que possui pelo menos uma característica definida em comum e que consiste em pelo menos um membro do grupo a menos do que todos os membros do grupo de referência, a menos que especificado de outra forma. Por exemplo, uma "subpopulação" de proteínas vp1 é pelo menos uma (1) proteína vp1 e menor que todas as proteínas vp1 em um capsídeo AAV montado, a menos que especificado de outra forma. Uma "subpopulação" de proteínas vp3 pode ser uma (1) proteína vp3 a menos do que todas as proteínas vp3 em um capsídeo AAV montado, a menos que especificado de outra forma. Por exemplo, as proteínas vp1 podem ser uma subpopulação de proteínas vp; As proteínas vp2 podem ser uma subpopulação separada de proteínas vp, e vp3 são ainda uma subpopulação adicional de proteínas vp em um capsídeo

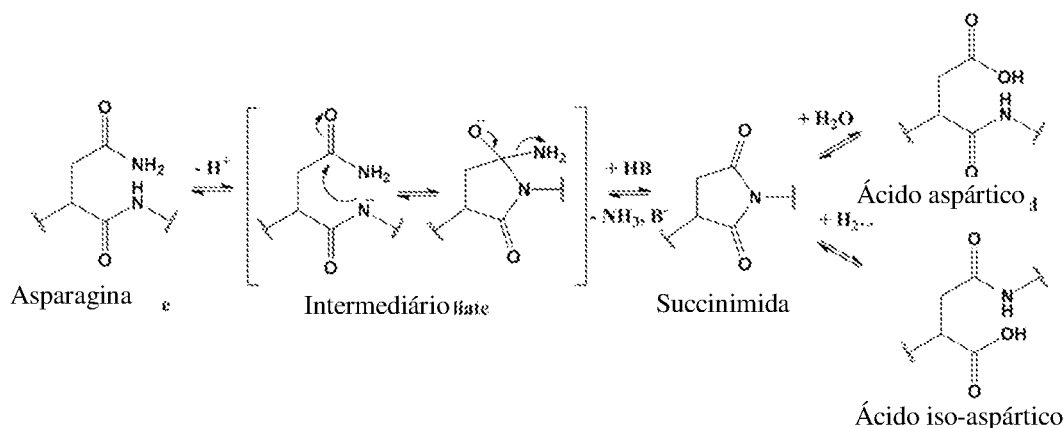
AAV montado. Em outro exemplo, as proteínas vp1, vp2 e vp3 podem conter subpopulações com diferentes modificações, por exemplo, pelo menos uma, duas, três ou quatro asparaginas altamente desamidadas, por exemplo, em pares asparagina-glicina.

[00107] Salvo indicação em contrário, altamente desamidado refere-se a pelo menos 45% desamidado, pelo menos 50% desamidado, pelo menos 60% desamidado, pelo menos 65% desamidado, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, 97%, 99%, até cerca de 100% desamidado em uma posição de aminoácido referenciada, em comparação com a sequência de aminoácidos prevista na posição de aminoácido de referência (por exemplo, pelo menos 80% das asparaginas no aminoácido 57 da SEQ ID NO: 16 podem ser desamidadas com base nas proteínas vp1 totais ou 10% das asparaginas no aminoácido 409 da SEQ ID NO: 16 podem ser desamidadas com base no total de proteínas vp1, vp2 e vp3). Tais percentagens podem ser determinadas utilizando gel 2D, técnicas de espectrometria de massas ou outras técnicas adequadas.

[00108] Sem desejar estar vinculado pela teoria, acredita-se que a desamidação de resíduos pelo menos altamente desamidados nas proteínas vp no capsídeo AAVhu68 seja de natureza principalmente não enzimática, sendo causada por grupos funcionais dentro da proteína do capsídeo que desamidam asparaginas selecionadas e, em menor grau, resíduos de glutamina. A montagem eficiente do capsídeo da maioria das proteínas vp1 de desamidação indica que estes eventos ocorrem após a montagem do capsídeo ou que a desamidação em monômeros individuais (vp1, vp2 ou vp3) é bem tolerada estruturalmente e em grande parte não afeta a dinâmica de montagem. A desamidação extensa na região exclusiva de VP1 (VP1-u) (~aa 1-137), geralmente considerada como localizada internamente antes da entrada celular,

sugere que a desamidação de VP pode ocorrer antes da montagem do capsídeo.

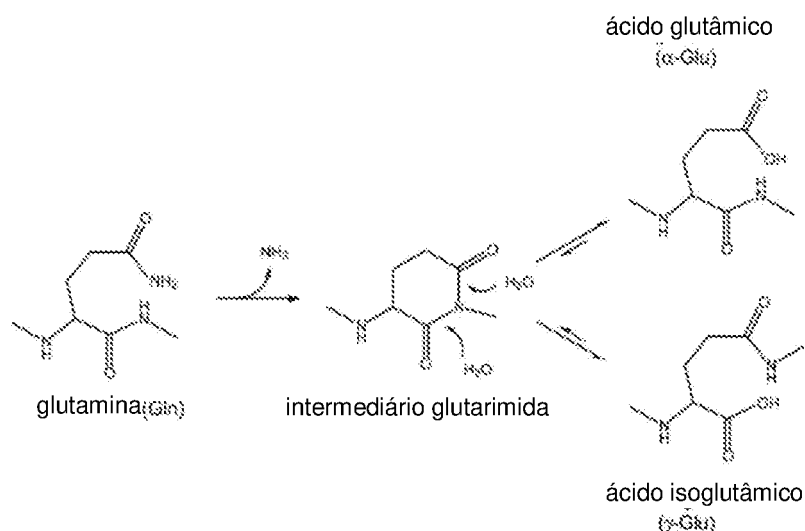
[00109] Sem desejar ser limitado pela teoria, a desamidação de N pode ocorrer quando o átomo de nitrogênio da cadeia principal do seu resíduo C-terminal conduz um ataque nucleofílico ao átomo de carbono do grupo amida da cadeia lateral de Asn. Acredita-se que, assim, um resíduo intermediário de succinimida fechada em anel se forma. O resíduo de succinimida então conduz uma hidrólise rápida para levar ao produto final ácido aspártico (Asp) ou ácido iso aspártico (IsoAsp). Portanto, em certas modalidades, a desamidação de asparagina (N ou Asn) leva a um Asp ou IsoAsp, que pode interconverter através do intermediário succinimida, por exemplo, conforme ilustrado abaixo.



[00110] Conforme fornecido neste documento, cada N desamidada da SEQ ID NO: 16 pode independentemente ser ácido aspártico (Asp), ácido isoaspártico (isoAsp), aspartato e/ou uma mistura de interconversão de Asp e isoAsp, ou combinações dos mesmos. Qualquer proporção adequada de ácido  $\alpha$ - e isoaspártico pode estar presente. Por exemplo, em certas modalidades, a proporção pode ser de 10:1 a 1:10 aspártico para iso-aspártico, cerca de 50:50 aspártico: iso-aspártico ou cerca de 1:3 aspártico: iso-aspártico, ou outra proporção selecionada.

[00111] Em certas modalidades, uma ou mais glutamina (Q) na SEQ ID NO: 16 desamida em ácido glutâmico (Glu), ou seja, ácido  $\alpha$ -

glutâmico, ácido  $\gamma$ -glutâmico (Glu) ou uma mistura de  $\alpha$  e  $\gamma$ -glutâmico ácido, que pode se interconverter através de um intermediário comum da glutarinimida. Qualquer proporção adequada de ácido  $\alpha$ - e  $\gamma$ -glutâmico pode estar presente. Por exemplo, em certas modalidades, a proporção pode ser de 10:1 a 1:10  $\alpha$  a  $\gamma$ , cerca de 50:50  $\alpha$ :  $\gamma$ , ou cerca de 1:3  $\alpha$ :  $\gamma$ , ou outra proporção selecionada.



[00112] Assim, um rAAVhu68 inclui subpopulações no capsídeo rAAVhu68 das proteínas vp1, vp2 e/ou vp3 com aminoácidos desamidados, incluindo, no mínimo, pelo menos uma subpopulação compreendendo pelo menos uma asparagina altamente desamidada. Além disso, outras modificações podem incluir isomerização, particularmente em posições de resíduos de ácido aspártico (D ou Asp) selecionadas. Ainda em outras modalidades, as modificações podem incluir uma amidação em uma posição Asp.

[00113] Em certas modalidades, um capsídeo AAVhu68 contém subpopulações de vp1, vp2 e vp3 possuindo pelo menos 4 a pelo menos cerca de 25 posições de resíduos de aminoácidos desamidados, das quais pelo menos 1 a 10% são desamidadas em comparação com a sequência de aminoácidos codificada da SEQ ID NO: 16. A maioria destes pode ser resíduos N. Contudo, os resíduos Q também podem ser desamidados.



[00114] Em certas modalidades, um capsídeo AAV68 é ainda caracterizado por um ou mais dos seguintes. As proteínas do capsídeo AAVhu68 compreendem: proteínas AAVhu68 vp1 produzidas por expressão de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de aminoácidos prevista de 1 a 736 da SEQ ID NO: 16, proteínas vp1 produzidas a partir da SEQ ID NO: 18 ou proteínas vp1 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 18 que codifica a sequência de aminoácidos prevista de 1 a 736 da SEQ ID NO: 16; proteínas AAVhu68 vp2 produzidas por expressão de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de aminoácidos prevista de pelo menos cerca de aminoácidos 138 a 736 da SEQ ID NO: 16, proteínas vp2 produzidas a partir de uma sequência compreendendo pelo menos os nucleotídeos 412 a 2211 da SEQ ID NO: 18 ou proteínas vp2 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica a pelo menos os nucleotídeos 412 a 2211 da SEQ ID NO: 18 que codifica a sequência de aminoácidos prevista de pelo menos cerca dos aminoácidos 138 a 736 da SEQ ID NO: 16 e/ou proteínas AAVhu68 vp3 produzidas por expressão de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de aminoácidos prevista de pelo menos cerca dos aminoácidos 203 a 736 da SEQ ID NO: 16, proteínas vp3 produzidas a partir de uma sequência compreendendo pelo menos nucleotídeos 607 a 2211 da SEQ ID NO: 18 ou proteínas vp3 produzidas a partir de uma sequência de ácidos nucleicos pelo menos 70% idêntica a pelo menos os nucleotídeos 607 a 2211 da SEQ ID NO: 18 que codificam a sequência de aminoácidos prevista de pelo menos cerca dos aminoácidos de 203 a 736 da SEQ ID NO: 16.

[00115] Adicionalmente ou alternativamente, é fornecido um capsídeo AAV que compreende uma população heterogênea de proteínas vp1, uma população heterogênea de proteínas vp2

opcionalmente compreendendo uma valina na posição 157 e uma população heterogênea de proteínas vp3, em que pelo menos uma subpopulação das proteínas vp1 e vp2 compreendem uma valina na posição 157 e opcionalmente compreendem ainda uma glutamina na posição 57 com base na numeração do capsídeo vp1 da SEQ ID NO: 16. Adicionalmente ou alternativamente, é fornecido um capsídeo AAVhu68 que compreende uma população heterogênea de proteínas vp1 que são o produto de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16, uma população heterogênea de proteínas vp2 que são o produto de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos de pelo menos cerca dos aminoácidos 138 a 736 da SEQ ID NO: 16 e uma população heterogênea de proteínas vp3 que são o produto de uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos os aminoácidos 203 a 736 da SEQ ID NO: 16, em que: as proteínas vp1, vp2 e vp3 contêm subpopulações com modificações de aminoácidos

[00116] As proteínas AAVhu68 vp1, vp2 e vp3 são tipicamente expressas como variantes de splice alternativas codificadas pela mesma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos vp1 completa da SEQ ID NO: 16 (aminoácido 1 a 736). Opcionalmente, a sequência de codificação de vp1 é usada sozinha para expressar as proteínas vp1, vp2 e vp3. Alternativamente, esta sequência pode ser coexpressa com uma ou mais sequências de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos AAVhu68 vp3 da SEQ ID NO: 16 (cerca de aa 203 a 736) sem a região exclusiva de vp1 (cerca de aa 1 a cerca de aa 137) e/ou regiões exclusivas de vp2 (cerca de aa 1 a cerca de aa 202), ou uma cadeia complementar a esta, o mRNA ou tRNA correspondente (cerca de nt 607 a cerca de nt 2211 da SEQ ID N18), ou uma sequência pelo menos 70% a pelo menos 99% (por exemplo, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo

menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99%) idêntica à SEQ ID NO: 18 que codifica aa 203 a 736 da SEQ ID NO: 16. Adicionalmente, ou alternativamente, a sequência de codificação de vp1 e/ou codificação de vp2 pode ser co-expressa com a sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos de vp2 de AAVhu68 da SEQ ID NO: 16 (cerca de aa 138 a 736) sem a região exclusiva de vp1 (cerca de aa 1 a cerca de 137), ou uma cadeia complementar a esta, o mRNA ou tRNA correspondente (nt 412 a 2211 da SEQ ID NO: 18) ou uma sequência pelo menos 70% a pelo menos 99% (por exemplo, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99%) idêntica à SEQ ID NO: 18 que codifica cerca de aa 138 a 736 da SEQ ID NO: 16.

[00117] Conforme descrito neste documento, um rAAVhu68 possui um capsídeo rAAVhu68 produzido em um sistema de produção que expressa capsídeos de um ácido nucleico de AAVhu68 que codifica a sequência de aminoácidos da vp1 da SEQ ID NO: 16, e opcionalmente sequências adicionais de ácido nucleico, por exemplo, codificando uma proteína vp3 livre das regiões exclusivas de vp1 e/ou vp2. O rAAVhu68 resultante da produção utilizando uma única sequência de ácido nucleico vp1 produz as populações heterogêneas de proteínas vp1, proteínas vp2 e proteínas vp3. Mais particularmente, o capsídeo AAVhu68 contém subpopulações nas proteínas vp1, nas proteínas vp2 e nas proteínas vp3 que possuem modificações a partir dos resíduos de aminoácidos previstos na SEQ ID NO: 16. Essas subpopulações incluem, no mínimo, resíduos de asparagina (N ou Asn) desamidada. Por exemplo, asparaginas em pares asparagina - glicina são altamente desamidadas.

[00118] Em uma modalidade, a sequência de ácido nucleico de AAVhu68vp1 possui a sequência da SEQ ID NO: 18, ou uma cadeia complementar à mesma, por exemplo, o mRNA ou tRNA

correspondente. Em certas modalidades, as proteínas vp2 e/ou vp3 podem ser expressas adicionalmente ou alternativamente a partir de diferentes sequências de ácidos nucleicos que a vp1, por exemplo, para alterar a proporção das proteínas vp em um sistema de expressão selecionado. Em certas modalidades, também é fornecida uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos AAVhu68 vp3 da SEQ ID NO: 16 (cerca de aa 203 a 736) sem a região exclusiva de vp1 (cerca de aa 1 a cerca de aa 137) e/ou regiões exclusivas de vp2 (cerca de aa 1 a cerca de aa 202), ou uma cadeia complementar à mesma, o mRNA ou tRNA correspondente (cerca de nt 607 a cerca de nt 2211 da SEQ ID NO: 18). Em certas modalidades, também é fornecida uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos AAVhu68 vp2 da SEQ ID NO: 16 (cerca de um a 138 a 736) sem a região exclusiva de vp1 (cerca de um a 1 a cerca de 137) ou uma cadeia complementar à mesma, o mRNA ou tRNA correspondente (nt 412 a 2211 da SEQ ID NO: 18).

[00119] No entanto, outras sequências de ácido nucleico que codificam a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16 podem ser selecionadas para utilização na produção de capsídeos rAAVhu68. Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico possui a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 18 ou uma sequência pelo menos 70% a 99% idêntica, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99%, idêntica à SEQ ID NO: 18 que codifica a SEQ ID NO: 16. Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico possui a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 18 ou uma sequência pelo menos 70% a 99%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99%, idêntica a cerca de nt 412 a cerca de nt 2211 da SEQ ID NO: 18 que codifica a proteína do capsídeo vp2 (cerca de aa 138 a 736) da SEQ ID NO: 16.

Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico possui a sequência de ácido nucleico de cerca de nt 607 a cerca de nt 2211 da SEQ ID NO: 18 ou uma sequência pelo menos 70% a 99%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99%, idêntica a nt da SEQ ID NO:18 que codifica a proteína do capsídeo vp3 (cerca de aa 203 a 736) da SEQ ID NO: 16.

[00120] É do conhecimento da técnica desenhar sequências de ácidos nucleicos que codificam esse capsídeo AAVhu68, incluindo DNA (genômico ou cDNA) ou RNA (por exemplo, mRNA). Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico que codifica a proteína do capsídeo AAVhu68vp1 é fornecida na SEQ ID NO: 18. *Ver também*, FIGURAS 1B-1D. Em outras modalidades, uma sequência de ácido nucleico de 70% a 99,9% de identidade com a SEQ ID NO: 18 pode ser selecionada para expressar as proteínas do capsídeo AAVhu68. Em certas outras modalidades, a sequência de ácido nucleico é pelo menos cerca de 75% idêntica, pelo menos 80% idêntica, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% idêntica, ou pelo menos 99% a 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 18. Tais sequências de ácido nucleico podem ser otimizadas por códon para expressão em um sistema selecionado (isto é, tipo de célula) e podem ser desenhadas por vários métodos. Essa otimização pode ser realizada utilizando métodos que estão disponíveis on-line (por exemplo, GeneArt), métodos publicados ou uma empresa que fornece serviços de otimização de códons, por exemplo, DNA2.0 (Menlo Park, CA). Um método de otimização de códons é descrito, por exemplo, na Publicação de Patente Internacional dos EUA Nº WO 2015/012924, que é incorporada neste documento por referência na sua totalidade. *Ver também*, por exemplo, a Publicação de Patente dos EUA 2014/0032186 e a Publicação de Patente dos EUA 2006/0136184. Adequadamente, o comprimento

completo do quadro de leitura aberta (ORF) para o produto é modificado. No entanto, em algumas modalidades, apenas um fragmento da ORF pode ser alterado. Utilizando um destes métodos, podem-se aplicar as frequências a qualquer sequência polipeptídica e produzir um fragmento de ácido nucleico de uma região codificadora otimizada por códons que codifica o polipeptídeo. Estão disponíveis várias opções para efetuar as alterações reais aos códons ou para sintetizar as regiões de codificação otimizadas por códons concebidas como descritas neste documento. Tais modificações ou síntese podem ser realizadas utilizando manipulações biológicas moleculares padrão e de rotina bem conhecidas dos versados na técnica. Em uma abordagem, uma série de pares de oligonucleotídeos complementares de 80-90 nucleotídeos cada um em comprimento e abrangendo o comprimento da sequência desejada são sintetizados através de métodos padrão. Estes pares de oligonucleotídeos são sintetizados de tal modo que após o anelamento, formam fragmentos de cadeia dupla de 80-90 pares de bases, contendo extremidades coesivas, por exemplo, cada oligonucleotídeo no par é sintetizado para se estender 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, ou mais bases além da região que é complementar ao outro oligonucleotídeo no par. As extremidades de fita simples de cada par de oligonucleotídeos são desenhadas para anelarem com a extremidade de fita simples de outro par de oligonucleotídeos. Os pares de oligonucleotídeos são autorizados a emparelhar, e aproximadamente cinco a seis destes fragmentos de cadeia dupla são então permitidos emparelharem juntos através das extremidades coesivas de cadeia simples, e depois são ligados e clonados em um vetor de clonagem bacteriano padrão, por exemplo, um vetor TOPO® disponível pela Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia. O construto é então sequenciado por métodos padrão. Vários destes construtos consistindo de 5 a 6 fragmentos de fragmentos de 80 a 90 pares de bases ligados

entre si, ou seja, fragmentos de cerca de 500 pares de bases, são preparados de tal modo que toda a sequência desejada é representada em uma série de construtos plasmáticos. As inserções destes plasmídeos são então cortadas com enzimas de restrição apropriadas e ligadas em conjunto para formar o construto final. O construto final é então clonado em um vetor de clonagem bacteriana padrão e sequenciada. Métodos adicionais seriam imediatamente evidentes para o versado na técnica. Além disso, a síntese gênica está prontamente disponível comercialmente.

[00121] Em certas modalidades, a asparagina (N) nos pares N-G nas proteínas AAVhu68 vp1, vp2 e vp3 é altamente desamidada. Em certas modalidades, um capsídeo AAVhu68 contém subpopulações de proteínas do capsídeo AAV vp1, vp2 e/ou vp3 possuindo pelo menos quatro posições de asparagina (N) nas proteínas do capsídeo AAVhu68 que sejam altamente desamidadas. Em certas modalidades, cerca de 20 a 50% dos pares N-N (exclusivos das tríades N-N-N) apresentam desamidação. Em certas modalidades, o primeiro N é desamidado. Em certas modalidades, o segundo N é desamidado. Em certas modalidades, a desamidação está entre cerca de 15% e cerca de 25% de desamidação. Adesamidação no Q na posição 259 da SEQ ID NO: 16 é de cerca de 8% a cerca de 42% das proteínas do capsídeo vp1, vp2 e vp3 de AAVhu68 de uma proteína AAVhu68.

[00122] Em certas modalidades, o capsídeo rAAVhu68 é ainda caracterizado por uma amidação em D297 das proteínas vp1, vp2 e vp3. Em certas modalidades, cerca de 70% a cerca de 75% do D na posição 297 das proteínas vp1, vp2 e/ou vp3 em um capsídeo AAVhu68 são amidadas, com base na numeração da SEQ ID NO: 16.

[00123] Em certas modalidades, pelo menos um Asp no vp1, vp2 e/ou vp3 do capsídeo é isomerizado em D-Asp. Esses isômeros estão geralmente presentes em uma quantidade inferior a cerca de 1% da Asp

em uma ou mais posições de resíduo 97, 107, 384, com base na numeração da SEQ ID NO: 16.

[00124] Em certas modalidades, um rAAVhu68 possui um capsídeo AAVhu68 com proteínas vp1, vp2 e vp3 com subpopulações compreendendo combinações de dois, três, quatro ou mais resíduos desamidados nas posições definidas na tabela abaixo. A desamidação no rAAV pode ser determinada usando eletroforese em gel 2D e/ou espectrometria de massas e/ou técnicas de modelagem de proteínas. A cromatografia on-line pode ser realizada com uma coluna Acclaim PepMap e um sistema Thermo UltiMate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um Q Exactive HF com uma fonte NanoFlex (Thermo Fisher Scientific). Os dados da MS são adquiridos usando um método top-20 dependente de dados para o Q Exactive HF, escolhendo dinamicamente os íons precursores ainda não sequenciados mais abundantes das varreduras da pesquisa (200-2000 m/z). O sequenciamento é realizado através de fragmentação de dissociação de colisão de alta energia com um valor alvo de  $1e5$  íons determinados com controle de ganho automático preditivo e um isolamento de precursores foi realizado com uma janela de 4 m/z. Os exames foram adquiridos com uma resolução de 120.000 a m/z 200. A resolução para os espectros de HCD pode ser configurada para 30.000 a m/z 200, com um tempo máximo de injeção de íons de 50 ms e uma energia de colisão normalizada de 30. O nível de RF da lente S pode ser fixado em 50, para fornecer a transmissão ideal da região m/z ocupada pelos peptídeos da massa digerida. Os íons precursores com estados de carga únicos, não atribuídos ou de seis ou mais podem ser excluídos da seleção de fragmentação. O software BioPharma Finder 1.0 (Thermo Fischer Scientific) pode ser usado para análise dos dados adquiridos. Para o mapeamento peptídico, as buscas são realizadas usando um banco de dados FASTA de proteína de entrada única com um conjunto



de carbamidometilação como uma modificação fixa; e oxidação, desamidação e fosforilação ajustadas como modificações variáveis, uma precisão de massa de 10 ppm, uma alta especificidade de protease e um nível de confiança de 0,8 para espectros de MS/MS. Exemplos de proteases adequadas podem incluir, por exemplo, tripsina ou quimotripsina. A identificação espectrométrica de massas de peptídeos desamidados é relativamente simples, pois a desamidação aumenta a massa da molécula intacta +0,984 Da (a diferença de massa entre os grupos  $-OH$  e  $-NH_2$ ). A porcentagem de desamidação de um peptídeo particular é a área de massa determinada do peptídeo desamidado dividida pela soma da área dos peptídeos desamidados e nativos. Considerando o número de possíveis sítios de desamidação, as espécies isobáricas que são desamidadas em diferentes sítios podem co-migrar em um único pico. Consequentemente, os íons de fragmentos originários de peptídeos com múltiplos sítios potenciais de desamidação podem ser utilizados para localizar ou diferenciar múltiplos sítios de desamidação. Nestes casos, as intensidades relativas dentro dos padrões de isótopos observados podem ser utilizadas para determinar especificamente a abundância relativa dos diferentes isômeros peptídicos desamidados. Este método assume que a eficiência da fragmentação para todas as espécies isoméricas é a mesma e independente do sítio de desamidação. Será entendido por um versado na técnica que podem ser usadas diversas variações destes métodos ilustrativos. Por exemplo, espectrômetros de massas adequados podem incluir, por exemplo, um espectrômetro de massa de tempo de voo quadrupolo (QTOF), como um Waters Xevo ou Agilent 6530 ou um instrumento orbitrap, como o Orbitrap Fusion ou Orbitrap Velos (Thermo Fisher). Os sistemas de cromatografia líquida apropriados incluem, por exemplo, o sistema Acquity UPLC dos sistemas Waters ou Agilent (série 1100 ou 1200). O software de análise de dados adequado pode incluir,

por exemplo, MassLynx (Waters), Pinpoint e Pepfinder (Thermo Fischer Scientific), Mascote (Matrix Science), Peaks DB (Bioinformatics Solutions). Ainda outras técnicas podem ser descritas, por exemplo, em X. Jin et al, Hu Gene Therapy Methods, vol. 28, nº 5, pp. 255-267, publicado online em 16 de junho de 2017.

Desamidação Baseado no AAVHu68 Previsto [SEQ ID NO: 16]	% Média com base nas proteínas VP1/VP2/VP3 no capsídeo AAVhu68	
Resíduo Desamidado + 1 (AA vizinho)	Ampla faixa de Porcentagens (%)	Faixas Estreitas (%)
N57 (N-G)	78 a 100%	80 a 100, 85 a 97
N66 (N-E)	0 a 5	0, 1 a 5
N94 (N-H)	0 a 15,	0, 1 a 15, 5 a 12, 8
N113 (N-L)	0 a 2	0, 1 a 2
~N253 (N-N)	10 a 25	15 a 22
Q259 (Q-I)	8 a 42	10 a 40, 20 a 35
~N270 (N-D)	12 a 30	15 a 28
~N304 (N-N) (posição 303 também N)	0 a 5	1 a 4
N319 (N-I)	0 a 5	0, 1 a 5, 1 a 3
N329 * (N-G)*(posição 328 também N)	65 a 100	70 a 95, 85 a 95, 80 a 100, 85 a 100,
N336	0 a 100	0, 1 a 10, 25 a

Desamidação Baseado no AAVHu68 Previsto [SEQ ID NO: 16]	% Média com base nas proteínas VP1/VP2/VP3 no capsídeo AAVhu68	
Resíduo Desamidado + 1 (AA vizinho)	Ampla faixa de Porcentagens (%)	Faixas Estreitas (%)
(N-N)		100, 30 a 100, 30 a 95
~N409 (N-N)	15 a 30	20 a 25
N452 (N-G)	75 a 100	80 a 100, 90 a 100, 95 a 100,
N477 (N-Y)	0 a 8	0, 1 a 5
N512 (N-G)	65 a 100	70 a 95, 85 a 95, 80 a 100, 85 a 100,
~N515 (N-S)	0 a 25	0, 1 a 10, 5 a 25, 15 a 25
~Q599 (Asn-Q-Gly)	1 a 20	2 a 20, 5 a 15
N628 (N-F)	0 a 10	0, 1 a 10, 2 a 8
N651 (N-T)	0 a 3	0, 1 a 3
N663 (N-K)	0 a 5	0, 1 a 5, 2 a 4
N709 (N-N)	0 a 25	0, 1 a 22, 15 a 25
N735	0 a 40	0, 1 a 35, 5 a 50, 20 a 35

[00125] Em certas modalidades, o capsídeo AAVhu68 é caracterizado por possuir proteínas de capsídeo nas quais pelo menos

45% dos resíduos N são desamidados em pelo menos uma das posições N57, N329, N452 e/ou N512 com base na numeração da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16. Em certas modalidades, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos 90% dos resíduos N em uma ou mais destas posições N-G (isto é, N57, N329, N452 e/ou N512, com base na numeração da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16) são desamidados. Nestas e em outras modalidades, um capsídeo AAVhu68 é ainda caracterizado por ter uma população de proteínas em que cerca de 1% a cerca de 20% dos resíduos N possuem desamidações em uma ou mais posições: N94, N253, N270, N304, N409, N477 e/ou Q599, com base na numeração da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16. Em certas modalidades, o AAVhu68 compreende pelo menos uma subpopulação de proteínas vp1, vp2 e/ou vp3 que são desamidadas em uma ou mais das posições N35, N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, N735, com base na numeração da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16 ou combinações das mesmas. Em certas modalidades, as proteínas do capsídeo podem ter um ou mais aminoácidos amidados.

[00126] Ainda são observadas outras modificações, a maioria das quais não resulta na conversão de um aminoácido em um resíduo de aminoácido diferente. Opcionalmente, pelo menos uma Lys na vp1, vp2 e vp3 do capsídeo é acetilada. Opcionalmente, pelo menos um Asp na vp1, vp2 e/ou vp3 do capsídeo é isomerizado em D-Asp. Opcionalmente, pelo menos um S (Ser, Serina) na vp1, vp2 e/ou vp3 do capsídeo é fosforilado. Opcionalmente, pelo menos um T (Thr, treonina) na vp1, vp2 e/ou vp3 do capsídeo é fosforilado. Opcionalmente, pelo menos um W (trp, triptofano) na vp1, vp2 e/ou vp3 do capsídeo é oxidado. Opcionalmente, pelo menos um M (Met, Metionina) na vp1, vp2

e/ou vp3 do capsídeo é oxidado. Em certas modalidades, as proteínas do capsídeo possuem uma ou mais fosforilações. Por exemplo, certas proteínas de capsídeo vp1 podem ser fosforiladas na posição 149.

[00127] Em certas modalidades, um capsídeo AAVhu68 compreende uma população heterogênea de proteínas vp1 que são o produto de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16, em que as proteínas vp1 compreendem um ácido glutâmico (Glu) na posição 67 e/ou uma valina (Val) na posição 157; uma população heterogênea de proteínas vp2 compreendendo opcionalmente uma valina (Val) na posição 157; e uma população heterogênea de proteínas vp3. O capsídeo AAVhu68 contém pelo menos uma subpopulação em que pelo menos 65% das asparaginas (N) em pares asparagina - glicina localizados na posição 57 das proteínas vp1 e pelo menos 70% de asparaginas (N) em pares asparagina - glicina nas posições 329, 452 e/ou 512 das proteínas vp1, v2 e vp3 são desamidadas, com base na numeração do resíduo da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16, em que a desamidação resulta em uma alteração de aminoácidos. Conforme discutido em mais detalhes neste documento, as asparaginas desamidadas podem ser desamidadas em ácido aspártico, ácido iso-aspártico, um par de ácido aspártico/ácido iso-aspártico interconversor ou combinações dos mesmos. Em certas modalidades, os rAAVhu68 são ainda caracterizados por um ou mais dos seguintes: (a) cada uma das proteínas vp2 é independentemente o produto de uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos a proteína vp2 da SEQ ID NO: 16; (b) cada uma das proteínas vp3 é independentemente o produto de uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos a proteína vp3 da SEQ ID NO: 16; (c) a sequência de ácido nucleico que codifica as proteínas vp1 é a SEQ ID NO: 18, ou uma sequência pelo menos 70% a pelo menos 99% (por exemplo, pelo menos 85%, pelo menos

90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99%) idêntica à SEQ ID NO: 18, que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16. Opcionalmente, essa sequência é usada sozinha para expressar as proteínas vp1, vp2 e vp3. Alternativamente, esta sequência pode ser co-expressa com uma ou mais sequências de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos vp3 de AAVhu68 da SEQ ID NO: 16 (cerca de aa 203 a 736) sem a região exclusiva de vp1 (cerca de aa 1 a cerca de aa 137) e/ou regiões exclusivas de vp2 (cerca de aa 1 a cerca de aa 202), ou uma cadeia complementar a esta, o mRNA ou tRNA correspondente (cerca de nt 607 a cerca de nt 2211 da SEQ ID NO: 18), ou uma sequência pelo menos 70% a pelo menos 99% (por exemplo, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99%) idêntica à SEQ ID NO: 18 que codifica aa 203 a 736 da SEQ ID NO: 16. Adicionalmente, ou alternativamente, a sequência de codificação de vp1 e/ou codificação de vp2 pode ser co-expressa com a sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos de vp2 de AAVhu68 da SEQ ID NO: 16 (cerca de aa 138 a 736) sem a região exclusiva de vp1 (cerca de aa 1 a cerca de 137), ou uma cadeia complementar a esta, o mRNA ou tRNA correspondente (nt 412 a 2211 da SEQ ID NO: 18) ou uma sequência pelo menos 70% a pelo menos 99% (por exemplo, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99%) idêntica à SEQ ID NO: 18 que codifica cerca de aa 138 a 736 da SEQ ID NO: 16.

[00128] Adicionalmente ou alternativamente, o capsídeo rAAVhu68 compreende pelo menos uma subpopulação de proteínas vp1, vp2 e/ou vp3 que são desamidadas em uma ou mais das posições N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N512, N515, N598, Q599, N628,

N651, N663, N709, com base na numeração da SEQ ID NO: 16 ou combinações das mesmas; (e) o capsídeo rAAVhu68 compreende uma subpopulação de proteínas vp1, vp2 e/ou vp3 que compreendem desamidação de 1% a 20% em uma ou mais das posições N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, com base na numeração da SEQ ID NO: 16 ou combinações das mesmas; (f) o capsídeo rAAVhu68 compreende uma subpopulação de vp1 na qual são desamidadas 65% a 100% das N na posição 57 das proteínas vp1, com base na numeração da SEQ ID NO: 16; (g) o capsídeo rAAVhu68 compreende uma subpopulação de proteínas vp1 na qual são desamidadas 75% a 100% das N na posição 57 das proteínas vp1; (h) o capsídeo rAAVhu68 compreende subpopulação de proteínas vp1, proteínas vp2 e/ou proteínas vp3 nas quais 80% a 100% das N na posição 329, com base na numeração da SEQ ID NO: 16, são desamidadas; (i) o capsídeo rAAVhu68 compreende subpopulação de proteínas vp1, proteínas vp2 e/ou proteínas vp3 nas quais 80% a 100% das N na posição 452, com base na numeração da SEQ ID NO: 16, são desamidadas; (j) o capsídeo rAAVhu68 compreende subpopulação de proteínas vp1, proteínas vp2 e/ou proteínas vp3 nas quais 80% a 100% das N na posição 512, com base na numeração da SEQ ID NO: 16, são desamidadas; (k) o rAAV compreende cerca de 60 proteínas totais do capsídeo em uma proporção de cerca de 1 vp1 a cerca de 1 a 1,5 vp2 a 3 a 10 proteínas vp3; (l) o rAAV compreende cerca de 60 proteínas totais do capsídeo em uma proporção de cerca de 1 vp1 a cerca de 1 vp2 a 3 a 9 proteínas vp3.

[00129] Em certas modalidades, o AAVhu68 é modificado para alterar a glicina em um par asparagina-glicina, para reduzir a desamidação. Em outras modalidades, a asparagina é alterada para um aminoácido diferente, por exemplo, uma glutamina que desamida a uma

velocidade menor; ou a um aminoácido que não possui grupos amida (por exemplo, glutamina e asparagina contêm grupos amida); e/ou a um aminoácido que não possui grupos amina (por exemplo, lisina, arginina e histidina contêm grupos amida). Conforme utilizado neste documento, aminoácidos que não possuem grupos laterais amida ou amina referem-se a, por exemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cistina, fenilalanina, tirosina ou triptofano e/ou prolina. Modificações como as descritas podem estar em um, dois ou três dos pares asparagina-glicina encontrados na sequência de aminoácidos AAVhu68 codificada. Em certas modalidades, essas modificações não são feitas em todos os quatro pares de asparagina - glicina. Assim, um método para reduzir a desamidação de AAVhu68 e/ou variantes de AAVhu68 manipuladas com taxas de desamidação mais baixas. Adicionalmente ou alternativamente, um ou mais outros aminoácidos amidos podem ser alterados para um aminoácido não amida para reduzir a desamidação do AAVhu68.

[00130] Essas modificações de aminoácidos podem ser feitas por técnicas convencionais de manipulação genética. Por exemplo, pode ser gerada uma sequência de ácido nucleico contendo códons de AAVhu68 modificados, em que um a três dos códons que codificam glicina na posição 58, 330, 453 e/ou 513 na SEQ ID NO: 16 (pares de arginina-glicina) são modificados para codificar um aminoácido diferente de glicina. Em certas modalidades, uma sequência de ácido nucleico contendo códons de arginina modificados pode ser manipulada em um a três dos pares de arginina-glicina localizados na posição 57, 329, 452 e/ou 512 na SEQ ID NO: 16, de modo que o códon modificado codifique um aminoácido diferente de arginina. Cada códon modificado pode codificar um aminoácido diferente. Alternativamente, um ou mais dos códons alterados podem codificar o mesmo aminoácido. Em certas modalidades, estas sequências de ácido nucleico de AAVhu68



modificadas podem ser utilizadas para gerar um rAAVhu68 mutante possuindo um capsídeo com desamidação inferior ao capsídeo de hu68 nativo. Tal rAAVhu68 mutante pode ter imunogenicidade reduzida e/ou estabilidade aumentada durante o armazenamento, particularmente armazenamento na forma de suspensão.

[00131] Em uma modalidade, é fornecido um vírus adenoassociadorecombinante (rAAV) que compreende: (A) um capsídeo AAV68 compreendendo um ou mais dentre: (1) proteínas do capsídeo AAV hu68 compreendendo: proteínas AAVhu68 vp1 produzidas por expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos prevista de 1 a 736 da SEQ ID NO: 16, proteínas vp1 produzidas a partir da SEQ ID NO: 18 ou proteínas vp1 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 18 que codifica a sequência de aminoácidos prevista de 1 a 736 da SEQ ID NO: 16, proteínas AAVhu68 vp2 produzidas por expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos prevista de pelo menos cerca dos aminoácidos 138 a 736 da SEQ ID NO: 16, proteínas vp2 produzidas a partir de uma sequência compreendendo pelo menos os nucleotídeos 412 a 2211 da SEQ ID NO: 18, ou proteínas vp2 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica a pelo menos os nucleotídeos 412 a 2211 da SEQ ID NO: 18 que codifica a sequência de aminoácidos prevista de pelo menos cerca dos aminoácidos 138 a 736 da SEQ ID NO: 16, proteínas AAVhu68 vp3 produzidas por expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos prevista de pelo menos cerca dos aminoácidos 203 a 736 da SEQ ID NO: 16, proteínas vp3 produzidas a partir de uma sequência compreendendo pelo menos os nucleotídeos 607 a 2211 da SEQ ID NO: 18, ou proteínas vp3 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica a pelo

menos os nucleotídeos 607 a 2211 da SEQ ID NO: 18 que codifica a sequência de aminoácidos prevista de pelo menos cerca dos aminoácidos 203 a 736 da SEQ ID NO: 16; e/ou (2) proteínas do capsídeo AAV compreendendo uma população heterogênea de proteínas vp1, uma população heterogênea de proteínas vp2 opcionalmente compreendendo uma valina na posição 157, e uma população heterogênea de proteínas vp3, em que pelo menos uma subpopulação das proteínas vp1 e vp2 compreende uma valina na posição 157 e opcionalmente compreendendo ainda um ácido glutâmico na posição 57 com base na numeração do capsídeo vp1 da SEQ ID NO: 16; e/ou (3) uma população heterogênea de proteínas vp1 que são o produto de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16, uma população heterogênea de proteínas vp2 que são o produto de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos de pelo menos cerca dos aminoácidos 138 a 736 da SEQ ID NO: 16 e uma população heterogênea de proteínas vp3 que são o produto de uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos os aminoácidos 203 a 736 da SEQ ID NO: 16, em que: as proteínas vp1, vp2 e vp3 contêm subpopulações com modificações de aminoácidos compreendendo pelo menos duas asparaginas (N) altamente desamidadas em pares asparagina-glicina na SEQ ID NO: 16 e, opcionalmente, ainda compreendendo subpopulações compreendendo outros aminoácidos desamidados, em que a desamidação resulta em uma alteração de aminoácidos; e (B) um genoma de vetor no capsídeo AAVhu68, o genoma de vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo sequências repetidas terminais invertidas AAV e uma sequência de ácido nucleico não-AAV que codifica um produto operacionalmente ligado a sequências que direcionam a expressão do produto em uma célula hospedeira. Por exemplo, quatro resíduos (N57,

N329, N452, N512) exibem rotineiramente altos níveis de desamidação. Resíduos adicionais (N94, N253, N270, N304, N409, N477 e Q599) também exibem níveis de desamidação de até ~20% em vários lotes.

[00132] Em certas modalidades, as asparaginas desamidadas são desamidadas em ácido aspártico, ácido iso-aspártico, um par de ácido aspártico interconversor/ácido iso-aspártico, ou combinações dos mesmos. Em certas modalidades, a(s) glutamina(s) desamidada(s) é(são) desamidada(s) em ácido (α)-glutâmico, ácido γ-glutâmico, um par de interconversão de ácido (α)-glutâmico/ácido γ-glutâmico ou combinações dos mesmos.

[00133] Em certas modalidades, o capsídeo AAVhu68 compreende subpopulações possuindo um ou mais de: (a) pelo menos 65% das asparaginas (N) em pares asparagina-glicina localizados nas posições 57 das proteínas vp1 são desamidadas, com base na numeração de SEQ ID NO: 16; (b) pelo menos 75% das N em pares asparagina-glicina na posição 329 das proteínas vp1, vp2 e vp3 são desamidadas, com base na numeração de resíduos da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16; (c) pelo menos 50% das N em pares asparagina-glicina na posição 452 das proteínas vp1, v2 e vp3 são desamidadas, com base na numeração de resíduos da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16; e/ou (d) pelo menos 75% das N em pares asparagina-glicina na posição 512 das proteínas vp1, v2 e vp3 são desamidadas, com base na numeração de resíduos da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16. Em certas modalidades, o capsídeo hu68 compreende uma subpopulação de vp1 na qual 75% a 100% das N na posição 57 das proteínas vp1 são desamidadas, conforme determinado por espectrometria de massa. Em certas modalidades, o capsídeo hu68 compreende uma subpopulação de proteínas vp1, proteínas vp2 e/ou proteínas vp3 nas quais 75% a 100% das N na posição 329, com base na numeração da SEQ ID NO: 16, são desamidadas conforme

determinado usando espectrometria de massas. Em certas modalidades, o capsídeo hu68 compreende uma subpopulação de proteínas vp1, proteínas vp2 e/ou proteínas vp3 nas quais 75% a 100% das N na posição 452, com base na numeração da SEQ ID NO: 16, são desamidadas conforme determinado usando espectrometria de massa. Em certas modalidades, o capsídeo hu68 compreende uma subpopulação de proteínas vp1, proteínas vp2 e/ou proteínas vp3 nas quais 75% a 100% das N na posição 512, com base na numeração da SEQ ID NO: 16, são desamidadas. Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico que codifica as proteínas é SEQ ID NO: 18, ou uma sequência de pelo menos 80% a pelo menos 99% idêntica à SEQ ID NO: 18 que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. Em certas modalidades, a sequência é pelo menos 80% a 97% idêntica à SEQ ID NO: 18. Em certas modalidades, o capsídeo rAAVhu68 compreende ainda pelo menos uma subpopulação de proteínas vp1, vp2 e/ou vp3 possuindo modificações de aminoácidos em relação à SEQ ID NO: 16 compreendendo pelo menos cerca de 50 a 100% de desamidação de pelo menos quatro posições selecionadas de uma ou mais dentre N57, 329, 452, 512, ou combinações das mesmas. Em certas modalidades, o capsídeo hu68 compreende subpopulações de proteínas vp1, vp2 e/ou vp3 que compreendem ainda de 1% a cerca de 40% de desamidação em pelo menos uma ou mais das posições N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, ou combinações das mesmas. Em certas modalidades, o capsídeo hu68 compreende as subpopulações de proteínas vp1, vp2 e/ou vp3 que compreendem ainda uma ou mais modificações selecionadas dentre uma ou mais modificações em um ou mais dos seguintes: lisina acetilada, serina e/ou treonina fosforilada, ácido aspártico isomerizado, triptofano e/ou metionina oxidada, ou um aminoácido amidado. Em

certas modalidades, o rAAVhu68 compreende cerca de 60 proteínas totais do capsídeo em uma proporção de cerca de 1 vp1 a cerca de 1 a 1,5 vp2 a 3 a 10 proteínas vp3. Em certas modalidades, o capsídeo AAVhu68 compreende cerca de 60 proteínas totais do capsídeo em uma proporção de cerca de 1 vp1 a cerca de 1 vp2 a 3 a 9 proteínas vp3. Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende sequências AAV ITR de uma fonte de AAV diferente de AAVhu68.

[00134] Em certas modalidades, é fornecida uma composição que compreende uma população mista de vírus adenoassociadorecombinante hu68 (rAAVhu68), em que cada um dos rAAVhu68 é selecionado independentemente a partir de um rAAVhu68, conforme descrito neste documento. Em certas modalidades, o capsídeo AAVhu68 regular compreende cerca de 60 proteínas totais do capsídeo em uma proporção de cerca de 1 vp1 a cerca de 1 a 1,5 vp2 a 3 a 10 proteínas vp3. Em certas modalidades, o capsídeo AAVhu68 regular compreende cerca de 60 proteínas totais do capsídeo em uma proporção de cerca de 1 vp1 a cerca de 1 vp2 a 3 a 6 proteínas vp3. Em certas modalidades, a composição é formulada para distribuição intratecal. Em certas modalidades, a composição é formulada para distribuição intranasal ou intramuscular. Em certas modalidades, uma composição compreende pelo menos um estoque de vetores rAAVhu68 e um veículo, excipiente e/ou conservante opcional.

[00135] Qualquer sistema de produção de rAAV adequado útil para produzir um AAVhu68 recombinante pode ser usado. Por exemplo, tal sistema de produção pode compreender: (a) uma sequência de ácido nucleico do capsídeo AAVhu68 que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16; (b) uma molécula de ácido nucleico adequada para o empacotamento no capsídeo AAVhu68, a referida molécula de ácido nucleico compreendendo pelo menos uma repetição terminal invertida de AAV (ITR) e uma sequência de ácido nucleico não-

AAV que codifica um produto genético operativamente ligado a sequências que expressam diretamente o produto em uma célula hospedeira; e (c) funções de rep e funções auxiliares do AAV suficientes para permitir o empacotamento da molécula de ácido nucleico no capsídeo AAVhu68 recombinante. Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico de (a) compreende pelo menos a SEQ ID NO: 18 ou uma sequência de pelo menos 70% a pelo menos 99% idêntica à SEQ ID NO: 18 que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16. Em certas modalidades, o sistema opcionalmente compreende ainda uma sequência de ácido nucleico de cerca de nt 607 a cerca de nt 2211 da SEQ ID NO: 18 que codifica a AAVhu68 vp3 de cerca de aa 203 a cerca do aminoácido 736 da SEQ ID NO: 16. Em certas modalidades, o sistema compreende células 293 de rim embrionário humano ou um sistema de baculovírus.

[00136] Em certas modalidades, é fornecido um método para reduzir a desamidação de um capsídeo AAVhu68. O método compreende a produção de um capsídeo de AAVhu68 a partir de uma sequência de ácido nucleico contendo códons AAVhu68 vp modificados, com a sequência de ácido nucleico compreendendo códons de glicina independentemente modificados em de um a três dos pares de arginina - glicina localizados nas posições 58, 330, 453 e/ou 513 na SEQ ID NO: 16, de modo que o códon modificado codifique um aminoácido diferente de glicina. Em certas modalidades, o método compreende a produção de um capsídeo AAVhu68 a partir de uma sequência de ácido nucleico contendo códons de AAVhu68 vp, com a sequência de ácido nucleico compreendendo códons de arginina independentemente modificados em de um a três dos pares de arginina - glicina localizados nas posições 57, 329, 452 e/ou 512 na SEQ ID NO:16, de modo de que o códon modificado codifique um aminoácido diferente de arginina. Em certas modalidades, cada códon modificado codifica um aminoácido diferente.

Em certas modalidades, dois ou mais códons modificados codificam o mesmo aminoácido. Em certas modalidades, um capsídeo AAVhu68 mutante, conforme descrito neste documento, contém uma mutação em um par arginina - glicina, de modo que a glicina seja alterada para uma alanina ou serina. Um capsídeo AAVhu68 mutante pode conter um, dois ou três mutantes, onde o AAVhu68 de referência contém nativamente quatro pares NG. Em certas modalidades, um capsídeo AAVhu68 mutante contém apenas uma única mutação em um par NG. Em certas modalidades, um capsídeo AAVhu68 mutante contém mutações em dois pares de NG diferentes. Em certas modalidades, um capsídeo AAVhu68 mutante contém mutações em dois pares NG diferentes que estão localizados em uma localização estruturalmente separada no capsídeo AAVhu68. Em certas modalidades, a mutação não está na região exclusiva de VP1. Em certas modalidades, uma das mutações está na região exclusiva de VP1. Opcionalmente, um capsídeo AAVhu68 mutante não contém modificações nos pares NG, mas contém mutações para minimizar ou eliminar a desamidação em uma ou mais asparaginas, ou uma glutamina, localizadas fora de um par NG.

[00137] Conforme utilizado neste documento, "sequência de aminoácidos codificada" refere-se ao aminoácido que é previsto com base na tradução de um códon de DNA conhecido de uma sequência de ácido nucleico referenciada sendo traduzida em um aminoácido. A tabela a seguir ilustra os códons de DNA e vinte aminoácidos comuns, mostrando o código de uma letra (SLC) e o código de três letras (3LC).

Aminoácido	SLC	3LC	Códons de DNA
Isoleucina	I	Ile	ATT, ATC, ATA
Leucina	L	Leu	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Valina	V	Val	GTT, GTC, GTA, GTG
Fenilalanina	F	Phe	TTT, TTC

Aminoácido	SLC	3LC	Códons de DNA
Metionina	M	Met	ATG
Cisteína	C	Cys	TGT, TGC
Alanina	A	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG
Glicina	G	Gly	GGT, GGC, GGA, GGG
Prolina	P	Pro	CCT, CCC, CCA, CCG
Treonina	T	Thr	ACT, ACC, ACA, ACG
Serina	S	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Tirosina	Y	Tyr	TAT, TAC
Triptofano	W	Trp	TGG
Glutamina	Q	Gln	CAA, CAG
Asparagina	N	Asn	AAT, AAC
Histidina	H	His	CAT, CAC
Ácido glutâmico	E	Glu	GAA, GAG
Ácido aspártico	D	Asp	GAT, GAC
Lisina	K	Lys	AAA, AAG
Arginina	R	Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Códons de Parada	Parada		TAA, TAG, TGA

[00138] Métodos para gerar capsídeos, e, portanto, sequências de codificação, e métodos para a produção de vetores virais de rAAV foram descritos. Ver, por exemplo, Gao, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) e US 2013/0045186A1.

[00139] Como indicado acima, as sequências e proteínas de AAVhu68 são úteis na produção de rAAV. Os exemplos abaixo descrevem a produção de vetores rAAV com vetores AAVhu68 ou



AAV9. No entanto, em outras modalidades, outro capsídeo AAV é selecionado. A especificidade do tecido é determinada pelo tipo de capsídeo. Por exemplo, um vetor viral com um AAVhu68 é ilustrado nos exemplos abaixo como sendo útil para a transdução de células epiteliais nasais. As sequências de AAVhu68 são descritas neste documento. Além disso, foram descritos métodos de geração de vetores contendo o capsídeo AAV9 e capsídeos quiméricos derivados de AAV9. Ver, por exemplo, US 7.906.111, que é incorporado neste documento por referência. Outros sorotipos de AAV que transduzem células nasais ou outro alvo adequado (por exemplo, músculo ou pulmão) podem ser selecionados como fontes para capsídeos de vetores virais de AAV (partículas virais resistentes a DNase), incluindo, por exemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh10, AAVrh64R1, AAVrh64R2, rh8 (ver, por exemplo, Pedido de Patente Publicado nos EUA 2007-0036760-A1; Pedido de Patente Publicado nos EUA 2009-0197338-A1; e EP 1310571). Ver também WO 2003/042397 (AAV7 e outros símios AAV), Patente dos EUA 7790449 e Patente dos EUA 7282199 (AAV8), WO 2005/033321 (AAV9) e WO 2006/110689, ou ainda a ser descoberto, ou um AAV recombinante com base no mesmo, pode ser usado como fonte para o capsídeo AAV. Estes documentos também descrevem outros AAV que podem ser selecionados para gerar AAV e são incorporados por referência. Em algumas modalidades, um capsídeo (cap) AAV para uso no vetor viral pode ser gerado por mutagênese (ou seja, por inserções, deleções ou substituições) de um dos capsídeos AAV supracitados ou do seu ácido nucleico de codificação. Em algumas modalidades, o capsídeo AAV é quimérico, compreendendo domínios de duas ou três ou quatro ou mais das proteínas do capsídeo AAV supracitadas. Em algumas modalidades, o capsídeo AAV é um mosaico de monômeros Vp1, Vp2 e Vp3 de dois ou três AAVs diferentes ou AAVs recombinantes. Em

algumas modalidades, uma composição de rAAV compreende mais de um dos caps supracitados.

### III. Cassete de expressão e vetores

[00140] As sequências genômicas que são empacotadas em um capsídeo AAV e distribuídos a uma célula hospedeira são tipicamente compostas de, no mínimo, um transgene e suas sequências reguladoras e repetições terminais invertidas do AAV (ITRs). O AAV de fita simples e o AAV auto-complementar (sc) são abrangidos pelo rAAV. O transgene é uma sequência de codificação de ácido nucleico, heteróloga às sequências vetoriais, que codifica um polipeptídeo, proteína, molécula de RNA funcional (por exemplo, miRNA, inibidor de miRNA) ou outro produto genético de interesse. A sequência de codificação de ácido nucleico está operacionalmente ligada a componentes reguladores de uma maneira que permite transcrição, tradução e/ou expressão de transgene em uma célula de um tecido alvo.

[00141] As sequências de AAV do vetor compreendem tipicamente as sequências de repetição terminal invertidas de 5' e 3' de ação cis (ver, por exemplo, B. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)). As sequências ITR tem cerca de 145 bp de comprimento. Preferencialmente, substancialmente, todas as sequências que codificam os ITRs são usadas na molécula, embora seja permitido algum grau de modificação menor dessas sequências. A capacidade de modificar essas sequências ITR está dentro da habilidade da técnica. (Ver, por exemplo, textos como Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring harbor Laboratory, New York (1989); e K. Fisher et al., J. Virol., 70:520 532 (1996)). Um exemplo de tal molécula empregada na presente invenção é um plasmídeo "cis-acting" (de ação cis) contendo o transgene, no qual a sequência de transgenes selecionados e os elementos regulatórios associados são flanqueados pelas sequências 5' e 3' ITR de AAV. Em

uma modalidade, as ITRs são de um AAV diferente daquele que fornece um capsídeo. Em uma modalidade, as sequências ITR de AAV2. Uma versão abreviada da ITR 5', denominada  $\Delta$ ITR, foi descrita, em que o sítio da resolução terminal (tsr) e a sequência D são excluídos. Em outras modalidades, são utilizadas AVV 5' e ITRs 3' de comprimento completo. No entanto, pode ser selecionado um AAV de outras fontes adequadas. Quando a fonte das ITRs vier de AAV2 e o capsídeo de AAV for de outra fonte de AAV, o vetor resultante pode ser denominado pseudotipado. No entanto, outras configurações desses elementos podem ser adequadas.

[00142] Para além dos principais elementos identificados acima para os vetores AAV recombinantes, o vetor também inclui elementos de controle convencionais necessários que estão operativamente ligados ao transgene de uma maneira que permita a sua transcrição, tradução e/ou expressão em uma célula transfectada com o vetor plasmídeo ou infectada com o vírus produzido pela invenção. Tal como utilizado neste documento, as sequências "operacionalmente ligadas" incluem ambas as sequências de controle de expressão que são contíguas ao gene de interesse e as sequências de controle de expressão que atuam em trans ou a uma distância para controlar o gene de interesse.

[00143] Os elementos de controle regulatório contêm tipicamente uma sequência promotora como parte das sequências de controle de expressão, por exemplo, localizadas entre a sequência ITR 5' selecionada e a sequência de codificação. Promotores constitutivos, promotores reguláveis [ver, por exemplo, WO 2011/126808 e WO 2013/04943], promotores específicos de tecidos, ou um promotor responsivo a estímulos fisiológicos podem ser utilizados nos vetores descritos neste documento.

[00144] Exemplos de promotores constitutivos adequados para controlar a expressão dos produtos terapêuticos incluem, mas não estão

limitados a actina de  $\beta$ galinha (CB), promotor CB7, promotor de citomegalovírus humano (CMV), promotor de ubiquitina C (UbC), os promotores iniciais e tardios do vírus símio 40 (SV40), promotor U6, promotores de metalotioneína, promotor EFl $\alpha$ , promotor ubiquitina, promotor hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), promotor diidrofolato redutase (DHFR) (Scharfmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4626-4630 (1991), promotor de adenosina desaminase, promotor de fosfoglicerol cinase (PGK), promotor de piruvato cinase, promotor de fosfoglicerol mutase, o promotor de  $\beta$ -actina (Lai *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10006-10010 (1989)), as repetições terminais longas (LTR) do vírus da leucemia Moloney e outros retrovírus, o promotor da timidina-quinase do vírus Herpes Simplex e outros promotores constitutivos conhecidos dos versados na técnica. Exemplos de promotores específicos de tecido ou célula adequados para uso na presente invenção incluem, mas não estão limitados a, endotelina-I (ET-I) e Flt-I, que são específicos para células endoteliais, FoxJ1 (que tem como alvo células ciliadas).

[00145] Promotores induzíveis adequados para controlar a expressão do produto terapêutico incluem promotores responsivos a agentes exógenos (por exemplo, agentes farmacológicos) ou a sinais fisiológicos. Estes elementos de resposta incluem, mas não estão limitados a, um elemento de resposta à hipóxia (HRE) que liga HIF-1 $\alpha$  e  $\beta$ , um elemento de resposta de íons metálicos, como descrito por Mayo *et al.* (1982, Cell 29: 99-108); Brinster *et al.* (1982, Nature 296: 39-42) e Searle *et al.* (1985, Mol. Cell. Biol. 5:1480-1489); ou um elemento de resposta ao choque térmico, como descrito por Nouer *et al.* (em: Heat Shock Response, ed. Nouer, L., CRC, Boca Raton, Fla., pp167-220, 1991).

[00146] Em uma modalidade, a expressão do construto de anticorpo neutralizante é controlada por um promotor regulável que fornece

controle rígido sobre a transcrição do gene que codifica o construto de anticorpo neutralizante, por exemplo, um agente farmacológico ou fatores de transcrição ativados por um agente farmacológico ou em modalidades alternativas, pistas fisiológicas. São preferidos sistemas promotores que não sejam vazados e que possam ser rigidamente controlados.

[00147] Exemplos de promotores reguláveis que são complexos de fatores de transcrição dependentes de ligandos que podem ser utilizados na invenção incluem, sem limitação, membros da superfamília de receptores nucleares ativados por seus respectivos ligandos (por exemplo, glicocorticoide, estrogênio, progestina, retinoide, ecdisona e análogos e miméticos dos mesmos) e rTTA ativado pela tetraciclina. Em um aspecto da invenção, a troca de genes é uma troca de genes baseada em EcR. Exemplos de tais sistemas incluem, sem limitação, os sistemas descritos nas patentes US 6.258.603, 7.045.315, pedidos de patentes publicados nos EUA 2006/0014711, 2007/0161086 e pedido internacional publicado nº WO 01/70816. Exemplos de sistemas quiméricos de receptores de ecdisona são descritos na Patente US 7.091.038, pedidos de patente publicados nos EUA 2002/0110861, 2004/0033600, 2004/0096942, 2005/0266457 e 2006/0100416, e pedidos publicados internacionais nºs. WO 01/70816, WO 02/066612, WO 02/066613, WO 02/066614, WO 02/066615, WO 02/29075 e WO 2005/108617, cada um dos quais é incorporado por referência na sua totalidade. Um exemplo de um sistema regulado por agonista de ecdisona não esteroide é o sistema de expressão induzível por mamíferos RheoSwitch® (New England Biolabs, Ipswich, MA).

[00148] Ainda outros sistemas promotores podem incluir elementos de resposta incluindo, entre outros, um elemento de resposta à tetraciclina (tet) (como descrito por Gossen & Bujard (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-551); ou um elemento de resposta hormonal

tal como descrito por Lee et al. (1981, Nature 294: 228-232); Hynes et al. (1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2038-2042); Klock et al. (1987, Nature 329: 734-736); e Israel & Kaufman (1989, Nucl. Acids Res. 17:2589-2604) e outros promotores induzíveis conhecidos na técnica. Utilizando esses promotores, a expressão do construto de anticorpo neutralizante pode ser controlada, por exemplo, pelo sistema Tet-on/off (Gossen et al., 1995, Science 268: 1766-9; Gossen et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA., 89(12):5547-51); o sistema TetR-KRAB (Urrutia R., 2003, Genome Biol., 4 (10): 231; Deuschle U et al., 1995, Mol Cell Biol. (4): 1907-14); o sistema regulável de mifepristona (RU486) (Geneswitch; Wang Y et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (17):8180-4; Schillinger et al., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. US A.102(39):13789-94); e o sistema regulável de tamoxifeno-dep humanizado (Roscelli et al., 2002, Mol. Ther. 6(5):653-63).

[00149] Em outro aspecto da invenção, a troca de genes é baseada na heterodimerização da proteína de ligação a FK506 (FKBP) com a proteína associada à rapamicina (FRAP) e é regulada através da rapamicina ou seus análogos não imunossupressores. Exemplos de tais sistemas incluem, sem limitação, a Tecnologia Transcricional ARGENT™ (ARIAD Pharmaceuticals, Cambridge, Mass.) e os sistemas descritos na Pat. N°s 6.015.709, 6.117.680, 6.479.653, 6.187.757 e 6.649.595, Publicação dos EUA N° 2002/0173474, Publicação dos EUA N° 200910100535, Patente dos EUA N° 5.834.266, Patente dos EUA N° 7.109.317, Patente dos EUA 7.485.441, Patente dos EUA 5.830.462, Patente dos EUA N° 5.869.337, Patente dos EUA N° 5.871.753, Patente dos EUA N° 6.011.018, Patente dos EUA N° 6.043.082, Patente dos EUA N° 6.046.047, Patente dos EUA N° 6.063.625, Patente dos EUA N° 6.140.120, Patente dos EUA N° 6.165.787, Patente dos EUA N° 6.972.193, Patente dos EUA N° 6.326.166, Patente dos EUA N° 7.008.780, Patente dos EUA N° 6.133.456, Patente dos EUA N°

6.150.527, Patente dos EUA Nº 6.506.379, Patente dos EUA Nº 6.258.823, Patente dos EUA Nº 6.693.189, Patente dos EUA Nº 6.127.521, Patente dos EUA Nº 6.150.137, Patente dos EUA Nº 6.464.974, Patente dos EUA Nº 6.509.152, Patente dos EUA Nº 6.015.709, Patente dos EUA Nº 6.117.680, Patente dos EUA Nº 6.479.653, Patente dos EUA Nº 6.187.757, Patente dos EUA Nº 6.649.595, Patente dos EUA Nº 6.984.635, Patente dos EUA Nº 7.067.526, Patente dos EUA Nº 7.196.192, Patente dos EUA Nº 6.476.200, Patente dos EUA Nº 6.492.106, WO 94/18347, WO 96/20951, WO 96/06097, WO 97/31898, WO 96/41865, WO 98/02441, WO 95/33052, WO 99110508, WO 99110510, WO 99/36553, WO 99/41258, WO 01114387, ARGENT™ Kit de Retrovírus de Transcrição Regulada, Versão 2.0 (9109102), e ARGENT™ Kit de Plasmídeo de Transcrição Regulada, Versão 2.0 (9109/02), cada um dos quais é incorporado neste documento em sua totalidade. O sistema Ariad é desenhado para ser induzido pela rapamicina e análogos da mesma referidos como "rapalogs". Exemplos de rapamicinas adequados são fornecidos nos documentos listados acima em conexão com a descrição do sistema ARGENT™. Em uma modalidade, a molécula é rapamicina [por exemplo, comercializada como Rapamune™ pela Pfizer]. Em outra modalidade, um rapalog conhecido como AP21967 [ARIAD] é usado. Exemplos dessas moléculas de dimerizador que podem ser usadas na presente invenção incluem, entre outros, rapamicina, FK506, FK1012 (um homodímero de FK506), análogos da rapamicina ("rapalogs") que são prontamente preparados por modificações químicas do produto natural para adicionar uma "protuberância" que reduz ou elimina a afinidade por FKBP endógeno e/ou FRAP. Exemplos de rapalogs incluem, entre outros, AP26113 (Ariad), AP1510 (Amara, JF, et al., 1997, Proc Natl Acad Sci USA, 94 (20): 10618-23) AP22660, AP22594, AP21370, AP22594, AP23054, AP1855, AP1856, AP1701, AP1861,

AP1692 e AP1889, com 'protuberâncias' desenhados que minimizam as interações com o FKBP endógeno. Ainda outros rapalogs podem ser selecionados, por exemplo, AP23573 [Merck].

[00150] Outros intensificadores adequados incluem aqueles que são apropriados para uma indicação desejada de tecido alvo. Em uma modalidade, o cassete de expressão compreende um ou mais intensificadores de expressão. Em uma modalidade, o cassete de expressão contém dois ou mais intensificadores de expressão. Esses intensificadores podem ser os mesmos ou podem diferir um do outro. Por exemplo, um intensificador pode incluir um intensificador precoce imediato de CMV. Esse intensificador pode estar presente em duas cópias que estão localizadas adjacientemente entre si. Alternativamente, as cópias duplas do intensificador podem ser separadas por uma ou mais sequências. Ainda em outra modalidade, o cassete de expressão contém ainda um íntron, por exemplo, o íntron beta-actina de galinha. Outros íntrons adequados incluem aqueles conhecidos na técnica, por exemplo, conforme descritos em WO 2011/126808. Exemplos de sequências poliA adequadas incluem, por exemplo, globulina de ligação de coelho (rBG), SV40, SV50, hormônio do crescimento bovino (bGH), hormônio do crescimento humano e poliAs sintéticos. Opcionalmente, uma ou mais sequências podem ser selecionadas para estabilizar o mRNA. Um exemplo de tal sequência é uma sequência WPRE modificada, que pode ser manipulada a montante da sequência poliA e a jusante da sequência de codificação (ver, por exemplo, MA Zanta-Boussif, et al., Gene Therapy (2009) 16: 605-619).

[00151] Um vetor viral de AAV pode incluir vários transgenes. Em certas situações, um transgene diferente pode ser usado para codificar cada subunidade de uma proteína (por exemplo, um domínio de imunoglobulina, uma cadeia pesada de imunoglobulina, uma cadeia leve de imunoglobulina). Em uma modalidade, uma célula produz a



proteína de multi-subunidades após infecção/transfecção com o vírus contendo cada uma das diferentes subunidades. Em outra modalidade, diferentes subunidades de uma proteína podem ser codificadas pelo mesmo transgene. Nesse caso, um único transgene inclui o DNA que codifica cada uma das subunidades, com o DNA de cada subunidade separado por um sítio interno de entrada de ribozima (IRES) ou por um peptídeo de auto-clivagem (por exemplo, 2A). Um IRES é desejável quando o tamanho do DNA que codifica cada uma das subunidades é pequeno, por exemplo, o tamanho total do DNA que codifica as subunidades e o IRES é menor que cinco kilobases. Como uma alternativa a um IRES, o DNA pode ser separado por sequências que codificam um peptídeo 2A, que se auto-cliva em um evento pós-tradução. Ver, por exemplo, ML Donnelly, *et al*, (Jan 1997) *J. Gen. Virol.*, **78**(Pt 1):13-21; S. Furler, S *et al*, (Junho 2001) *Gene Ther.*, **8**(11):864-873; H. Klump, *et al.*, (Maio 2001) *Gene Ther.*, **8**(10):811-817. Este peptídeo 2A é significativamente menor que o IRES, tornando-o adequado para uso quando o espaço é um fator limitante. Mais frequentemente, quando o transgene é grande, consiste em multi-subunidades, ou dois transgenes são codistribuídos, rAAV carreando o (s) transgene (s) desejado (s) ou subunidades são coadministrados para permitir concatamerizar *in vivo* para formar um único genoma de vetor. Em tal modalidade, um primeiro AAV pode carrear um cassete de expressão que expressa um único transgene e um segundo AAV pode carrear um cassete de expressão que expressa um transgene diferente para co-expressão na célula hospedeira. No entanto, o transgene selecionado pode codificar qualquer produto biologicamente ativo ou outro produto, por exemplo, um produto desejável para estudo.

[00152] Além dos elementos identificados acima para o cassete de expressão, o vetor também inclui elementos de controle convencionais que estão operacionalmente ligados à sequência de codificação de uma

maneira que permite a transcrição, tradução e/ou expressão do produto codificado (por exemplo, um anticorpo neutralizante ou uma porção do mesmo) em uma célula transfectada com o vetor plasmídeo ou infectada com o vírus produzido pela invenção. Tal como utilizado neste documento, as sequências "operacionalmente ligadas" incluem ambas as sequências de controle de expressão que são contíguas ao gene de interesse e as sequências de controle de expressão que atuam em *trans* ou a uma distância para controlar o gene de interesse.

[00153] Sequências de controle de expressão incluem intensificador apropriado; fator de transcrição; terminador de transcrição; promotor; sinais de processamento de RNA eficientes, como sinais de splicing e poliadenilação (polyA); sequências que estabilizam o mRNA citoplásmico, por exemplo elemento regulamentar Pós-transcricional do vírus da hepatite de Woodchuck (WHP) (WPRE); sequências que melhoram a eficiência da tradução (ou seja, sequência de consenso de Kozak); sequências que potenciam a estabilidade proteica; e quando desejado, sequências que melhoram a secreção do produto codificado.

[00154] Em uma modalidade, as sequências reguladoras são selecionadas de tal modo que o genoma do vetor rAAV total tenha cerca de 2,0 a cerca de 5,5 quilobases de tamanho. Em uma modalidade, é desejável que o genoma do vetor de rAAV se aproxime do tamanho do genoma de AAV nativo. Assim, em uma modalidade, as sequências reguladoras são selecionadas de tal modo que o genoma total do vetor rAAV tem cerca de 4,7 kb de tamanho. Em outra modalidade, o genoma total do vetor de rAAV tem menos de 5,2 kb de tamanho. O tamanho do genoma do vetor pode ser manipulado com base no tamanho das sequências reguladoras, incluindo o promotor, intensificador, íntron, poli A, etc. Ver, Wu et al, Mol Ther, Jan 2010 18(1): 80-6, que é incorporado neste documento por referência.

[00155] Assim, em uma modalidade, um íntron é incluído no vetor.

Os íntrons adequados incluem o íntron beta-actina de galinha, a beta globina humana IVS2 (Kelly et al., Nucleic Acids Research, 43 (9): 4721-32 (2015)); o íntron quimérico Promega (Almond, B. e Schenborn, E. T. A Comparison of pCI-neo Vector e pcDNA4 / HisMax Vector); e o íntron hFIX. Vários íntrons adequados neste documento são conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, os encontrados em [bpg.utoledo.edu/~afedorov/lab/eid.html](http://bpg.utoledo.edu/~afedorov/lab/eid.html), que é incorporado neste documento por referência. Ver também, Shepelev V., Fedorov A. Advances in the Exon-Intron Database. Briefings in Bioinformatics 2006, 7: 178-185, que é incorporado neste documento por referência.

[00156] Vários genomas virais diferentes foram gerados nos estudos descritos neste documento. No entanto, será entendido pelo versado na técnica que outras configurações genômicas, incluindo outras sequências reguladoras, podem ser substituídas pelo promotor, intensificador e outras sequências de codificação. Exemplos de genomas de vetor e cassetes de expressão que codificam os domínios de imunoglobulina e/ou proteínas de fusão descritos neste documento são fornecidos, por exemplo, na SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 e SEQ ID NO: 31. Adequadamente, esses genomas de vetor ilustrativos incluem elementos do vetor, incluindo um promotor (por exemplo, beta-actina de galinha, UBC ou TBG), um íntron (por exemplo, íntron SV40 ou um íntron quimérico), uma sequência UTR de 5' (por exemplo, c- myc), uma sequência de Kozak, um poli A (por exemplo, SV40, hormônio de crescimento bovino ou globina de coelho). Em certas modalidades, um IRES ou uma furina, furina/F2A, ou ambos, são incluídos em um cassete de expressão. Será entendido que outros elementos do vetor podem ser selecionados.

#### IV. Produção vetorial de rAAV

[00157] Para uso na produção de um vetor viral de AAV (por

exemplo, um AAV recombinante (r)), os cassetes de expressão podem ser carregados em qualquer vetor adequado, por exemplo, um plasmídeo, que é distribuído a uma célula hospedeira de empacotamento. Os plasmídeos úteis nesta invenção podem ser manipulados de modo a serem adequados para replicação e empacotamento *in vitro* em células procarióticas, células de insetos, células de mamíferos, entre outros. Técnicas de transfecção adequadas e células hospedeiras de empacotamento são conhecidas e/ou podem ser prontamente desenhadas por um versado na técnica.

[00158] São conhecidos métodos de preparação de vetores baseados em AAV (por exemplo, tendo um AAV9 ou outro capsídeo de AAV). Ver, por exemplo, o Pedido de Patente Publicada nos EUA 2007/0036760 (15 de fevereiro de 2007), que é incorporado neste documento por referência. A invenção não se limita ao uso de AAV9 ou outras sequências de aminoácidos de FAAV de clade, mas engloba peptídeos e/ou proteínas contendo a ligação  $\beta$ -galactose terminal gerada por outros métodos conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, por síntese química, por outras técnicas sintéticas ou por outros métodos. As sequências de qualquer um dos capsídeos AAV fornecidos neste documento podem ser facilmente geradas usando uma variedade de técnicas. Técnicas de produção adequadas são bem conhecidas por aqueles versados na técnica. Ver, por exemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY). Alternativamente, os peptídeos também podem ser sintetizados pelos métodos de síntese de peptídeos em fase sólida bem conhecidos (Merrifield, (1962) *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149; Stewart e Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Freeman, San Francisco, 1969) pp. 27-62). Estes métodos podem envolver, por exemplo, a cultura de uma célula hospedeira que contém uma sequência de ácido nucleico que codifica um capsídeo AAV; um gene

rep funcional; um minigene composto, no mínimo, por repetições terminais invertidas AAV (ITRs) e um transgene; e funções auxiliares suficientes para permitir o empacotamento do minigene na proteína do capsídeo AAV. Esses e outros métodos de produção adequados estão dentro do conhecimento daqueles versados na técnica e não são uma limitação da presente invenção.

[00159] Os componentes necessários para serem cultivados na célula hospedeira para empacotar um minigene AAV em um capsídeo AAV podem ser fornecidos para a célula hospedeira em *trans*. Alternativamente, qualquer um ou mais dos componentes necessários (por exemplo, minigene, sequências *rep*, sequências *cap* e/ou funções auxiliares) podem ser fornecidos por uma célula hospedeira estável que foi desenhada para conter um ou mais componentes necessários usando métodos conhecido por aqueles versados na técnica. Mais adequadamente, uma célula hospedeira estável conterá o(s) componente(s) necessário(s) sob o controle de um promotor induzível. No entanto, o(s) componente(s) requerido(s) pode (m) estar sob o controle de um promotor constitutivo. Exemplos de promotores indutíveis e constitutivos adequados são fornecidos neste documento, na discussão de elementos reguladores adequados para uso com o transgene. Ainda em outra alternativa, uma célula hospedeira estável selecionada pode conter componente(s) selecionado(s) sob o controle de um promotor constitutivo e outros componentes selecionados sob o controle de um ou mais promotores induzíveis. Por exemplo, uma célula hospedeira estável pode ser gerada, a qual é derivada de células 293 (que contêm funções auxiliares de E1 sob o controle de um promotor constitutivo), mas que contêm as proteínas *rep* e/ou *cap* sob o controle de promotores induzíveis. Ainda outras células hospedeiras estáveis podem ser geradas por um versado na técnica.

[00160] Esses rAAVs são particularmente adequados para a

distribuição de genes para fins terapêuticos e para imunização, incluindo a indução de imunidade protetora. Além disso, as composições da invenção também podem ser utilizadas para a produção de um produto gênico desejado *in vitro*. Para produção *in vitro*, um produto desejado (por exemplo, uma proteína) pode ser obtido a partir de uma cultura desejada após a transfecção das células hospedeiras com um rAAV contendo a molécula que codifica o produto desejado e cultivar a cultura de células sob condições que permitem a expressão. O produto expresso pode então ser purificado e isolado, conforme desejado. Técnicas adequadas para transfecção, cultura de células, purificação e isolamento são conhecidas pelos versados na técnica. Os métodos para gerar e isolar AAVs adequados para uso como vetores são conhecidos na técnica. Ver em geral, por exemplo, Grieger & Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145; Buning *et al.*, 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," *J. Gene Med.* 10:717-733; e as referências citadas abaixo, cada uma das quais é incorporada neste documento por referência na sua totalidade. Para empacotar um transgene em vírions, as ITRs são os únicos componentes de AAV necessários *em cis* no mesmo construto que a molécula de ácido nucleico que contém os cassetes de expressão. Os genes cap e rep podem ser fornecidos *em trans*.

[00161] Em uma modalidade, os cassetes de expressão descritos neste documento são modificados por manipulação genética em um elemento genético (por exemplo, um plasmídeo shuttle) que transfere as sequências de construto de imunoglobulina carregadas nela para uma célula hospedeira de empacotamento para produção de um vetor viral. Em uma modalidade, o elemento genético selecionado pode ser distribuído a uma célula de empacotamento de AAV por qualquer

método adequado, incluindo transfecção, eletroporação, distribuição de lipossomas, técnicas de fusão de membrana, grânulos revestidos com DNA de alta velocidade, infecção viral e fusão de protoplasto. Também podem ser feitas células de empacotamento de AAV estáveis. Alternativamente, os cassetes de expressão podem ser usados para gerar um vetor viral que não seja o AAV, ou para a produção de misturas de anticorpos in vitro. Os métodos usados para fazer tais construtos são conhecidos daqueles versados na manipulação de ácido nucleico e incluem manipulação genética, manipulação recombinante e técnicas sintéticas. Ver, por exemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed. Green e Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

[00162] O termo "intermediário AAV" ou "intermediário do vetor AAV" refere-se a um capsídeo rAAV montado que não possui as sequências genômicas desejadas nele empacotadas. Estes também podem ser denominados capsídeos "vazios". Esse capsídeo pode não conter nenhuma sequência genômica detectável de um cassete de expressão ou apenas sequências genômicas parcialmente empacotadas, que são insuficientes para obter o produto genômico. Esses capsídeos vazios não são funcionais para transferir o gene de interesse a uma célula hospedeira.

[00163] O AAV recombinante descrito neste documento pode ser gerado usando técnicas conhecidas. Ver, por exemplo, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. Esse método envolve a cultura de uma célula hospedeira que contém uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um capsídeo de AAV; um gene de rep funcional; um cassete de expressão composto por, no mínimo, repetições terminais invertidas de AAV (ITRs) e um transgene; e funções auxiliares suficientes para permitir o empacotamento do cassete de expressão na proteína do capsídeo de AAV. Métodos para

gerar capsídeos, e, portanto, sequências de codificação, e métodos para a produção de vetores virais de rAAV foram descritos. Ver, por exemplo, Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) e US 2013/0045186A1.

[00164] Em uma modalidade, é fornecida uma cultura de células de produção útil para a produção de um AAVhu68 recombinante. Essa cultura celular contém um ácido nucleico que expressa a proteína do capsídeo AAVhu68 na célula hospedeira; uma molécula de ácido nucleico adequada para empacotamento no capsídeo AAVhu68, por exemplo, um genoma de vetor que contém ITRs de AAV e uma sequência de ácido nucleico não-AAV que codifica um produto de gene operacionalmente ligado a sequências que direcionam a expressão do produto em uma célula hospedeira; e funções de rep AAV suficientes e funções auxiliares de adenovírus para permitir o empacotamento da molécula de ácido nucleico no capsídeo AAVhu68 recombinante. Em uma modalidade, a cultura de células é composta de células de mamífero (por exemplo, células 293 de rim embrionário humano, entre outras) ou células de inseto (por exemplo, baculovírus). Opcionalmente, as funções rep são fornecidas por um AAV diferente de hu68. Em certas modalidades, pelo menos partes das funções rep são de AAVhu68. Opcionalmente, as sequências rep e cap estão no mesmo elemento genético na cultura de células. Pode haver um espaçador entre a sequência rep e o gene cap. Opcionalmente, o espaçador é atgacttaaaccaggt, (SEQ ID NO: 33). Qualquer uma destas sequências do capsídeo AAVhu68 ou AAV mutante pode estar sob o controle de sequências de controle reguladoras exógenas que direcionam sua expressão em uma célula hospedeira.

[00165] Em uma modalidade, as células são fabricadas em uma cultura de células adequada (por exemplo, células HEK 293). Os métodos para fabricar os vetores de terapia gênica descritos neste



documento incluem métodos bem conhecidos na técnica, tais como geração de DNA de plasmídeo, utilizado para a produção dos vetores de terapia gênica, geração dos vetores e purificação dos vetores. Em algumas modalidades, o vetor de terapia gênica é um vetor de AAV e os plasmídeos gerados são um plasmídeo *cis*AAV que codifica o genoma de AAV e o gene de interesse, um plasmídeo trans de AAV contendo genes rep e cap de AAV e um plasmídeo auxiliar de adenovírus. O processo de geração de vetores pode incluir etapas do método, como iniciação de cultura celular, passagem de células, semeadura de células, transfecção de células com o DNA de plasmídeo, troca de meio pós-transfecção para meio livre de soro e coleta de células contendo o vetor e os meios de cultura. As células e meios de cultura contendo os vetores coletados são referidas neste documento como coletas de células brutas. Em ainda outro sistema, os vetores de terapia gênica são introduzidos nas células de insetos por infecção com vetores baseados em baculovírus. Para revisões sobre estes sistemas de produção, ver geralmente, por exemplo, Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20:922-929, o conteúdo dos quais é incorporado neste documento por referência na sua totalidade. Métodos de produção e utilização destes e de outros sistemas de produção de AAV são também descritos nas seguintes patentes dos EUA, o conteúdo de cada um das quais é incorporado neste documento por referência na sua totalidade: 5.139.941; 5.741.683; 6.057.152; 6.204.059; 6.268.213; 6.491.907; 6.660.514; 6.951.753; 7.094.604; 7.172.893; 7.201.898; 7.229.823; e 7.439.065.

[00166] A coleta de células brutas pode então ser as etapas do método em questão, como a concentração da coleta vetoral, a diafiltração da coleta vetoral, a microfluidização da coleta vetoral, a digestão de nuclease da coleta vetoral, a filtração do intermediário

microfluidizado, a purificação bruta por cromatografia, a purificação bruta por ultracentrifugação, a permuta de tampão por filtração de luxo tangencial e/ou a formulação e a filtração para preparar o vetor de volume.

[00167] Uma purificação por cromatografia de afinidade de duas etapas a uma elevada concentração de sal, seguida de uma cromatografia de resina por permuta aniônica, é usada para purificar o produto da droga vetorial e para remover os capsídeos vazios. Esses métodos são descritos em mais detalhes no Pedido de Patente Internacional Nº PCT/US2016 /065970, depositado em 9 de dezembro de 2016, e seus documentos prioritários, Pedido de Patente US Nº 62/322.071, depositado em 13 de abril de 2016 e 62/226.357, depositado em 11 de dezembro de 2015 e intitulado "Scalable Purification Method for AAV9", cada um dos quais é incorporado neste documento por referência. Métodos de purificação de AAV8, Pedido de Patente Internacional Nº PCT/US2016/065976, depositado em 9 de dezembro de 2016 e os documentos prioritários dos Pedidos de Patente US Nos. 62/322.098, depositado em 13 de abril de 2016, e 62/266.341, depositado em 11 de dezembro de 2015, e rh10, Pedido de Patente Internacional No. PCT/US16/66013, depositado em 9 de dezembro de 2016, e seus documentos de prioridade, o Pedido de Patente No. 62/322.055, depositado em 13 de abril de 2016, e 62/266.347, intitulado "Scalable purificação método para AAVrh10", também depositado em 11 de dezembro de 2015, e para AAV1, o Pedido de Patente Internacional No. PCT/US2016/065974, depositado em 9 de dezembro de 2016, e seus documentos prioritários, os Pedidos de Patente US Nºs. 62/322.083, depositado em 13 de abril de 2016, e 62/26.351, intitulado "Scalable Purification Method for AAV1", depositado em 11 de dezembro de 2015, todos incorporados neste documento por referência.

[00168] Para calcular o conteúdo de partículas vazias e completas,

os volumes de banda VP3 de uma amostra selecionada (por exemplo, em exemplos neste documento, uma preparação purificada por gradiente de iodixanol em que o número de GC = número de partículas) são representados graficamente em comparação com partículas de GC carregadas. A equação linear resultante ( $y = mx + c$ ) é usada para calcular o número de partículas nos volumes de banda dos picos do artigo de teste. O número de partículas (pt) por 20  $\mu$ L carregados é então multiplicado por 50 para gerar partículas (pt)/mL. Pt/mL dividido por GC/mL dá a proporção de partículas por cópias do genoma (pt/GC). Pt/mL–GC/mL gera pt/mL vazio. O pt/mL vazio dividido por pt/mL e  $\times 100$  dá o percentual de partículas vazias.

[00169] Geralmente, os métodos para avaliar os capsídeos vazios e as partículas do vetor de AAV com genomas empacotados são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Grimm et al., *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; e Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128. Para testar o capsídeo desnaturado, os métodos incluem submeter o estoque de AAV tratado a uma eletroforese de gel de SDS-poliacrilamida, consistindo em qualquer gel capaz de separar as três proteínas de capsídeo, por exemplo, um gradiente de gel contendo tris-acetato a 3-8% no tampão, depois executar o gel até o material da amostra ser separado e transferir o gel para as membranas de náilon ou nitrocelulose, de preferência náilon. Os anticorpos do capsídeo anti-AAV são então utilizados como anticorpos primários que se ligam a proteínas de capsídeo desnaturadas, de preferência um anticorpo monoclonal anti-capsídeo de AAV, mais preferencialmente o anticorpo monoclonal anti-AAV-2 B1 (Wobus et al. *J. Virol.* (2000) 74:9281-9293). Então, um anticorpo secundário é utilizado, um que se liga ao anticorpo primário e contém um meio para detectar a ligação ao anticorpo primário, mais preferencialmente um anticorpo anti-IgG contendo uma molécula de detecção ligada covalentemente a este, mais

preferencialmente um anticorpo de IgG anti-camundongo de ovelha ligado covalentemente à peroxidase de rábano. Um método para detectar a ligação é usado para determinar semi-quantitativamente a ligação entre os anticorpos primário e secundário, preferencialmente um método de detecção capaz de detectar emissões de isótopos radioativos, radiação eletromagnética ou alterações colorimétricas, mais preferencialmente um kit de detecção de quimiluminescência. Por exemplo, para a SDS-PAGE, amostras de frações de coluna podem ser tomadas e aquecidas em tampão de carga de SDS-PAGE contendo um agente redutor (por exemplo, DTT) e as proteínas do capsídeo foram resolvidas em géis de poliacrilamida pré-moldados (por exemplo, Novex). Uma coloração prata pode ser realizada utilizando SilverXpress (Invitrogen, CA), de acordo com as instruções do fabricante ou outro método de coloração adequado, ou seja por coloração SYPRO ruby ou coomassie. Em uma modalidade, a concentração de genomas de vetores de AAV (vg) em frações de coluna pode ser medida por PCR quantitativa em tempo real (Q-PCR). As amostras são diluídas e digeridas com DNase I (ou outra nuclease adequada) para remover o DNA exógeno. Após a desativação da nuclease, as amostras são posteriormente diluídas e amplificadas utilizando iniciadores e uma sonda fluorogênica TaqMan™ específica para a sequência de DNA entre os iniciadores. O número de ciclos necessários para atingir um nível definido de fluorescência (ciclo limite, Ct) é medido para cada amostra em um Sistema de Detecção de Sequências Applied Biosystems Prism 7700. Um DNA plasmídico contendo sequências idênticas às contidas no vetor AAV é empregado para gerar uma curva padrão na reação Q-PCR. Os valores do limiar do ciclo (Ct) obtidos das amostras são utilizados para determinar o título do genoma vetorial normalizando-o ao valor Ct da curva padrão do plasmídeo. Ensaios endpoint baseados na PCR digital também podem ser usados.

[00170] Além disso, outro exemplo de medição da proporção de partícula vazia para total também é conhecido na técnica. A velocidade de sedimentação, conforme medida em uma ultracentrífuga analítica (AUC), pode detectar agregados, outros componentes menores, além de fornecer boa quantificação de quantidades relativas de diferentes espécies de partículas com base em seus diferentes coeficientes de sedimentação. Este é um método absoluto baseado em unidades fundamentais de comprimento e tempo, não requerendo nenhuma molécula padrão como referência. As amostras de vetores são carregadas nas células com peças centrais de carvão epon de 2 canais com comprimento de caminho óptico de 12 mm. O tampão de diluição fornecido é carregado no canal de referência de cada célula. As células carregadas são então colocadas em um rotor analítico AN-60Ti e carregadas em uma ultracentrífuga analítica Beckman-Coulter ProteomeLab XL-I equipada com detectores de absorvância e RI. Após o equilíbrio da temperatura total a 20°C, o rotor é levado à velocidade final de 12.000 rpm. Varreduras  $A_{280}$  são registradas aproximadamente a cada 3 minutos por aproximadamente 5,5 horas (110 varreduras totais para cada amostra). Os dados brutos são analisados pelo método c (s) e implementados no programa de análise SEDFIT. As distribuições de tamanho resultantes são representadas graficamente e os picos integrados. Os valores percentuais associados a cada pico representam a fração da área do pico da área total sob todos os picos e são baseados nos dados brutos gerados a 280nm; muitos laboratórios usam esses valores para calcular vazios: proporções de partículas completas. No entanto, como as partículas vazias e cheias têm coeficientes de extinção diferentes nesse comprimento de onda, os dados brutos podem ser ajustados de acordo. A proporção entre os valores de pico de partículas vazias e de monômero completo antes e após o ajuste do coeficiente de extinção é usada para determinar a proporção de partículas vazias.

[00171] Em um aspecto, utiliza-se um método de q-PCR otimizado que utiliza uma serina protease de amplo espectro, por exemplo, a proteinase K (tal como disponibilizado comercialmente pela Qiagen). Mais particularmente, o ensaio de título de genoma qPCR otimizado é semelhante a um ensaio padrão, exceto pelo fato de que após a digestão com DNase I as amostras são diluídas com tampão de proteinase K e tratadas com proteinase K seguida de desativação térmica. Adequadamente, as amostras são diluídas com tampão de proteinase K em uma quantidade igual ao tamanho da amostra. O tampão de proteinase K pode ser concentrado 2 vezes ou mais. Em geral, o tratamento com proteinase K é de cerca de 0,2 mg/mL, mas pode variar entre 0,1 mg/mL e cerca de 1 mg/mL. A etapa de tratamento geralmente é conduzida a cerca de 55°C durante cerca de 15 minutos, mas pode ser realizada a uma temperatura mais baixa (por exemplo, cerca de 37°C a cerca de 50°C) durante um período de tempo mais longo (por exemplo, cerca de 20 minutos a cerca de 30 minutos) ou a uma temperatura mais alta (por exemplo, até cerca de 60°C) por um período de tempo mais curto (por exemplo, por cerca de 5 a 10 minutos). De modo semelhante, a desativação térmica se dá geralmente a cerca de 95°C durante cerca de 15 minutos, mas a temperatura pode ser diminuída (por exemplo, cerca de 70°C a cerca de 90 °C) e o tempo prolongado (por exemplo, de cerca de 20 minutos a cerca de 30 minutos). As amostras são então diluídas (por exemplo, 1000 vezes) e submetidas a uma análise TaqMan, conforme descrito no ensaio padrão. A quantificação também pode ser feita usando ViroCyt ou citometria de fluxo.

[00172] Além disso, ou alternativamente, a PCR digital gota a gota (ddPCR) pode ser usada. Por exemplo, foram descritos métodos para determinar títulos de genoma de vetores de AAV auto-complementares e de fita simples por ddPCR. Ver, por exemplo, M. Lock et al, Hu Gene

Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. abril de 2014;25(2):115-25. doi: 10,1089/hgtb.2013,131. Epub 14 de fevereiro de 2014.

[00173] Em resumo, o método para separar partículas de rAAVhu68 com sequências gênicas empacotadas de intermediários de rAAVhu68 deficientes em genoma envolve submeter uma suspensão compreendendo partículas virais recombinantes de rAAVhu68 e intermediários do capsídeo de rAAVhu68 a uma cromatografia líquida de desempenho rápido, em que as partículas virais de rAAVhu68 e intermediários de rAAVhu68 são ligadas a uma resina de permuta aniônica forte equilibrada a um pH de 10,2 e submetidas a um gradiente salino enquanto se monitora o eluato quanto à absorvância ultravioleta a cerca de 260 e a cerca de 280. Embora menos ideal para o rAAVhu68, o pH pode estar no faixa de cerca de 10,0 a 10,4. Neste método, os capsídeos totais de AAVhu68 são coletados a partir de uma fração que é eluída quando a proporção de A260/A280 atinge um ponto de inflexão. Em um exemplo, para a Etapa de Cromatografia de Afinidade, o produto diafiltrado pode ser aplicado a uma resina de afinidade Capture Select™ Poros- AAV2/9 (Life Technologies), que captura com eficácia o sorotipo AAV2/hu68. Sob essas condições iônicas, um percentual significativo de DNA e proteínas celulares residuais flui através da coluna, ao mesmo tempo em que as partículas de AAV são capturadas com eficiência.

#### V. Composições e Usos

[00174] São fornecidas neste documento composições contendo pelo menos um estoque de rAAV (por exemplo, um estoque de rAAVhu68) e um veículo, excipiente e/ou conservante opcional. Um estoque de rAAV refere-se a uma pluralidade de vetores de rAAV que são os mesmos, por exemplo, como nas quantidades descritas abaixo na discussão de concentrações e unidades de dosagem.

[00175] Como utilizado neste documento, o termo "AAVhu68.JAb" refere-se a um rAAV que possui um capsídeo AAVhu68 como definido

neste documento que empacotou nele um genoma de vetor que codifica os domínios do anticorpo anti-influenza (Ab). Como utilizado neste documento, o termo "AAV9.JAb" refere-se a um rAAV que possui um capsídeo AAV9 como definido neste documento que empacotou nele um genoma de vetor que codifica os domínios do anticorpo anti-influenza (Ab). Em certas modalidades, um único estoque de rAAV codifica todas as quatro regiões de imunoglobulina da SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, opcionalmente em uma ou mais proteínas de fusão. Os genomas de vetor podem incluir qualquer um dos ilustrados neste documento, por exemplo, na SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 31, ou outro genoma de vetor manipulado como descrito neste documento.

[00176] Em certas modalidades, uma composição pode conter pelo menos um segundo estoque diferente de rAAV. Este segundo estoque vetorial pode variar do primeiro por ter um capsídeo AAV diferente e / ou um genoma vetorial diferente. Em certas modalidades, uma composição como descrita neste documento pode conter um vetor diferente que expressa um cassete de expressão como descrito neste documento, ou outro componente anti-influenza (por exemplo, um construto de anticorpo, outra droga biológica e/ou uma molécula pequena).

[00177] Como usado neste documento, "veículo" inclui quaisquer solventes, mídia de dispersão, veículos, revestimentos, diluentes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardadores de absorção, tampões, soluções carreadoras, suspensões, coloides e similares. A utilização de tais meios e agentes para substâncias farmacologicamente ativas é bem conhecida na técnica. Ingredientes ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições. A frase "farmacologicamente aceitável"



refere-se a entidades moleculares e composições que não produzem uma reação alérgica ou similar desagradável quando administrada a um hospedeiro. Os veículos de distribuição, tais como lipossomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas e semelhantes, podem ser utilizados para a introdução das composições da presente invenção em células hospedeiras adequadas. Em particular, os transgenes administrados pelo vetor rAAV podem ser formulados para distribuição quer encapsulada em uma partícula lipídica, um lipossoma, uma vesícula, uma nanoesfera ou uma nanopartícula ou semelhante.

[00178] Em uma modalidade, uma composição inclui uma formulação final adequada para distribuição a um sujeito, por exemplo, é uma suspensão líquida aquosa tamponada a uma concentração de pH e sal fisiologicamente compatível. Opcionalmente, um ou mais surfactantes estão presentes na formulação. Em outra modalidade, a composição pode ser transportada como um concentrado que é diluído para administração a um sujeito. Em outras modalidades, a composição pode ser liofilizada e reconstituída no momento da administração.

[00179] Um surfactante adequado, ou uma combinação de surfactantes, pode ser selecionado dentre surfactantes não iônicos que não sejam tóxicos. Em uma modalidade, um surfactante de copolímero em bloco difuncional que termina em grupos hidroxil primários é selecionado, por exemplo, como Pluronic® F68 [BASF], também conhecido como Poloxamer 188, que tem um pH neutro e um peso molecular médio de 8400. Outros surfactantes e outros poloxâmeros podem ser selecionados, quais sejam, copolímeros tribloco não iônicos compostos por uma cadeia hidrofóbica central de polioxipropileno (óxido de polipropileno) flanqueado por duas cadeias hidrofílicas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)), Solutol HS 15 (Macrogol-15 Hidroxiestearato), Labrasol (glicero poli-caprilico), éter de polioxi-10

oleil, TWEEN (ésteres de ácido graxo e polioxietileno sorbitano), etanol e polietilenoglicol. Em uma modalidade, a formulação contém um poloxâmero. Esses copolímeros geralmente são nomeados com a letra "P" (de poloxâmero) seguidos de três dígitos: os dois primeiros dígitos x 100 dão a massa molecular aproximada do núcleo de polioxipropileno e o último dígito x 10 indica o percentual de polioxietileno. Em uma modalidade, o Poloxamer 188 é selecionado. O surfactante pode estar presente em uma quantidade de cerca de 0,0005% até cerca de 0,001% da suspensão.

[00180] Os vetores são administrados em quantidades suficientes para transfectar as células e fornecer níveis suficientes de transferência e expressão gênica para fornecer um benefício terapêutico sem efeitos adversos indevidos, ou com efeitos fisiológicos clinicamente aceitáveis, que podem ser determinados pelos versados na técnica médica. As vias de administração convencionais e farmacologicamente aceitáveis incluem, mas não estão limitadas a distribuição direta a um órgão desejado (por exemplo, fígado (opcionalmente através da artéria hepática), pulmão, coração, olho, rim), oral, inalação, intranasal, vias de administração parentais intratecal, intratraqueal, intra-arterial, intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intradérmica e outras vias parentéricas de administração. As vias de administração podem ser combinadas, se desejado.

[00181] As dosagens do vetor viral dependerão principalmente de fatores como a condição a ser tratada, a idade, peso e saúde do paciente e, portanto, podem variar entre os pacientes. Por exemplo, uma dosagem humana terapeuticamente eficaz do vetor viral está geralmente na faixa de cerca de 25 a cerca de 1000 microlitros a cerca de 5 mL de líquido de suspensão aquoso contendo doses de cerca de  $10^9$  a  $4 \times 10^{14}$  GC do vetor AAV. A dosagem será ajustada para equilibrar o benefício terapêutico contra quaisquer efeitos colaterais e tais

dosagens podem variar dependendo da aplicação terapêutica para a qual o vetor recombinante é empregado. Os níveis de expressão do transgene podem ser monitorados para determinar a frequência da dosagem resultando em vetores virais, preferencialmente vetores AAV contendo o minigene. Opcionalmente, regimes de dosagem semelhantes aos descritos para fins terapêuticos podem ser utilizados para imunização utilizando as composições da invenção.

[00182] As composições de vírus com defeito de replicação podem ser formuladas em unidades de dosagem para conter uma quantidade de vírus com defeito de replicação que está na faixa de cerca de  $10^9$  GC a cerca  $10^{16}$  GC (para tratar um sujeito médio de 70 kg em peso corporal) incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa e, de preferência,  $10^{12}$  GC a  $10^{14}$  GC para um paciente humano. Em uma modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos  $10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ , or  $9 \times 10^9$  GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos  $10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ , ou  $9 \times 10^{10}$  GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos  $10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ , ou  $9 \times 10^{11}$  GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos  $10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ , ou  $9 \times 10^{12}$  GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos  $10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$ , ou  $9 \times 10^{13}$  GC por dose, incluindo todos os

números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos  $10^{14}$ ,  $2 \times 10^{14}$ ,  $3 \times 10^{14}$ ,  $4 \times 10^{14}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $6 \times 10^{14}$ ,  $7 \times 10^{14}$ ,  $8 \times 10^{14}$ , ou  $9 \times 10^{14}$  GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos  $10^{15}$ ,  $2 \times 10^{15}$ ,  $3 \times 10^{15}$ ,  $4 \times 10^{15}$ ,  $5 \times 10^{15}$ ,  $6 \times 10^{15}$ ,  $7 \times 10^{15}$ ,  $8 \times 10^{15}$ , ou  $9 \times 10^{15}$  GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em uma modalidade, para aplicação humana a dose pode variar de  $10^{10}$  a cerca de  $10^{12}$  GC por dose incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionadas dentro da faixa. Em uma modalidade, para aplicação humana a dose pode variar de  $10^9$  a cerca de  $7 \times 10^{13}$  GC por dose incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionadas dentro da faixa. Em uma modalidade, para aplicação humana, a dose varia de  $6,25 \times 10^{12}$  GC a  $5,00 \times 10^{13}$  GC. Em uma modalidade adicional, a dose é de cerca de  $6,25 \times 10^{12}$  GC, cerca de  $1,25 \times 10^{13}$  GC, cerca  $2,50 \times 10^{13}$  GC, ou cerca de  $5,00 \times 10^{13}$  GC. Em certa modalidade, a dose é dividida igualmente em uma metade e administrada a cada narina. Em certas modalidades, para aplicação humana, a dose varia de  $6,25 \times 10^{12}$  GC a  $5,00 \times 10^{13}$  GC administrado como duas alíquotas de 0,2 ml por narina para um volume total distribuído em cada sujeito de 0,8 ml.

[00183] Estas doses acima podem ser administradas em uma variedade de volumes de formulação de veículo, excipiente ou tampão, variando de cerca de 25 a cerca de 1000 microlitros, ou volumes maiores, incluindo todos os números dentro da faixa, dependendo do tamanho da área a ser tratada, o título viral usado, a via de administração e o efeito desejado do método. Em uma modalidade, o volume de veículo, excipiente ou tampão é pelo menos cerca de 25  $\mu$ L. Em uma modalidade, o volume é de cerca de 50  $\mu$ L. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 75  $\mu$ L. Em outra modalidade, o

volume é de cerca de 100 µL. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 125 µL. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 150 µL. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 175 µL. Ainda em outra modalidade, o volume é de cerca de 200 µL. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 225 µL. Ainda em outra modalidade, o volume é de cerca de 250 µL. Ainda em outra modalidade, o volume é de cerca de 275 µL. Ainda em outra modalidade, o volume é de cerca de 300 µL. Ainda em outra modalidade, o volume é de cerca de 325 µL. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 350 µL. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 375 µL. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 400 µL. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 450 µL. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 500 µL. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 550 µL. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 600 µL. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 650 µL. Em outra modalidade, o volume é de cerca de 700 µL. Em outra modalidade, o volume é de entre cerca de 700 e 1000 µL.

[00184] Em certas modalidades, os vetores recombinantes podem ser dosados por via intranasal usando dois sprays para cada narina. Em uma modalidade, os dois sprays são administrados alternando a cada narina, por exemplo, spray de narina esquerda, spray de narina direita, depois spray de narina esquerda, spray de narina direita. Em certas modalidades, pode haver um atraso entre sprays alternados. Por exemplo, cada narina pode receber vários sprays que são separados por um intervalo de cerca de 10 a 60 segundos, ou 20 a 40 segundos, ou cerca de 30 segundos, a alguns minutos ou mais. Tais sprays podem fornecer, por exemplo, cerca de 150 µL a 300 µL ou cerca de 250 µL em cada spray, para atingir um volume total doseado de cerca de 200 µL a cerca de 600 µL, 400 µL a 700 µL ou 450 µL a 1000 µL.

[00185] Em certa modalidade, o vetor AAV recombinante pode ser doseado por via intranasal para atingir uma concentração de 5-20 ng/ml

do produto de expressão do transgene (por exemplo, o construto de anticorpo neutralizante, o JAb210a MDAb) conforme medido em uma solução de lavagem nasal pós-dosagem, por exemplo, uma semana a quatro semanas ou cerca de duas semanas após a administração do vetor. Os métodos de aquisição da solução de lavagem nasal no sujeito, bem como os métodos de quantificação do produto de expressão do transgene são convencionais. Ver, por exemplo, Exemplos 18 e 19.

[00186] Para outras vias de administração, por exemplo, por via intravenosa ou intramuscular, os níveis de dose seriam mais altos do que os administrados por via intranasal. Por exemplo, essas suspensões podem ser doses de volumes de cerca de 1 mL a cerca de 25 mL, com doses de até cerca de  $2,5 \times 10^{15}$  GC.

[00187] Os vetores recombinantes descritos acima podem ser distribuídos às células hospedeiras de acordo com os métodos publicados. O rAAV, preferencialmente suspenso em um veículo fisiologicamente compatível, pode ser administrado a um paciente mamífero humano ou não humano. Em outra modalidade, a composição inclui um veículo, diluente, excipiente e/ou adjuvante. Os veículos adequados podem ser facilmente selecionados por um versado na técnica em vista da indicação para a qual o vírus de transferência é direcionado. Por exemplo, um veículo adequado inclui solução salina, que pode ser formulada com uma variedade de soluções tampão (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato). Outros veículos exemplificativos incluem solução salina estéril, lactose, sacarose, fosfato de cálcio, gelatina, dextrano, ágar, pectina, óleo de amendoim, óleo de gergelim e água. O tampão/veículo deve incluir um componente que impede que o rAAV cole na tubagem de infusão mas não interfira com a atividade de ligação *in vivo* ao rAAV.

[00188] Opcionalmente, as composições da invenção podem conter, além do rAAV e veículo(s), outros ingredientes farmacêuticos

convencionais, tais como conservantes ou estabilizadores químicos. Preservantes exemplares adequados incluem clorobutanol, sorbato de potássio, ácido sórbico, dióxido de enxofre, galato de propil, parabenos, etil vanilina, glicerina, fenol e paraclorofenol. Estabilizadores químicos adequados incluem gelatina e albumina.

[00189] As composições de acordo com a presente invenção podem compreender um veículo farmacêuticamente aceitável, tal como definido acima. Adequadamente, as composições descritas neste documento compreendem uma quantidade eficaz de um ou mais AAV suspensos em um veículo farmacêuticamente adequado e/ou misturado com excipientes adequados desenhados para distribuição ao sujeito por injeção, bomba osmótica, cateter intratecal, ou para distribuição por outro dispositivo ou via. Em um exemplo, a composição é formulada para administração intranasal. Em outro exemplo, a composição é formulada para administração intramuscular. Ainda em outro exemplo, a composição é formulada para administração intravenosa. Em ainda outro exemplo, a composição é formulada para administração intraperitoneal.

[00190] Em uma modalidade, uma composição contendo os vetores virais que codificam o construto antipatógeno (por exemplo, um construto de anticorpo neutralizante) é distribuído intranasalmente como líquido (por exemplo, atomizado, aerossol, spray, etc.) ao sujeito a um volume de instilação relativamente baixo para minimizar a transdução pulmonar. Em uma modalidade, a distribuição de AAV de baixo volume restringe mais de cerca de 70%, mais de 80%, mais de 90%, mais de cerca de 95% ou mais de cerca de 99% da transdução (conforme medido por expressão) ao epitélio nasal. Em outra modalidade, os vetores virais podem ser distribuídos localmente através de um meio diferente de um spray intranasal, por exemplo, injeção intranasal.

[00191] Em certas modalidades, o dispositivo de distribuição

intranasal fornece um atomizador de spray que fornece uma névoa de partículas com uma faixa de tamanho médio de cerca de 30 microns a cerca de 100 microns de tamanho. Em certas modalidades, a faixa de tamanho médio é de cerca de 10 microns a cerca de 50 microns. Dispositivos adequados foram descritos na literatura e alguns estão disponíveis comercialmente, por exemplo, o LMA MAD NASAL™ (Teleflex Medical; Irlanda); Teleflex VaxINator™ (Teleflex Medical; Irlanda); Controlled Particle Dispersion® (CPD) da Kurve Technologies. Ver também PG Djupesland, Drug Deliv e Transl. Res (2013) 3: 42-62. Em certas modalidades, o tamanho das partículas e o volume de distribuição são controlados de modo a atingir preferencialmente células epiteliais nasais e minimizar o direcionamento para o pulmão. Em outras modalidades, a névoa de partículas é de cerca de 0,1 micron a cerca de 20 microns, ou menos, a fim de distribuir às células pulmonares. Tais tamanhos menores de partículas podem minimizar a retenção no epitélio nasal.

[00192] Qualquer método ou via adequados podem ser utilizados para administrar uma composição contendo AAV conforme descrito neste documento e, opcionalmente, para co-administrar outras drogas ou terapias ativas em conjunto com os anticorpos mediados por AAV descritos neste documento. As vias de administração incluem, por exemplo, administração sistêmica, oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular.

[00193] Em uma modalidade, é fornecida uma composição congelada que contém um rAAV em uma solução de tampão, conforme descrito neste documento, em forma congelada. Opcionalmente, um ou mais surfactantes (por exemplo, Pluronic F68), estabilizadores ou conservantes estão presentes nesta composição. Adequadamente, para utilização, uma composição é descongelada e titulada à dose desejada com um diluente adequado, por exemplo, uma solução salina



estéril ou solução salina tamponada.

[00194] Opcionalmente, uma composição descrita neste documento pode ser usada em combinação com outros medicamentos antivirais e/ou vacinas contra outros alvos virais, incluindo outras vacinas contra influenza, incluindo: Influenza A, Influenza B e Influenza C. Os vírus influenza do tipo A são os patógenos humanos mais virulentos. Os sorotipos de influenza A que foram associados a pandemias incluem o H1N1, que causou a gripe espanhola em 1918 e a gripe suína em 2009; H2N2, que causou a gripe asiática em 1957; H3N2, que causou a gripe de Hong Kong em 1968; H5N1, que causou a gripe aviária em 2004; H7N7; H1N2; H9N2; H7N2; H7N3; e H10N7. Anticorpos neutralizantes amplamente contra a influenza A foram descritos. Como usado neste documento, um "anticorpo amplamente neutralizante" refere-se a um anticorpo neutralizante que pode neutralizar várias cepas de vários subtipos. Por exemplo, CR6261 [The Scripps Institute / Crucell] foi descrito como um anticorpo monoclonal que se liga a uma ampla gama do vírus da influenza incluindo a "gripe espanhola" de 1918 (SC1918 / H1) e a um vírus da classe H5N1 de influenza aviária que saltou de galinhas para um ser humano no Vietnã em 2004 (Viet04/H5). O CR6261 reconhece uma região helicoidal altamente conservada no tronco proximal da membrana da hemaglutinina, a proteína predominante na superfície do vírus influenza. Este anticorpo é descrito no documento WO 2010/130636, incorporado neste documento por referência. Outro anticorpo neutralizante, F10 [XOMA Ltd] foi descrito como sendo útil contra H1N1 e H5N1 (Sui, Jianhua, et al. "Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses." *Nature structural & molecular biology* 16.3 (2009): 265-273). Outros anticorpos contra a influenza, por exemplo, Fab28 e Fab49, podem ser selecionados. Ver, por exemplo, WO 2010/140114 e WO 2009/115972, que são incorporados por referência. Ainda outros

anticorpos, como os descritos em WO 2010/010466, Publicação de Patente Publicado EUA/2011/076265 e WO 2008/156763, podem ser facilmente selecionados.

[00195] Os métodos para usar esses rAAV, por exemplo, para imunização passiva, são descritos, por exemplo, no documento WO 2012/145572. Outros métodos de distribuição e usos serão evidentes para um versado na técnica. Por exemplo, um regime como descrito neste documento pode compreender, além de uma ou mais das combinações descritas neste documento, combinação adicional com um ou mais de uma droga biológica, uma droga de molécula pequena, um agente quimioterapêutico, melhoradores imunológicos, radiação, cirurgia, e similar. Uma droga biológica como descrita neste documento, é baseada em um peptídeo, polipeptídeo, proteína, enzima, molécula de ácido nucleico, vetor (incluindo vetores virais) ou semelhantes.

[00196] Em uma terapia combinada, o construto de imunoglobulina distribuído pelo AAV descrito neste documento é administrado antes, durante ou após o início da terapia com outro agente, por exemplo, terapia anti-viral, antibióticos, bem como qualquer combinação dos mesmos, ou seja, antes e durante, antes e depois, durante e depois ou antes, durante e após o início da terapia. Por exemplo, o AAV pode ser administrado entre 8 horas a 30 dias, em certas modalidades, pode demorar cerca de 12 horas, 1 dia, cerca de 3 dias, cerca de 3 a 30 dias ou 5 a 12 dias antes de iniciar a terapia.

#### Exemplos

[00197] Os exemplos a seguir são meramente ilustrativos e não são uma limitação da invenção descrita neste documento.

[00198] Algumas abreviações usadas neste documento são ilustradas abaixo: AAV, vírus adeno-associado; LBA, líquido de lavagem broncoalveolar; CB7, promotor de  $\beta$ -actina de galinha com elementos intensificadores de citomegalovírus; cDNA, DNA complementar; GC,

cópia do genoma; HRP, peroxidase de rábano; IN, Intranasal; IP, Intraperitoneal; ITRs, repetições terminais invertidas; kg, quilograma; ORF, quadro de leitura aberto; poliA, poliadenilação; e rBG,  $\beta$ -globina de coelho.

[00199] Para desenvolver um regime de profilaxia baseado em vetor do vírus adenoassociado (AAV) contra a influenza A e B como uma alternativa à vacina tradicional da gripe no cenário de infecções sazonais e / ou pandêmicas da influenza, novos vetores de AAV foram descobertos com um perfil de desempenho aprimorado no epitélio das vias aéreas. Utilizando técnicas moleculares altamente especializadas desenhadas para detectar e isolar AAVs endógenos de uma variedade de tecidos de primatas humanos e não humanos, um novo AAV, AAVhu68, foi isolado do tecido humano. Este vetor exibe um fenótipo favorável que inclui capacidade de fabricação aprimorada e transdução aprimorada em muitos tipos diferentes de tecidos. Utilizando AAVhu68 como um sorotipo candidato do vetor AAV candidato exemplificado, o cassete de expressão de anticorpo influenza foi otimizado. Apenas um vetor AAV que codifica um único quadro de leitura aberto para a expressão de um Ab de múltiplos domínios (MDAb) foi testado.

Exemplo 1 - Novo Clade F AAV -- AAVhu68

[00200] O DNA tecidual foi extraído de amostras de tecido humano como modelo de PCR com colunas QIAamp (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante com as seguintes modificações. A DNA polimerase Q5 (Mistura Principal de Alta Fidelidade 2X Q5® Hot Start, NEB) foi escolhida por sua extraordinária alta fidelidade e eficiência robusta para recuperar o gene VP1 de AAVs nas amostras, conforme descrito por Gao, et al [Proc Natl Acad Sci USA, 2002 Set 3, 99(18): 11854-11859 (Epub 2002 Aug 21)] com o conjunto de iniciador modificado como se segue: no lugar do AV1NS, iniciador, prm504, [GCTGCGTCAACTGGACCAATGAGAAC, SEQ ID NO: 28] foi utilizado

e no lugar do iniciador reverso AV2CAS, prm505 [CGCAGAGACCAAAGTTCAACTGAAACGA, SEQ ID NO: 29], foi utilizado.

[00201] As condições de PCR foram modificadas da seguinte forma:

	μL
Água	9
prm504	1,25
prm505	1,25
modelo	1
2X Q5	12,5

programa PCR

	Tempo (segundos)	Ciclo (s)
98°	30	1
98°	10	50
59°	10	
72°	93	
72°	120	1

[00202] As bandas de ~ 3 kb da PCR foram cortadas do gel; o DNA foi extraído com o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) e clonado no kit de clonagem Zero Blunt® TOPO® PCR (Thermo Fisher Scientific). Os plasmídeos foram sequenciados para obter o comprimento total do gene AAV VP1. Para a maioria das amostras, pelo menos três plasmídeos foram totalmente sequenciados e sequências de consenso foram desenhadas como a sequência final do AAV para essa amostra.

[00203] A sequência de ácido nucleico adquirida que codifica a proteína do capsídeo vp1 de AAVhu68 fornecida na SEQ ID NO: 18. Ver, também, FIGURAS 1B-1D. A sequência de aminoácidos da vp1 de AAVhu68 fornecida na FIGURA 1A e SEQ ID NO: 16. Comparado ao AAV9 (SEQ ID NO: 17), AAVhu31 (SEQ ID NO: 34) e AAVhu32 (SEQ ID NO: 35), duas mutações (A67E e A157V) foram identificadas como

críticas em AAVhu68 (circuladas na FIGURA 1A).

[00204] O plasmídeo pAAV2/hu68 *trans* foi então produzido carregando o gene VP1 de AAVhu68 em uma estrutura principal pAAV2/9 no lugar do gene AAV9 VP1, a fim de avaliar a eficiência de empacotamento, rendimento e propriedades de transdução. O plasmídeo pAAV2/9 contém ITRs 5' e 3' de AAV2 flanqueando o gene de capsídeo e está disponível no Penn Vector Core [Universidade da Pensilvânia, Phila, PA US, pennvectorcore.med.upenn.edu].

#### Exemplo 2 - Rendimento de vetores AAVhu68

[00205] Foram gerados e avaliados os vetores AAVhu68 e AAV9 carreando vários cassetes transgenes, como GFP e LacZ. Cada um dos vetores foi gerado usando a técnica de transfecção tripla em células 293, como descrito por Gao et al [Gao, Guang-Ping, et al. "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." Proceedings of the National Academy of Sciences 99.18 (2002): 11854-11859.].

##### a. Produção de plasmídeo *trans* pAAVhu68

[00206] A sequência de ácido nucleico que codifica a proteína da capsídeo vp1 fornecida na SEQ ID NO: 18.

[00207] O plasmídeo pAAV2/hu68 *trans* foi então produzido carregando-se o gene VP1 de AAVhu68 em uma estrutura principal pAAV2/9 no lugar do gene AAV9 VP1, a fim de avaliar a eficiência de empacotamento, rendimento e propriedades de transdução. O plasmídeo pAAV2/9 contém ITRs 5' e 3' de AAV2 flanqueando o gene de capsídeo e está disponível no Penn Vector Core [Universidade da Pensilvânia, Phila, PA US, pennvectorcore.med.upenn.edu].

##### b. Rendimento de vetores AAVhu68

[00208] Cultivaram-se 293 células e mantiveram-se no Meio Essencial Mínimo de Eagle com 10% de soro fetal bovino sob a atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. As transfecções foram realizadas

como descrito por Gao *et al* [Gao, Guang-Ping, *et al*. "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.18 (2002): 11854-11859] com o vetor de plasmídeo substituído por pAAV2/hu68 ou pAAV2/9. As células transfectadas foram ainda cultivadas em placas de 6 poços. O lisado total das células, bem como o sobrenadante, foi coletado para quantificação do vírus via análise TaqMan (Applied Biosystems) usando sondas e iniciadores direcionados às regiões poliA, conforme descrito em Gao *et al*. [Gao, Guangping, *et al*. "Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance *in vivo*." *Human gene therapy* 11.15 (2000): 2079-2091.]. Os rendimentos de seis plasmídeos pAAV2/9 e seis plasmídeos pAAV2/hu68 foram comparados em placas de 6 poços, frente a frente, em termos de título sobrenadante e título total de lisado. Cada plasmídeo foi de uma colônia de bactérias individual.

[00209] Verificou-se que o rendimento de AAVhu68 era semelhante ao de AAV9 em termos de lisado total. No entanto, no sobrenadante, o rendimento de AAVhu68 foi significativamente maior do que o de AAV9. Assim, o AAVhu68 foi demonstrado como um vetor melhor comparado ao AAV9 em termos de produção escalonável, uma vez que o sobrenadante é o preferido para o aumento da produção.

c. Comparação de diferentes capsídeos AAV com construtos de anticorpos

[00210] Em um estudo, houve um aumento no rendimento para o vetor AAVhu68 (Tabela 1).

Tabela 1. Rendimento dos vetores AAV1, AAV9 e AAVhu68.

Vetor	Rendimento total (GC)
AAV1.CB7.Cl.hJAb	$1,03 \times 10^{13}$
AAV9.CB7.Cl.hJAb	$2,89 \pm 0,08 \times 10^{13}$
AAVhu68.CB7.Cl.hJAb	$3,40 \times 10^{13}$

Exemplo 3 - Administração intranasal mediada por AAVhu68 a camundongos BALB/c para proteger contra desafio nasal com A/Puerto Rico/8/34 (PR8-MTS)

[00211] O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a eficácia protetora dos vetores AAV1.CB7.hJAb, AAV9.CB7.hJAb e AAVhu68.CB7.hJAb, todos desenhados para conferir profilaxia contra influenza A (A/Puerto Rico/8/34) quando administrados por via intranasal (IN) em camundongos. Para todos os estudos, os camundongos BALB/c fêmeas (6 semanas de idade) foram adquiridos no Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) e alojados no Animal Facility dos Translational Research Laboratories da Universidade da Pensilvânia. Todos os procedimentos animais descritos neste documento foram aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Committee da Universidade da Pensilvânia.

[00212] Os camundongos anestesiados foram suspensos por seus incisivos dorsais e receberam  $10^9$  cópias do genoma (GC) intranasal (IN) de cada vetor AAV diluído em PBS até um volume total de 51  $\mu$ l distribuído como três alíquotas de 17  $\mu$ l. Os estudos de desafio ocorreram sete dias após a administração do vetor. Camundongos anestesiados foram suspensos por seus incisivos dorsais e administrados em 51  $\mu$ l de influenza A/Puerto Rico/8/34 (ou seja, PR8) ( $5LD_{50}$ ) distribuídos como três alíquotas de 17  $\mu$ l. Os camundongos foram pesados uma vez por dia durante os primeiros 14 dias. Qualquer camundongo mostrando sinais de sofrimento ou perda de peso  $\geq 30\%$  foi sacrificado. Os camundongos sobreviventes foram sacrificados 21 dias após o desafio. Os resultados são mostrados nas FIGURAS 2A - 2B.

[00213] Em resumo, na distribuição IN de  $10^9$  GC de AAV1.CB7.hJAb conferiu proteção parcial (40%) contra o desafio PR8, juntamente com significativa perda de peso ( $> 20\%$ ). Em contraste, distribuição IN de

AAV9.CB7.hJAb e AAVhu68.CB7.hJAb na dose de  $10^9$  GC conferiu 80% de proteção contra o desafio PR8 que foi acompanhado por uma perda de peso de 10 a 20%.

Exemplo 4 - Administração do vetor AAVhu68 para camundongos BALB/c para proteção contra desafio nasal com B/Lee/40

[00214] O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a eficácia protetora dos vetores AAV1.CB7.hJAb, AAV9.CB7.hJAb e AAVhu68.CB7.hJAb, todos desenhados para conferir profilaxia contra influenza B (B/Lee/40) quando administrados IN em camundongos.

[00215] Os camundongos anestesiados foram suspensos por seus incisivos dorsais e receberam  $10^9$  GC IN intranasal de cada vetor AAV diluído em PBS até um volume total de 51  $\mu$ l distribuído como três alíquotas de 17  $\mu$ l.

[00216] Os estudos de desafio ocorreram sete dias após a administração do vetor. Camundongos anestesiados foram suspensos por seus incisivos dorsais e administrados em 51  $\mu$ l IN de influenza B/Lee/40 ( $5LD_{50}$ ) distribuídos como três alíquotas de 17  $\mu$ l. Os camundongos foram pesados uma vez por dia durante os primeiros 14 dias. Qualquer camundongo mostrando sinais de sofrimento ou perda de peso  $\geq 30\%$  foi sacrificado. Os camundongos sobreviventes foram sacrificados 21 dias após o desafio. Os resultados são mostrados nas FIGURAS 3A - 3B.

[00217] Em resumo, na distribuição de  $10^9$  GC de AAV1.CB7.hJAb, AAV9.CB7.hJAb ou AAVhu68.CB7.hJAb conferiu proteção total contra o desafio IN com B/Lee/40, juntamente com nenhuma perda de peso significativa ao longo do desafio.

Exemplo 5 - Perfil de expressão da expressão de hJAb mediada por AAVhu68 no fluido de lavagem broncoalveolar (LALF) de camundongos BALB/c

[00218] O objetivo deste estudo foi avaliar o nível de expressão de



hJAb no LBAF ao variar doses de AAVhu68.CB7.hJAb foram distribuídos IN em camundongos BALB/c.

[00219] Os camundongos foram administrados IN com vetor AAVhu68.CB7.hJAb em doses que variam de  $10^9$  GC a  $10^{11}$  GC. Os camundongos foram necropsiados sete dias depois e o BALF coletado em 500 µl de PBS. Foi utilizado um ELISA da proteína A para quantificar a quantidade de Ab como se segue. As placas ELISA foram revestidas com proteína A. Após uma incubação durante a noite, as placas foram lavadas com Tween-20/PBS a 0,05% e bloqueadas. As amostras BALF foram diluídas em PBS e adicionadas à placa por 1 hora a 37°C. A ligação foi detectada utilizando um Ab específico para IgG Fcg anti-IgG humano de cabra com biotina-SP-AffiniPure (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) e um conjugado estreptavidina-HRP (Abcam, Cambridge, MA). As placas foram desenvolvidas com substrato TMB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Os resultados são mostrados na FIGURA 4.

[00220] Expressão significativa de hJAb foi detectada no BALF de camundongos sete dias após a administração IN de AAVhu68.CB7.hJAb. Como esperado, a expressão de hJAb no BALF de camundongos tratados com vetor aumentou à medida que as doses de vetor aumentaram de  $10^9$  GC a  $10^{11}$  GC.

Exemplo 6 - Determinação da dose mínima eficaz (MED) de AAVhu68.CB7.JAb210a para proteção contra a Influenza A ou Influenza B

[00221] O objetivo deste estudo foi determinar a MED do vetor AAVhu68.CB7.JAb210a necessária para profilaxia contra influenza A ou B.

[00222] A camundongos BALB/c foi administrado IN o vetor AAVhu68.JAb210a em doses variando de  $3 \times 10^8$  GC to  $10^{10}$  GC diluído em PBS a um volume total de 51µl e desafiado sete dias depois

(observado neste documento como dia 0) com 5 LD<sub>50</sub> de PR8 ou B/LEE/40 e pesado diariamente durante a duração do estudo (21 dias). O percentual de peso foi calculado com base no peso no dia da infecção.

[00223] Os camundongos foram dados AAVhu68 IN.CB7. Vetor JAb210a em doses que variam de 10<sup>7</sup> GC a 10<sup>11</sup> GC em 51 µl, como descrito anteriormente. Os estudos de desafio ocorreram sete dias após a administração do vetor. Os camundongos foram desafiados com 5LD<sub>50</sub> de influenza A (PR8) (FIGURAS 5A e 5B) ou influenza B (B/Lee/40) (FIGURAS 6A e 6B) e pesados diariamente.

[00224] A proteção eficaz contra o desafio PR8, que foi acompanhado por nenhuma perda de animais ou perda de peso, foi alcançada com a dose de 10<sup>9</sup> GC de vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG, como mostrado nas FIGURAS 5A e 5B. A sobrevivência que foi acompanhada por significativa perda de peso foi alcançada com a dose de 3 x 10<sup>8</sup> GC de Vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG, como mostrado nas FIGURAS 5A e 5B.

[00225] A proteção eficaz contra o desafio B/Lee/40, que foi acompanhado por nenhuma perda de animais e nenhuma perda de peso, foi alcançada com a dose de 10<sup>9</sup> GC de vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG, como mostrado nas FIGURAS 6A e 6B. A sobrevivência que foi acompanhada por significativa perda de peso foi alcançada com a dose de 3 x 10<sup>8</sup> GC de vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG, como mostrado nas FIGURAS 6A e 6B.

[00226] Em conclusão, a MED do AAVhu68.CB7. JAb210a para proteção contra PR8 é 10<sup>9</sup> GC. Além disso, a dose de AAVhu68.CB7. JAb210a que confere proteção total contra PR8 sem perda de peso acompanhada é 3x10<sup>9</sup> GC.

[00227] Para proteção contra B/Lee/40, a MED do AAVhu68.CB7.

JAb210a é  $3 \times 10^8$  GC, que é uma melhoria significativa em relação a uma terapia combinada que é uma mistura de AAV9.FI6 e AAV9.CR8033, como descrito no documento WO 2016/200543, publicado em 15 de dezembro de 2016, que possuía um MED contra B/Lee/40 de  $10^9$  GC. A dose de AAVhu68.CB7. JAb210a que confere proteção total contra B/Lee/40 sem perda de peso acompanhada é de  $10^9$  GC.

Exemplo 7 - Otimização de códon de hJAb para melhorar a expressão *In Vivo*

[00228] O objetivo deste estudo foi melhorar ainda mais a eficácia comprovada da expressão de hJAb mediada por AAV, alcançando a expressão preferencial de hJAb das células do epitélio das vias aéreas usando esquemas de otimização de códons previstos para melhorar a expressão de hJAb das células que revestem as vias aéreas. Vários esquemas diferentes de otimização de códons foram utilizados para melhorar a expressão de hJAb nas vias aéreas *in vivo*. Além da avaliação de sua potência nos estudos de desafio à influenza, também foi avaliado o rendimento da produção de vetores. A otimização do códon resultou em um rendimento  $\sim 20\%$  maior de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a em comparação com o AAVhu68.CB7.hJAb de origem. Além disso, AAVhu68.CB7.CI.JAb210a foi avaliado quanto à proteção contra influenza A e B em uma série de estudos de desafio desenhados para (a) estabelecer o MED para proteção contra desafio IN com influenza A ou B (b) avaliar o início da proteção conferida pelo vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a e (c) avaliar a capacidade do vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a deve ser efetivamente re-administrado na presença de NAb específico de AAVhu68 circulante no soro.

Exemplo 8 - Início Rápido de Proteção mediada por AAVhu68.CB7.CI.JAb210a contra infecção por influenza A ou B

[00229] O objetivo deste estudo foi determinar o início da proteção

efetiva contra a influenza A (PR8) ou B (B/Lee/40) pelo vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a após administração IN em camundongos.

[00230] A camundongos BALB/c foi administrado IN vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a a  $10^9$  GC ou  $10^{10}$  GC diluídos em PBS para um volume total de 51  $\mu$ l, conforme descrito anteriormente, e desafiados com 5 LD<sub>50</sub> do vírus PR8 ou B/LEE/40, um, dois, três ou sete dias depois (apresentado nas FIGURAS 7A (PR8) e 8A (B/Lee/40) como -1, -2, -3 e -7 dias antes do desafio, respectivamente) e pesados diariamente durante a duração do estudo. O percentual de peso foi calculado com base no peso no dia da infecção.

[00231] O início rápido da proteção eficaz contra o desafio PR8, que foi acompanhado por nenhuma perda de animais, foi alcançado com a dose de  $10^{10}$  GC de vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a como mostrado nas FIGURAS 7B e 7C. Para proteção contra B/Lee/40, o rápido início de proteção efetiva foi alcançado com uma dose log<sub>10</sub> mais baixa a  $10^9$  GC de vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a como mostrado nas FIGURAS 8B e 8C.

Exemplo 9 - Administração Nasal de vetor AAVhu68.CB7.JAb210a na presença de abs circulantes séricos específicos de AAVhu68

[00232] O objetivo deste estudo foi determinar a capacidade do vetor AAVhu68.CB7.JAb210a para efetivamente transduzir as células do epitélio das vias aéreas, apesar da presença de NAb circulante no soro contra AAVhu68. Os camundongos receberam IN vetor AAVhu68.CB7.nLacZ (expressando um irrelevante para o transgene da influenza) em doses variando de  $10^9$  GC to  $3 \times 10^{10}$  GC em 51  $\mu$ l, como descrito anteriormente. Vinte e oito dias depois (no pico das respostas de anticorpos) ou no dia 90 (momento em que o Nab deve ser estabilizado) o soro foi isolado de cada um dos camundongos tratados com vetor (e não tratados com vetor) e o título de AAVhu68 específico foi ensaiado o NAb no soro. Os camundongos nos grupos do dia 28 e

do dia 90 foram estratificados de acordo com seu status de NAb e distribuídos a cada um dos três grupos para administração do vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a (FIGURAS 9A-9F e FIGURAS 10A-10C). O grupo 1 foi administrado com  $10^9$  GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a (FIGURA 9A, dia 28 ou FIGURA 10A, dia 90). O grupo 2 foi administrado com  $3 \times 10^9$  GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a (FIGURA 9B, dia 28 ou FIGURA 10B, dia 90). O grupo 3 foi administrado com  $10^{10}$  GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a (FIGURA 9C, dia 28 ou FIGURA 10C, dia 90).

[00233] Conforme previsto, a administração de vetor AAVhu68.CB.nLacZ resultou na geração de NAb específicos para AAVhu68 em circulação sérica, mostrados à direita de cada gráfico nas FIGURAS 9 e 10.

[00234] AAVhu68.CB7.CI.JAb210a pode ser efetivamente re-administrado na presença de NAb específico de AAVhu68 circulante no soro. O NAb específico do AAVhu68 circulante no soro preexistente afeta a readministração eficaz de  $10^9$  GC do vetor. No entanto, aumentando a dose do vetor pela metade do log10 para  $3 \times 10^9$  GC, ou um log10 completo para  $10^{10}$  GC, melhora-se significativamente a sobrevivência de camundongos desafiados pela influenza A. Uma dose de  $10^{10}$  GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a distribuído IN em camundongos com um AAVhu68 NAb circulante no soro de 1:20 a 1:1.280 resulta em proteção eficaz de camundongos contra o desafio PR8. Aumentar o intervalo de tempo entre a exposição inicial ao capsídeo AAVhu68 e a administração com AAVhu68.CB7.CI.JAb210a resultou em uma tendência em direção à proteção aprimorada contra o PR8.

Exemplo 10 - Perfil de biodistribuição de AAVhu68.CB7.hJAb, após administração IN em camundongos

[00235] Camundongos BALB/c receberam o vetor AAVhu68.hJAb IN

em doses variando de  $10^{11}$  GC (alto) a  $10^9$  GC (baixo) e necropsia sete dias depois. Os tecidos (pulmão, fígado, baço, coração e cérebro) foram coletados para análise de biodistribuição. A linha pontilhada representa o nível de fundo no ensaio.

[00236] O objetivo deste estudo foi determinar o perfil de biodistribuição de a) vetor AAVhu68.CB7.CI.hJAb após administração IN de doses de vetor variando de  $10^9$  GC a  $10^{11}$  GC e necropsiado sete dias depois; e b) vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a após a administração IN de uma dose de vetor 100 vezes maior ( $10^{11}$  GC) do que a MED proposta. O estudo foi realizado em duas partes. A Parte A avaliou o perfil de biodistribuição de AAVhu68.hJAb administrado IN em camundongos em doses variando de  $10^9$  a  $10^{11}$  GC necropsiado no dia 7 após a distribuição do vetor. A parte B avaliou o perfil de biodistribuição do AAVhu68.CB7.CI.JAb210a administrado a camundongos na dose mais alta ( $10^{11}$  GC), que foi 100 vezes maior que o MED. Os camundongos foram necropsiados 30 dias após a administração do vetor.

[00237] No estudo da parte A, os camundongos receberam  $10^9$  GC a  $10^{11}$  GC IN de AAVhu68.CB7.hJAb diluído em PBS até um volume total de 51  $\mu$ l, como descrito anteriormente. Os camundongos foram necropsiados sete dias depois e vários tecidos foram coletados para análise da biodistribuição do AAVhu68.

[00238] No estudo da parte B, os camundongos receberam  $10^{11}$  GC IN de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a diluído em PBS até um volume total de 51  $\mu$ l, como descrito anteriormente. Os camundongos foram necropsiados trinta dias depois e vários tecidos foram coletados para análise da biodistribuição do AAVhu68.

[00239] Como previsto quando o vetor é administrado IN, a maioria dos genomas do vetor se deposita no pulmão. Na MED proposta de AAVhu68.CB7.hJAb ( $10^9$  GC) não foram detectados genomas de

AAVhu68 no cérebro e no coração (FIGURA 11), enquanto o nível dos genomas de vetores AAVhu68 detectados no baço e no fígado estava próximo do fundo (FIGURA 11).

[00240] À medida que a dose do vetor aumentava, a quantidade de genomas do vetor depositada no fígado, baço, coração e cérebro aumentava de maneira dependente da dose (FIGURA 11).

[00241] Quando se utilizam altas doses do vetor AAVhu68 (FIGURAS 11, 12A e 12B), os genomas AAVhu68 foram detectados em outros tecidos que não o pulmão. Como mostrado nas Figuras 12A e 12B, a maioria da deposição de genoma de vetor ocorreu no pulmão, seguido pelo baço. Níveis muito baixos do genoma do vetor AAVhu68 estavam presentes no rim, fígado e coração (FIGURA 12A e 12B). Além disso, o nível de genomas de AAVhu68 no cérebro, ovário ou olho estava muito próximo do fundo para permitir uma interpretação precisa dos dados (FIGURA 12A).

[00242] No MED proposto de AAVhu68.CB7.hJAb ( $10^9$  GC) não foram detectados genomas de AAVhu68 no cérebro e no coração, enquanto o nível dos genomas de AAVhu68 detectados no baço e no fígado estava próximo do fundo. Quando se utilizam altas doses do vetor AAVhu68 (FIGURAS 11, 12A e 12B), os genomas do vetor AAVhu68 foram detectados em outros tecidos que não o pulmão. Como mostrado na FIGURA 12A, o nível de genomas de AAVhu68 no cérebro, ovário ou olho estava muito próximo do fundo para permitir uma interpretação precisa dos dados.

#### Exemplo 11

[00243] Os vetores AAVhu68.hJAb e AAVhu68.JAb210a exibiram *in vivo* um perfil de profilaxia impressionante contra desafio letal com várias cepas de influenza A e B. Quando aplicados no nariz do camundongo, conferiram proteção total contra as cepas de influenza A ou B, mesmo quando administrados em doses baixas.

[00244] Curiosamente, a baixa dose protetora do vetor AAV resultou na produção de anticorpos neutralizantes específicos para o AAV de baixo nível circulante no soro. Mostramos que esses anticorpos não comprometeram a re-administração eficaz do vetor, o que é benéfico caso seja necessário proteger contra uma cepa de influenza pandêmica que possa surgir durante a janela da profilaxia universal eficaz do AAV.

[00245] Atualmente, o perfil de segurança do vetor está sendo avaliado em estudos de investigação IND - enabling studies, de apoio à progressão deste produto de profilaxia para um ensaio clínico de fase I. Exemplo 12 - Avaliação do perfil de expressão e distribuição de vetores de AAV9.CB7.hJAb administrado em nariz de macaco usando o dispositivo de atomização intranasal de mucosa nasal LMA® MAD Nasal™ (MAD nasal)

[00246] Este estudo foi desenvolvido para avaliar o dispositivo de distribuição clínica de atomização intranasal de mucosa nasal LMA® MAD Nasal™ (MAD nasal), para distribuição do vetor substituto (AAV9) que expressa a alfa-fetoproteína rhesus (rhAFP; substituto para JAb210a) no nariz do rhesus. O início e o pico do nível de expressão do produto transgênico, rhAFP, foram avaliados no líquido de lavagem nasal e a biodistribuição do vetor foi avaliada no momento da necropsia.

[00247] No dia da administração do vetor, os animais foram sedados, pesados e os sinais vitais foram registrados. Para a coleta do líquido de lavagem nasal (NLF): um cateter de Foley pediátrico foi colocado em uma das narinas e, uma vez instalado, o balão foi inflado com ar e o cateter foi puxado para trás até que a resistência fosse alcançada. Infundiram-se até 5 ml de solução salina tamponada com fosfato na cavidade nasal isolada e a cabeça foi inclinada para o lado para permitir o fluxo da lavagem em um tubo Falcon de 50 ml posicionado logo abaixo da narina. No final do processo, o cateter posicionado distalmente foi liberado e removido, limpo externamente com PBS estéril e posicionado



na área adjacente onde o procedimento foi repetido. Os macacos foram intubados com um tubo endotraqueal para manter uma via aérea patente e permaneceram em decúbito dorsal. Para distribuição de líquido do vetor AAV (animal RA0065): um cateter de Foley pediátrico foi colocado em uma das narinas, o balão foi inflado com ar e o cateter foi puxado para trás até que a resistência fosse alcançada. O vetor AAV (em um volume de 1 mL) em uma dose de  $10^{13}$  GC foi adicionado a cada narina e deixado ali por ~5 minutos (dose total  $2 \times 10^{13}$  GC).

[00248] Para distribuição do vetor AAV através do MAD nasal (animal RQ9476): O vetor AAV foi distribuído através do MAD nasal como  $10^{13}$  GC em um total de 0,5 ml por narina, ambas as doses administradas uma vez (dose total  $2 \times 10^{13}$  GC).

[00249] Em dias selecionados (dias 7, 21, 35, 50, 81 e 99), os macacos foram monitorados quanto a sinais vitais, patologia clínica e expressão do produto substituto do transgene no líquido de lavagem nasal coletado nas narinas direita e esquerda. Na necropsia, os tecidos foram coletados para análise do genoma do vetor AAV9. Adicionando ao perfil de segurança da combinação do MAD nasal com o vetor AAV9 estava a ausência de genoma do vetor no cérebro e no bulbo olfativo.

[00250] A AFP segregada das células das vias aéreas transduzidas por AAV9 foi detectada usando o kit ELISA de alfafetoproteína quantiquina humana (R&D Systems, Inc, Minneapolis MN, EUA), analisando amostras de NLF.

[00251] Quando o vetor AAV9 que expressa rhAFP a uma dose de  $2 \times 10^{13}$  GC em um volume total de 0,5 ml foi distribuído via MAD nas narinas de um macaco rhesus, fomos capazes de analisar a expressão gênica no NLF ao longo do tempo. Curiosamente, após análise da biodistribuição do vetor AAV9, observamos disseminação sistêmica mínima do vetor AAV9 distribuída via nasal MAD com a maioria dos genomas vetoriais detectados no nariz e na traqueia.

[00252] Um macaco rhesus masculino recebeu IN AAV9.CB7.CI.rhAFP.rBG. Especificamente, um macaco recebeu IN  $5,45 \times 10^{12}$  GC de AAV9.CB7.CI.rhAFP.rBG em um volume total de 0,34 ml (dado como uma alíquota de 0,170 ml por narina) usando o MAD Nasal™ (em quadrados, FIGURA 22). O MAD Nasal™ atomiza os medicamentos aprovados em uma névoa fina que pode ser administrada IN. Para o macaco de controle (em círculos, FIGURA 22), o vetor foi distribuído como líquido (0,5 ml por narina). Este estudo de curto prazo foi desenhado para avaliar o perfil de biodistribuição do AAV9.CB7.CI.rhAFP.rBG, quando distribuído ao nariz do macaco rhesus usando o MAD Nasal™. Os animais foram necropsiados 99 dias depois. O vetor AAV9 foi detectado no cérebro (dados não mostrados) e no bulbo olfativo (FIGURA 22).

Exemplo 13 - Avaliação do perfil de expressão de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a no nariz de macaco rhesus

[00253] Este estudo foi desenhado para avaliar o perfil de expressão de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG, quando distribuído ao nariz do macaco rhesus usando o MAD Nasal™. Um macaco rhesus macho foi administrado com  $2 \times 10^{13}$  GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a em um volume de 0,34 mL dividido igualmente entre as narinas via do dispositivo MAD Nasal™. O MAD nasal atomiza os medicamentos aprovados em uma névoa fina que pode ser administrada IN. Verificações diárias de viabilidade são realizadas em todos os animais, de acordo com SOPs 7404. O peso corporal, a temperatura, a frequência respiratória e a frequência cardíaca são monitorados e registrados em todos os momentos, de acordo com SOPs. Os esfregaços nasais são coletados nos dias 7, 14, 21, 28 e 35 para análise da expressão de JAb210a por RT-PCR. Após a avaliação dos dados do dia 35, é tomada uma decisão sobre se o animal é seguido a longo prazo ou necropsiado para biodistribuição do vetor. Amostras de NLF e

sangue foram coletadas nos dias 7, 14, 21, 28, 35, 56 e 77 para análise da expressão de JAb210a. A expressão de JAb210a foi confirmada em amostras (células nasais sucateadas, coletadas do nariz usando uma escova fina) coletadas no dia 77, por um ensaio baseado em RT-PCR projetado especificamente para detectar o JAb 210a.

#### Estudo de reatividade cruzada de tecidos

[00254] O uso de Abs monoclonal como agentes terapêuticos requer uma avaliação da reatividade cruzada do Ab para tecidos normais de humanos e macacos rhesus. Os estudos de reatividade cruzada de tecidos envolvem testes imuno-histoquímicos ou citoquímicos do Ab monoclonal contra uma variedade de tecidos humanos e rhesus normais, compatíveis com os "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Ab Products for Human Use" publicados em fevereiro de 1997 pelo FDA e a "Guideline on Development, Production, Characterisation and Specifications for Monoclonal Antibodies and Related Products" (EMEA/CHMP/BWP/157653/2007) publicada em dezembro de 2008 pela EMA. O objetivo deste estudo é avaliar, por imuno-histoquímica, a potencial reatividade cruzada do produto transgênico do AAVhu68.CB7.CI.JAb210a, com um painel selecionado de tecidos humanos e de rhesus.

Exemplo 14 - Avaliação da eficácia protetora do AAVhu68.CB7.CI.JAb210a contra a influenza A em camundongos velhos

[00255] O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de profilaxia eficaz de camundongos velhos e avaliar a eficácia protetora do vetor AAVhu68.CB7.JAb210a contra influenza A (A/Puerto Rico/8/34) quando administrados IN em camundongos BALB/c fêmeas velhas (9 a 18 meses de idade). Os camundongos anestesiados foram suspensos por seus incisivos dorsais e receberam  $10^9$  GC ou  $3 \times 10^9$  IN de cada vetor AAV diluído em PBS até um volume total de 51  $\mu$ l distribuído como três

alíquotas de 17 µl. Os estudos de desafio ocorreram sete dias após a administração do vetor. Camundongos anestesiados foram suspensos por seus incisivos dorsais e administrados com 51 µl de PR8 IN (5LD<sub>50</sub>) distribuídos como três alíquotas de 17 µl. Os camundongos foram pesados diariamente após o desafio, como mostrado na FIGURA 13A. A perda de peso percentual foi calculada com base no peso no dia do desafio de influenza. Qualquer camundongo mostrando sinais de sofrimento ou perda de peso  $\geq 30\%$  foi sacrificado. Os camundongos sobreviventes foram sacrificados 21 dias após o desafio. A FIGURA 13B representa graficamente a porcentagem de sobrevivência após o desafio PR8.

[00256] Em resumo, na distribuição de  $10^9$  GC ou  $3 \times 10^9$  GC de AAVhu68.CB7.JAb210a conferiu proteção total contra o desafio PR8 e resultou na proteção de camundongos velhos contra um desafio letal com influenza A (5LD<sub>50</sub> de PR8).

Exemplo 15 - Proteção universal contra a infecção por influenza por um anticorpo de vários domínios contra a hemaglutinina da influenza

[00257] Anticorpos de múltiplos domínios que foram gerados a partir de um painel de diversos anticorpos de domínio único de lhama para hemaglutinina da influenza foram relatados neste documento e foram relacionados com amplitude e potência sem precedentes contra os vírus influenza A e B. O anticorpo de múltiplos domínios protege contra a infecção por influenza A e B em camundongos quando administrado por via intravenosa ou expressa localmente a partir de um vetor de vírus adenoassociado recombinante. Os resultados demonstram que os anticorpos de múltiplos domínios direcionados a múltiplos epítomos exibem maior reatividade e potência cruzada do vírus e, quando usados em combinação com a distribuição de vírus adeno-associado, fornecem uma prevenção de infecção por influenza e outros patógenos altamente variáveis.

[00258] As vacinas permanecem essenciais para o controle e prevenção da influenza, mas a maioria dos anticorpos induzidos pela vacinação contra a influenza reconhece a região principal altamente variável da glicoproteína de superfície da hemaglutinina (HA). Tais anticorpos são principalmente específicos de uma cepa e conferem proteção contra apenas um pequeno subconjunto de variantes semelhantes. A seleção anual de cepas de vacina apropriadas também apresenta muitos desafios e uma má combinação com vírus circulantes pode resultar em eficácia subideal da vacina (H. Xie et al., H3N2 Mismatch of 2014-15 Northern Hemisphere Influenza Vaccines and Head-to-head Comparison between Human and Ferret Antisera derived Antigenic Maps. *Sci. Rep.* 5, 15279 (2015)). Além disso, vários estudos indicam que a eficácia das vacinas contra influenza é significativamente reduzida em idosos, que apresentam maior risco de desenvolver complicações relacionadas à influenza. Ver, por exemplo, H. Chen et al., Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* 436, 191-192 (2005); M. T. Osterholm, N. S. Kelley, A. Sommer, E. A. Belongia, Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 12, 36-44 (2012); e W. E. Beyer et al., Cochrane re-arranged: support for policies to vaccinate elderly people against influenza. *Vaccine* 31, 6030-6033 (2013). Anticorpos amplamente neutralizantes (bnAbs) contra uma ampla gama de HAs dos vírus influenza A e B foram extensivamente caracterizados. Ver, por exemplo, A. K. Kashyap et al., Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5986-5991 (2008); M. Throsby et al., Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells. *PLoS One* 3, e3942 (2008); D. Corti et al., A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1

and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* 333, 850-856 (2011); C. Dreyfus et al., Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science* 337, 1343-1348 (2012); D. C. Ekiert et al., Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 324, 246-251 (2009); J. Sui et al., Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 265-273 (2009); D. C. Ekiert et al., A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* 333, 843-850 (2011); R. H. Friesen et al., A common solution to group 2 influenza virus neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 445-450 (2014); P. S. Lee et al., Heterosubtypic antibody recognition of the influenza virus hemagglutinin receptor binding site enhanced by avidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 17040-17045 (2012); e A. Forsman et al., Llama antibody fragments with cross-subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-neutralizing properties and high affinity for HIV-1 gp120. *J. Virol.* 82, 12069-12081 (2008). Anteriormente, esses bnAbs foram propostos como agentes profiláticos em idosos e em outros grupos de alto risco, mas esse uso é seriamente dificultado (i) pela falta de reatividade cruzada e proteção adequadas contra os vírus influenza A e B, o que requer administração de pelo menos dois bnAbs e (ii) a necessidade de múltiplas injeções de altas doses para proteção durante toda a temporada de gripe.

[00259] É apresentada neste documento uma estratégia para a prevenção da influenza que se baseia na expressão da mucosa de uma única proteína semelhante a anticorpo (referida como anticorpo de múltiplos domínios ou MDAb ou JAb) com atividade anti-influenza A e B. O transgene MDAb é expresso na superfície do epitélio respiratório após administração intranasal de um vetor de vírus adenoassociado recombinante (AAV) que codifica o transgene MDAb. Estudos anteriores mostraram que a expressão de bnAb mediada por AAV na mucosa

nasofaríngea pode fornecer proteção duradoura contra a infecção pelo vírus influenza A. Ver, por exemplo, M. P. Limberis et al., Intranasal antibody gene transfer in mice and ferrets elicits broad protection against pandemic influenza. *Sci. Transl. Med.* 5, 187ra72 (2013); e V. S. Adam et al., Adeno-associated virus 9-mediated airway expression of antibody protects old and immunodeficient mice against influenza virus. *Clin. Vaccine Immunol.* 21, 1528-1533 (2014).

A. Eficácia profilática do MD3606 expresso por AAV9.

[00260] Avaliar a proteção *in vivo* pelo MD3606 expresso por AAV (AAV9.MD3606), avaliamos a eficácia profilática de um vetor AAV9 recombinante que codifica sequências humanizadas que codificam domínios de anticorpo anti-influenza (Ab) em camundongos BALB/c desafiados com vírus influenza H1N1, H3N2 e B adaptado a camundongo (FIGURAS 14A a 14B). AAV9.MD3606h foi administrado por via intranasal 7 dias antes do desafio da influenza em doses de vetor variando de  $4 \times 10^7$  to  $5 \times 10^9$  cópias do genoma (GC). A administração de  $5 \times 10^9$  GC protegeu completamente os camundongos contra o desafio letal com o vírus H1N1 (A/Puerto Rico/8/34-MA), enquanto 7 dos 8 camundongos sobreviveram com uma dose 5 vezes menor. Os camundongos desafiados com um vírus H3N2 (A/Hong Kong/1/68-MA) foram totalmente protegidos por administração intranasal de  $5 \times 10^8$  GC de AAV9.MD3606h (dose mais baixa testada). Finalmente, os camundongos desafiados com o vírus influenza B (B/Lee/40-MA) foram completamente protegidos pela administração intranasal de  $1 \times 10^9$  GC de AAV9.MD3606h.

[00261] Distribuição intranasal de AAV9. O MD3606h forneceu proteção total contra os vírus influenza A e B em doses vetoriais tão baixas quanto  $5 \times 10^8$  GC/camundongo. Embora o próprio MD3606 possa ser desenvolvido para indicações que não exijam exposição a anticorpos a longo prazo, como profilaxia pós-exposição ou tratamento

da influenza, o MD3606 expresso por AAV pode ser usado para fornecer proteção duradoura contra a infecção por influenza. Uma administração intranasal uma vez por ano de um único vetor de AAV expressando MD3606 humanizado pode ser suficiente para fornecer proteção passiva durante toda a temporada de gripe. Tal abordagem profilática seria de particular benefício para os idosos e outros grupos de alto risco, onde a vacinação é menos eficaz. A segurança e eficácia desta estratégia profilática são avaliadas. O rápido início da proteção, juntamente com a reatividade cruzada sem precedentes do MD3606 às cepas de influenza aviária, também oferece um tratamento profilático imediatamente após o início de uma pandemia de influenza, fornecendo vantagens significativas sobre a produção padrão de vacinas baseadas em ovos.

#### B. Materiais e métodos - Eficácia profilática do AAV9.hJAb em camundongos

[00262] O vetor AAV9 que expressa JAb humanizado, hJAb sob o controle de um promotor de  $\beta$ -actina de galinha (CB7), intensificador do citomegalovírus híbrido (CMV), foi construído e produzido como descrito anteriormente (M. P. Limberis et al., Intranasal antibody gene transfer in mice and ferrets elicits broad protection against pandemic influenza. *Sci. Transl. Med.* 5, 187ra72 (2013)). Camundongos BALB/c fêmeas de seis semanas de idade, adquiridos no Laboratório Jackson, Bar Harbor, Maine, EUA, foram alojados nas instalações de animais dos Laboratórios de Pesquisa Translacional da Universidade da Pensilvânia. Os camundongos foram anestesiados por uma injeção intraperitoneal de uma mistura de 100 mg/kg de cetamina/10 mg/kg de xilazina em PBS, suspensos por seus incisivos dorsais com os membros posteriores apoiados em uma plataforma e administrados por via intranasal do vetor AAV9.hJAb em um volume total de 51  $\mu$ L de PBS administrados como três alíquotas de 17  $\mu$ l em narinas alternativas.



Uma semana após a administração do vetor, os camundongos tratados e naive foram pesados, anestesiados como descrito acima e vírus de desafio administrados por via intranasal (5LD<sub>50</sub> A/Puerto Rico/8/34-MA H1N1, 5 LD<sub>50</sub> A/Hong Kong/1/68-MA H3N2 ou 5 LD<sub>50</sub> B/Lee/40-MA) em um volume total de 51 µl de PBS como descrito acima. Os camundongos foram pesados diariamente e monitorizados quanto a sinais de doença ou sofrimento. Os animais que apresentaram sinais comportamentais de sofrimento ou perderam 25% do seu peso corporal inicial foram sacrificados. As experiências foram aprovadas e realizadas de acordo com as diretrizes do Institutional Animal Care and Use Committee da Universidade da Pensilvânia.

Exemplo 16 - Produção e fabricação de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG [00263] O vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG consiste em um componente vetorial externo e genoma interno do DNA. O componente do vetor externo é um capsídeo icosaédrico de sorotipo 68, T = 1, consistindo em 60 cópias de três proteínas virais de AAV, VP1, VP2 e VP3, em uma proporção de 1:1:18. O capsídeo contém um genoma de DNA de fita simples que consiste no transgene JAb210a, flanqueado pelas duas repetições terminais invertidas do AAV (ITRs). Um intensificador, promotor, íntron, sequência codificante de JAb210a e sinal de poliadenilação (poliA) compreendem o transgene JAb210a. As ITRs são os elementos genéticos responsáveis pela replicação e empacotamento do genoma durante a produção vetorial e são os únicos elementos cis virais requeridos para gerar o rAAV. A expressão da sequência de codificação de JAb210a conduzida por um promotor CB7, um híbrido entre um intensificador precoce imediato (C4) de citomegalovírus (CMV) e o promotor de beta-actina de galinha. A transcrição deste promotor é aumentada pela presença do íntron de beta actina de galinha (CI). Um sinal poliA de beta globina de coelho é incluído para mediar a terminação de transcritos de mRNA de JAb210a

humano. Um esquema do genoma do vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG é mostrado na FIGURA 15.

[00264] O processo de fabricação do AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG envolve transfecção transitória de células de rim embrionário humano (HEK293) com DNA plasmídico. O banco de células principal HEK293 (MCB) usado na produção do AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG é testado e qualificado conforme detalhado nas diretrizes da FDA e ICH. Os lotes da Substância de Drogas a Granel (BDS) são produzidos por transfecção tripla mediada por polietilenimina (PEI) de células HEK293 no HYPERStacks® Corning de 36 camadas (HS-36). Os processos a jusante envolvem sistemas descartáveis e fechados de bioprocessamento, na medida do possível (filtração, filtragem de fluxo tangencial e cromatografia em coluna). A purificação do vetor envolve várias etapas ortogonais e AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG é formulado em tampão de formulação final (FFB; PBS com uma concentração total de sal de 200 mM, 0,001% (p/v) de F68 plurônico e 5% de glicerol). Os lotes de BDS são congelados, subsequentemente descongelados, reunidos, ajustados à concentração alvo, filtrados esterilmente por um filtro de 0,22 µm e frascos Daikyo Crystal Zenith® de 2 ml (West Pharmaceutical Services, Inc.®). Os dados de preenchimento e a qualificação da mídia são fornecidos como parte do pacote de documentação do lote. Um tamanho de lote de produção de GMP de até 50 x recipientes de cultura de células HS-36 é usado com vários lotes planejados e usados conforme necessário para satisfazer a quantidade de vetores necessária.

[00265] AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG é produzido por transfecção tripla de plasmídeo de células HEK 293 MCB humanas com: (i) o plasmídeo do genoma do vetor, (ii) um plasmídeo auxiliar de AAV denominado pAAVhu68.KanR contendo os genes AAV rep2 e cap hu68

de tipo selvagem (iii) um plasmídeo de adenovírus auxiliar denominado pAdΔF6(Kan). O tamanho do pAAVhu68.CB7.O genoma do vetor empacotado JAb210a (p3618) é 4718bp.

A. Plasmídeo do genoma do vetor AAV: pAAV.CB7.JAb210a.rBG (p3618)

[00266] O plasmídeo do genoma do vetor pAAV.CB7.CI.JAb210a.rBG (p3618, FIGURA 16) foi construído e tem um tamanho de 7976 pb. O genoma do vetor derivado deste plasmídeo é um genoma de DNA de fita simples com ITRs derivadas de AAV2 que flanqueiam o cassete de expressão de JAb210a. A expressão do cassete de transgene é acionada por um promotor CB7, um híbrido entre um intensificador precoce imediato de citomegalovírus (CMV) (C4) e o promotor de beta actina de galinha, enquanto a transcrição deste promotor é aumentada pela presença do íntron de beta actina de galinha (CI). O sinal de poliA para o cassete de expressão é o poliA da beta-globina de coelho (rBG). O plasmídeo foi construído otimizando o códon e sintetizando a sequência (GeneArt) que codifica a região de IgG1 FC humana fundida ao polipeptídeo do tipo MDAb que reconhece vários antígenos da gripe e o construto resultante foi clonado no plasmídeo pN469, um cassete de expressão AAV2 flanqueado por ITR contendo elementos de expressão CB7, CI e rBG para dar pAAV.CB7.CI.JAb210a.rBG (p3618). Todas as partes componentes do plasmídeo são verificadas por sequenciação direta pela Qiagen Genomic Services e confirmadas como parte do processo de fabricação da Puresyn.

B. Descrição dos Elementos de Sequência

[00267] Repetições de terminal invertidas (ITR): ITRs AAV (GenBank Nº NC001401) são sequências idênticas em ambas as extremidades, mas em orientação oposta. As sequências de ITR de AAV2 funcionam tanto como origem da replicação do DNA do vetor quanto do sinal de

empacotamento do genoma do vetor, quando as funções auxiliares do AAV e do adenovírus são fornecidas em trans. Como tal, as sequências ITR representam as únicas sequências cis necessárias para a replicação e empacotamento do genoma vetorial.

[00268] intensificador imediato do CMV (382 pb, GenBank N<sup>o</sup> K03104.1).

[00269] Promotor de  $\beta$ -actina de galinha (282 pb; CB; GenBank N<sup>o</sup> X00182.1) e utilizado para dirigir expressão de Jab210a de alto nível.

[00270] O promotor CB7 foi selecionado para conduzir a expressão do hJAb, pois produz expressão de alto nível, específica das vias aéreas. Foi observada uma expressão forte e específica das vias aéreas de diferentes transgenes acionados pelo promotor CB7 e uma boa traduzibilidade entre várias espécies, incluindo camundongos, furões e MHPs.

[00271] Íntron de  $\beta$ -actina de galinha: O íntron de 973 pb do gene da  $\beta$ -actina de galinha (GenBank N<sup>o</sup> X00182.1) está presente no cassete de expressão vetorial. O íntron é transcrito, mas removido do RNA mensageiro maduro (mRNA) por splicing, reunindo as sequências em ambos os lados do mesmo. A presença de um íntron em um cassete de expressão demonstrou facilitar o transporte de mRNA do núcleo para o citoplasma, aumentando assim a acumulação do nível estável de mRNA para tradução. Esta é uma característica comum em vetores genéticos destinados ao aumento do nível de expressão gênica.

[00272] Sequência de codificação: a região FC de IgG1 humana fundida ao polipeptídeo do tipo MDAb que reconhece múltiplos antígenos da gripe foi otimizada e sintetizada por códon. Os domínios variáveis originais foram identificados a partir das bibliotecas VHH de lhama, analisando vários antígenos da gripe. As cadeias de VHH de lhama específicas da gripe foram totalmente humanizadas. A especificidade e a amplitude dos polipeptídeos de múltiplos domínios

humanizados foram mantidas após o processo de humanização. O polipeptídeo de múltiplos domínios contém 4 domínios IgG pesados variáveis ligados por ligantes Gly-Ser flexíveis.

[00273] Sinal de Poliadenilação: O sinal de poliadenilação de  $\beta$ -globina de coelho de 127 bp (GenBank N<sup>o</sup> V00882.1) fornece sequências cis para poliadenilação eficiente do mRNA de anticorpo. Este elemento funciona como um sinal para a terminação de transcrição, um evento de clivagem específico na extremidade 3' do transcrito nascente e adição de uma cauda longa de poliadenilação.

C. Plasmídeo auxiliar de AAVhu68: pAAV2/hu68.KanR (p0068)

[00274] O plasmídeo auxiliar AAV2/hu68 pAAV2/hu68 (lote N<sup>o</sup>: p0065; 7329bp) foi construído. É um plasmídeo auxiliar de AAV que codifica as quatro proteínas rep de AAV2 do tipo selvagem e as três proteínas do capsídeo AAV VP do tipo selvagem do sorotipo AAV hu68. Uma nova sequência de AAV foi obtida a partir do DNA do tecido cardíaco humano e designada sorotipo AAV hu68. Para criar o construto de empacotamento quimérico, o gene cap AAV2 do plasmídeo pAAV2/9 (p0061-2), contendo os genes AAV2 rep e cap AAV9 do tipo selvagem foi removido e substituído pelo fragmento do plasmídeo pAAV2/hu68 do gene AAVhu68 cap (p0065) (FIGURA 17A). O promotor p5 de AAV que normalmente conduz a expressão de rep é movido neste construto da extremidade 5' de rep para a extremidade 3' de cap. Este arranjo serve para introduzir um espaçador entre o promotor e o gene rep (isto é, a estrutura do plasmídeo), regula para baixo a expressão de rep e aumenta a capacidade de suportar a produção de vetores. A estrutura principal plasmídica em pAAV2/9 é de pBluescript KS. Todas as partes componentes do plasmídeo foram verificadas por sequenciamento direto. O gene de resistência à ampicilina foi então substituído pelo gene de resistência à canamicina para dar pAAV2/hu68n.KanR (p0068) (FIGURA 17B). A identidade do gene do capsídeo AAVhu68 foi

confirmada pelo sequenciamento do plasmídeo de DNA realizado pela Qiagen Genomic Services.

D. Plasmídeo auxiliar de adenovírus pAdDeltaF6 (Kan)

[00275] O plasmídeo pAdDeltaF6 (Kan) foi construído tem 15.774 bp de tamanho. O plasmídeo contém as regiões do genoma do adenovírus que são importantes para a replicação do AAV, ou seja, os RNAs E2A, E4 e VA (as funções E1 do adenovírus são fornecidas pelas células 293), mas não contém outra replicação de adenovírus ou genes estruturais. O plasmídeo não contém os elementos cis críticos para a replicação, como as repetições terminais invertidas adenovirais e, portanto, não é esperado que nenhum adenovírus infeccioso seja gerado. Foi derivado de um clone molecular de Ad5 eliminado por E1, E3 (pBHG10, um plasmídeo baseado em pBR322). As deleções foram introduzidas no DNA de Ad5 para remover a expressão de genes de adenovírus desnecessários e reduzir a quantidade de DNA de adenovírus de 32 kb para 12 kb (FIGURA 18A). Finalmente, o gene de resistência à ampicilina foi substituído pelo gene de resistência à canamicina para obter pAdeltaF6(Kan) (FIGURA 18B). Os genes adenovirais E2, E4 e VAI que permanecem neste plasmídeo, juntamente com E1, que está presente nas células HEK293, são necessários para a produção do vetor AAV.

E. Bancos principais de células bacterianas

[00276] Os estoques de glicerol do banco principal de células bacterianas (BMCB) são obtidos por mistura de 1 mL de uma cultura bacteriana de 1 L durante a noite usada para amplificação de DNA de plasmídeo com um volume igual de glicerol estéril a 50%. Duas alíquotas de 0,5 mL dos estoques de glicerol BMCB por construto são preparadas a partir da mistura e armazenadas em frascos criogênicos Nalgene em -80°C. Para verificar os estoques de glicerol BMCB, o DNA plasmídico amplificado é submetido a análise de estrutura envolvendo

digestão com enzima de restrição seguida de eletroforese em gel, e análise da sequência plasmídica completa por sequencição Sanger na Qiagen. Para preparar alíquotas de estoque de glicerol do banco de células bacterianas de trabalho (BWCB) para remessa ao fabricante de DNA do plasmídeo (Puresyn), uma cultura de 3 mL é inoculada a partir de um estoque de glicerol da BMCB e cultivada durante a noite. Um mL da cultura da noite para o dia é usado para preparar alíquotas de estoque de glicerol BWCB como descrito acima. Novas alíquotas de estoque de glicerol BWCB são verificadas pela análise da estrutura acima mencionada no DNA extraído dos 2 ml restantes da cultura bacteriana durante a noite. Uma vez recebido no fabricante do DNA do plasmídeo, o estoque de glicerol BWCB é armazenado em um local específico do projeto a -80°C. As culturas de produção são inoculadas por raspagem do estoque congelado de glicerol BWCB.

#### F. Fabricação de DNA de plasmídeo

[00277] Todos os plasmídeos para uso na produção dos vetores AAV para estudos de toxicologia/biodistribuição e ensaios de fase 1/2 foram feitos por Puresyn através de seu Programa Clínico Especial e Pronto para IND. Puresyn produz plasmídeos superenrolados para serem utilizados na fabricação de cGMP de vetores virais recombinantes e outros produtos quando o plasmídeo superenrolado é um intermediário na produção do produto final. Todo o meio de crescimento usado no processo é "isento de animais" (com base no Certificado de Análise de cada fornecedor para produtos componentes). Todos os componentes utilizados no processo, desde frascos de fermentação, recipientes, membranas, resina, colunas, tubos e qualquer componente que entre em contato com o plasmídeo são dedicados a um único plasmídeo e são certificados como livres de BSE. Não há componentes compartilhados e descartáveis são usados quando apropriado. A resina PolyFlo®, as colunas e os componentes são utilizados exclusivamente

pela Puresyn para a fabricação de um único plasmídeo. Além do uso de componentes dedicados a um plasmídeo específico, o plasmídeo é processado em uma campanha. A fermentação, lise e purificação do plasmídeo ocorrem em salas dedicadas à produção do plasmídeo específico. Todas as salas são marcadas com o nome do plasmídeo designado e nenhum outro plasmídeo é processado nessas salas ao mesmo tempo. As salas e equipamentos são limpos entre cada campanha de produção de plasmídeo. As especificações para cada plasmídeo são fornecidas na Tabela 2. Além disso, cada plasmídeo produzido é totalmente sequenciado antes do uso na produção do vetor recombinante AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG.

Tabela 2: Especificações de liberação para produção de plasmídeo

PARÂMETRO	RELATÓRIO DESCRITIVO
Aparência	Transparentes, incolores, sem partículas visíveis
A260: 280	1,7-2,0
Concentração	1,0-1,1mg/mL
Homogeneidade do DNA	≥90% Todos superenrolados
RNA residual	Nenhum detectado @ carga 1,0mg
ssDNA, DNA linear, DNA cromossômico	Nenhum detectado @ carga 1,0mg
Endotoxina	<30 EU/mg
Identidade	Consistente com as informações fornecidas
Proteína	Somente para informação
Biocarga de cinco dias	Nenhum crescimento
pH	7,5 - 8,5
Formulação	Tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0-8,1)

G. Banco de Células Mestras do Rim Embrionário Humano 293



[00278] As células 293 do rim embrionário humano (HEK) foram originalmente geradas pela transformação de células HEK com DNA de adenovírus do tipo 5 cortado por Frank Graham e colegas (Graham FL, et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 1977;36:59-74). As células expressam os produtos dos genes E1A e E1B necessários para a produção de rAAV com alto título. As células HEK293 são aderentes e altamente transfectáveis, produzindo altos títulos de rAAV após a transfecção de plasmídeo de DNA.

#### H. Processo de fabricação

[00279] Um diagrama de fluxo do processo de fabricação é mostrado nas FIGURAS 19A a 19B e representa o processo de produção de vetores AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG. Os principais reagentes que entram na preparação do produto estão indicados no lado esquerdo do diagrama e as avaliações de qualidade no processo estão representadas no lado direito do diagrama. Também é fornecida uma descrição de cada etapa de produção e purificação. A fabricação do produto segue um fluxo linear de operações da unidade e utiliza sistemas de bioprocessamento descartáveis e fechados, a menos que especificado de outra forma. AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG é o único produto fabricado dentro de um conjunto de produção especificado. Todas as etapas do processo de produção envolvendo a cultura de células, desde a semeadura da célula até a coleta do sobrenadante, são realizadas de maneira asséptica usando conjuntos descartáveis de tubos e bolsas estéreis de uso único. As células são cultivadas em CellSTACKs® de 10 camadas Corning (CS-10) e HYPERstack® 36 camadas (S-36) e todas as manipulações abertas são realizadas em gabinetes de biossegurança classe II em um ambiente ISO classe 5. O processo de purificação é realizado em um sistema fechado sempre que possível; no entanto, as manipulações de cromatografia em coluna não

são vistas como um sistema completamente fechado. Para minimizar esse risco, caminhos de fluxo descartáveis de uso único são utilizados como parte da plataforma de skid de produção de cromatografia em coluna. Após purificação por cromatografia em coluna, o produto é diafiltrado com FFB. O BDS é então congelado a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ . Depois que os lotes de BDS são testados e verificados individualmente de acordo com as especificações aprovadas, eles são descongelados, reunidos conforme necessário, ajustados para a concentração desejada, com tampão de formulação final, filtrados estéril e preenchidos em frascos estéreis Daikyo Crystal Zenith® 2ml (West Pharmaceutical Services, Inc.®) contêineres em seu Fill Suite. Os filtros usados na filtragem estéril são testados quanto à integridade do filtro após o uso. Após o preenchimento, o AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG passa por testes de liberação e revisão de garantia de qualidade (QA). Todo o processo de produção, da expansão da célula ao Preenchimento final, é documentado nos BRDs (Documentos de Registro em Lote) executados, que passam por uma revisão técnica da equipe e do controle de qualidade antes da liberação para os sítios clínicos.

a. Semeadura Celular

[00280] Uma linha de células HEK293 qualificada é usada para o processo de produção. Um banco de células de trabalho (WCB) foi produzido a partir de um MCB totalmente caracterizado. A cultura de células utilizada para a produção vetorial é iniciada a partir de um único frasco WCB descongelado e expandida de acordo com um Documento de Registro de Lote Principal (MBR). As células são expandidas para  $5 \times 10^9$ – $5 \times 10^{10}$  células usando os frascos T Corning e CS-10, o que permite gerar massa celular suficiente para semear até 45 Hyperstack - 36 (HS-36) para produção vetorial por lote de BDS. As células são cultivadas em meio composto por Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS) de origem

norte-americana irradiado com radiação gama. As células são dependentes de ancoragem e a dissociação celular é realizada utilizando TrypLE™ Select, um reagente de dissociação de células sem produto animal. A semeadura de células é realizada usando sacos de bioprocesso descartáveis de uso único estéreis e conjuntos de tubos. As células serão mantidas a 37° C ( $\pm$  2° C), em atmosfera de 5% ( $\pm$  0,5%) de CO<sub>2</sub>.

b. Transfecção transitória

[00281] Após aproximadamente 3 dias de crescimento (meio DMEM + 10% de FBS), o meio de cultura de células HS-36 é substituído por meio DMEM fresco e sem soro e transfectado com os 3 plasmídeos de produção usando um método de transfecção baseado em polietilenoimina otimizada (PEI). Todos os plasmídeos usados no processo de produção são produzidos no contexto de um sistema de qualidade e infraestrutura de CMO, utilizando controles para garantir a rastreabilidade, controle de documentos e segregação de materiais. Um complexo de transfecção de plasmídeo de DNA suficiente é preparado no BSC para transfectar 50 HS-36 (por lote de BDS). Inicialmente, uma mistura de DNA/PEI é preparada contendo plasmídeo cis (genoma do vetor), plasmídeo trans (gene capsídeo) e plasmídeo auxiliar (Ad) na razão de 0,1:1:2 e PEI de grau GMP PEI (PEIPro, PolyPlus Transfection SA). Essa razão de plasmídeo foi determinada como sendo ideal para a produção de AAV em estudos de otimização de pequena escala. Depois de se misturar bem, a solução é deixada em temperatura ambiente por 25 min., depois é adicionada a meio isento de soro para extinguir a reação e depois é, finalmente, adicionada a HS-36. A mistura de transfecção é equalizada entre todas as 36 camadas de HS-36 e as células são incubadas a 37° C ( $\pm$  2° C) em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% ( $\pm$  0,5%) durante 5 dias.

c. Coleta de Meios Celulares

[00282] As células e meios transfectados são coletados de cada HS-36 usando sacos de bioprocesso descartáveis por meio de drenagem asséptica do meio para fora das unidades. Após a coleta dos meios, o volume de ~200 litros serão suplementados com  $MgCl_2$  para uma concentração final de 2 mM (cofator para Benzonase) e nuclease Benzonase (Cat#: 1.016797.0001, Merck Group) serão adicionados a uma concentração final de 25 unidades/ml. O produto (em um saco descartável de bioprocesso) é incubado a 37°C por 2 horas em uma incubadora para fornecer tempo suficiente para a digestão enzimática de DNA residual celular e plasmidial presente na coleta como resultado do procedimento de transfecção. Essa etapa é realizada para minimizar a quantidade de DNA residual no vetor final. Após a incubação, o NaCl é adicionado a uma concentração final de 500 mM para auxiliar na recuperação do produto durante filtração e filtração do fluxo tangencial a jusante.

d. Clarificação

[00283] Células e detritos celulares são removidos do produto usando uma cápsula de filtro de profundidade (1,2/0,22  $\mu m$ ) conectada em série como um conjunto de saco e tubulação estéril fechado que é acionado por uma bomba peristáltica. A clarificação assegura que os filtros a jusante e as colunas de cromatografia são protegidos da incrustação, e a filtração de redução de biocarga assegura que, no final do trem de filtros, qualquer carga biológica potencialmente introduzida durante o processo de produção a montante é removida antes da purificação a jusante. O material coletado será passado através de um filtro de cápsula Sartorius Sartoguard PES (1,2/0,22  $\mu m$ ) (Sartorius Stedim Biotech Inc.).

e. Filtração de Fluxo Tangencial em Larga Escala

[00284] A redução de volume (10 vezes) do produto clarificado é obtida por Filtração de Fluxo Tangencial (TFF) usando um conjunto

personalizado de membrana, saco e tubo de bioprocessamento fechado estéril. O princípio da TFF é fazer fluir uma solução sob pressão paralela a uma membrana de porosidade adequada (100 kDa). O diferencial de pressão aciona moléculas de menor tamanho através da membrana e, efetivamente, em direção ao fluxo de resíduos, enquanto retém moléculas maiores que os poros da membrana. Ao recircular a solução, o fluxo paralelo varre a superfície da membrana, evitando a incrustação dos poros da membrana. Ao se escolher um tamanho de poro de membrana apropriado e área de superfície, uma amostra líquida pode ser rapidamente reduzida em volume, enquanto retém e concentra a molécula desejada. A diafiltração em aplicações TFF envolve a adição de um novo tampão à amostra recirculante na mesma velocidade que o líquido está passando através da membrana e para o fluxo de resíduos. Com volumes crescentes de diafiltração, quantidades crescentes das pequenas moléculas são removidas da amostra recirculante. Isso resulta em uma purificação modesta do produto clarificado, mas também se obtém uma troca de tampão compatível com a etapa subsequente de cromatografia em coluna de afinidade. Por conseguinte, é utilizada uma membrana PES de 100 kDa para a concentração, que é então diafiltrada com um mínimo de 4 diavolumes de um tampão composto por: Tris a 20 mM, pH 7,5 e NaCl a 400 mM. O produto diafiltrado é armazenado durante a noite a 4°C e depois clarificado com uma cápsula de filtro de profundidade de 1,2/0,22 µm para remover qualquer material precipitado.

f. Cromatografia de Afinidade

[00285] O produto diafiltrado é aplicado a uma resina de afinidade Poros TM Capture Select™ AAV9 (Life Technologies) que captura com eficiência o sorotipo AAVhu68. Sob essas condições iônicas, um percentual significativo de DNA e proteínas celulares residuais flui através da coluna, ao mesmo tempo em que as partículas de AAV são

capturadas com eficiência. Após a aplicação, a coluna é tratada com 5 volumes de uma solução de Benzonase com baixo sal (2500 unidades/mL de Benzonase, Tris a 20 mM pH 7,5 e NaCl a 40 mM,  $MgCl_2$  a 1,5 mM) para remover qualquer célula hospedeira restante e ácido nucleico plasmídico. A coluna é lavada para remover impurezas adicionais de alimentação seguido por uma eluição de pH baixo (NaCl 400 mM, citrato de sódio 20 mM; pH 2,5) que é imediatamente neutralizado por coleta em um volume de 1/10<sup>a</sup> de um tampão de neutralização (Bis Tris Propano, 200 mM, pH 10,2).

g. Cromatografia de Troca Aniônica

[00286] Para se obter maior redução de impurezas em processo, incluindo partículas vazias de AAV, o pool de eluição Poros-AAVhu68 é diluído 50 vezes (Bis Tris Propano a 20 mM, Pluronic F68 a 0,001%; pH 10,2) para reduzir a força iônica e permitir a ligação a uma matriz monolítica CIMmultus<sup>TM</sup> QA (BIA Separations). Após uma lavagem com pouco sal, o produto de vetor é eluído utilizando um gradiente salino linear de NaCl de 60 volumes de coluna (CV) (10-180 mM de NaCl). Este gradiente de sal raso separa efetivamente partículas de capsídeo sem um genoma de vetor (partículas vazias) de partículas contendo genoma de vetor (partículas cheias) e resulta em uma preparação enriquecida para capsídeos completos. As frações são coletadas em tubos contendo 1/100<sup>o</sup> de volume de Pluronic F68 a 0,1% e 1/27<sup>o</sup> de volume de Bis Tris a pH 6,3 para minimizar a ligação não específica aos tubos e a duração da exposição a pH alto, respectivamente. As frações de pico de partículas totais reunidas são diluídas 20 vezes em Bis Tris Propano a 20 mM, Pluronic F68 a 0,001%, pH 10,2, e reaplicadas à mesma coluna, a qual foi limpa no local. O gradiente de sal NaCl a 10-180 mM é reaplicado e as frações de pico de partículas completas apropriadas são coletadas. A área do pico é avaliada e comparada com os dados anteriores para determinação do

rendimento aproximado do vetor.

h. Tampão de Formulação Final (FFB) e Filtração de Redução de Biocarga para fornecer o BDS

[00287] PBS com uma concentração total de sal de 200 mM, 0,001% (p/v) de Pluronic F68 e 5% de glicerol) e concentrado para render o Intermediário BDS em um alvo desejado (isto é,  $4,5 - 5,5 \times 10^{13}$  GC/ml). As amostras são removidas para teste de Intermediário BDS. O Intermediário BDS é filtrado estéril (0,22  $\mu$ m), armazenado em tubos de polipropileno estéreis e congelado a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$  em um local de quarentena até a liberação para o Preenchimento Final.

i. Preenchimento Final

[00288] PBS com concentração total de sal de 200 mM, 0,001% (p/v) de Pluronic F68 e glicerol a 5%. O produto é então filtrado terminalmente através de um filtro de 0,22  $\mu$ m e preenchido em frascos esterilizados Daikyo Crystal Zenith® de 2ml (West Pharmaceutical Services, Inc.®) e tampas com vedações de crimpagem com um volume de preenchimento  $\geq 0,5$  mL a  $\leq 1,0$  mL por frasco. Os frascos são rotulados individualmente. Os frascos rotulados são armazenados a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ . Algumas doses exigirão diluição no FFB antes da administração. No momento da administração, a diluição é realizada pela farmácia no sítio clínico.

j. Biocompatibilidade

[00289] Um problema que pode produzir variabilidade nos níveis de dosagem é a perda do vetor AAV por meio da ligação a plásticos e outras superfícies sólidas durante o armazenamento do vetor e a administração ao paciente. A este respeito, o surfactante clinicamente adequado Pluronic F68 é adicionado ao tampão de formulação final do vetor AAV e é antecipado para minimizar este tipo de perda.

Exemplo 17 - AAVhu68.Profilaxia Mediada por JAb210a de Camundongos Imunodeficientes Contra Influenza A

[00290] O potencial para profilaxia eficaz de camundongos que não possuem um sistema imunológico funcional foi avaliado. Foram utilizados camundongos Rag KO (Rag1<sup>tm1Mom</sup>, Jax 002216) que não possuem células T maduras ou células B. Camundongos fêmeas Rag KO (6-8 semanas de idade) receberam IN 10<sup>10</sup> GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG diluído em PBS para um volume total de 51µl distribuído como três alíquotas de 17µl. Sete dias depois, os camundongos foram desafiados com 5LD<sub>50</sub> de PR8. A FIGURA 20 é um gráfico de linhas que mostra a alteração percentual (%) no peso para camundongos Rag KO desafiados sete dias após a administração do vetor. Os animais foram pesados diariamente, conforme representados no eixo x. A perda de peso percentual foi calculada com base no peso no dia do desafio de infecção por influenza. Qualquer camundongo mostrando sinais de angústia ou perda de peso ≥ 30% foi sacrificado. Todos os camundongos Rag KO a receber AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG sobreviveram ao desafio PR8.

[00291] Os camundongos Rag KO que sobreviveram ao desafio foram então submetidos a um segundo desafio com influenza B. Como os camundongos Rag KO não possuem um sistema imunológico funcional, esse experimento serviu para abordar o impacto de uma infecção anterior na eficácia da profilaxia contra um desafio de influenza subsequente. Os camundongos Rag KO de controle receberam 10<sup>10</sup> GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG diluído em PBS para um volume total de 51µl distribuído como três alíquotas de 17µl para confirmar a eficiência da profilaxia contra influenza B na ausência de uma infecção prévia. Sete dias depois, grupos de camundongos, incluindo camundongos ingênuos e camundongos tratados com vetor sobreviventes (anteriormente apresentados na FIGURA 20), foram desafiados com 5LD<sub>50</sub> de B/Lee/40 (FIGURAS 21A e 21B).

[00292] A FIGURA 21A é um gráfico de linhas que mostra a



porcentagem (%) de mudança no peso para camundongos Rag KO desafiados com 5LD<sub>50</sub> B/Lee/40. Os animais foram pesados diariamente, conforme representados no eixo x. A perda de peso percentual foi calculada com base no peso no dia do desafio de infecção por influenza. Qualquer camundongo mostrando sinais de angústia ou perda de peso  $\geq 30\%$  foi sacrificado. Os camundongos sobreviventes foram sacrificados 42 dias após o desafio. A FIGURA. 21B representa graficamente a porcentagem de sobrevivência após o desafio B/Lee/40. Camundongos a receber o vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG na ausência de uma infecção prévia por influenza sobreviveram ao desafio com 5LD<sub>50</sub> B/Lee/40. No entanto, houve um impacto na sobrevivência do grupo de camundongos que foram previamente expostos a um desafio PR8. Observamos uma taxa de sobrevivência de 80% para camundongos Rag KO que receberam o vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG e foram desafiados com PR8.

Exemplo 18 - Toxicidade e Tolerabilidade de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG; Estudo de Farmacologia Não Clínica/Toxicidade e Biodistribuição de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG em Macacos Rhesus

#### A. Visão Geral

[00293] Para este estudo não clínico de farmacologia/toxicologia, os macacos rhesus recebem uma administração nasal de uma das duas doses de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG ou veículo (FFB) apenas como controle. O vetor é diluído em 1 x DPBS estéril + 0,001% de Pluronic F-68. A formulação do vetor clínico para o ensaio clínico de fase I é PBS com concentração final de sal de 200 mM, 0,001% (p/v) de Pluronic F68 e 5% de glicerol. Após a administração do vetor, os primatas não humanos (NHPs) são monitorados diariamente para observações gerais. Os NHPs são monitorados quinzenalmente para patologia clínica abrangente (contagem de células com diferenciais,

química clínica e painel de coagulação) e mensalmente para reações imunes ao vetor de transferência de genes [anticorpos neutralizantes (NAb) para o capsídeo AAVhu68, e as respostas de linfócitos T citotóxicos (CTL) contra o capsídeo e o transgene são avaliadas pelo ensaio IFN- $\gamma$  ELISPOT].

[00294] Após a conclusão da fase em vida deste estudo, no dia 28 e no dia 90 após a administração do vetor, os macacos são necropsiados com tecidos coletados para um exame histopatológico abrangente. DNA e RNA são extraídos de amostras do nariz, traqueia e pulmão para cópia do genoma e análise da expressão do transgene por qPCR e RT-PCR, respectivamente. A expressão de JAb210a também é avaliada na lavagem nasal e no soro. No momento da necropsia, os linfócitos são coletados do pulmão, baço e medula óssea para examinar a presença de CTLs nesses órgãos.

#### B. Vetor

[00295] O artigo de teste, AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG, é fabricado como descrito no Exemplo 16. O produto final é diluído em FFB. O vetor é armazenado a  $<-60^{\circ}\text{C}$  após a produção até o dia da dosagem. As preparações de vetor são realizadas no dia da dosagem. A preparação e diluições são verificadas. O vetor diluído é mantido em gelo úmido ou a  $2-8^{\circ}\text{C}$  até a dosagem por até 6 horas. Os animais de controle são administrados com tampão de veículo que não contém vetor (artigo de controle). Isso serve como controle de veículo para este estudo. O artigo de controle é armazenado em temperatura ambiente após o recebimento até o dia da dosagem. Após a dosagem, as demais preparações vetorais e o artigo de controle são retidos e congelados novamente a  $<-60^{\circ}\text{C}$ .

[00296] O vetor AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG é distribuído de forma não invasiva em cada narina, usando o dispositivo LMA® Mad Nasal™ (Mad Nasal™) (Teleflex, Inc.) conforme POP 7410. O Mad

Nasal™ atomiza os medicamentos aprovados em uma névoa fina que pode ser administrada IN. Estudos semelhantes em outras espécies, como camundongos, foram realizados utilizando instilação líquida direta pela via aérea nasal. No entanto, a expressão gênica para as vias aéreas nasais de camundongos por entrega líquida não equivale à das espécies superiores nas quais o vetor é distribuído usando o dispositivo clínico, Mad Nasal™. Além disso, certas respostas toxicológicas e imunológicas no NHP representam de perto a de um ser humano.

Tabela 3: Comparação da Área de Superfície do Nariz e do Volume de Dosagem entre o Nariz de Macaco Rhesus e o de Humano

	Nariz	
	Humano (adulto)	Macaco rhesus (adulto) (3-6 anos)
Área de superfície (m <sup>2</sup> )	0,0181*	0,00616*
Volume de distribuição (µL)	800	272

\*Handbook of Toxicology, Terceira Edição, editado por Michael J. Derelanko, Carol S. Auletta.

[00297] A área de superfície do nariz humano (0,0181 m<sup>2</sup>) é aproximadamente 2,94 vezes maior que a área de superfície do nariz do macaco rhesus (0,00616 m<sup>2</sup>) (Tabela 3). Como tal, o volume proposto para ser distribuído no nariz do NHP é de 0,80 mL (o volume em que o vetor é distribuído ao nariz humano) ÷ 2,94 = 0,272 mL. A dose clínica mais alta para uso em humanos é proposta como 5x10<sup>13</sup> GC. Ao se extrapolar essa dose com base na área da superfície do nariz do macaco rhesus, a dose análoga para uso no macaco rhesus é 5x10<sup>13</sup> GC ÷ 2,94 = 1,7x10<sup>13</sup> GC. Para permitir maior precisão ao se distribuir pequenos volumes no nariz do macaco, o volume é aumentado para 0,28 mL para permitir maior precisão na entrega de duas alíquotas de 70 µL em vez de 68 µL por narina; ambas as narinas são tratadas.

C. Animais

[00298] Sete macacos rhesus machos e sete fêmeas (3-6 anos, 3-10 kg) são usados neste estudo e duas doses diferentes de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG são examinadas. Um grupo (grupo 1) de NHPs recebe  $1,7 \times 10^{13}$  GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG em um volume total de 0,28 mL (dado como quatro alíquotas de 70  $\mu$ L) que, quando extrapolado com base na área superficial do nariz humano (Tabela 3), representa a dose vetorial mais alta do ensaio clínico. O outro grupo (grupo 2) de NHPs recebe  $4,25 \times 10^{13}$  GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG, dado como um volume total de 0,56 mL (dado como oito alíquotas de 0,07 mL). Quando extrapolada com base na área da superfície do nariz de NHP, essa dose é 2,5 vezes maior que a dose vetorial mais alta do ensaio clínico.

[00299] O vetor é administrado IN usando Mad Nasal. O vetor é distribuído como alíquotas de 0,07 mL, dadas nas narinas esquerda e direita; são distribuídas duas alíquotas por narina para a dose de  $1,7 \times 10^{13}$  GC por 5 minutos e quatro alíquotas por narina são distribuídas para a dose de  $4,25 \times 10^{13}$  por 5 minutos. A via IN através das passagens nasais foi selecionada para uso, pois é a via mais eficiente para atingir o nariz, o sítio clínico do alvo da doença.

[00300] O NHP de cada sexo é atribuído aleatoriamente a uma das três coortes pelo programa online Research Randomizer ([www.randomizer.org/form.htm](http://www.randomizer.org/form.htm)). O sangue é coletado em pelo menos três momentos antes da dosagem do vetor e enviado a Antech GLP para contagem de células com diferenciais e químicas clínicas. Os títulos de NAB são determinados pelo menos duas vezes antes do início do estudo e os PBMCs são isolados para fornecer um nível basal de resposta imune celular ao capsídeo e ao transgene do vetor. Todas as avaliações da linha de base são realizadas dentro de um mês antes do início do estudo.

[00301] A sala de estudo é mantida sob condições de fluxo de ar

positivo em relação ao corredor. Os quartos são fornecidos de forma independente com um mínimo de 10 trocas de ar por hora, com 100% de ar fresco passados pelos filtros. As salas de manutenção de animais são mantidas em uma faixa de temperatura de 18 a 26°C (64 a 79°F) com uma faixa de umidade de 30 a 70%. As mudanças de temperatura, umidade e ar são monitoradas pelo Edstrom Watchdog System, de acordo com o POP 8026.

[00302] Os animais são alojados individualmente sob condições de ABSL-2 em gaiolas de aço inoxidável com uma área útil de 4,3 a 6,0 pés quadrados e uma altura de 30 a 32 polegadas, respectivamente. Todos os tamanhos de gaiola e condições de alojamento estão em conformidade com o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals e de acordo com POPs 7707 e 7710. A sala de alojamento e as gaiolas são mantidas trancadas o tempo todo e são acessíveis apenas ao pessoal autorizado. Os animais são alojados individualmente sob uma isenção aprovada pela IACUC para evitar a soroconversão (desenvolvimento de NABs específicos do capsídeo do vetor AAV) antes da administração do vetor. Os animais podem ser alojados em pares a partir de duas semanas após a administração do vetor, de acordo com POP 7709. As necessidades comportamentais, emocionais e sociais do animal são atendidas por meio de interação humana e conspecífica (estímulos auditivos e visuais), recompensa alimentar e manipulanda, de acordo com POP 7701. Manipulanda são higienizadas e alternadas a cada duas semanas. A entrada na instalação é controlada através do acesso a chaves e crachás. Um ciclo de luz controlado automaticamente de 12 horas de luz: 12 horas de escuridão são mantidas e controladas pelo sistema de automação predial com monitoramento pelo sistema Edstrom Watchdog. O período escuro começa às 1900 horas ( $\pm$  30 minutos). As gaiolas são limpas diariamente e trocadas e higienizadas a cada duas semanas, de acordo

com POPs 7710 e 7711. As gaiolas e prateleiras são higienizadas usando o equipamento de lavagem da gaiola uma vez a cada duas semanas e quantas vezes for necessário para evitar acúmulo excessivo de sujeira, detritos, resíduos, fezes ou risco de doença. Os animais são alimentados com Certified Primate Diet 5048 da PMI Feeds Inc., Brentwood, MO, *ad libitum*, de acordo com POP 7710. As análises são realizadas rotineiramente pelo fornecedor de alimentos. A água é fornecida *ad libitum* através de um sistema de irrigação automático. O suprimento de água é retirado da cidade da Filadélfia e é filtrado por osmose reversa. A água processada é analisada duas vezes por ano quanto a possível contaminação química (Lancaster Laboratories, Lancaster, PA) e trimestralmente quanto a contaminação bacteriana (QC Laboratories, Southampton, PA). Dispositivos de enriquecimento certificados são adicionados à gaiola de cada animal de estudo ao longo do decurso do estudo. As análises de contaminação são realizadas pelo fabricante e os dados de análise estão disponíveis. O enriquecimento de alimentos, como frutas, legumes, nozes e cereais, é fornecido diariamente. Manipulanda, como brinquedos kong, espelhos, comedouro quebra-cabeças e bolinhos de passas, são fornecidos diariamente. Os animais também recebem enriquecimento visual junto com interação humana diariamente. Os macacos são anestesiados, de acordo com POP 7408.

[00303] Os macacos são anestesiados, de acordo com POP 7408. O vetor é administrado no nariz em um volume que varia de 0,28 mL a 0,56 mL, como a seguir. O vetor AAV é entregue usando o Mad Nasal. O vetor é distribuído como alíquotas de 0,07 mL a cada narina. Para a dose de  $1,7 \times 10^{13}$  GC, duas alíquotas a cada narina são distribuídas ao longo de 5 minutos. Para o  $4,25 \times 10^{13}$  GC, quatro alíquotas a cada narina são distribuídas ao longo de 5 minutos. Após a administração do vetor, os animais são monitorados diariamente para observações gerais.

Todas as observações são registradas de acordo com POP 7404.

[00304] Os animais são monitorados por observação visual diária quanto à aparência geral, sinais de toxicidade, angústia e mudanças de comportamento. Todos os animais são examinados fisicamente cada vez que são anestesiados para coleta de sangue. No momento da necropsia, os animais são examinados quanto a anormalidades graves.

#### D. Cronograma de Estudo

##### Cronograma de Estudo da Tabela 4

Tampa vermelha (RC): Sem anticoagulante; Tampa Lavanda (LT): EDTA de potássio; Tampa Verde (GT): heparina; Tampa Azul (BT): Citrato de Sódio.

Cronograma do Estudo sobre Biodistribuição e Toxicidade/Farmacologia do NHP				
Ponto no Tempo do Estudo	Amostra/Procedimento	Grupo 1 A, B, C, D, E, F*	Grupo 2 G, H, I, J, K, L*	Grupo 3 M, N*
-X Dias	Peso Corporal, Temperatura, Frequência Respiratória, Frequência Cardíaca	6	6	2
	Caminho clínico (linha de base) (LT, RC)	6	6	2
	Painel de coagulação (linha de base) (BT)	6	6	2
	Desprendimento de vetor (amostragem de urina e fezes)	6	6	2
	Anticorpos (linha de base) (RC)	6	6	2
-Y Dias (dentro de um mês de início do estudo)	Peso Corporal, Temperatura, Frequência Respiratória, Frequência Cardíaca	6	6	2
	Imunologia (linha de base) (PBMC) (GT)	6	6	2
	Caminho clínico (linha de base) (LT, RC)	6	6	2
	Painel de coagulação (linha de base) (BT)	6	6	2
	Isolamento PBMC/ELISPOT	6	6	2

Cronograma do Estudo sobre Biodistribuição e Toxicidade/Farmacologia do NHP				
Ponto no Tempo do Estudo	Amostra/Procedimento	Grupo 1 A, B, C, D, E, F*	Grupo 2 G, H, I, J, K, L*	Grupo 3 M, N*
	Desprendimento de vetor (amostragem de urina e fezes)	6	6	2
	Anticorpos (linha de base) (RC)	6	6	2
	Líquido de lavagem nasal e soro para expressão proteica de JAb210a	6	6	2
Dia 0	Peso Corporal, Temperatura, Frequência Respiratória, Frequência Cardíaca	6	6	2
	Caminho clínico (linha de base) (LT, RC)	6	6	2
	Painel de coagulação (linha de base) (BT)	6	6	2
	Isolamento PBMC/ELISPOT	6	6	2
	Desprendimento de vetor (amostragem de urina e fezes)	6	6	2
	Anticorpos (linha de base) (RC)	6	6	2
	Líquido de lavagem nasal e soro para expressão proteica de JAb210a	6	6	2
	AAVhu68.CB7.Cl.JAb210a.rBG, 1,7x10 <sup>13</sup> GC em 0,28 mL, IN	6	-	-
	AAVhu68.CB7.Cl.JAb210a.rBG, GC de 4,25x10 <sup>13</sup> em 0,56 mL, IN	-	6	-
	Controle do veículo, 0,28 mL, IN	-	-	2
Dia 7	Peso Corporal, Temperatura, Frequência Respiratória, Frequência Cardíaca	6	6	2
	Caminho clínico (LT, RC)	6	6	2
	Painel de coagulação (BT)	6	6	2
	Desprendimento de vetor (amostragem de urina e fezes)	6	6	2
	Anticorpos (RC)	6	6	2
	Líquido de lavagem nasal e soro para	6	6	2



Cronograma do Estudo sobre Biodistribuição e Toxicidade/Farmacologia do NHP				
Ponto no Tempo do Estudo	Amostra/Procedimento	Grupo 1 A, B, C, D, E, F*	Grupo 2 G, H, I, J, K, L*	Grupo 3 M, N*
	expressão proteica de JAb210a			
Dia 14	Peso Corporal, Temperatura, Frequência Respiratória, Frequência Cardíaca	6	6	2
	Imunologia (PBMC) (GT)	6	6	2
	Caminho clínico (LT, RC)	6	6	2
	Painel de coagulação (BT)	6	6	2
	Desprendimento de vetor (amostragem de urina e fezes)	6	6	2
	Anticorpos (RC)	6	6	2
	Líquido de lavagem nasal e soro para expressão proteica de JAb210a	6	6	2
Dia 21	Peso Corporal, Temperatura, Frequência Respiratória, Frequência Cardíaca	6	6	2
	Caminho clínico (LT, RC)	6	6	2
	Painel de coagulação (BT)	6	6	2
	Isolamento PBMC/ELISPOT	6	6	2
	Anticorpos (RC)	6	6	2
	Líquido de lavagem nasal e soro para expressão proteica de JAb210a	6	6	2
Dia 28 ± 3	Peso Corporal, Temperatura, Frequência Respiratória, Frequência Cardíaca	6	6	2
	Imunologia (PBMC) (GT)	6	6	2
	Caminho clínico (LT, RC)	6	6	2
	Painel de coagulação (BT)	6	6	2
	Isolamento PBMC/ELISPOT	6	6	2

Cronograma do Estudo sobre Biodistribuição e Toxicidade/Farmacologia do NHP				
Ponto no Tempo do Estudo	Amostra/Procedimento	Grupo 1 A, B, C, D, E, F*	Grupo 2 G, H, I, J, K, L*	Grupo 3 M, N*
	Isolamento linfocitário (pulmão, baço) / ELISPOT	3	3	2
	Anticorpos (RC)	6	6	2
	Líquido de lavagem nasal e soro para expressão proteica de JAb210a	6	6	2
	Desprendimento de vetor (amostragem de urina e fezes)	6	6	2
	Necropsia	3	3	2
	Tecidos a serem coletados como descrito neste documento	3	3	2
Dia 35	Peso Corporal, Temperatura, Frequência Respiratória, Frequência Cardíaca	3	3	0
	Caminho clínico (LT, RC)	3	3	0
	Painel de coagulação (BT)	3	3	0
	Isolamento PBMC/ELISPOT	3	3	0
	Anticorpos (RC)	3	3	0
	Líquido de lavagem nasal e soro para expressão proteica de JAb210a	3	3	0
Dia 42	Peso Corporal, Temperatura, Frequência Respiratória, Frequência Cardíaca	3	3	0
	Imunologia (PBMC) (GT)	3	3	0
	Caminho clínico (LT, RC)	3	3	0
	Painel de coagulação (BT)	3	3	0
	Desprendimento de vetor (amostragem de urina e fezes)	3	3	0
	Anticorpos (RC)	3	3	0
	Líquido de lavagem nasal e soro para expressão proteica de JAb210a	3	3	0

Cronograma do Estudo sobre Biodistribuição e Toxicidade/Farmacologia do NHP				
Ponto no Tempo do Estudo	Amostra/Procedimento	Grupo 1 A, B, C, D, E, F*	Grupo 2 G, H, I, J, K, L*	Grupo 3 M, N*
Dia 49	Peso Corporal, Temperatura, Frequência Respiratória, Frequência Cardíaca	3	3	0
	Caminho clínico (LT, RC)	3	3	0
	Painel de coagulação (BT)	3	3	0
	Isolamento PBMC/ELISPOT	3	3	0
	Anticorpos (RC)	3	3	0
	Líquido de lavagem nasal e soro para expressão proteica de JAb210a	3	3	0
Dia 90 ± 3	Peso Corporal, Temperatura, Frequência Respiratória, Frequência Cardíaca	3	3	0
	Imunologia (PBMC) (GT)	3	3	0
	Caminho clínico (LT, RC)	3	3	0
	Painel de coagulação (BT)	3	3	0
	Isolamento PBMC/ELISPOT	3	3	0
	Isolamento linfocitário (pulmão, baço) / ELISPOT	3	3	0
	Anticorpos (RC)	3	3	0
	Líquido de lavagem nasal e soro para expressão proteica de JAb210a	3	3	0
	Desprendimento de vetor (amostragem de urina e fezes)	3	3	0
	Necropsia	3	3	0
	Tecidos a serem coletados como descrito neste documento	3	3	0

\*Os macacos são representados aqui por letras sequenciais.

[00305] O vetor é administrado IN usando Mad Nasal™. O vetor é distribuído como alíquotas de 70 µL, dadas nas narinas esquerda e direita; são distribuídas duas alíquotas por narina para a dose de  $1,7 \times 10^{13}$  GC por 5 minutos e quatro alíquotas por narina são distribuídas

para a dose de  $4,25 \times 10^{13}$  GC por 5 minutos. Foram escolhidas doses de  $1,7 \times 10^{13}$  GC e  $4,25 \times 10^{13}$  GC para este estudo. A dose mais alta administrada nos sujeitos do ensaio clínico é de  $5 \times 10^{13}$  GC em 0,80 mL de PBS, administrada em alíquotas de 0,20 mL usando o MAD Nasal™. As doses selecionadas para o Grupo 1 ( $1,7 \times 10^{13}$  GC) e o Grupo 2 ( $4,25 \times 10^{13}$  GC) refletem a dose mais alta planejada para o ensaio clínico,  $5 \times 10^{13}$  GC e uma dose 2,5 vezes maior que a dose mais alta planejada para o ensaio clínico, respectivamente.

[00306] Cada grupo de tratamento vetorial inclui seis animais, uma mistura de macacos rhesus masculinos e femininos. O grupo controle inclui dois animais e é sacrificado no dia 28. Foram realizados estudos nas vias aéreas nasais de macacos rhesus projetados para avaliar o perfil de expressão do AAV9, um sorotipo que se assemelha muito ao AAVhu68. Utilizando vários transgenes, incluindo o rhesus AFP (rhAFP), a linha do tempo da cinética de expressão no líquido de lavagem nasal dos NHPs foi estabelecida quando o AAV é aplicado diretamente no nariz. A expressão do transgene foi detectada no dia 14 após a entrega do vetor e atingiu seu pico entre os dias 14 - 28. A expressão do transgene estabilizou e começou a diminuir entre os dias 56 e 84. Os pontos no tempo selecionados para o presente estudo descrito neste documento foram escolhidos para capturar o pico da expressão do gene (dia 28) e também além do pico da expressão do vetor (dia 90). Esses pontos no tempo permitem a coleta de informações importantes sobre segurança e toxicidade do vetor nos primeiros tempos (dia 28) e a longo prazo à medida que a expressão gênica diminui (dia 90).

[00307] No dia 0 do estudo, os macacos são dosados no nariz usando o MAD Nasal™ com  $1,7 \times 10^{13}$  GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG em um volume total de 0,28 mL (quatro alíquotas de 70 µL) ou  $4,25 \times 10^{13}$  GC de AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG

em um volume total de 0,56 mL (oito alíquotas de 70 µL).

[00308] Verificações diárias de viabilidade são realizadas em todos os animais, de acordo com POPs. O peso corporal, a temperatura, a frequência respiratória e a frequência cardíaca são monitorados e registrados em todos os momentos, de acordo com POPs. Os NHPs são anestesiados e o sangue é coletado, de acordo com os POPs 7408 e 7411. O sangue coletado é usado para hemograma, exame clínico e painel de coagulação. A patologia clínica, a química clínica e o painel de coagulação são realizados pelo Antech GLP. Mudanças nas químicas do sangue e perfis sanguíneos dos animais são analisadas. Químicas, hemograma completo (CBC) com diferenciais e contagem de plaquetas são avaliadas em amostras dos animais nos momentos indicados. Os animais são anestesiados conforme POP 7408. Um cateter de Foley pediátrico pode ser colocado em uma das narinas e, uma vez colocado, o balão é inflado com ar e o cateter é puxado para trás até que a resistência seja alcançada. A cabeça/corpo do macaco é inclinada para o lado respectivo e até 5 mL de PBS (por narina) são usados para lavar a cavidade nasal; o líquido é coletado como gotas em um tubo Falcon posicionado logo abaixo da respectiva narina. No final do processo, o cateter é removido e descartado e o procedimento repetido para a narina adjacente. O soro é separado e dividido em alíquotas em tubos de microcentrifuga rotulados. As respostas imunes humorais são examinadas no soro a partir dos pontos de tempo indicados, usando o ensaio NAB, de acordo com os POPs. Os PBMCs são isolados e criopreservados, de acordo com o POP 6003. As respostas das células T a AAVhu68 e JAb210a são analisadas por IFN- $\gamma$  ELISPOT, de acordo com POP 6002, onde os critérios de resposta positiva são unidades formadoras de spots (SFU)/ $10^6$  células  $> 55$  e  $\times 3$  o valor de controle negativo médio (sem estimulação). O ensaio de NAB sérico é realizado de acordo com POP, IFN- $\gamma$  ELISPOT de acordo com

POP 6002 e desprendimento de vetores AAV por TaqMan qPCR de acordo com POP. As amostras de urina e fezes são coletadas nos momentos indicados, congeladas em gelo seco e armazenadas a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ , de acordo com POP 7428. O DNA é extraído e as reações de qPCR do TaqMan foram realizadas, no espírito de POP 3001, mas modificações no protocolo podem ser necessárias com base na amostra.

[00309] Nos pontos no tempo de necropsia agendados no cronograma (dia 28 e dia 90 após a administração do vetor), os NHPs são sacrificados de acordo com os POPs 7422 e 7600. A morte é confirmada pela ausência de batimentos cardíacos e respiração, de acordo com o POP 7422. Os animais são necropsiados e os tecidos são coletados para patologia completa, de acordo com o POP 7600. Os tecidos também são coletados para biodistribuição e armazenados a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ .

[00310] Os tecidos coletados para biodistribuição e histologia incluem o Sistema Cardiovascular: Coração, Aorta (torácica e abdominal); Sistema Digestivo: Fígado (lobos caudado, esquerdo, médio e direito), Vesícula Biliar, Esôfago, Estômago, Duodeno, Jejuno, Íleo, Ceco, Cólon e Pâncreas; Sistema Endócrino: Glândula pituitária, Lobos tireoide e esquerdo, com paratireoide, Glândulas suprarrenais (esquerda e direita); Sistema Hematopoiético: Baço, Timo, Linfonodo (inguinal, esquerdo e direito), Linfonodo (mesentérico), Linfonodo (axilar, esquerdo e direito), Medula óssea (costela), Manchas de Peyer (coletadas com secções do intestino); Sistema Musculoesquelético: Músculo esquelético (quadríceps); Sistema respiratório: seios paranasais, placa cribiforme, Septo nasal, Faringe, laringe, traqueia, pulmões (4 lobos); Sistema Nervoso: Cérebro (incluindo lóbulos do cérebro [frontal e occipital]), Mesencéfalo, Nervo óptico (esquerdo e direito), Quiasma óptico, Cerebelo, Medula/Ponte, olhos (esquerdo e

direito, coletados no fixador de Davison modificado); Medula espinhal (cervical, médio torácica, lombar), Nervo ciático (esquerdo e direito); Sistema Reprodutivo (Masculino): Testes (esquerdo e direito, coletados no fixador de Davison modificado), Epidídimo (esquerdo e direito), Próstata; Sistema Reprodutivo (Feminino): Ovários (esquerdo e direito), Útero, Glândula mamária (esquerda e direita); Sistema Urinário: Rins (esquerdo e direito), Bexiga Urinária; e Diversos: Tatuagem no peito, Pele, Observações macroscópicas (feitas na necropsia para as quais a histopatologia não é apropriada (por exemplo, fluido, ar da matéria, falta de peças anatômicas) não são coletadas).

[00311] Todos os tecidos são fixados em NBF a 10% ou fixador de Davidson modificado e processados de acordo com os POPs 4003, 4004, 4006 e 4007. Quaisquer lesões macroscópicas observadas durante a necropsia são coletadas e preservadas em 10% de NBF. O processamento do tecido, avaliações histopatológicas, resposta das células T e preparação de RNA são realizadas seguindo os respectivos POPs. As lâminas de histopatologia são avaliadas.

[00312] No momento da necropsia, pulmão, fígado, baço e medula óssea são coletados e os linfócitos isolados de cada tecido, de acordo com os POPs 6004, 6005 e 6006, respectivamente. As respostas das células T a AAVhu68 e JAb210a são analisadas por IFN- $\gamma$  ELISPOT, de acordo com POP 6002, onde os critérios de resposta positiva foram unidades formadoras de spots (SFU)/ $10^6$  células  $> 55$  e  $\times 3$  o valor de controle negativo médio (sem estimulação). No momento da necropsia, os tecidos são coletados para biodistribuição, congelados em gelo seco e armazenados a  $\leq -60^\circ\text{C}$ . Se solicitado, o DNA é extraído dos tecidos e as reações de qPCR TaqMan foram realizadas, de acordo com o POP 3001. Além disso, no momento da necropsia, os tecidos são coletados para expressão do RNA, congelados em gelo seco e armazenados a  $\leq -60^\circ\text{C}$ . O RNA total tratado com DNase é isolado de 1 00 mg de nariz,

traqueia e várias áreas dos vários lobos dos pulmões. O RNA é quantificado por espectrofotometria e alíquotas transcritas reversamente para cDNA usando iniciadores aleatórios. O cDNA contendo a mensagem derivada do vetor é quantificado por qPCR detectando a sequência específica do vetor, a região abrangendo o transgene e o sinal de poli A.

[00313] As análises estatísticas são realizadas nos valores da química do sangue. Intervalos de valores normais para macacos rhesus do tipo selvagem são gerados considerando a média de todos os valores coletados para a dosagem do pré-vetor dos animais do estudo (no mínimo duas linhas de base) e calculando o desvio padrão (DP). O intervalo é apresentado como a média  $\pm$  DP. Valores fora de dois DPs da média são considerados valores extremos.

[00314] Os seguintes parâmetros químicos clínicos são determinados: Albumina, Fosfatase Alcalina (ALP), Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Amilase, Bilirrubina Direta, Bilirrubina (Total), Cálcio, Cloreto, Colesterol, Creatina Fosfoquinase (CPK), Creatinina, Gama-Glutamil Transferase (GGT), Glicose, Lactato Desidrogenase (LD), Lipase, Magnésio, Fósforo, Potássio, Sódio, Triglicerídeos, Proteína Total e Nitrogênio da Ureia.

[00315] O sangue para hemograma completo e a contagem de plaquetas são coletados e armazenados a 2-8°C até o envio noturno para o Antech GLP. Os seguintes parâmetros hematológicos são determinados: hemograma completo, volume médio de plaquetas (estáveis em 8 horas), hemograma, largura de distribuição de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), contagem de plaquetas, contagem de leucócitos, diferencial de leucócitos e morfologia de hemácias.

Exemplo 19 - Desenvolvimento Clínico - Segurança e Tolerabilidade do



## Vetor AAV para Distribuição de Anticorpo Antigripe

### A. Visão Geral

[00316] O ensaio clínico de fase 1 está sob investigação para determinar a dose apropriada de transgenes expressos em AAV2/hu68 para avaliações subsequentes de eficácia da fase 2. O desenvolvimento clínico é iniciado com um estudo de fase 1 de escalonamento de dose, avaliando uma única administração de um vetor AAV2/hu68, fornecendo o JAB210a MDAb, com expansão para avaliações de segurança na dose ideal. Se o vetor tiver perfil de segurança e PK aceitável no estudo inicial da fase 1, o desenvolvimento subsequente da fase 2 poderá incluir a avaliação do vetor quanto à segurança, PK e eficácia preliminar em um modelo controlado de desafio de influenza. A população idosa (65 anos ou mais) é a população alvo deste plano de desenvolvimento de produtos clínicos. O vetor é considerado como tendo dois possíveis papéis: uma contramedida contra uma pandemia e uma alternativa à vacina sazonal tradicional. Seu uso como contramedida pandêmica pode estar no contexto de um estoque ou de uma campanha de fabricação durante o surgimento de uma pandemia de influenza. Os ensaios de fase 1 começam nos Estados Unidos, com possível expansão para os ensaios de eficácia da fase 2 (estudo de desafio) em um CRO qualificado. Se a segurança e a eficácia preliminar forem demonstradas em voluntários saudáveis, os ensaios subsequentes em grupos populacionais expandidos serão considerados para maior desenvolvimento.

[00317] Desde que o estudo de fase 1 demonstre segurança aceitável (incluindo dados completos de segurança de 6 meses e dados pré-clínicos exigidos), farmacocinética (PK) e imunológica inicial (por exemplo, atividade de neutralização da influenza, nível e duração da expressão do transgene, respostas imunes ao capsídeo e transgenes), é realizado um estudo de fase 2. As doses são escolhidas no estudo de

fase 1 e testadas em um modelo controlado de desafio com influenza. O objetivo do estudo de fase 2 seria avaliar a eficácia preliminar e estabelecer uma dose eficaz do vetor.

[00318] O vetor é fabricado como descrito no Exemplo 16. O vetor é formulado como uma solução contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS) com concentração total de sal de 200 mM, 0,001% (p/v) de Pluronic F68 e 5% de glicerol (Tampão de Formulação Final, FFB). AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG é administrado por via intranasal após diluição em FFB em quatro níveis de dose. Os níveis de dose inicial foram escolhidos com base em dados de eficácia pré-clínica e são refinados com base em avaliações de segurança não clínicas, com a dose mais alta limitada pela concentração que pode ser alcançada sem a agregação de partículas do vetor AAV. As doses variam de  $6,25 \times 10^{12}$  cópias do genoma (GC) a  $5 \times 10^{13}$  GC administradas como duas alíquotas de 0,2 ml por narina através do dispositivo de atomização mucosa intranasal LMA (IMAD) comercialmente aprovado (IMAD) pela Teleflex Medical (MAD300) (MAD Nasal™) para um volume total distribuída em cada sujeito de 0,8 ml. O objetivo seria atingir uma concentração de 5-20 ng/ml de JAb210a MDAb, medida em uma solução de lavagem nasal duas semanas após a administração do vetor. Uma dose única do vetor em uma das quatro coortes de dose ( $6,25 \times 10^{12}$  GC,  $1,25 \times 10^{13}$  GC,  $2,5 \times 10^{13}$  GC ou  $5 \times 10^{13}$  GC) é administrada no Dia 0. Os sujeitos em cada regime de dosagem são monitorados quanto aos parâmetros de segurança e imunogenicidade até o Dia do Estudo 180 ( $\pm 2$ ).

## B. Objetivos

[00319] Os objetivos principais são a segurança e a tolerabilidade do vetor em sujeitos idosos. A ocorrência de eventos adversos com base em hemograma completo, produtos químicos, exame de urina, respostas imunes locais confinadas ao nariz e achados clínicos. Os

eventos adversos são classificados de acordo com uma versão modificada da Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventative Vaccine Clinical Trials ("Escala de Gradação de Toxicidade Para Voluntários Adolescentes e Adultos Saudáveis Participantes de Ensaios Clínicos de Vacinas Preventivas"), publicada pela FDA em setembro de 2007.

[00320] Os objetivos secundários são avaliar o nível e a duração da atividade de neutralização da influenza na lavagem nasal e no soro, por exemplo, ensaios baseados em ELISA anti-idiotipo e ELISA anti-HA; avaliar o nível e a duração da expressão de JAb210a MDAb na lavagem nasal e no soro; avaliar o nível de anticorpos neutralizantes ao transgene e ao capsídeo; avaliar o nível de respostas celulares ao transgene, JAb210a MDAb e capsídeo, conforme medido pelo ensaio IFN $\gamma$  ELISPOT e desprendimento de vetores em amostras nasais, faríngeas, urinárias, retais e de sangue.

#### C. Desenho do Estudo

[00321] Para avaliar a segurança e a tolerabilidade preliminares, para entender a farmacocinética do vetor em voluntários saudáveis e para selecionar um nível de dose para desenvolvimento adicional, é realizado um ensaio aberto de escalonamento de dose com os níveis de dose com base em dados pré-clínicos. O estudo registra até cinco coortes, com quatro sujeitos por coorte. Os sujeitos são triados 4-12 semanas antes do tratamento e são acompanhados por até 6 meses.

[00322] Voluntários saudáveis são tratados IN com o vetor. Os objetivos do estudo são avaliar a segurança e a tolerabilidade, entender a farmacocinética do vetor e selecionar a dose ideal para o desenvolvimento futuro.

[00323] Ensaio aberto usando dose única de vetor ascendente com uma avaliação formal de segurança de cada grupo de doses antes da escalada da dose. Quatro coortes com quatro sujeitos por coorte e

expansão adaptativa para oito para a dose ideal definida como aquela que resulta na produção de 5-20 ng/ml de MDAb no líquido de lavagem nasal.

a. Administração

[00324] Cada voluntário recebe uma dose de 0,8 ml do vetor IN por meio de duas aplicações sequenciais de 0,2 ml por narina em cada narina, usando o MAD Nasal™ aprovado. Até vinte e quatro voluntários estão inscritos em cinco coortes. As coortes 1-4 recebem níveis crescentes de dosagem do vetor com a coorte final (coorte 5) expandida para 8 voluntários no nível ideal de dose (definido pelos parâmetros de segurança e farmacocinéticos nas coortes 1-4).

[00325] O vetor é administrado usando o MAD Nasal™ no dia 0.

[00326] Coorte 1: Dose de  $6,25 \times 10^{12}$  GC;

[00327] Coorte 2: Dose de  $1,25 \times 10^{13}$  GC;

[00328] Coorte 3: Dose de  $2,50 \times 10^{13}$  GC;

[00329] Coorte 4: Dose de  $5,00 \times 10^{13}$  GC;

[00330] Coorte 5: coorte de expansão no nível ideal de dose.

[00331] Uma semana de observação é necessária entre a dosagem de sujeitos dentro de coortes. Um total de quatro semanas entre as coortes é usado para avaliar os dados de segurança antes de passar para a próxima dose.

[00332] Os sujeitos são admitidos em uma unidade de pesquisa na noite anterior à administração do vetor. De manhã, é obtido sangue em jejum e, em seguida, os sujeitos são administrados IN. Os sinais vitais são monitorados com frequência nas primeiras 24 horas. Swabs de sangue, lavagem nasal, urina e retais são coletados para testes de segurança nos dias 1, 3, 7, 14 e 28 e nos meses 2, 4 e 6, que representam o final do estudo. As amostras são usadas para laboratórios de segurança, detecção de desprendimento de vetores, avaliação da expressão do transgene e imunogenicidade do transgene

e do capsídeo do vetor.

[00333] A duração do estudo é de 6 meses (180 dias) após a administração do vetor.

[00334] As regras de parada são baseadas na ocorrência de toxicidade limitante da dose. A toxicidade limitante da dose é definida como a ocorrência de qualquer um dos eventos adversos de Grau 4 ou de dois eventos adversos relacionados ao tratamento de Grau 3 em uma coorte. Todos os eventos adversos são cuidadosamente revisados antes de qualquer decisão sobre aumento de dose, expansão de coorte ou interrupção.

Tabela 5

Coorte	N ativo	Nível de dosagem de AAVhu68.CB7.Cl.JAb210a.rBG (GC)	Volume total a ser administrado (ml)	Via de Administração
1	4	$6,25 \times 10^{12}$	0,2 ml em cada narina; dois conjuntos de aplicações, dose total de 0,8 ml por sujeito	IN
2	4	$1,25 \times 10^{13}$		IN
3	4	$2,50 \times 10^{13}$		IN
4	4	$5,00 \times 10^{13}$		IN
5	8	Dose ideal	0,2 ml em cada narina; dois conjuntos de aplicações, dose total de 0,8 ml por sujeito	IN
Total	24			

b. População Alvo, Critérios de Inclusão/Exclusão

[00335] O diagnóstico e os principais critérios de inclusão são indivíduos saudáveis do sexo masculino ou feminino, com idade igual ou superior a 65 anos, com índice de massa corporal  $\geq 19$  a  $\leq 30$  kg/m<sup>2</sup> e peso  $\geq 50$  a  $\leq 100$  kg. As mulheres com potencial para engravidar são elegíveis para inscrição se tiverem um teste de gravidez sérico negativo antes da entrada no estudo e estiverem usando um método

contraceptivo eficaz (hormonal, DIU).

[00336] Os critérios de inclusão são: sujeitos do sexo masculino ou feminino com 65 anos ou mais; Capazes de dar consentimento bem informado por escrito para participar; Saudáveis, conforme determinado pelo histórico médico, exame físico, sinais vitais e exames laboratoriais de segurança clínica na linha de base; Fumantes não habituais (fumantes habituais são pessoas que fumam mais de 4 cigarros ou outros produtos de tabaco semanalmente) e concordam em não usar produtos de tabaco durante a participação; e as mulheres devem cumprir um dos seguintes critérios: pelo menos um ano após a menopausa ou ser estéril cirurgicamente.

[00337] Os critérios de exclusão são: Histórico significativo de febre do feno sazonal ou rinite alérgica sazonal ou rinite alérgica perene ou condição crônica ou nasal ou sinusal; Histórico de asma que requer tratamento por até 1 ano antes da administração do vetor; Sujeitos com estrutura nasal anormal, incluindo desvio septal e pólipos nasais, sinusite crônica, asma ou DPOC; Uso atual de esteroides intranasais; Presença de doença médica ou psiquiátrica não controlada significativa (aguda ou crônica) avaliada pelo Investigador (Isso inclui, mas não se limita, a instituição de novo tratamento médico ou cirúrgico ou alteração significativa da dose para sintomas não controlados ou toxicidade do medicamento dentro de 3 meses de triagem e reconfirmado no dia 0 antes do desafio); Sorologia positiva para anticorpos anti-HIV-1 ou HIV-2 ou HBsAg ou HCV; Câncer, ou tratamento para câncer, dentro de 3 anos, excluindo carcinoma basocelular ou carcinoma espinocelular, que é permitido; Presença de imunossupressão ou qualquer condição médica que possa estar associada ao comprometimento da resposta imune, incluindo, entre outros, diabetes mellitus; Atualmente, recebendo (ou histórico de recebimento), durante o período de três meses anterior, quaisquer medicamentos ou outros tratamentos que possam afetar

adversamente o sistema imunológico, como injeções de alergias, globulina imune, interferon, imunomoduladores, drogas citotóxicas ou outras drogas conhecidas por serem frequentemente associadas à toxicidade significativa de órgão maior ou corticosteroides sistêmicos (orais ou injetáveis) (corticosteroides tópicos serão permitidos); Histórico de abuso de drogas ou produtos químicos no ano anterior ao estudo; Recebimento de qualquer produto sob investigação ou medicamento não registrado nos 30 dias anteriores à administração do vetor ou atualmente inscrito em qualquer estudo sobre drogas sob investigação ou que pretenda se inscrever em um estudo dentro do período de estudo subsequente; Recebimento de sangue ou produtos sanguíneos seis meses antes da administração do vetor ou administração planejada durante o período do estudo; Doença aguda dentro de 72 horas antes da administração do vetor, definida como a presença de uma doença moderada ou grave com ou sem febre (conforme determinado pelo Investigador através de histórico médico e exame físico) ou presença de febre  $> 38^{\circ}\text{C}$  por via oral; Fêmeas grávidas e/ou lactantes; Anticorpos neutralizantes circulantes no soro para o AAV2/hu68 de  $> 1:80$ ; e Qualquer condição que, na opinião do Investigador, possa interferir nos objetivos e nas avaliações principais do estudo.

c. Determinação do Nível de Dose

[00338] Os níveis de dose inicial foram escolhidos com base em dados de eficácia pré-clínica e são refinados com base em avaliações de segurança não-clínicas, com a dose mais alta limitada pelas propriedades de agregação do AAV. As doses variam de  $6,25 \times 10^{12}$  a  $5 \times 10^{13}$  GC/dose administrada em  $2 \times 0,2$  ml por narina através do MAD Nasal™. O objetivo seria ter uma meta de 5 a 20 ng/ml de JAb210a MDAb em lavagem nasal duas semanas após a administração do vetor. Essas doses são substancialmente mais baixas do que aquelas

administradas a macacos, camundongos e furões quando ajustadas para a massa corporal total. Não foi observada toxicidade substancial em estudos não clínicos realizados nessas espécies em qualquer dose com o vetor ou versões do vetor AAV similares em estrutura ao vetor para o ensaio clínico.

d. Administração e Duração da Dosagem

[00339] Cada grupo de doses recebe o vetor em 0,4 ml por cada narina através do MAD Nasal™. Os indivíduos são dosados um por um. Os intervalos de tratamento dentro do mesmo grupo de doses seriam determinados pelos estudos não clínicos (por exemplo, 1 semana). Depois que todos os indivíduos de uma coorte passam no dia 14 do estudo, os dados preliminares de segurança são revisados. Se nenhum problema de segurança for identificado, a escalação da dose para a próxima dose começará. Após a conclusão da coorte 4 e a segurança preliminar para a dose mais alta ser demonstrada, uma quinta e última coorte é inscrita para expansão para um total de oito sujeitos (ou seja, quatro sujeitos adicionais) na dose ideal que é a Dose Maximamente Tolerada ou a mais alta dose que pode ser administrada. O número máximo de sujeitos é 24.

e. Duração da Investigação Clínica Proposta

[00340] O consentimento informado/HIPAA, avaliação demográfica/histórico médico e triagem de inclusão/exclusão são realizados durante a visita 0 (triagem) nas semanas -12 a -4.

[00341] Histórico de medicamentos e Laboratoriais de Segurança (incluindo: painel metabólico abrangente [sódio, potássio, cloreto, dióxido de carbono, glicose, nitrogênio da ureia no sangue, lactato desidrogenase, creatinina, creatinina fosfoquinase, cálcio, proteína total, albumina, AST, ALT, fosfatase alcalina e CBC [contagem de glóbulos brancos, hemoglobina, hematócrito, contagem de plaquetas, largura de distribuição de eritrócitos, volume corpuscular médio,



hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média]; Urinanálise [cor urinária, turbidez, pH, glicose, bilirrubina, cetonas, sangue, proteína, leucócitos]; Coagulação [PT, INR, PTT]; sorologia (HIVAb, HBsAg, HepCAb, RPR)) são verificados nas visitas, incluindo a visita 0 (Triagem) nas semanas -12 a -4, visita 1 (Triagem) nas semanas -4 a -1, visita 2 no dia 0, visita 3 no dia 7, visita 4 no dia 14, visita 5 no dia 28, visita 6 no mês 2, visita 7 no mês 4 e visita 8 no mês 6.

[00342] Teste de gravidez na urina (apenas mulheres com potencial para engravidar), aconselhamento para evitar a gravidez, eletrocardiograma (alterações no QT e QTC a cada visita são analisadas com base nas orientações mais recentes da FDA) e teste de função pulmonar (espirometria (incluindo capacidade vital, capacidade vital forçada, volume expiratório forçado (VEF) em intervalos cronometrados de 0,5, 1, 2 e 3 segundos, fluxo expiratório forçado 25-75% (FEF 25-27) e ventilação voluntária máxima (MVV)), exame físico (peso, altura (apenas ser medido na visita 1), IMC), radiografia de tórax (a radiografia de tórax não precisa ser repetida se for realizada dentro de três meses após a triagem e for considerada normal e o indivíduo não apresentar sinais ou sintomas pulmonares contínuos), Vitais (sinais vitais durante o dia da infusão: antes da infusão, aos 15 ( $\pm 5$ ), 30 ( $\pm 5$ ) minutos e aos 1 ( $\pm 10$  min), 3 ( $\pm 10$  min) e 6 horas ( $\pm 10$  min) pós-dosagem. Inclui pressão arterial, frequência cardíaca, temperatura, respirações, Sangue de pesquisa (respostas das células T ao capsídeo e transgene), lavagem nasal de pesquisa (níveis de Ab por um teste de neutralização baseado em células), soro de pesquisa (NAB para capsídeo e transgene, níveis de Ab), fluxo expiratório nasal de pico (realizado usando um medidor de fluxo inspiratório portátil.) Após a expiração, o medidor com uma pequena máscara presa é mantido horizontalmente para formar uma vedação hermética ao redor do nariz.

O sujeito é instruído a inalar bruscamente e com força (por cerca de 1 segundo). A taxa de fluxo é anotada pela posição do cursor na escala calibrada após a conclusão de cada teste, e o SNOT-22 Questionnaire (um questionário de 22 pontos que faz aos pacientes uma série de perguntas sobre saúde e qualidade de vida onde classificam seus sintomas de 0 (sem sintomas) a 5 (o pior possível). A pontuação é a adição de todos os números selecionados (máximo de 110). Os pacientes também podem marcar até 5 problemas/preocupações que são mais importantes para eles; são avaliados na visita 1 (triagem) nas semanas -4 a -1, visita 2 no dia 0, visita 3 no dia 7, visita 4 no dia 14, visita 5 no dia 28, visita 6 no mês 2, visita 7 no mês 4 e visita 8 no mês 6.

[00343] A Administração e Admissão de Vetores para estadia de 24 horas são realizadas na visita 2 no dia 0.

[00344] Eventos adversos são monitorados na visita 2 no dia 0, visita 3 no dia 7, visita 4 no dia 14, visita 5 no dia 28, visita 6 no mês 2, visita 7 no mês 4 e visita 8 no mês 6.

[00345] A avaliação da reatogenicidade local e sistêmica é realizada na visita 2 no dia 0, visita 3 no dia 7, visita 4 no dia 14 e visita 5 no dia 28.

f. Observações e Metodologia de Medição

[00346] Os objetivos principais são a segurança e a tolerabilidade da dose única escalonada da solução vetorial, conforme definido pela ocorrência dos eventos adversos e pelas alterações nos parâmetros laboratoriais e nos sinais vitais, da linha de base e até seis meses após o tratamento. A avaliação de segurança também inclui a avaliação da reatogenicidade na mucosa nasal e nos pulmões pelo período agudo de 14 dias após a administração da solução vetorial.

[00347] Os objetivos secundários são a avaliação da farmacocinética, incluindo a concentração de transgene na lavagem

nasal, na concentração sérica, na concentração máxima, na depuração e na eliminação no intervalo; e avaliação da imunogenicidade de doses crescentes únicas medindo a ligação de anticorpos e as respostas das células T a todos os componentes do IP (capsídeo AAV2/hu68, JAb210a MDAb).

[00348] As avaliações incluem química do sangue (testes da função hepática [LFTs], creatinina), hematologia (hemograma completo [CBC] com diferencial, plaquetas, tempo de protrombina/tempo parcial de tromboplastina (PT/PTT), creatinina fosfoquinase (CPK), troponina e urina) são avaliados ao longo do decurso do estudo com monitoramento mais frequente no período agudo/subagudo após a administração da solução vetorial. A amostragem de soro, lavagem nasal e PBMCs é realizada durante todo o estudo para monitorar a expressão do transgene e para avaliações de anticorpos e respostas celulares ao transgene e ao capsídeo AAV2/hu68. O teste urinário de gonadotrofina coriônica humana (HCG) é realizado para todas as voluntárias mulheres antes da administração da solução vetorial.

[00349] Eventos adversos (EA) e eventos adversos graves (EAEs) são coletados durante o período do estudo (ou seja, 6 meses).

[00350] A farmacocinética (PK) é avaliada rotineiramente ao longo do decurso do estudo para determinar a cinética de expressão do JAb210a MDAb. A lavagem e o soro nasais são amostrados em intervalos regulares e o nível de Ab determinado por espectroscopia de massa e ELISA usando os ensaios.

[00351] Espectrometria de massa, Ensaios anti-idiotipo, Expressão do Transgene (ELISA), Avaliação de desprendimento de vetores, foram desenvolvidos de acordo com métodos convencionais.

g. Administração da solução vetorial

[00352] A administração da solução vetorial ocorre em duas doses sequenciais de 0,2 ml em cada narina (ou seja, total de 0,8 ml da

solução vetorial). A solução vetorial é administrada através de um dispositivo comercialmente aprovado fabricado pela Teleflex Medical (Teleflex.com). O dispositivo é chamado de LMA MAD Nasal™ (Dispositivo Intranasal de Atomização da Mucosa). Detalhes sobre a melhor forma de usar o dispositivo para fornecer IP à mucosa nasal são fornecidos no Guia de Procedimentos da empresa. Basicamente, o sujeito é colocado em uma posição reclinada e a ponta do dispositivo é colocada no orifício de cada passagem nasal (uma de cada vez), após o qual a solução vetorial é entregue empurrando o fluido através do atomizador através de uma seringa.

h. Desenho do estudo e determinação do Tamanho da Amostra

[00353] O critério de avaliação primário, no qual o esquema de escalonamento da dose é baseado, é a segurança. O monitoramento de segurança inclui observações clínicas e os resultados de testes de laboratório e é classificado de acordo com uma modificação da Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventative Vaccine Clinical Trials publicada pela FDA em setembro de 2007. A única revisão está relacionada a uma avaliação de anormalidades clínicas que no documento de orientação estão focadas nos achados relacionados ao local da injeção. Critérios relacionados aos achados clínicos nos sistemas respiratório proximal e distal são estabelecidos.

[00354] A dose máxima tolerada (MTD) é definida como a dose abaixo da dose na qual os sujeitos demonstram toxicidade limitante da dose (DLT), definida como qualquer Grau 3 relacionado ao tratamento em dois sujeitos ou um evento de Grau 4 relacionado ao tratamento. Reconhece-se que o MTD pode não ser atingida dentro da faixa de doses proposta. Nesse caso, a dose mais alta usada é a dose recomendada para ensaios futuros. Um mínimo de oito indivíduos é tratado na MTD, ou no caso de a MTD não ser atingida, na dose mais

alta. Assim, pode ser necessário adicionar quatro sujeitos adicionais para garantir que oito sujeitos sejam tratados na dose recomendada.

[00355] O projeto é um teste padrão de escalonamento de dose "4+4" de fase I com 4 pacientes por nível de dose, expandindo para 8 pacientes por nível no caso de toxicidade limitante da dose (DLT) em qualquer nível e com a possibilidade de expandir para 4 pacientes adicionais na dose recomendada para melhor caracterizar a dose ideal e a taxa de toxicidade nesse nível. Um período mínimo de 7 dias entre os pacientes dentro de uma coorte de doses e 2 semanas entre as coortes é usado para garantir uma avaliação adequada da potencial toxicidade a curto prazo. Os sujeitos são observados por 6 meses após a administração, embora o período de observação usado para determinar se a MTD tenha sido atingida e/ou escalar para a próxima dose seja o corpo total de dados da coorte, incluindo um mínimo de 14 dias após o sujeito final na coorte.

[00356] Se 0/4 sujeitos de uma coorte apresentarem toxicidades de Grau 3 ou 4, a dose será aumentada e os próximos quatro sujeitos serão tratados na próxima dose mais alta; Se 1/4 indivíduos tiverem uma toxicidade de Grau 3 relacionada ao tratamento, quatro indivíduos adicionais serão tratados na mesma dose. Se nenhum dos indivíduos adicionais apresentar uma toxicidade de Grau 3 ou 4 relacionada ao tratamento (total de 1/8), a dose é aumentada e os próximos quatro indivíduos são tratados na próxima dose mais alta. Se algum dos sujeitos adicionais apresentar uma toxicidade de Grau 3 ou 4 (total > 1/8), outros quatro sujeitos serão incluídos na coorte de dose mais baixa e, se limpa, será considerada a MTD; se algum sujeito apresentar uma toxicidade de Grau 4 relacionada ao tratamento, não serão mais incluídos sujeitos nessa dose e mais quatro sujeitos serão incluídos na coorte, recebendo uma dose abaixo daquela em que ocorreu a toxicidade de Grau 4 para estabelecer a MTD.

#### i. Segurança e Eventos Adversos

[00357] Problemas imprevistos que envolvem riscos para sujeitos ou outras pessoas são definidos como qualquer incidente, experiência ou resultado que atenda a todos os seguintes critérios: Inesperados em sua natureza, gravidade ou frequência (isto é, não descritos em documentos relacionados ao estudo, como o protocolo aprovado pelo IRB ou formulário de consentimento, a brochura do investigador etc.); relacionados ou possivelmente relacionados à participação na pesquisa (ou seja, possivelmente relacionado, significa que existe uma possibilidade razoável de que a experiência ou o resultado do incidente possa ter sido causado pelos procedimentos envolvidos na pesquisa); e que sugeriram que a pesquisa coloque sujeitos ou outras pessoas em maior risco de danos (incluindo danos físicos, psicológicos, econômicos ou sociais).

[00358] Um evento adverso (EA) é qualquer sintoma, sinal, doença ou experiência que se desenvolve ou piora em gravidade durante o decurso do estudo. Doenças ou lesões intercorrentes devem ser consideradas eventos adversos. Resultados anormais dos procedimentos de diagnóstico são considerados eventos adversos se a anormalidade: resultar na retirada do estudo; está associada a um evento adverso grave; está associada a sinais ou sintomas clínicos; leva a tratamento adicional ou a outros testes de diagnóstico; é considerada pelo investigador como tendo significado clínico.

[00359] Eventos adversos são classificados como graves ou não graves. Um evento adverso grave é qualquer EA que: seja fatal, com risco de vida, requer ou prolonga a permanência no hospital, resulta em incapacidade persistente ou significativa, anomalia congênita ou defeito de nascimento, seja um evento médico importante.

[00360] Eventos médicos importantes são aqueles que podem não ser imediatamente fatais, mas são claramente de grande significado

clínico. Eles podem comprometer o sujeito e podem exigir intervenção para evitar um dos outros resultados graves mencionados acima. Por exemplo, overdose ou abuso de drogas, uma convulsão que não resultou em internação hospitalar ou tratamento intensivo de broncoespasmo em um pronto-socorro geralmente seriam consideradas graves.

[00361] Todos os eventos adversos que não atendem a nenhum dos critérios de gravidade devem ser considerados eventos adversos não graves.

[00362] Uma condição preexistente é aquela que está presente no início do estudo. Uma condição preexistente deve ser registrada como um evento adverso se a frequência, intensidade ou o caráter da condição piorar durante o período do estudo.

[00363] Na triagem, qualquer anormalidade clinicamente significativa deve ser registrada como uma condição preexistente. No final do estudo, quaisquer novos achados/anormalidades clinicamente significativas que atendam à definição de evento adverso também devem ser registrados e documentados como evento adverso.

[00364] Todos os eventos adversos não resolvidos são seguidos pelo investigador até que os eventos sejam resolvidos, o sujeito tenha saído do acompanhamento ou o evento adverso seja explicado de outra forma. Na última visita agendada, o investigador deve instruir cada sujeito a relatar qualquer evento subsequente que o sujeito, ou o médico pessoal do sujeito, acredite estar razoavelmente relacionado à participação neste estudo. O investigador deve notificar o patrocinador do estudo sobre qualquer morte ou evento adverso que ocorra a qualquer momento após um sujeito ter descontinuado ou encerrado a participação no estudo que possa estar razoavelmente relacionada a este estudo. O patrocinador também deve ser notificado se o investigador tomar conhecimento do desenvolvimento de câncer ou de

uma anomalia congênita em um filho subsequentemente concebido de um sujeito que participou deste estudo.

[00365] Uma anormalidade laboratorial clínica é documentada como um evento adverso se qualquer uma das seguintes condições for atendida: a anormalidade laboratorial não é refutada por um teste repetido para confirmar a anormalidade; a anormalidade sugere uma doença e/ou toxicidade de órgão; a anormalidade é de um grau que requer gerenciamento ativo; por exemplo, mudança de dose, descontinuação do medicamento, avaliações de acompanhamento mais frequentes, investigação diagnóstica adicional etc.

[00366] Qualquer evento adverso que resulte em hospitalização ou hospitalização prolongada é documentado e relatado como um evento adverso grave, a menos que seja especificamente instruído de outra forma. Qualquer condição responsável pela cirurgia é documentada como um evento adverso se a condição atender aos critérios e ao evento adverso. Nem a condição, a hospitalização, a hospitalização prolongada nem a cirurgia são relatadas como um evento adverso nas seguintes circunstâncias: hospitalização ou hospitalização prolongada para procedimentos cirúrgicos diagnósticos ou eletivos para uma condição preexistente. A cirurgia não deve ser relatada como resultado de um evento adverso se o objetivo da cirurgia for eletivo ou diagnóstico e o resultado for sem intercorrências; hospitalização ou hospitalização prolongada necessária para permitir a mensuração da eficácia do estudo.

[00367] O investigador é responsável por garantir que os EAs sejam documentados na página apropriada da CRF, de acordo com os seguintes descritores: Leve: associado a nenhuma limitação das atividades habituais ou apenas um leve desconforto; Moderado: associado à limitação das atividades habituais ou desconforto significativo; Grave: associado à incapacidade de realizar atividades



habituais ou desconforto muito acentuado. Relação com o Fármaco do Estudo.

[00368] A relação dos EAs com o fármaco do estudo é determinada pelo investigador de acordo com as seguintes definições:

[00369] Provável: uma reação que segue uma sequência temporal razoável desde a administração da solução vetorial que segue um padrão de resposta conhecido ou esperado para o marcador de estudo suspeito; e que não poderia ser razoavelmente explicada pelas características conhecidas do estado clínico desse sujeito/paciente;

[00370] Possível: uma reação que segue uma sequência temporal razoável da administração do marcador do estudo; que segue um padrão de resposta conhecido ou esperado para o marcador de estudo suspeito; mas isso poderia ter sido produzido prontamente por vários outros fatores;

[00371] Improvável: uma reação que não segue uma sequência temporal razoável da administração do marcador do estudo. No entanto, a causalidade da solução vetorial não pode ser descartada.

[00372] Nenhuma: uma reação para a qual existem dados suficientes para indicar que a etiologia não está relacionada ao marcador do estudo.

[00373] Para garantir que os riscos para os sujeitos sejam minimizados, os sujeitos são incluídos no estudo em coortes separadas de quatro a oito sujeitos cada. Após a administração da solução vetorial a todos os sujeitos de uma coorte, a dosagem de outras coortes não ocorre até que o último sujeito da coorte tenha completado pelo menos 2 semanas de acompanhamento e a avaliação de segurança primária seja feita para toda a coorte e examinado. A dosagem entre os membros de uma coorte ocorre em intervalos não inferiores a 1 semana. Neste estudo, a toxicidade limitante da dose (DLT) é definida como duas toxicidades de Grau 3 em um evento de coorte ou Grau 4, nas quais são

consideradas relacionadas ao tratamento. Como descrito acima, um sujeito de uma coorte que experimenta uma toxicidade relacionada ao tratamento de Grau 3 aciona a dosagem de quatro sujeitos adicionais nessa dose chegando até a 8 sujeitos dessa coorte. Um segundo sujeito com toxicidade de Grau 3 relacionada ao tratamento nessa dose desencadeia uma redução da dose, com quatro sujeitos adicionais tratados com a dose mais baixa, se necessário, para garantir um total de 8 sujeitos tratados; se não houver mais do que duas toxicidades de Grau 3 e Grau 4 nesta dose mais baixa, é considerada como a MTD. Qualquer toxicidade de Grau 4 relacionada ao tratamento interrompe o acúmulo nessa dose e aciona o acúmulo de mais 4 sujeitos na dose mais baixa para ajudar a estabelecer a MTD. Qualquer evento adverso grave é imediatamente relatado e avaliado quanto à sua relação com o tratamento do estudo. Se um EAG é considerado relacionado ao tratamento, serve como critério de parada para o estudo.

#### j. Análise Estatística

[00374] Várias estatísticas descritivas, incluindo métodos gráficos, são usadas para resumir os parâmetros de eficácia. Médias, desvios padrão, medianas e intervalos são calculados para variáveis contínuas medidas. Intervalos de confiança são produzidos para estatísticas resumidas, conforme apropriado. Os testes de hipótese são realizados usando um nível de significância bilateral (erro tipo I) de  $\alpha = 0,05$ , embora valores reais de p sejam relatados. Para variáveis contínuas medidas, duas comparações de grupo (como entre grupos de doses) geralmente empregam testes de soma-classificação de Wilcoxon; Os testes de classificação assinada de Wilcoxon são usados para dados emparelhados, como alteração da linha de base nos parâmetros da função pulmonar. As variáveis categóricas são comparadas entre os grupos usando o teste exato de Fisher e nos pacientes usando o teste de McNemar.

[00375] Todas as patentes, publicações de patentes e outras publicações listadas neste relatório, bem como a listagem de sequência intitulada "17-7987PCT\_ST25.txt" e os pedidos prioritários, Pedido Provisório de Patente Provisório US Nº 62/618.443, depositado em 17 de janeiro de 2018, Pedido Nº 62/560.834, depositado em 20 de setembro de 2017, Pedido Nº 62/504.293, depositado em 10 de maio de 2017 e Pedido Nº 62/464.753, depositado em 2 de fevereiro de 2017, que são aqui incorporados por referência. Embora a invenção tenha sido descrita com referência a uma modalidade particularmente preferencial, será apreciado que modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito da invenção. Tais modificações se destinam a permanecer dentro do escopo das reivindicações anexas.

(Listagem de Sequência de Texto Livre)

As seguintes informações são fornecidas para sequências que contêm texto livre sob o identificador numérico <223>.

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
1	<223> Sequência de aminoácidos da primeira região de imunoglobulina
2	<223> Sequência de aminoácidos da segunda região de imunoglobulina
3	<223> Sequência de aminoácidos da terceira região de imunoglobulina
4	<223> Sequência de aminoácidos da quarta região de imunoglobulina
5	<223> Genoma de Vetor J210a com promotor CB7 e rBG poliA <220>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<221> região de repetição <222> (1)..(130) <223> 5' ITR  <220> <221> promotor <222> (198)..(579) <223> Promotor IE de CMV  <220> <221> potenciador <222> (279)..(538) <223> potenciador de C4  <220> <221> promotor <222> (582)..(862) <223> promotor de b-actina (CB) de galinha  <220> <221> sinal_TATA <222> (836)..(839)  <220> <221> Íntron <222> (956)..(1928) <223> íntron de beta-actina de galinha

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p data-bbox="518 533 619 568">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 593 727 629">&lt;221&gt; 5'UTR</p> <p data-bbox="518 654 847 689">&lt;222&gt; (1938)..(1985)</p> <p data-bbox="518 714 828 750">&lt;223&gt; c-myc 5'UTR</p> <p data-bbox="518 835 619 871">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 896 930 931">&lt;221&gt; característica mista</p> <p data-bbox="518 956 847 992">&lt;222&gt; (1986)..(1991)</p> <p data-bbox="518 1016 719 1052">&lt;223&gt; kozak</p> <p data-bbox="518 1137 619 1173">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 1198 930 1234">&lt;221&gt; característica mista</p> <p data-bbox="518 1258 847 1294">&lt;222&gt; (1992)..(2051)</p> <p data-bbox="518 1319 850 1355">&lt;223&gt; líder de hmlL2</p> <p data-bbox="518 1440 619 1476">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 1500 930 1536">&lt;221&gt; característica mista</p> <p data-bbox="518 1561 847 1597">&lt;222&gt; (2052)..(2423)</p> <p data-bbox="518 1621 1187 1657">&lt;223&gt; A primeira região de imunoglobulina</p> <p data-bbox="518 1742 619 1778">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 1803 930 1839">&lt;221&gt; característica mista</p> <p data-bbox="518 1863 847 1899">&lt;222&gt; (2424)..(2453)</p> <p data-bbox="518 1924 663 1960">&lt;223&gt; L1</p> <p data-bbox="518 2045 619 2080">&lt;220&gt;</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<221> característica mista <222> (2454)..(2822) <223> A segunda região de imunoglobulina  <220> <221> característica mista <222> (2823)..(2852) <223> L2  <220> <221> característica mista <222> (2853)..(3239) <223> A terceira região de imunoglobulina  <220> <221> característica mista <222> (3240)..(3269) <223> L3  <220> <221> característica mista <222> (3270)..(3617) <223> A quarta região de imunoglobulina  <220> <221> característica mista <222> (3618)..(3632)

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<223> dobradiça  <220> <221> característica mista <222> (3633)..(4298) <223> Fc  <220> <221> sinal de poliA <222> (4374)..(4500) <223> poliA de globina de coelho <220> <221> região de repetição <222> (4589)..(4718) <223> 3' ITR
6	<223> Sequência de aminoácidos do líder de IL2 humano (hmIL2)
7	<223> Sequência de aminoácido do ligante 1 (L1)
8	<223> dobradiça
9	<223> Construto Sintético
10	<223> Fc
11	<223> Construto Sintético
12	<223> FM1W3 humanizado

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
13	<p data-bbox="517 477 1236 510">&lt;223&gt; multímetro J310a de sdAb humanizado</p> <p data-bbox="517 656 619 689">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="517 712 927 745">&lt;221&gt; região de repetição</p> <p data-bbox="517 768 791 801">&lt;222&gt; (17)..(146)</p> <p data-bbox="517 824 719 857">&lt;223&gt; 5' ITR</p> <p data-bbox="517 947 619 981">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="517 1003 767 1037">&lt;221&gt; promotor</p> <p data-bbox="517 1059 828 1093">&lt;222&gt; (207)..(1433)</p> <p data-bbox="517 1115 699 1149">&lt;223&gt; UbC</p> <p data-bbox="517 1238 692 1272">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="517 1294 719 1328">&lt;221&gt; Íntron</p> <p data-bbox="517 1350 847 1384">&lt;222&gt; (1527)..(1659)</p> <p data-bbox="517 1406 1026 1440">&lt;223&gt; Íntron quimérico promega</p> <p data-bbox="517 1529 619 1563">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="517 1585 727 1619">&lt;221&gt; 5'UTR</p> <p data-bbox="517 1641 847 1675">&lt;222&gt; (1726)..(1773)</p> <p data-bbox="517 1697 828 1731">&lt;223&gt; c-myc 5'UTR</p> <p data-bbox="517 1821 619 1854">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="517 1877 930 1910">&lt;221&gt; característica mista</p> <p data-bbox="517 1933 847 1966">&lt;222&gt; (1774)..(1779)</p> <p data-bbox="517 1989 719 2022">&lt;223&gt; kozak</p>



SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; característica mista            &lt;222&gt; (1780)..(1839)            &lt;223&gt; líder de hmIL2</p> <p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; característica mista            &lt;222&gt; (1840)..(2211)            &lt;223&gt; A primeira região de imunoglobulina</p> <p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; característica de ligação            &lt;222&gt; (2212)..(2241)            &lt;223&gt; L1</p> <p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; característica mista            &lt;222&gt; (2242)..(2610)            &lt;223&gt; A segunda região de imunoglobulina</p> <p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; característica de ligação            &lt;222&gt; (2611)..(2640)            &lt;223&gt; L2</p> <p>&lt;220&gt;</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<221> característica mista <222> (2641)..(3027) <223> A terceira região de imunoglobulina  <220> <221> característica de ligação <222> (3028)..(3057) <223> L3  <220> <221> característica mista <222> (3058)..(3405) <223> A quarta região de imunoglobulina  <220> <221> característica de ligação <222> (3406)..(3435) <223> L4  <220> <221> característica mista <222> (3436)..(4101) <223> Fc  <220> <221> sinal de poliA <222> (4119)..(4350)

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<223> sinal de poliA tardio SV40  <220> <221> região de repetição <222> (4415)..(4544) <223> 3' ITR
14	<223> CB7_J310a  <220> <221> região de repetição <222> (1)..(130) <223> 5' ITR  <220> <221> promotor <222> (198) .. (579) <223> Promotor IE de CMV  <220> <221> promotor <222> (582)..(862) <223> Promotor CB  <220> <221> Sinal_TATA <222> (836)..(839)

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p data-bbox="515 481 718 515">&lt;223&gt; TATA</p> <p data-bbox="515 593 619 627">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="515 649 718 683">&lt;221&gt; Íntron</p> <p data-bbox="515 705 829 750">&lt;222&gt; (956)..(1928)</p> <p data-bbox="515 772 1117 817">&lt;223&gt; íntron de beta-actina de galinha</p> <p data-bbox="515 896 619 929">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="515 952 726 985">&lt;221&gt; 5'UTR</p> <p data-bbox="515 1008 845 1052">&lt;222&gt; (1938)..(1985)</p> <p data-bbox="515 1075 829 1120">&lt;223&gt; c-myc 5'UTR</p> <p data-bbox="515 1198 619 1232">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="515 1254 933 1288">&lt;221&gt; característica mista</p> <p data-bbox="515 1310 845 1355">&lt;222&gt; (1986)..(1991)</p> <p data-bbox="515 1377 718 1411">&lt;223&gt; kozak</p> <p data-bbox="515 1489 619 1523">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="515 1545 933 1579">&lt;221&gt; característica mista</p> <p data-bbox="515 1601 845 1646">&lt;222&gt; (1992)..(2051)</p> <p data-bbox="515 1668 853 1702">&lt;223&gt; líder de hmlL2</p> <p data-bbox="515 1780 619 1814">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="515 1836 933 1870">&lt;221&gt; característica mista</p> <p data-bbox="515 1892 845 1937">&lt;222&gt; (2052)..(2423)</p> <p data-bbox="515 1960 1189 2004">&lt;223&gt; A primeira região de imunoglobulina</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<220> <221> característica de ligação <222> (2424)..(2453) <223> L1  <220> <221> característica mista <222> (2454)..(2822) <223> A segunda região de imunoglobulina  <220> <221> característica de ligação <222> (2823)..(2852) <223> L2  <220> <221> característica mista <222> (2853)..(3239) <223> A terceira região de imunoglobulina  <220> <221> característica de ligação <222> (3240)..(3269) <223> L3  <220> <221> característica mista

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<222> (3270)..(3617) <223> A quarta região de imunoglobulina  <220> <221> característica de ligação <222> (3618)..(3647) <223> L4  <220> <221> característica mista <222> (3648)..(4313) <223> Fc  <220> <221> sinal de poliA <222> (4389)..(4515) <223> poliA de globina de coelho  <220> <221> região de repetição <222> (4604)..(4733) <223> 3' ITR
15	<223> CB7 J2201  <220> <221> região de repetição

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p data-bbox="517 477 772 510">&lt;222&gt; (1)..(130)</p> <p data-bbox="517 533 724 566">&lt;223&gt; 5' ITR</p> <p data-bbox="517 656 620 689">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="517 712 772 745">&lt;221&gt; promotor</p> <p data-bbox="517 768 836 801">&lt;222&gt; (198) .. (579)</p> <p data-bbox="517 824 948 857">&lt;223&gt; Promotor IE de CMV</p> <p data-bbox="517 947 620 981">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="517 1003 772 1037">&lt;221&gt; promotor</p> <p data-bbox="517 1059 812 1093">&lt;222&gt; (582)..(862)</p> <p data-bbox="517 1115 836 1149">&lt;223&gt; Promotor CB</p> <p data-bbox="517 1238 620 1272">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="517 1294 820 1328">&lt;221&gt; Sinal_TATA</p> <p data-bbox="517 1350 812 1384">&lt;222&gt; (836)..(839)</p> <p data-bbox="517 1473 620 1507">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="517 1529 724 1563">&lt;221&gt; Íntron</p> <p data-bbox="517 1585 836 1619">&lt;222&gt; (956)..(1928)</p> <p data-bbox="517 1641 1123 1675">&lt;223&gt; íntron de beta-actina de galinha</p> <p data-bbox="517 1765 620 1798">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="517 1821 724 1854">&lt;221&gt; 5'UTR</p> <p data-bbox="517 1877 852 1910">&lt;222&gt; (1938)..(1985)</p> <p data-bbox="517 1933 836 1966">&lt;223&gt; c-myc 5'UTR</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica mista</p> <p>&lt;222&gt; (1986)..(1991)</p> <p>&lt;223&gt; kozak</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica mista</p> <p>&lt;222&gt; (1992)..(2051)</p> <p>&lt;223&gt; líder de hmlL2</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica mista</p> <p>&lt;222&gt; (2052)..(2423)</p> <p>&lt;223&gt; A primeira região de imunoglobulina</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica de ligação</p> <p>&lt;222&gt; (2424)..(2453)</p> <p>&lt;223&gt; L1</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica mista</p> <p>&lt;222&gt; (2454)..(2822)</p> <p>&lt;223&gt; A segunda região de imunoglobulina</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica de ligação</p>



SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;222&gt; (2823)..(2852) &lt;223&gt; L2</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica mista &lt;222&gt; (2853)..(3239) &lt;223&gt; A terceira região de imunoglobulina</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica de ligação &lt;222&gt; (3240)..(3269) &lt;223&gt; L3</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica mista &lt;222&gt; (3270)..(3617) &lt;223&gt; A quarta região de imunoglobulina</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica de ligação &lt;222&gt; (3618)..(3632) &lt;223&gt; dobradiça</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica mista &lt;222&gt; (3633)..(4298) &lt;223&gt; Fc</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<220> <221> sinal de poliA <222> (4374)..(4500) <223> Poli A de globina de coelho  <220> <221> região de repetição <222> (4589)..(4718) <223> 3' ITR
16	<223> AAV hu68 vp1
17	<223> vírus 9 vp1 adenoassociado humano
18	<223> Sequência de codificação de AAVhu68 vp1
19	<223> Genoma de vetor que codifica quatro domínios de imunoglobulina com UbC promotor e poliA SV40  <220> <221> região de repetição <222> (17)..(146) <223> AAV2-5' ITR  <220> <221> promotor

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;222&gt; (207)..(1433)</p> <p>&lt;223&gt; Promotor de UbC, incluindo UB para sítio de priming</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; Íntron</p> <p>&lt;222&gt; (1527)..(1659)</p> <p>&lt;223&gt; íntron quimérico</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; 5'UTR</p> <p>&lt;222&gt; (1726)..(1773)</p> <p>&lt;223&gt; c-myc 5'UTR</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica mista</p> <p>&lt;222&gt; (1774)..(1779)</p> <p>&lt;223&gt; kozak</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica mista</p> <p>&lt;222&gt; (1780)..(1839)</p> <p>&lt;223&gt; líder de hm IL2</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica mista</p> <p>&lt;222&gt; (1840)..(2111)</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p data-bbox="518 477 1361 577">&lt;223&gt; região de codificação para a primeira região de imunoglobulina</p> <p data-bbox="518 656 622 689">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 712 1005 757">&lt;221&gt; característica de ligação</p> <p data-bbox="518 768 849 813">&lt;222&gt; (2212)..(2241)</p> <p data-bbox="518 824 778 869">&lt;223&gt; ligante L1</p> <p data-bbox="518 947 622 981">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 1003 930 1048">&lt;221&gt; característica mista</p> <p data-bbox="518 1059 849 1104">&lt;222&gt; (2242)..(2610)</p> <p data-bbox="518 1126 1361 1227">&lt;223&gt; sequência de codificação para a segunda região de imunoglobulina</p> <p data-bbox="518 1305 622 1339">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 1361 1005 1406">&lt;221&gt; característica de ligação</p> <p data-bbox="518 1417 849 1462">&lt;222&gt; (2611)..(2640)</p> <p data-bbox="518 1473 778 1518">&lt;223&gt; ligante L2</p> <p data-bbox="518 1597 622 1630">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 1653 930 1697">&lt;221&gt; característica mista</p> <p data-bbox="518 1709 849 1753">&lt;222&gt; (2641)..(3303)</p> <p data-bbox="518 1765 686 1809">&lt;223&gt; Fc1</p> <p data-bbox="518 1888 622 1921">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 1944 1005 1989">&lt;221&gt; característica de ligação</p> <p data-bbox="518 2000 849 2045">&lt;222&gt; (3304)..(3315)</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p data-bbox="518 477 718 510">&lt;223&gt; furina</p> <p data-bbox="518 595 619 629">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 651 1005 689">&lt;221&gt; característica de ligação</p> <p data-bbox="518 712 849 750">&lt;222&gt; (3316)..(3387)</p> <p data-bbox="518 772 673 806">&lt;223&gt; 2A</p> <p data-bbox="518 891 619 925">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 947 930 985">&lt;221&gt; característica mista</p> <p data-bbox="518 1008 849 1046">&lt;222&gt; (3388)..(3447)</p> <p data-bbox="518 1068 880 1102">&lt;223&gt; líder de hm1 IL2</p> <p data-bbox="518 1187 619 1220">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 1243 930 1281">&lt;221&gt; característica mista</p> <p data-bbox="518 1303 849 1341">&lt;222&gt; (3448)..(3834)</p> <p data-bbox="518 1364 1356 1464">&lt;223&gt; sequência de codificação para a terceira região de imunoglobulina</p> <p data-bbox="518 1550 619 1583">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 1606 1005 1644">&lt;221&gt; característica de ligação</p> <p data-bbox="518 1666 849 1704">&lt;222&gt; (3835)..(3864)</p> <p data-bbox="518 1727 997 1765">&lt;223&gt; sequência do ligante L3</p> <p data-bbox="518 1850 619 1883">&lt;220&gt;</p> <p data-bbox="518 1906 930 1944">&lt;221&gt; característica mista</p> <p data-bbox="518 1966 849 2004">&lt;222&gt; (3865)..(4212)</p> <p data-bbox="518 2027 1356 2065">&lt;223&gt; sequência de codificação para a quarta região</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>de imunoglobulina</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica de ligação</p> <p>&lt;222&gt; (4213)..(4242)</p> <p>&lt;223&gt; ligante L4</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica mista</p> <p>&lt;222&gt; (4243)..(4908)</p> <p>&lt;223&gt; Fc2</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; sinal de poliA</p> <p>&lt;222&gt; (4926)..(5157)</p> <p>&lt;223&gt; sinal de poliA tardio SV40</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; região de repetição</p> <p>&lt;222&gt; (5222)..(5351)</p> <p>&lt;223&gt; AAV2 - 3' ITR</p>
20	<p>&lt;213&gt; Sequência Artificial</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;223&gt; genoma de vetor com promotor de TBG, poliA de BGH</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<220> <221> região de repetição <222> (1)..(130) <223> AAV2 - 5' ITR  <220> <221> promotor <222> (205)..(913) <223> promotor de globulina de ligação à tiroxina (TBG)  <220> <221> sinal_TATA <222> (875)..(878)  <220> <221> Íntron <222> (939)..(1071) <223> Íntron misc de SV40  <220> <221> 5'UTR <222> (1096)..(1143) <223> c-myc 5'UTR  <220>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;221&gt; característica mista &lt;222&gt; (1144)..(1149) &lt;223&gt; kozak</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica mista &lt;222&gt; (1150)..(1209) &lt;223&gt; ligante de hmlL2</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica mista &lt;222&gt; (1210)..(1581) &lt;223&gt; sequência de codificação para a primeira região de imunoglobulina</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica de ligação &lt;222&gt; (1582)..(1611) &lt;223&gt; ligante L1</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica mista &lt;222&gt; (1612)..(1980) &lt;223&gt; sequência de codificação para a segunda região de imunoglobulina</p> <p>&lt;220&gt;</p>



SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;221&gt; característica de ligação &lt;222&gt; (1981)..(1995) &lt;223&gt; dobradiça</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica mista &lt;222&gt; (1996)..(2658) &lt;223&gt; Fc1</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica de ligação &lt;222&gt; (2659)..(2670) &lt;223&gt; furina</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica de ligação &lt;222&gt; (2671)..(2742) &lt;223&gt; 2A</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica mista &lt;222&gt; (2743)..(2802) &lt;223&gt; líder de hm IL2</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; característica mista &lt;222&gt; (2803)..(3189)</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;223&gt; sequência de codificação para a terceira região de imunoglobulina</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica de ligação</p> <p>&lt;222&gt; (3190)..(3219)</p> <p>&lt;223&gt; sequência do ligante L3</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica mista</p> <p>&lt;222&gt; (3220)..(3567)</p> <p>&lt;223&gt; sequência de codificação para a quarta região de imunoglobulina</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica de ligação</p> <p>&lt;222&gt; (3568)..(3582)</p> <p>&lt;223&gt; dobradiça</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; característica mista</p> <p>&lt;222&gt; (3583)..(4248)</p> <p>&lt;223&gt; Fc2</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; sinal de poliA</p> <p>&lt;222&gt; (4377)..(4591)</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<223> poliA de hormônio de crescimento bovino (BGH)  <220> <221> região de repetição <222> (4679)..(4808) <223> AAV2 - 3'ITR
21	<223> Sequência de codificação de J211 para proteína de fusão  <220> <221> 5'UTR <222> (1)..(48) <223> c-myc 5'UTR  <220> <221> característica mista <222> (49)..(54) <223> kozak  <220> <221> característica mista <222> (55)..(114) <223> líder de hmlL2  <220>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;221&gt; característica mista          &lt;222&gt; (115)..(486)          &lt;223&gt; sequência de codificação para a primeira região de imunoglobulina</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; característica de ligação          &lt;222&gt; (487)..(516)          &lt;223&gt; sequência do ligante L1</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; característica mista          &lt;222&gt; (517)..(885)          &lt;223&gt; sequência de codificação para a segunda região de imunoglobulina</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; característica de ligação          &lt;222&gt; (886)..(915)          &lt;223&gt; sequência de líder L2</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; característica mista          &lt;222&gt; (916)..(1302)          &lt;223&gt; sequência de codificação para a terceira região de imunoglobulina</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<220> <221> característica de ligação <222> (1303)..(1332) <223> sequência do ligante L3  <220> <221> característica mista <222> (1333)..(1680) <223> sequência de codificação para a quarta região de imunoglobulina  <220> <221> característica de ligação <222> (1681)..(1695) <223> dobradiça  <220> <221> característica mista <222> (1696)..(2361) <223> Fc
22	<223> Ligante
23	<223> Ligante
24	<223> Ligante
25	<223> Ligante

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
26	<223> sequência de codificação de J210a
27	<223> Construto Sintético
28	<223> iniciador prm504
29	<223> iniciador prm505
30	<223> sequência de aminoácido de MD3606  <220> <221> CARACTERÍSTICA MISTA <222> (24)..(147) <223> A primeira região de imunoglobulina com I110M  <220> <221> CARACTERÍSTICA MISTA <222> (158)..(280) <223> A segunda região de imunoglobulina  <220> <221> CARACTERÍSTICA MISTA <222> (291)..(419) <223> A terceira região de imunoglobulina  <220> <221> CARACTERÍSTICA MISTA <222> (430)..(485)

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<223> A quarta região de imunoglobulina  <220> <221> CARACTERÍSTICA MISTA <222> (551)..(772) <223> Fc
31	<223> Genoma do vetor AAV AAV.CB7.hJAB Fc  <220> <221> região de repetição <222> (1)..(130) <223> 5' IRT  <220> <221> promotor <222> (198) .. (579) <223> Promotor IE de CMV  <220> <221> potenciador <222> (279)..(538) <223> Potenciador de C4 com 2 desemparelhamentos  <220> <221> promotor <222> (582)..(862)

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<223> Promotor CB  <220> <221> Sinal_TATA <222> (836)..(839) <223> TATA  <220> <221> Íntron <222> (956)..(1928) <223> íntron de beta-actina de galinha  <220> <221> característica mista <222> (1941)..(4259) <223> sequência de codificação para MD3606  <220> <221> sinal de poliA <222> (4346)..(4472) <223> Poli A de globina de coelho  <220> <221> região de repetição <222> (4561)..(4690) <223> 3' ITR



SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
32	<223> sequência de codificação de MD3606
33	<223> Espaçador
34	<223> AAVhu31 vp1 humano
35	<223> AAVhu32 vp1 humano
36	<223> Sequência de codificação de vp1 do capsídeo AAV9
37	<223> Sequência de codificação de AAVhu31
38	<223> Sequência de codificação de AAVhu32 VP1
39	<223> hu68vp1 modificado  <220> <221> CARACTERÍSTICA MISTA <222> (23)..(23) <223> Xaa pode ser W (Trp, triptofano) ou W oxidado.  <220> <221> CARACTERÍSTICA MISTA <222> (35)..(35) <223> Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp  <220> <221> CARACTERÍSTICA MISTA

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;222&gt; (57)..(57)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (66)..(66)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (94)..(94)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (97)..(97)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser D (asp, ácido aspártico) ou D isomerizado.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (107)..(107)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser D (asp, ácido aspártico) ou D isomerizado.</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>           &lt;220&gt;            &lt;221&gt; característica mista            &lt;222&gt; (113)..(113)            &lt;223&gt; Xaa pode ser qualquer aminoácido que ocorre naturalmente         </p> <p>           &lt;220&gt;            &lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA            &lt;222&gt; (149)..(149)            &lt;223&gt; Xaa pode ser S (Ser, serina) ou S Fosforilado         </p> <p>           &lt;220&gt;            &lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA            &lt;222&gt; (149)..(149)            &lt;223&gt; Xaa pode ser S (Ser, serina) ou S fosforilado         </p> <p>           &lt;220&gt;            &lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA            &lt;222&gt; (247)..(247)            &lt;223&gt; Xaa pode ser W (Trp, triptofano) ou W oxidado (por exemplo, quinurenina).         </p> <p>           &lt;220&gt;            &lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA            &lt;222&gt; (253)..(253)            &lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp,         </p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (259)..(259)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa representa Q ou Q desamidado em ácido glutâmico (ácido alfa-glutâmico), ácido gama-glutâmico (Glu) ou uma mistura de ácido alfa e gama-glutâmico</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (270)..(270)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (297)..(297)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa representa D (Asp, ácido aspártico) ou D a N amidado (Asn, asparagina)</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (304)..(304)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp,</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (306)..(306)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser W (Trp, triptofano) ou W oxidado (por exemplo, quinurenina).</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (314)..(314)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (319)..(319)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (329)..(329)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (332)..(332)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser K (lys, lisina) ou K acetilado</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (336)..(336)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (384)..(384)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser D (asp, ácido aspártico) ou D isomerizado.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (404)..(404)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser M (Met, Metionina) ou M oxidado.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (409)..(409)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (436)..(436)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser M (Met, Metionina) ou M oxidado.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (452)..(452)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (477)..(477)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (499)..(499)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser S (Ser, serina) ou S fosforilado</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (512)..(512)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA            &lt;222&gt; (515)..(515)            &lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA            &lt;222&gt; (518)..(518)            &lt;223&gt; Xaa pode ser M (Met, Metionina) ou M oxidado.</p> <p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA            &lt;222&gt; (524)..(524)            &lt;223&gt; Xaa pode ser M (Met, Metionina) ou M oxidado.</p> <p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA            &lt;222&gt; (559)..(559)            &lt;223&gt; Xaa pode ser M (Met, Metionina) ou M oxidado.</p> <p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA            &lt;222&gt; (569)..(569)            &lt;223&gt; Xaa pode ser T (Thr, treonina) ou T Fosforilada</p>



SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (586)..(586)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser S (Ser, serina) ou S fosforilado</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (599)..(599)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa representa Q ou Q desamidado em ácido glutâmico (ácido alfa-glutâmico), ácido gama-glutâmico (Glu) ou uma mistura de ácido alfa e gama-glutâmico</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (605)..(605)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser M (Met, Metionina) ou M oxidado.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (619)..(619)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser W (Trp, triptofano) ou W oxidado (por exemplo, quinurenina).</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (628)..(628)</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (640)..(640)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser M (Met, Metionina) ou M oxidado.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (651)..(651)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (663)..(663)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (666)..(666)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser K (lys, lisina) ou K acetilado</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p>

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto Livre sob <223>
	<p>&lt;222&gt; (689)..(689)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser K (lys, lisina) ou K acetilado</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (693)..(693)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser K (lys, lisina) ou K acetilado</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (695)..(695)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser W (Trp, triptofano) ou W oxidado.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (709)..(709)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; CARACTERÍSTICA MISTA</p> <p>&lt;222&gt; (735)..(735)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa pode ser Asn ou desamidada em Asp, isoAsp ou Asp/isoAsp</p>

## REIVINDICAÇÕES

1. Vírus adenoassociado recombinante não replicante (rAAV), caracterizado pelo fato de que apresenta um capsídeo de AAV que tem empacotado nele um genoma do vetor que compreende sequências de repetição terminal invertidas do AAV e pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica uma região de imunoglobulina (a), (b), (c) e (d), e em que cada uma das regiões de imunoglobulina (a), (b), (c) e (d) é expressa a partir do rAAV, em que

(a) é uma primeira região de imunoglobulina tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1: (Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ile Ser Ile Phe Asp Ile Tyr Ala Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Val Ser Phe Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Val Ser Leu Tyr Arg Asp Pro Leu Gly Val Ala Gly Gly Ile Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser);

(b) uma segunda região de imunoglobulina tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2: (Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Ala Leu Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala Gln Gly Gln Trp Arg Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Glu Tyr Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser);

(c) uma terceira região de imunoglobulina tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 3: (Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Asn Lys Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala

Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Leu Cys Ile Ser Lys Ser Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Thr Ala Gly Gly Gly Leu Cys Trp Asp Gly Thr Thr Phe Ser Arg Leu Ala Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser);

e

(d) uma quarta região de imunoglobulina tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:4: (Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Asn Thr Asp Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Trp Gly Gly Pro Glu Pro Thr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser).

2. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a primeira, segunda, terceira e/ou quarta regiões de imunoglobulina estão em um construto de fusão que compreende ainda uma região Fc, em que há opcionalmente uma sequência de ligação que une as quatro regiões de imunoglobulina e a região Fc.

3. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o construto de fusão compreende ainda a sequência de ligação localizada entre duas ou mais das regiões de imunoglobulina.

4. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que cada sequência de ligação é independentemente selecionada.

5. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de

acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma sequência de ligação é GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 7).

6. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o genoma do vetor compreende um peptídeo sinal de uma fonte exógena à imunoglobulina no terminal amino da primeira imunoglobulina.

7. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o peptídeo sinal é um peptídeo sinal da interleucina-2 humana.

8. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o genoma do vetor compreende um cassete de expressão monocistrônico.

9. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o genoma do vetor compreende um cassete de expressão bicistrônico.

10. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que duas das regiões da imunoglobulina são ligadas a um primeiro Fc para formar uma primeira cadeia e as outras duas regiões da imunoglobulina são ligadas a um segundo Fc para formar uma segunda cadeia.

11. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que o genoma do vetor compreende um IRES ou uma sequência F2A.

12. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o genoma do vetor compreende uma 5' UTR.

13. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a 5' UTR é um fragmento de 5' UTR de c-myc humano.

14. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o genoma do vetor compreende uma repetição terminal invertida 5' de AAV de fita única e uma repetição terminal invertida 3' de AAV.

15. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que o genoma do vetor codifica um construto de fusão anti-influenza tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 12, ou SEQ ID NO: 30.

16. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que o genoma do vetor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 31 e SEQ ID NO: 32.

17. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o rAAV tem um capsídeo de AAVhu68, em que o capsídeo de AAVhu68 compreende:

uma população heterogênea de proteínas vp1 de AAVhu68 selecionadas dentre: proteínas vp1 produzidas pela expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos prevista de 1 a 736 da SEQ ID NO: 16, proteínas vp1 produzidas a partir da SEQ ID NO: 18, ou proteínas vp1 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 18 que codifica a sequência de aminoácidos prevista de 1 a 736 da SEQ

ID NO: 16,

uma população heterogênea de proteínas vp2 de AAVhu68 selecionadas dentre: proteínas vp2 produzidas pela expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos prevista pelo menos de cerca dos aminoácidos 138 a 736 da SEQ ID NO:16, proteínas vp2 produzidas a partir de uma sequência compreendendo pelo menos os nucleotídeos 412 a 2211 da SEQ ID NO: 18, ou proteínas vp2 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica aos pelo menos nucleotídeos 412 a 2211 da SEQ ID NO: 18 que codificam a sequência de aminoácidos prevista pelo menos de cerca dos aminoácidos 138 a 736 da SEQ ID NO: 16,

uma população heterogênea de proteínas vp3 de AAVhu68 selecionadas dentre: vp3 produzidas pela expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos prevista pelo menos de cerca dos aminoácidos 203 a 736 da SEQ ID NO: 16, proteínas vp3 produzidas a partir de uma sequência compreendendo pelo menos os nucleotídeos 607 a 2211 da SEQ ID NO: 18, ou proteínas vp3 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica aos pelo menos nucleotídeos 607 a 2211 da SEQ ID NO: 18 que codificam a sequência de aminoácidos prevista pelo menos de cerca dos aminoácidos 203 a 736 da SEQ ID NO: 16.

18. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que a sequência de ácido nucleico que codifica as proteínas é a SEQ ID NO: 18, ou uma sequência pelo menos 80% a pelo menos 99% idêntica à SEQ ID NO: 18 que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16.

19. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que a



sequência é pelo menos 80% a 97% idêntica à SEQ ID NO: 18.

20. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o AAV tem um capsídeo de AAV9, em que o referido capsídeo do AAV9 compreende proteínas de capsídeo vp1 tendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 17 ou uma sequência de aminoácidos codificada pela SEQ ID NO: 36.

21. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um veículo, diluente ou excipiente e um estoque do pelo menos rAAV não replicante, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 20.

22. Composição, de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que a composição é formulada para administração intranasal.

23. Composição, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a composição é formulada para administração intramuscular ou intravenosa.

24. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 23, caracterizado pelo fato de que é útil para vacinação ou imunização de pacientes humanos contra influenza.

25. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV) ou composição, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que é adaptado para dosagem de um paciente para via intranasal com cerca de  $10^9$  a cerca de  $7 \times 10^{13}$  GC de rAAV.

26. Uso do rAAV, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 20, ou composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 21 a 25, caracterizado pelo fato de que é para proteção de pacientes humanos contra influenza.

27. Método para imunização de pacientes humanos contra influenza, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade eficaz do rAAV, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 20, ou da composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 21 a 25.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o paciente é administrado com uma dose por via intranasal em uma quantidade de cerca de  $10^9$  a cerca de  $7 \times 10^{13}$  GC de rAAV.

29. Produto, caracterizado pelo fato de que compreende um recipiente compreendendo um rAAV, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 20, diluente opcional e instruções para a administração.

FILE 1A

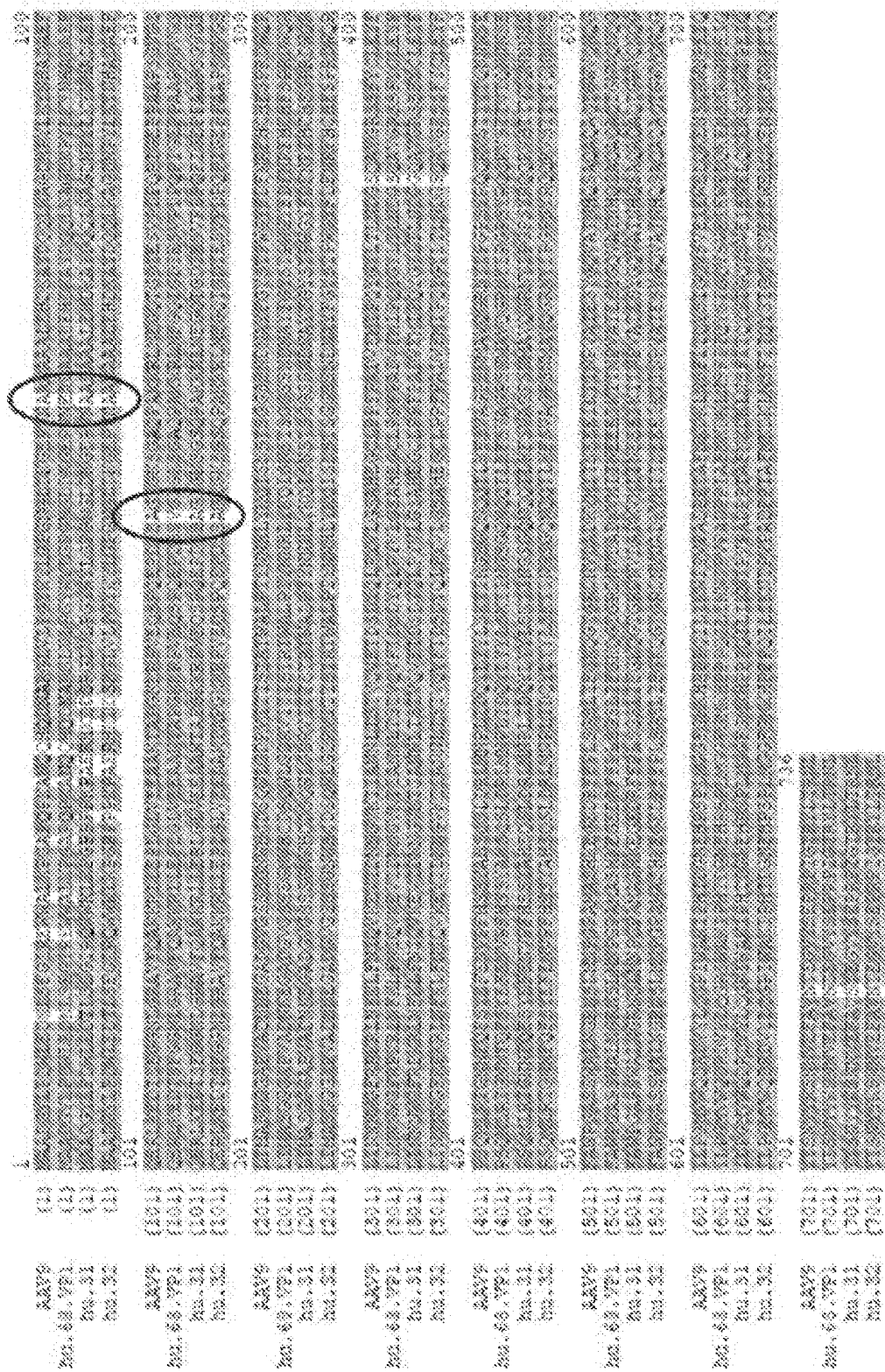


FIG 1B

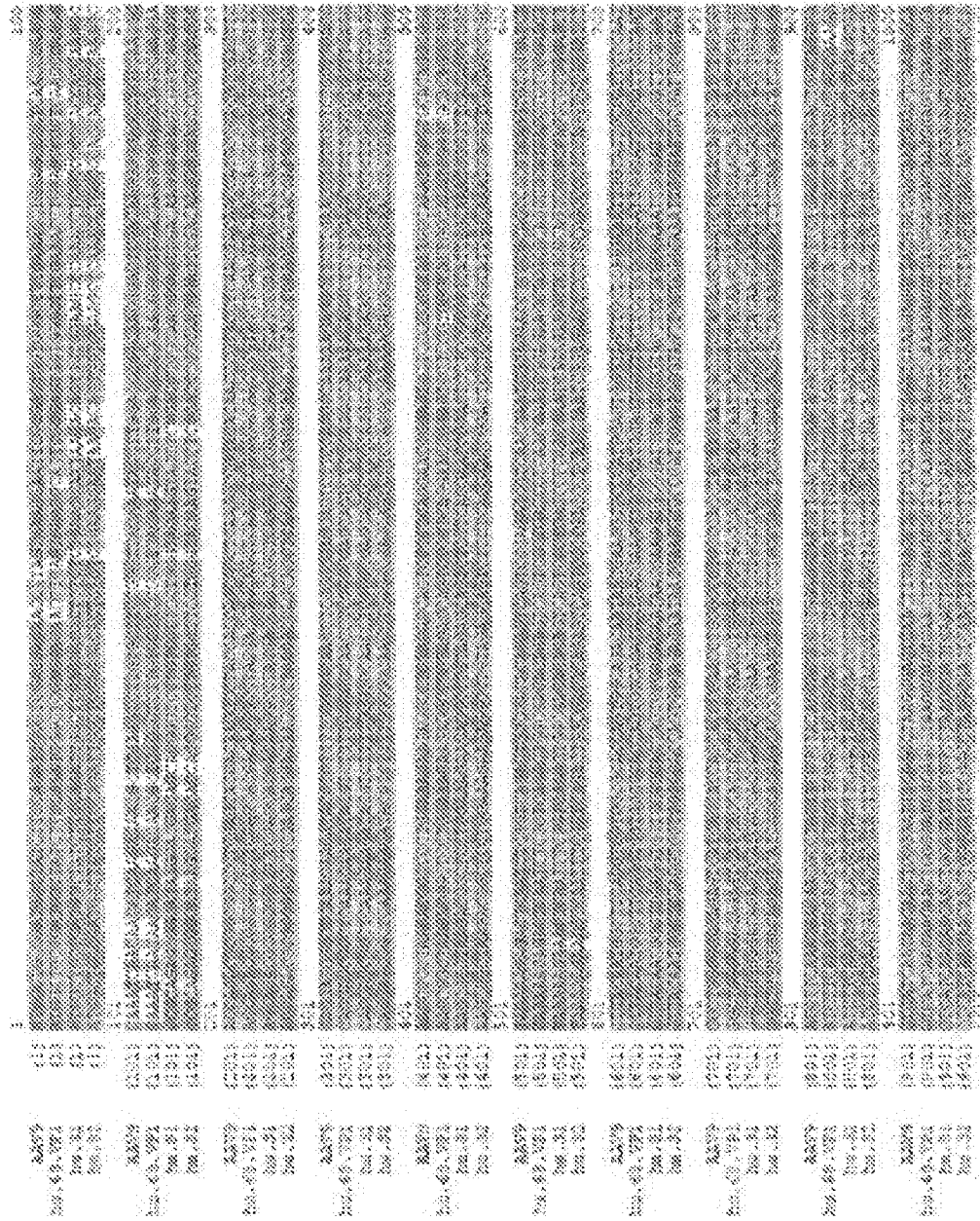


FIG 1C

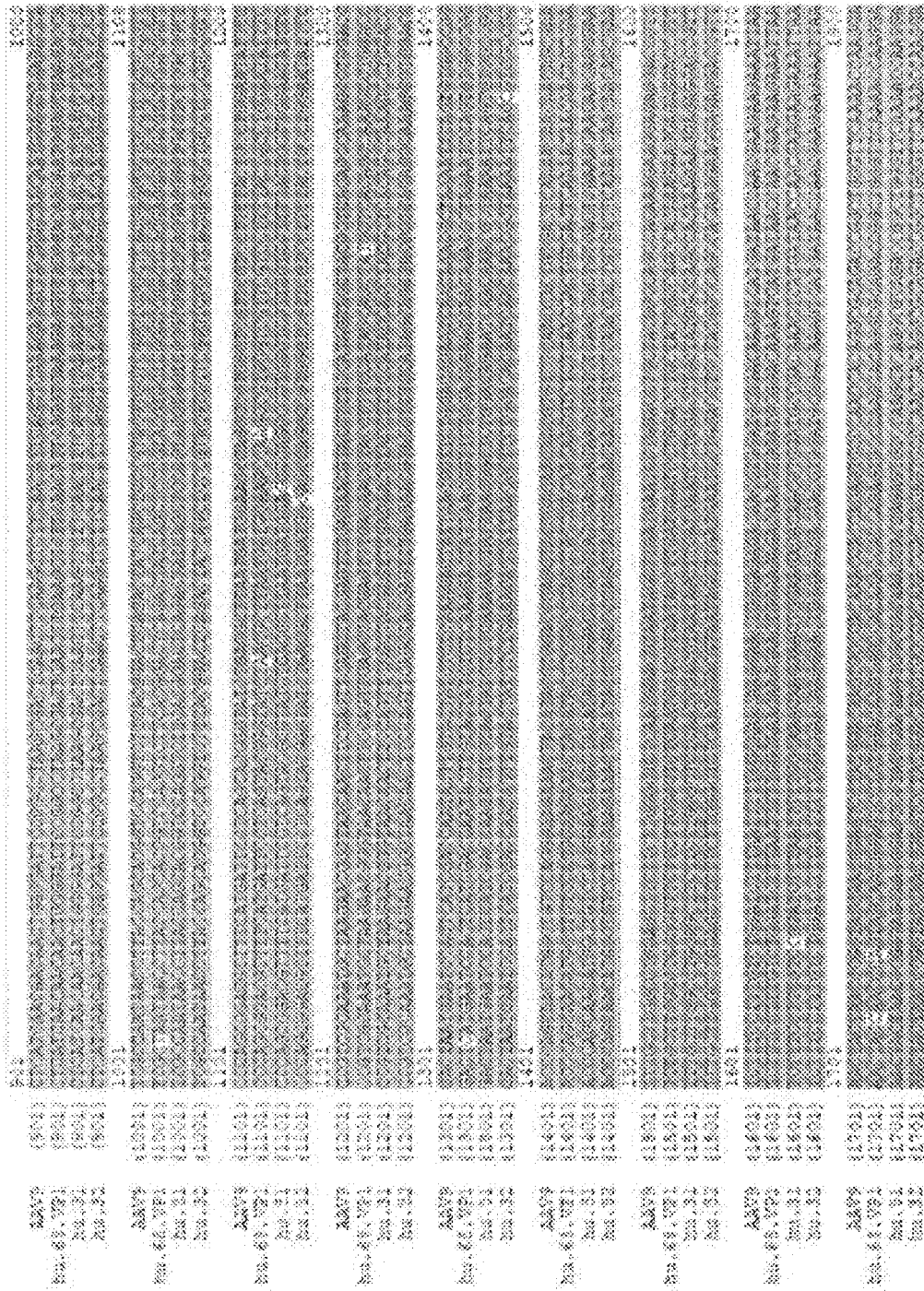


FIG 1D

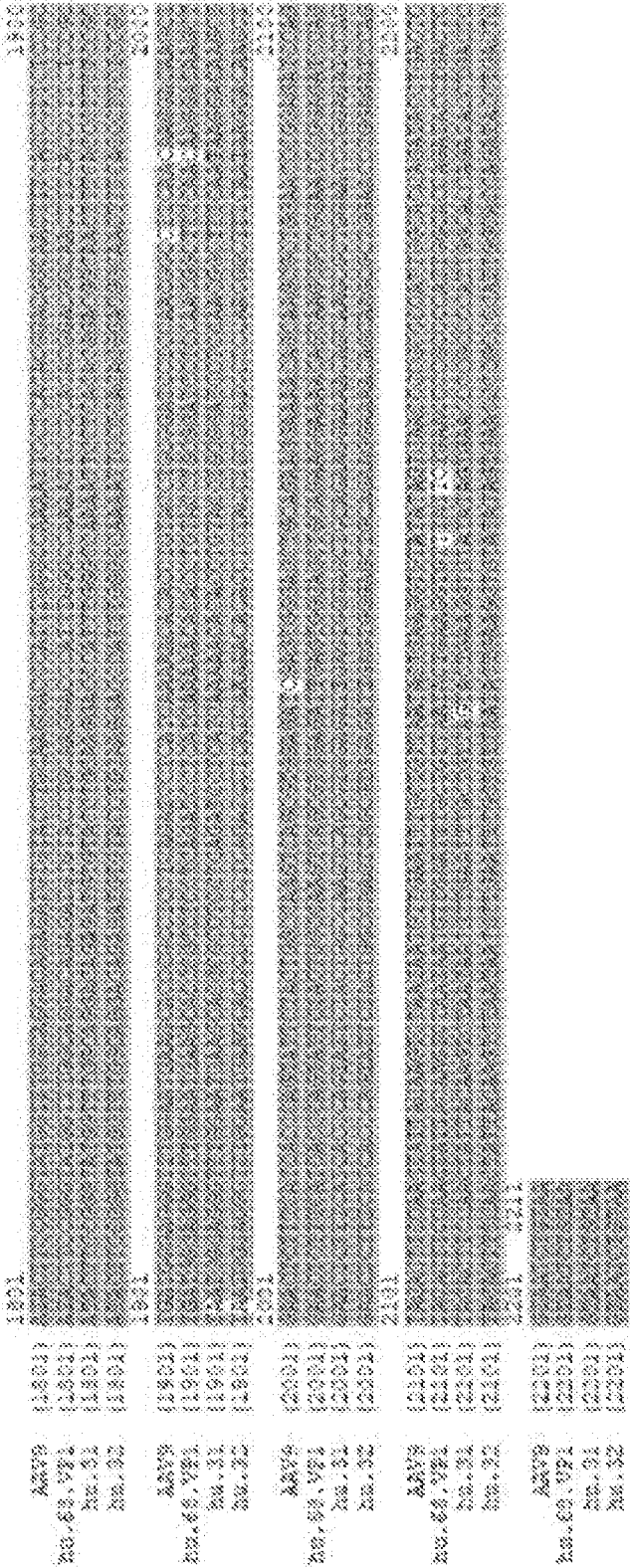


FIG 2A

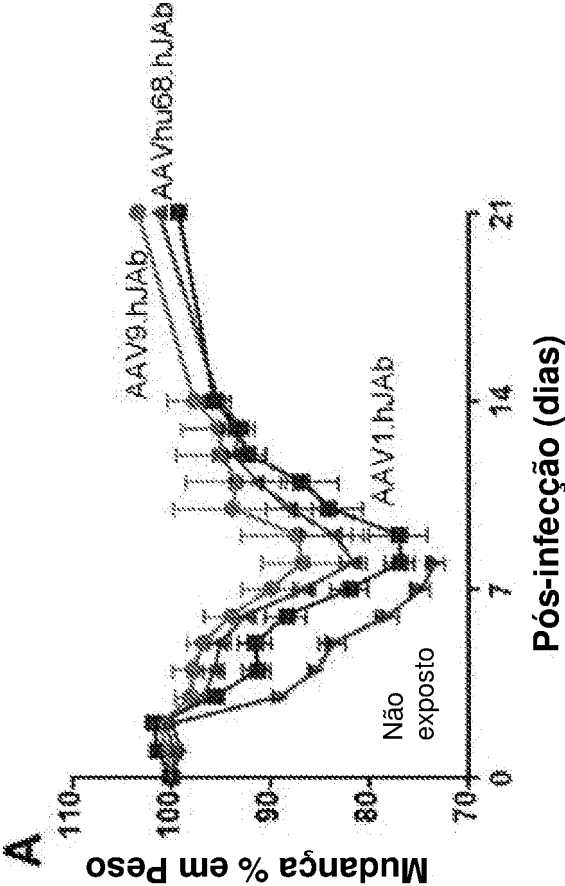


FIG 2B

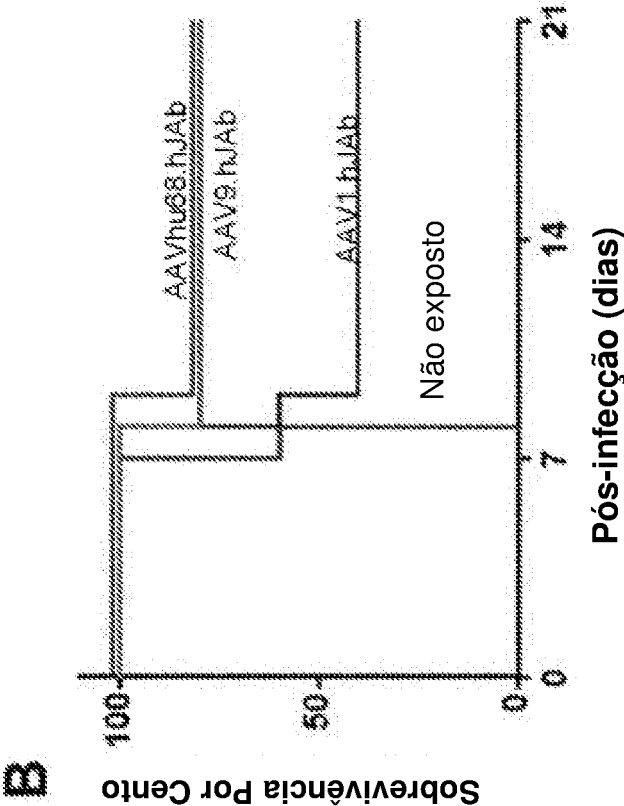


FIG 3B

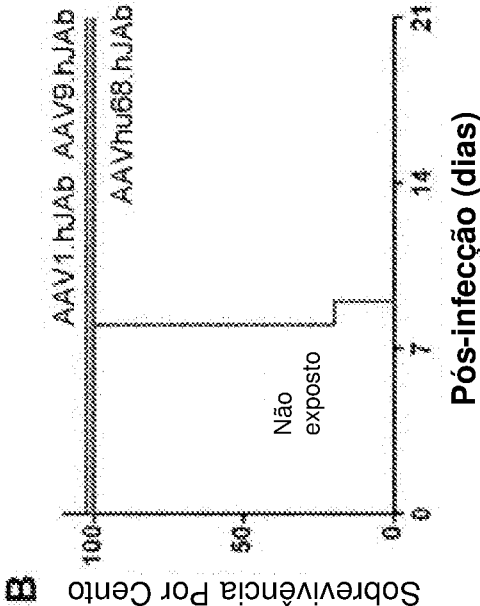


FIG 3A

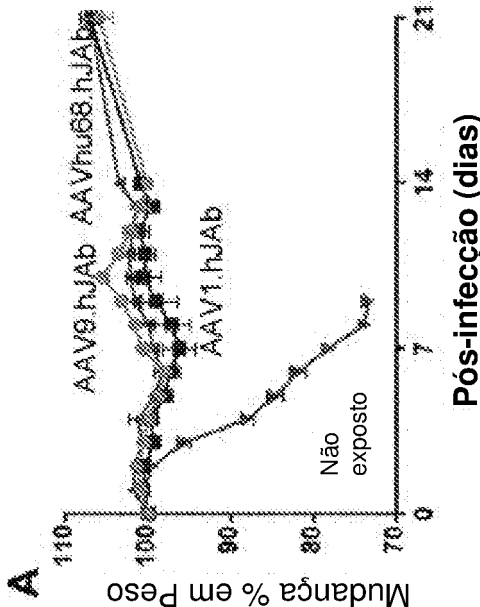




FIG 4

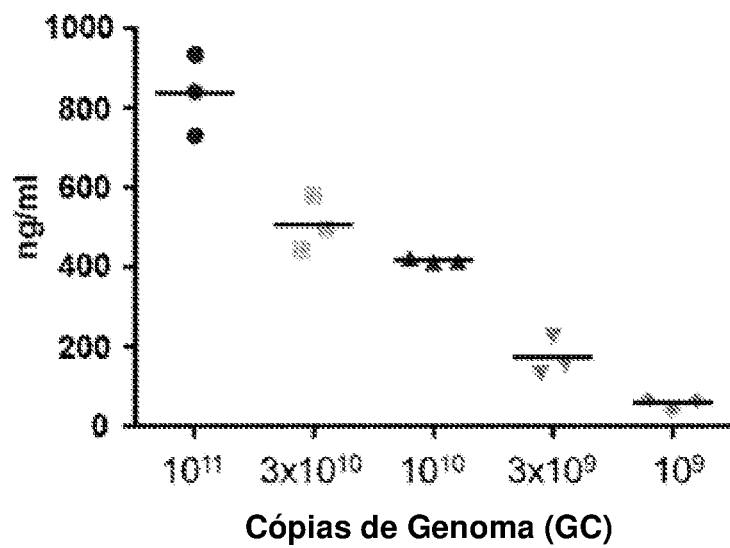


FIG 5A

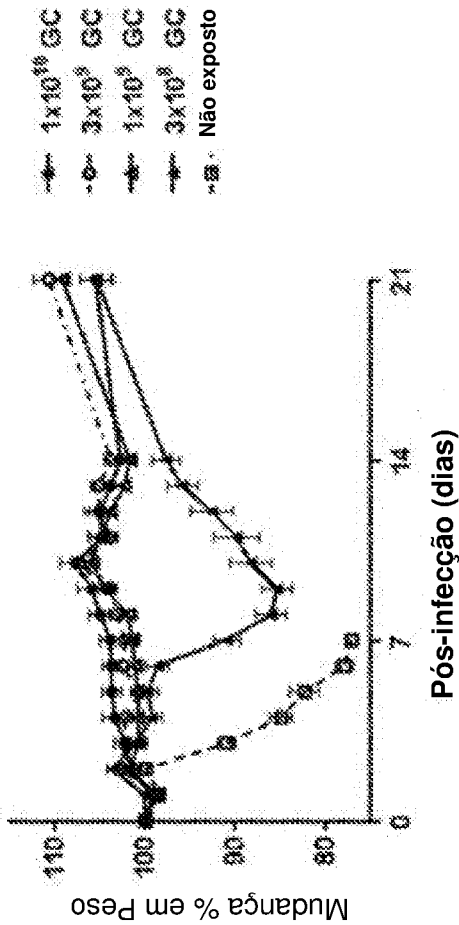
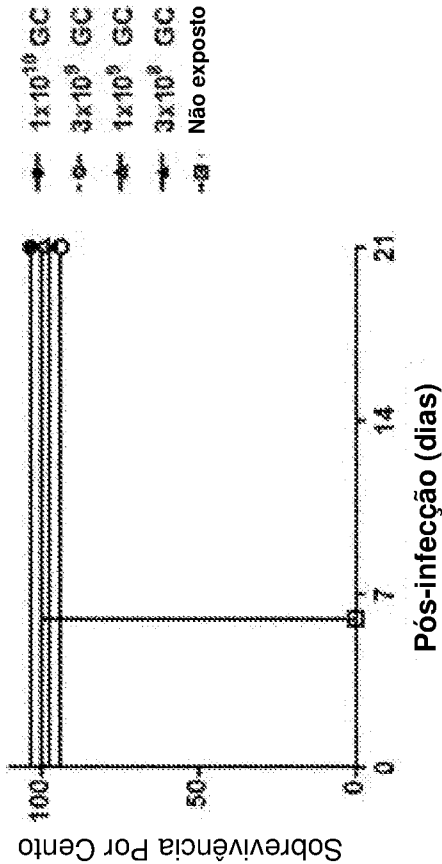


FIG 5B



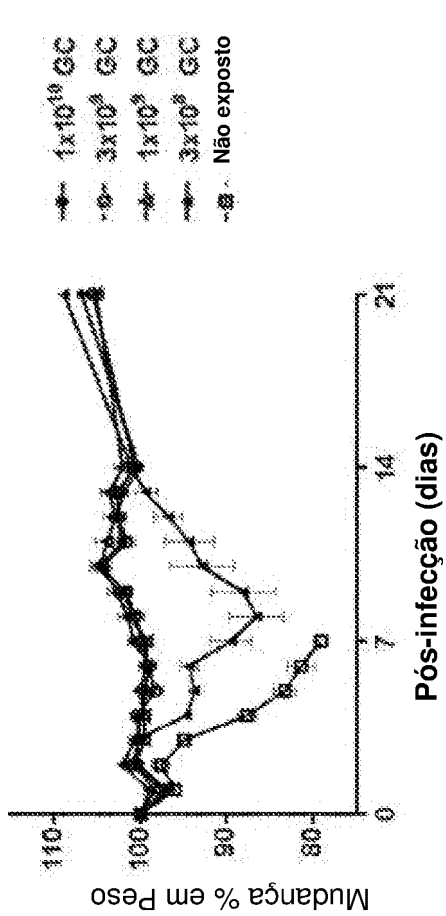


FIG 6A

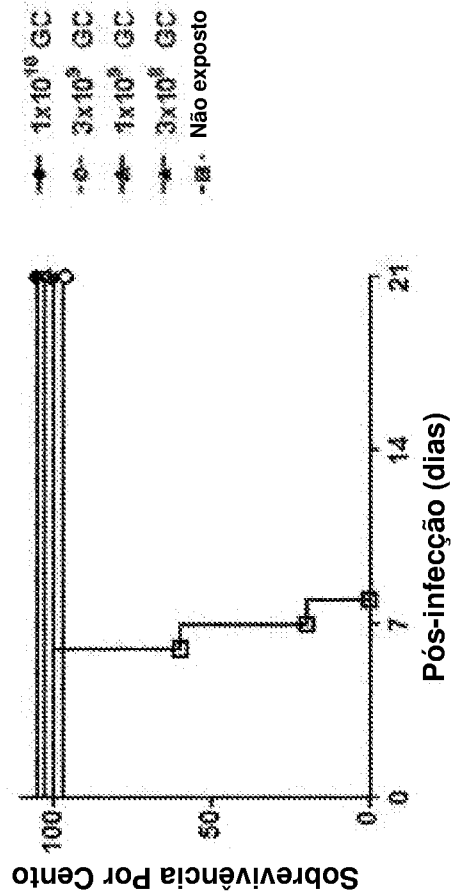
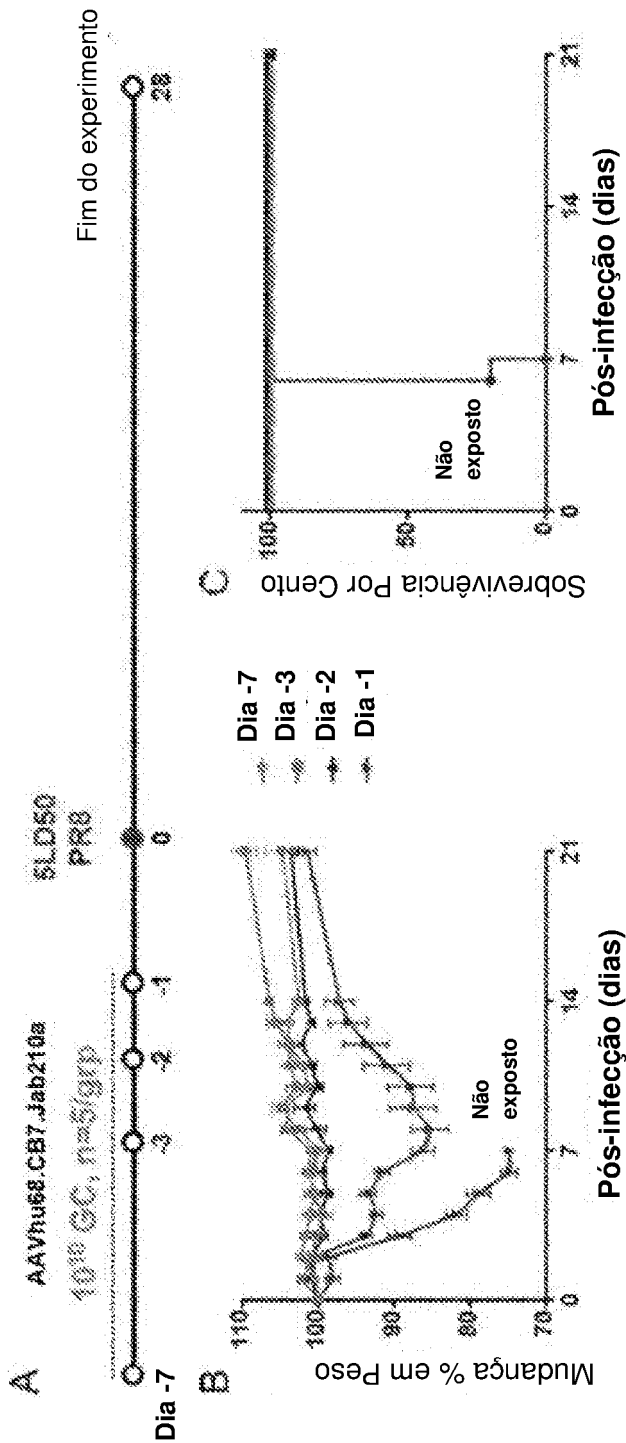
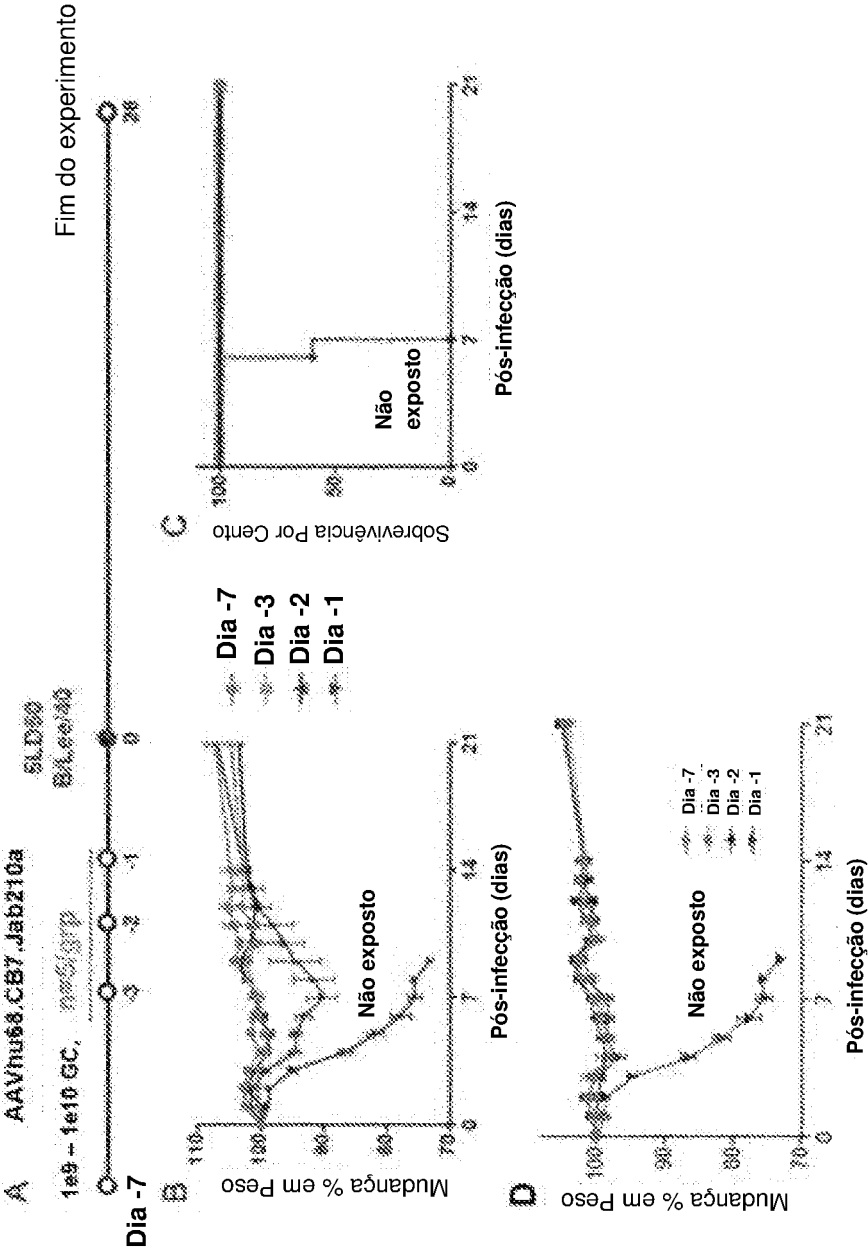


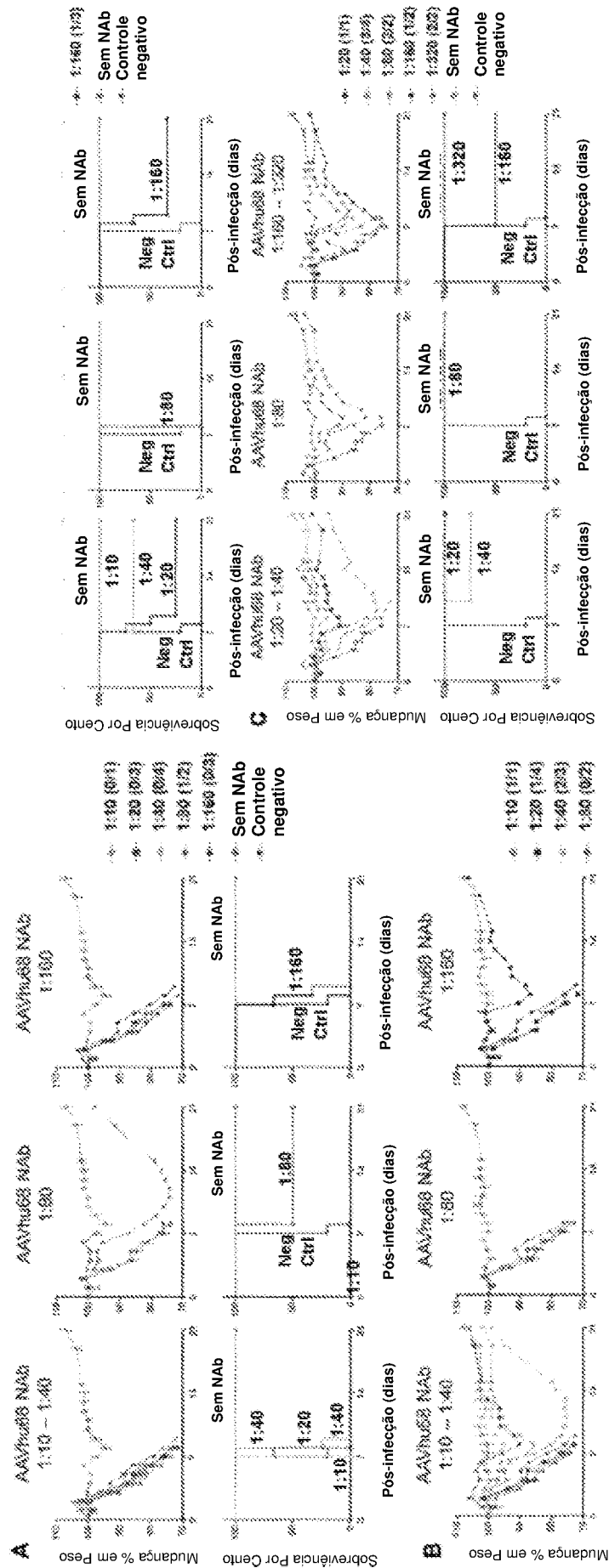
FIG 6B

FIG 7A-7C



FIGS 8A-8D





FIGS. 9A-9C

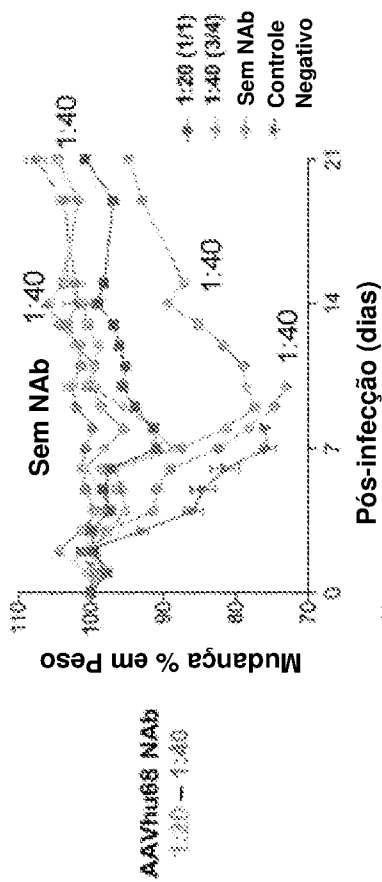


FIG. 9D

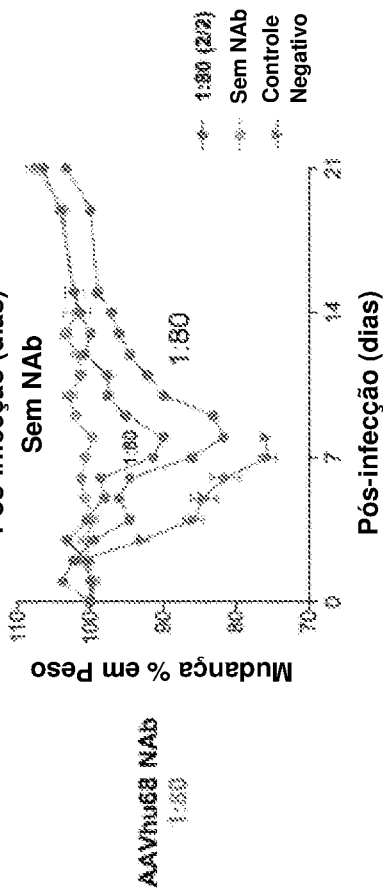


FIG. 9E

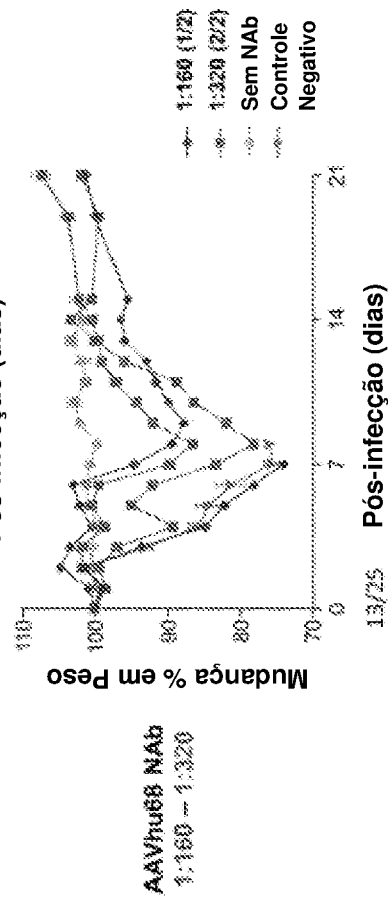


FIG. 9F

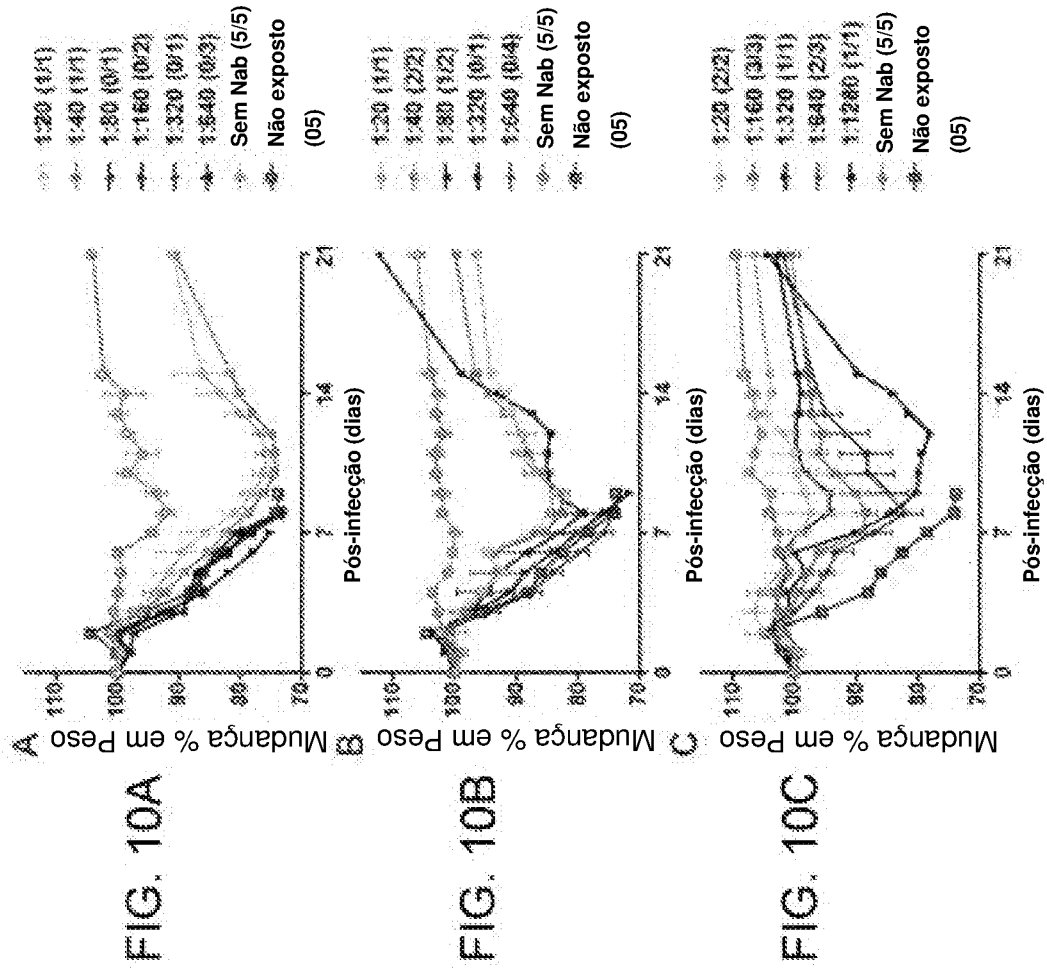




FIG 11

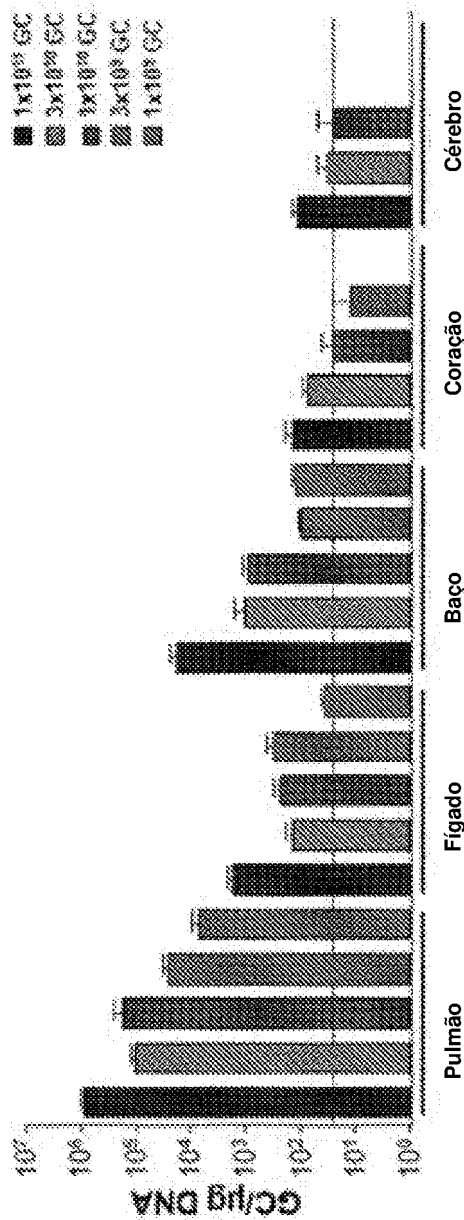


FIG 12A

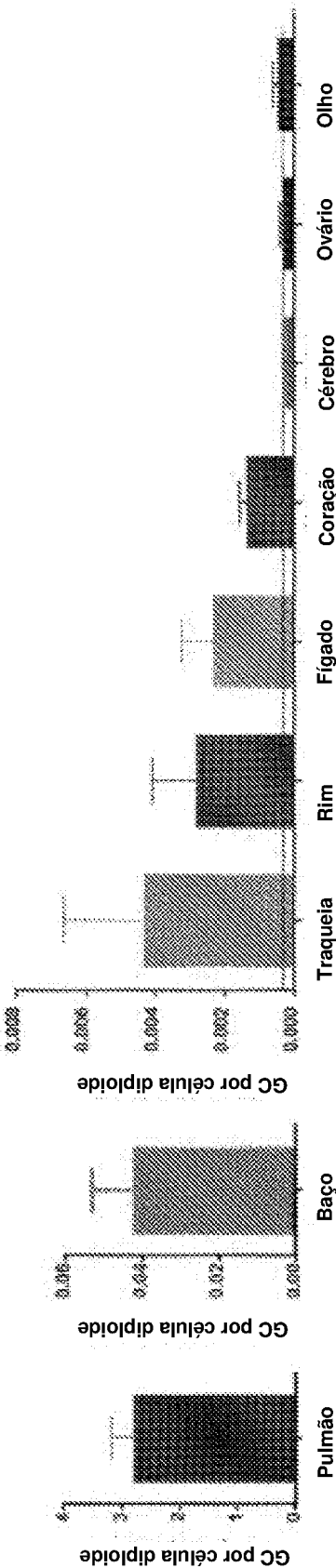


FIG 12B

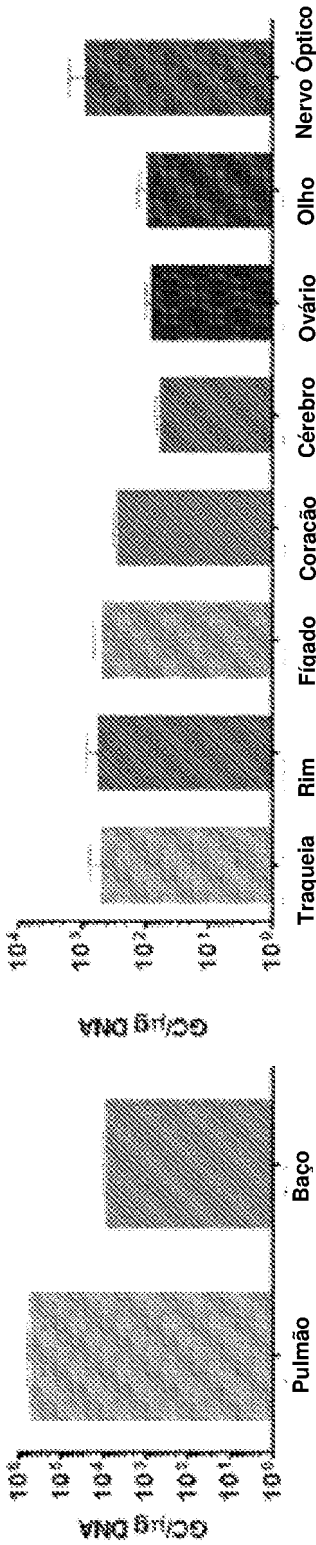


FIG 13A

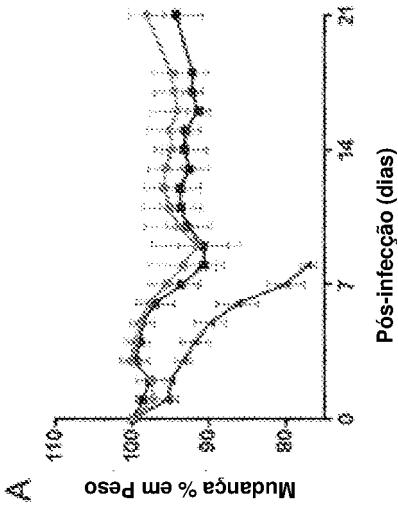
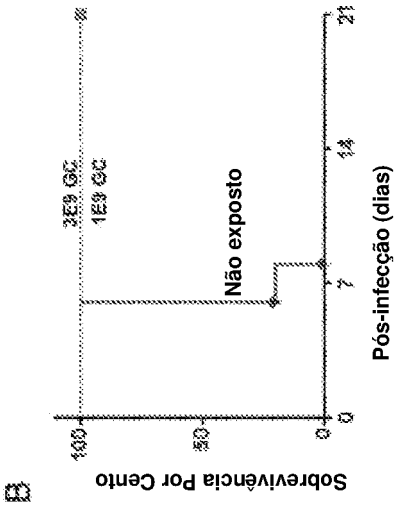


FIG 13B



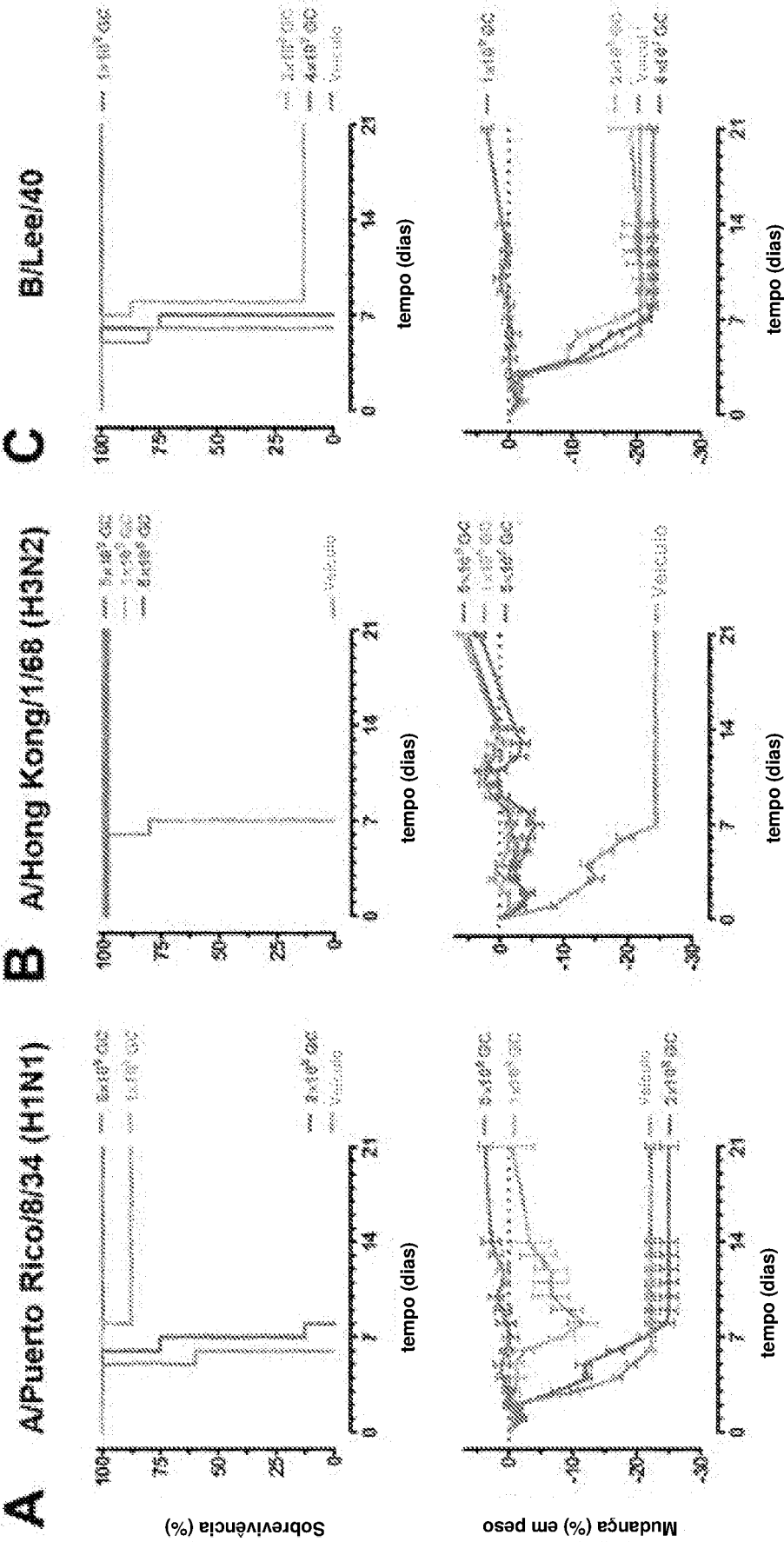
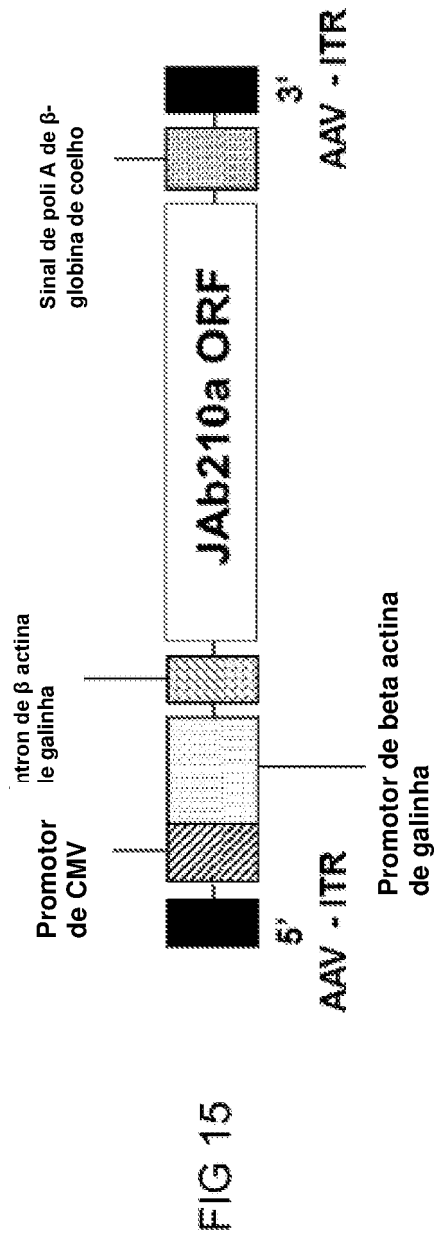


FIG 14



**FIG 16**

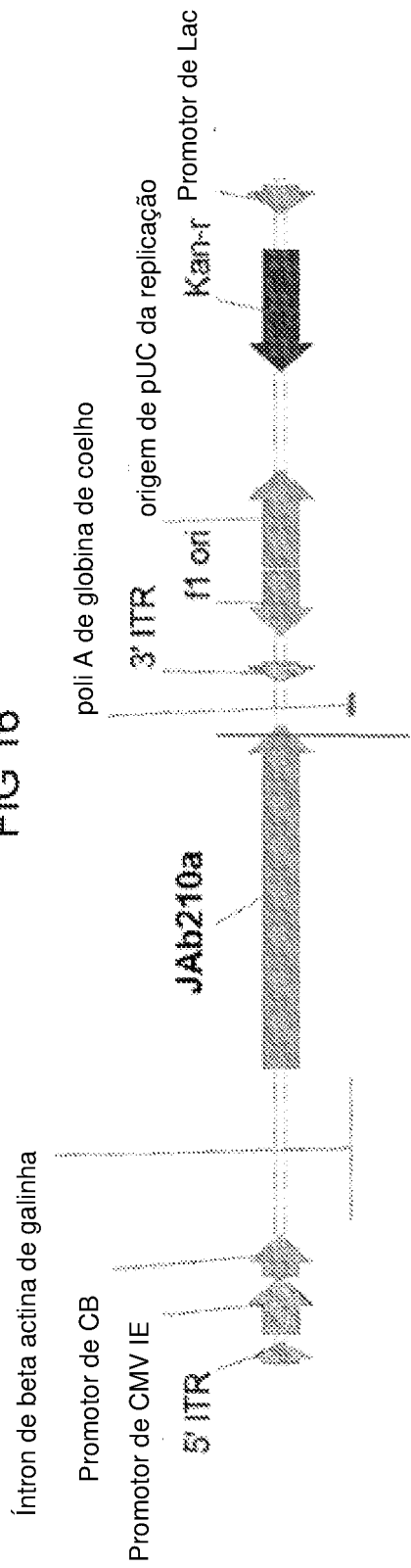
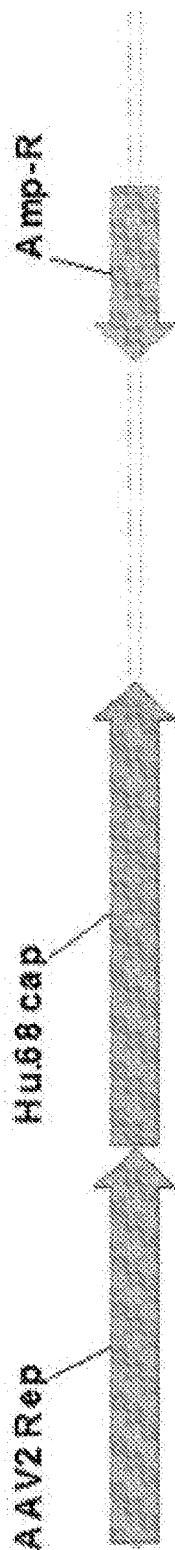
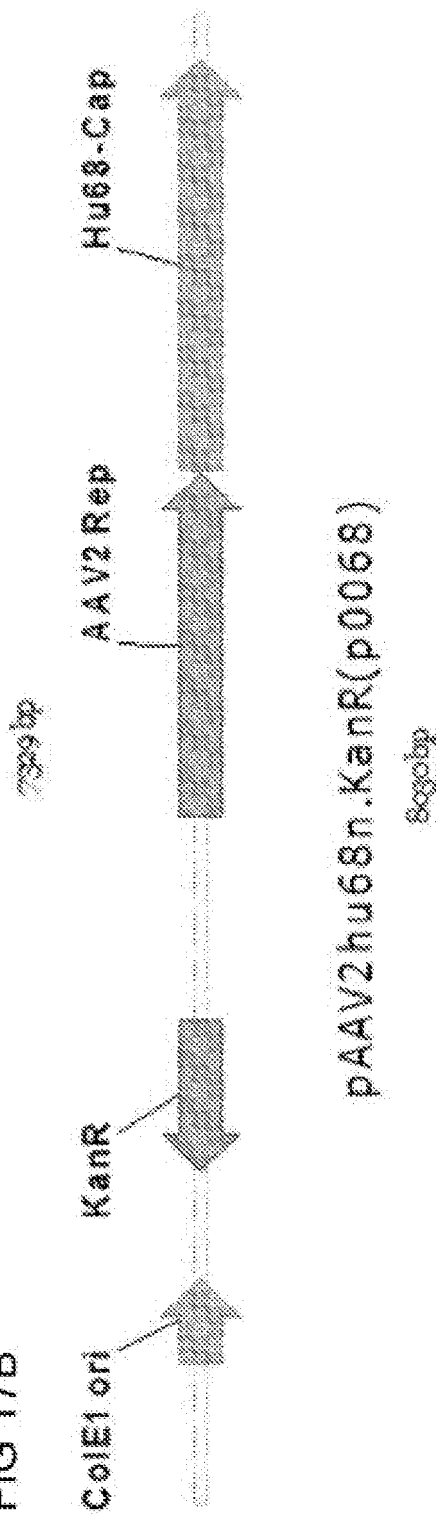


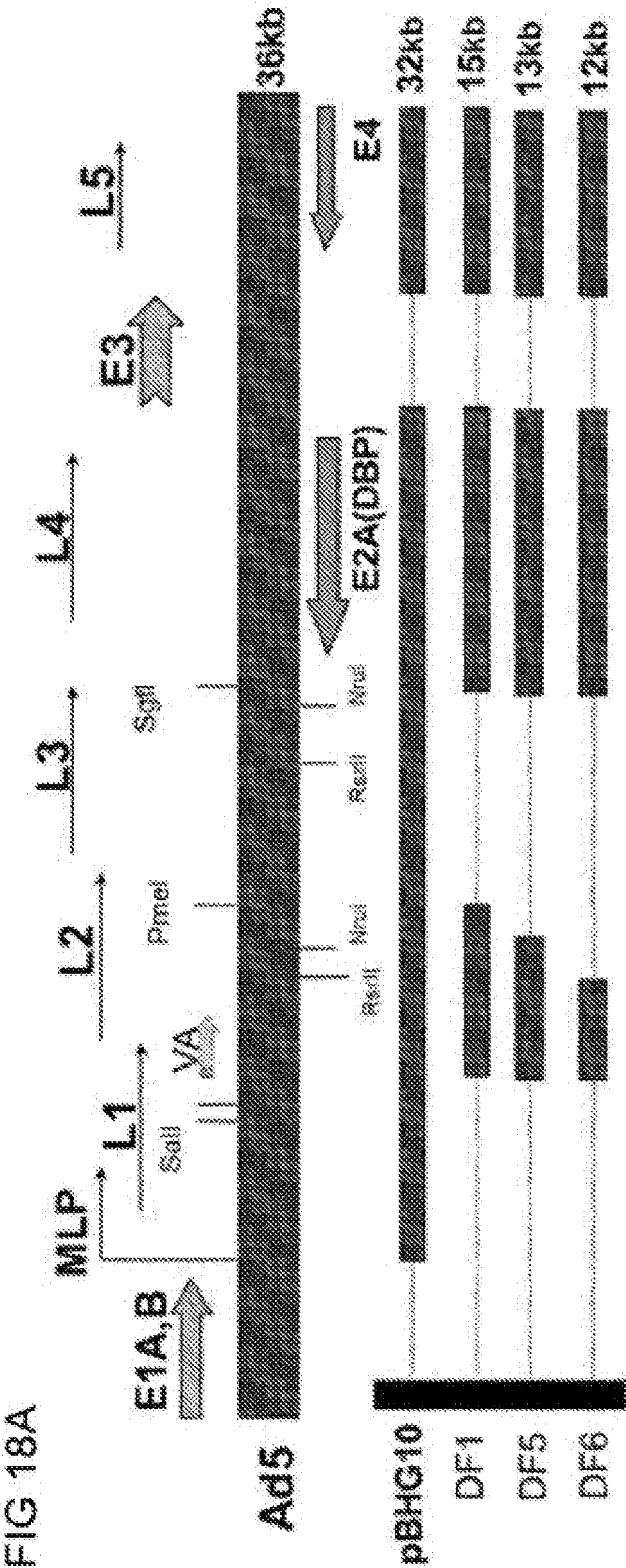
FIG 17A



pAAV2/hu.68 (p0065)

FIG 17B





DF1= Fragmentos de pBHG10 menos MLP para Sall e de PmeI/SgfI  
DF5= Fragmento de DF1 menos NruI/NruI (2,3 kb)  
DF6= Fragmento de DF5 menos RsrII/NruI (0,5 kb)

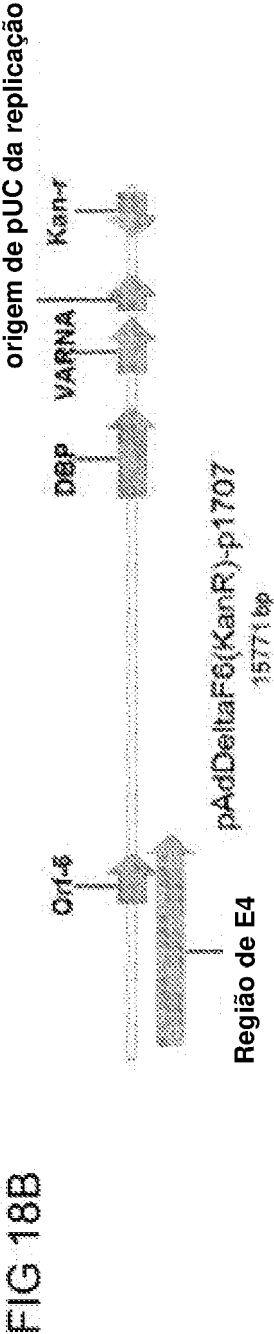


FIG 19A

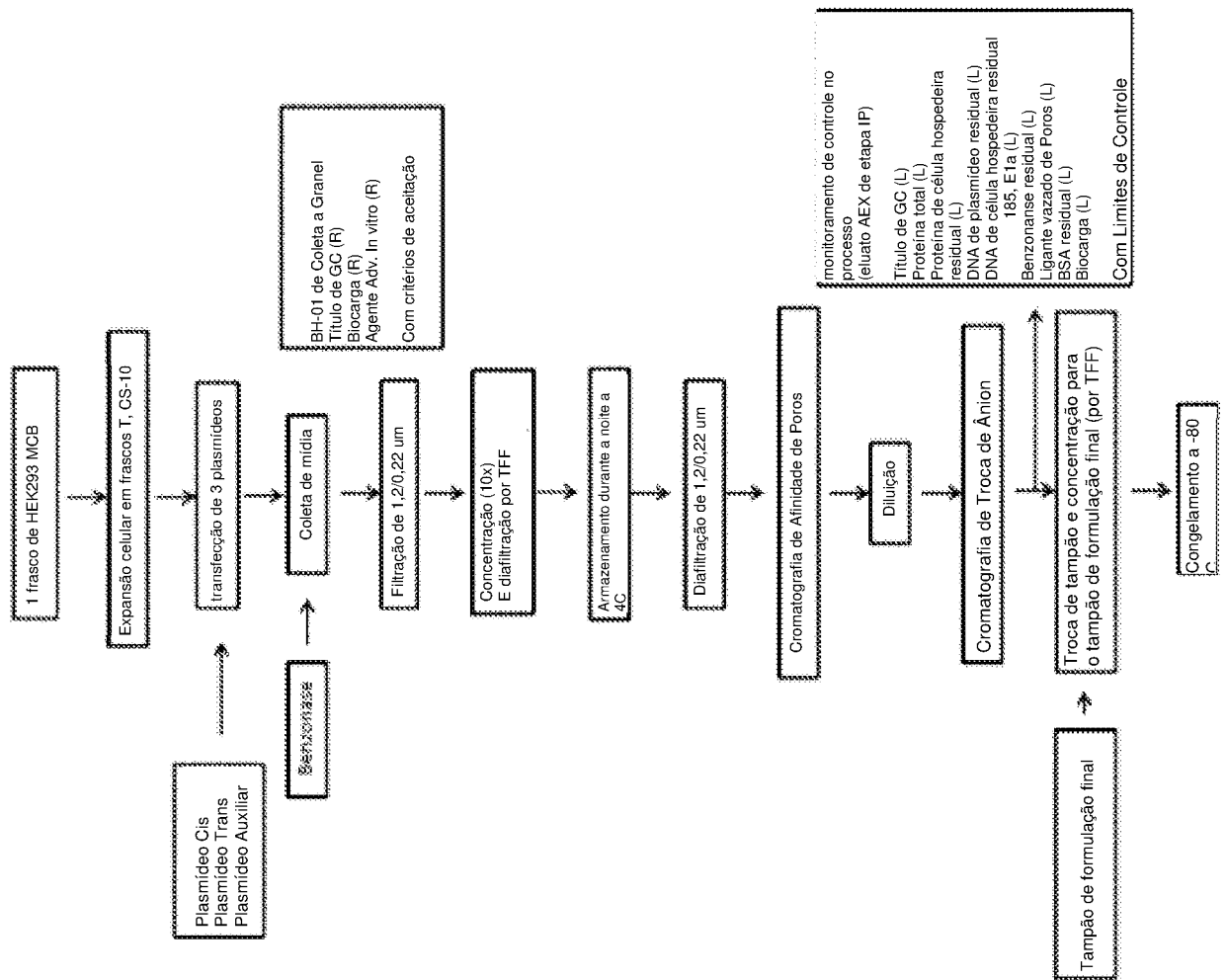
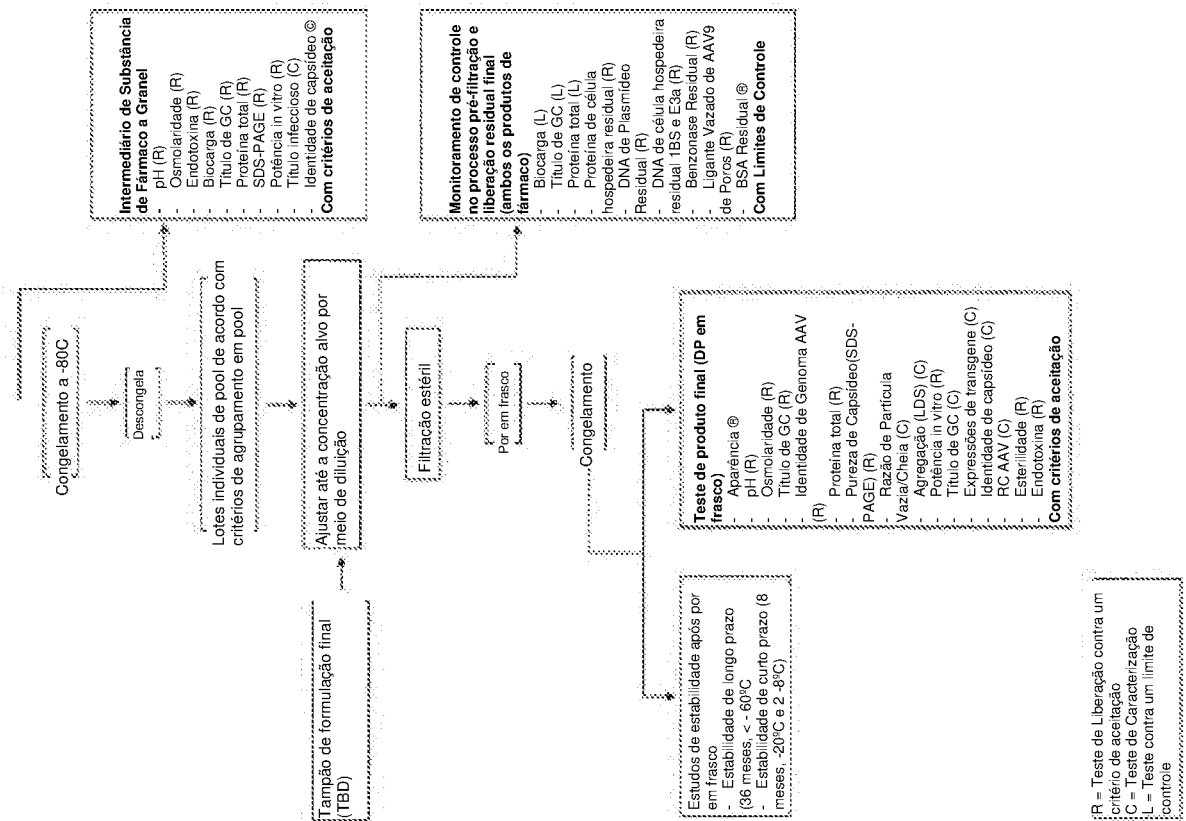


FIG 19B





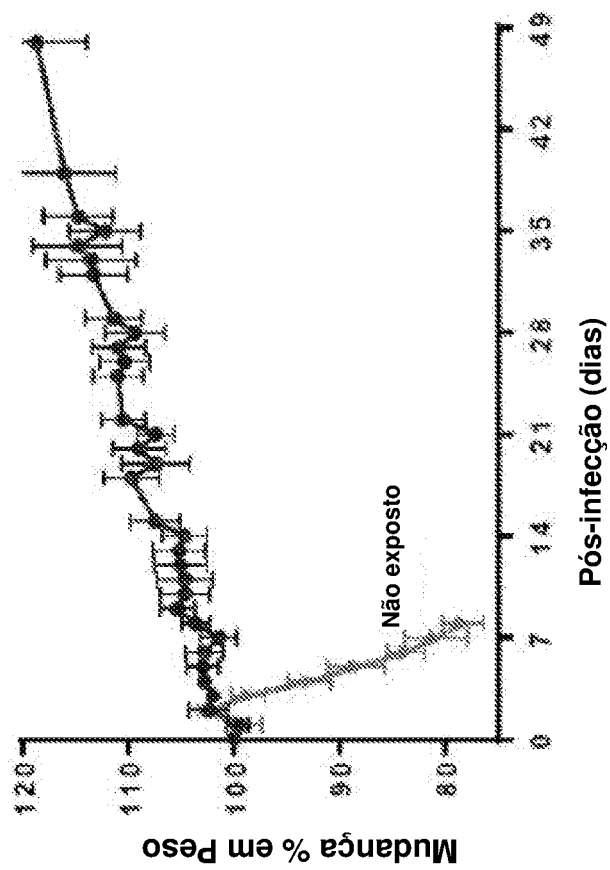


FIG 20

FIG 21A

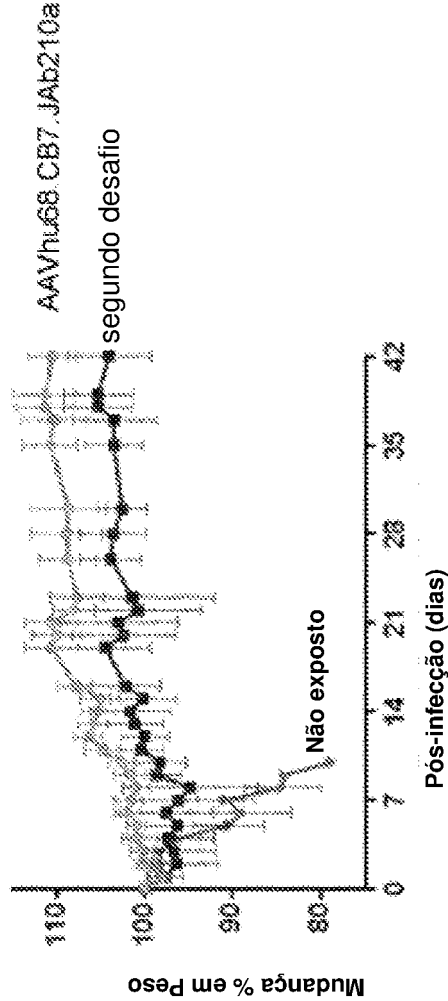


FIG 21B

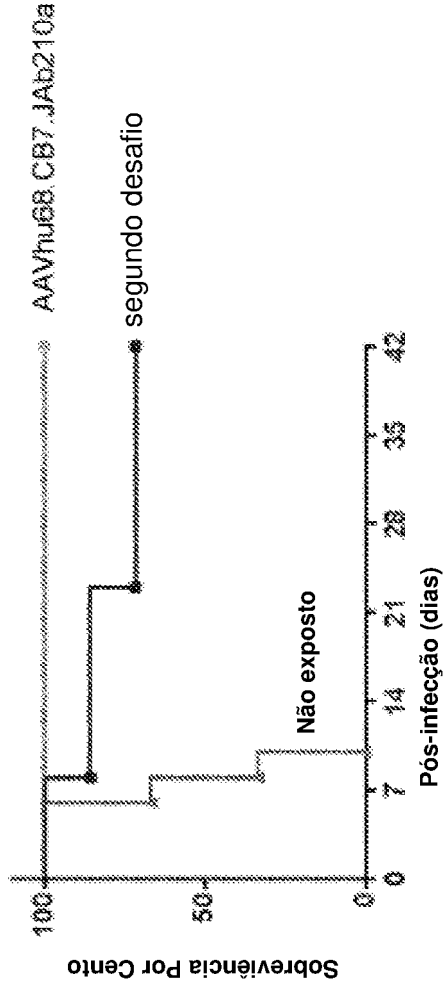
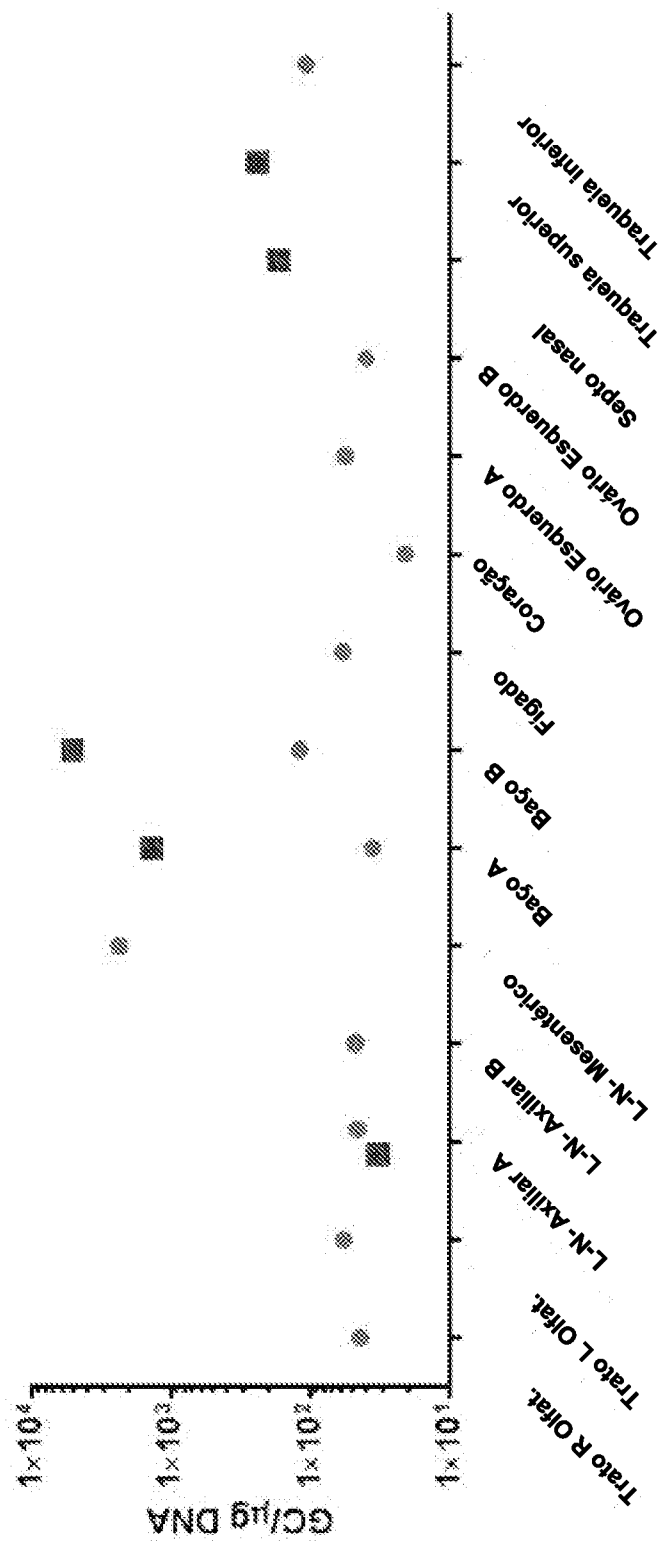


FIG 22



## RESUMO

Patente de Invenção: "**VACINAS CONTRA INFLUENZA BASEADAS EM VETORES DE VÍRUS ADENOASSOCIADO (AAV)**".

São fornecidos vírus associados a adenoassociados recombinantes não replicantes (rAAV) tendo um capsídeo de AAV que tem empacotado nele um genoma do vetor que compreende sequências de repetição terminal invertidas do AAV e pelo menos uma sequência de ácido nucleico que codifica quatro regiões de imunoglobulina diferentes (a), (b), (c) e (d). As imunoglobulinas expressas pelo rAAV são úteis para proporcionar imunização passiva contra influenza A e influenza B. Também são descritas neste documento composições que contêm o rAAV. São fornecidos métodos de vacinação de pacientes contra influenza.

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

### **Código de Controle**

Campo 1



Campo 2



### **Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA (JUNTADA) P241832.TXT
- Data de Geração do Código: 30/10/2019
- Hora de Geração do Código: 10:14:38
- Código de Controle:
  - Campo 1: 69A9CAA7E2E31703
  - Campo 2: 1135B1381C5EBFFA