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

(21) BR 112020013319-1 A2

(22) Data do Depósito: 18/01/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 01/12/2020

(54) Título: VETORES DE DNA DE EXTREMIDADE FECHADA OBTENÍVEIS A PARTIR DE SÍNTESE LIVRE DE CÉLULAS E PROCESSO PARA OBTER VETORES DE CEDNA

(51) Int. Cl.: C12N 15/09; C12N 15/63; C12N 15/64; C12N 15/66; C12N 15/86.

(30) Prioridade Unionista: 19/01/2018 US 62/619,392.

(71) Depositante(es): GENERATION BIO CO..

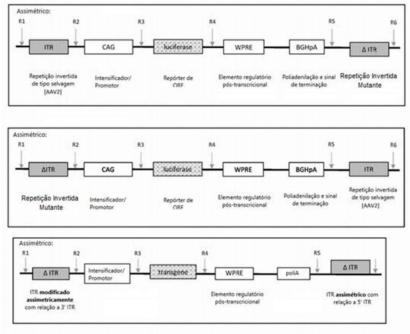
(72) Inventor(es): OZAN ALKAN; ROBERT MICHAEL KOTIN; MATTHEW STANTON; DOUGLAS ANTHONY KERR; CAROLYN PELLETIER.

(86) Pedido PCT: PCT US2019014122 de 18/01/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/143885 de 25/07/2019

(85) Data da Fase Nacional: 29/06/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a métodos para síntese sintética e síntese livre de células de vetores de DNA, particularmente vetores de DNA de extremidade fechada (por exemplo, vetores de ceDNA) que têm estrutura linear e contínua para entrega e expressão de um transgene. A presente invenção se refere a um processo in vitro para a produção de vetores de DNA de extremidade fechada, produtos de vetor de DNA correspondentes produzidos pelos métodos e usos dos mesmos, e oligonucleotídeos e kits úteis no processo da invenção. Os vetores de DNA produzidos utilizando os métodos descritos no presente documento estão livres de efeitos colaterais indesejados devido a contaminantes introduzidos durante a produção em linhagens de células, por exemplo, linhas de células bacterianas ou de insetos. São ainda fornecidos no presente documento métodos e linhagens de células para expressão gênica confiável in vitro, ex vivo e in vivo com o uso dos vetores de ceDNA sintetizados utilizando os métodos descritos no presente documento.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VETORES DE DNA DE EXTREMIDADE FECHADA OBTENÍVEIS A PARTIR DE SÍNTESE LIVRE DE CÉLULAS E PROCESSO PARA OBTER VETORES DE ceDNA".**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica benefício de acordo com 35 USC § 119(e) do Pedido Provisório nº US 62/619.392, depositado em 19 de janeiro de 2018, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] O pedido instantâneo contém uma Listagem de Sequências que foi enviada eletronicamente no formato ASCII e é incorporada a título de referência em sua totalidade. A dita cópia em ASCII, criada em 17 de janeiro de 2019, é nomeada 080170-091310-WOPT_SL.txt e tem 102.804 bytes de tamanho.

CAMPO DA TÉCNICA

[003] A presente invenção refere-se ao campo de terapia gênica, incluindo a produção de vetores não virais para a finalidade de expressar um transgene ou polinucleotídeos isolados em um sujeito ou célula. Por exemplo, a presente descrição fornece métodos livres de células para sintetizar vetores de DNA não virais. A descrição também se refere aos construtos de ácido nucleico produzidos por esse meio e métodos de seu uso.

ANTECEDENTES

[004] A terapia gênica visa melhorar os resultados clínicos de pacientes que sofrem de mutações genéticas ou doenças adquiridas causadas por uma aberração no perfil de expressão gênica. A terapia gênica inclui o tratamento ou a prevenção de condições médicas que resultam de genes defeituosos ou regulação ou expressão anormal, por exemplo, subexpressão ou superexpressão, que podem resultar

em um distúrbio, doença, malignidade, etc. Por exemplo, uma doença ou distúrbio causado por um gene defeituoso pode ser tratado, prevenido ou amenizado pela entrega de um material genético corretivo a um paciente ou pode ser tratado, prevenido ou amenizado pela alteração ou silenciamento de um gene defeituoso, por exemplo, com um material genético corretivo para um paciente, resultando na expressão terapêutica do material genético dentro do paciente.

[005] A base da terapia gênica é fornecer um cassete de transcrição com um produto gênico ativo (às vezes denominado transgene), por exemplo, que pode resultar em um efeito positivo de ganho de função, um efeito negativo de perda de função ou outro resultado. A terapia gênica também pode ser usada para tratar uma doença ou malignidade causada por outros fatores. Os distúrbios monogênicos humanos podem ser tratados pela entrega e expressão de um gene normal nas células-alvo. A entrega e a expressão de um gene corretivo nas células-alvo do paciente podem ser realizadas através de vários métodos, incluindo o uso de vírus geneticamente modificados e vetores de entrega de genes virais. Entre os muitos vetores derivados de vírus disponíveis (por exemplo, retrovírus recombinante, lentivírus recombinante, adenovírus recombinante e similares), o vírus adenoassociado recombinante (rAAV) está ganhando popularidade como um vetor versátil em terapia gênica.

[006] Os vírus adenoassociados (AAV) pertencem à família de *parvoviridae* e constituem mais especificamente o gênero dependoparvovírus. Os vetores derivados de AAV (isto é, vetores AAV ou AAV recombinantes (rAVV)) são atrativos para a entrega de material gênico, pois (i) têm capacidade para infectar (transduzir) uma ampla variedade de tipos de células que não se dividem e se dividem, incluindo miócitos e neurônios; (ii) são desprovidos dos genes estruturais do vírus, diminuindo assim as respostas das células hospedeiras à infecção

pelo vírus, por exemplo, respostas mediadas por interferon; (iii) vírus do tipo selvagem são considerados não patológicos em seres humanos; (iv) em contraste com o AAV do tipo selvagem, que tem capacidade para se integrar no genoma de célula hospedeira, os vetores de AAV com deficiência de replicação não possuem o gene de *rep* e geralmente persistem como episssomas, assim, limitando o risco de mutagênese de inserção ou genotoxicidade; e (v) em comparação com outros sistemas de vetores, os vetores de AAV geralmente são considerados imunógenos relativamente pobres e, portanto, não desencadeiam uma resposta imune significativa (consultar ii), ganhando assim a persistência do DNA de vetor e potencialmente a expressão a longo prazo dos transgenes terapêuticos.

[007] No entanto, há várias deficiências importantes no uso de partículas de AAV como um vetor de entrega de genes. Uma grande desvantagem associada ao rAAV é sua capacidade limitada de empacotamento viral de cerca de 4,5 kb de DNA heterólogo (Dong et al., 1996; Athanasopoulos et al., 2004; Lai et al., 2010) e, como resultado, o uso de vetores AAV foi limitado a uma capacidade de codificação de proteína de menos de 150.000 Da. A segunda desvantagem é que, como resultado da prevalência de infecção por AAV do tipo selvagem na população, os candidatos à terapia gênica com rAAV devem ser triados quanto à presença de anticorpos neutralizantes que eliminam o vetor do paciente. Uma terceira desvantagem está relacionada à imunogenicidade de capsídeo que impede a readministração em pacientes que não foram excluídos de um tratamento inicial. O sistema imunológico do paciente pode responder ao vetor, que atua efetivamente como uma injeção de "reforço" para estimular o sistema imunológico, gerando anticorpos anti-AAV de alta titulação que impedem tratamentos futuros. Alguns relatórios recentes indicam preocupações com a imunogenicidade em situações de altas doses. Outra desvantagem

notável é que o início da expressão gênica mediada por AAV é relativamente lento, dado que o DNA de AAV de filamento simples deve ser convertido em DNA de filamento duplo antes da expressão gênica heteróloga.

[008] Adicionalmente, os vírions de AAV convencionais com capsídeos são produzidos através da introdução de um plasmídeo ou plasmídeos que contêm o genoma de AAV, os genes de rep e os genes de cap (Grimm et al., 1998). No entanto, verificou-se que tais vetores de vírus de AAV encapsidados transduzem ineficientemente determinados tipos de células e tecidos e os capsídeos também induzem uma resposta imune.

[009] Consequentemente, o uso de vetores de vírus adenoassociado (AAV) para terapia gênica é limitado devido à administração única a pacientes (devido à resposta imunológica do paciente), à gama limitada de material genético transgênico adequado para a entrega em vetores de AAV devido a uma capacidade de empacotamento viral mínima (cerca de 4,5 kb) e à lenta expressão gênica mediada por AAV.

[0010] Foram desenvolvidos vetores de DNA de extremidade fechada que têm capacidade para fornecer um ou mais transgenes desejados *in vivo* para propósitos terapêuticos ou outros propósitos, e que evitam as dificuldades descritas acima de AAV e outros sistemas de vetores de vírus. No entanto, os métodos para produzir esses vetores de ceDNA se basearam nos métodos tradicionais de produção de células bacterianas ou de insetos. Tais métodos podem resultar em contaminantes (por exemplo, contaminantes de ácido nucleico) das células usadas para produzir os vetores que são inconvenientes ou dispendiosos para remover e que podem ter efeitos colaterais indesejáveis se incluídos em uma formulação terapêutica de ceDNA. Consequentemente, há uma necessidade no campo de uma tecnologia que permita a geração de vetores recombinantes a serem utilizados em

métodos de controle da expressão gênica com efeitos mínimos fora do alvo, como os introduzidos por esses contaminantes ou outros artefatos do método de purificação. Os métodos fornecidos no presente documento diminuem ou evitam esses problemas.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0011] Os métodos convencionais para a produção de DNA viral e derivado de vírus geralmente usam células eucarióticas, por exemplo, células de mamíferos ou insetos. Uma linhagem celular de insetos comumente usada é Sf9. No entanto, essas células não apenas contêm enzimas e outras proteínas que podem ter um efeito deletério sobre o DNA a ser replicado, mas o processo de purificação do DNA desejado dos lisados celulares introduz ácidos nucleicos celulares cuja presença pode tornar a purificação do produto de DNA desejado mais difícil. Além disso, essas impurezas ou contaminantes podem ter uma gama de efeitos deletérios e/ou indesejados no sujeito ao qual o DNA desejado é administrado. Além disso, esses métodos de produção baseados em células tradicionais podem ter problemas com relação à quantidade de produto vetorial de DNA produzido, e não é incomum que a modificação genética significativa da própria linhagem celular ou a tecnologia de produção seja necessária para produzir rendimentos desejáveis. A tecnologia descrita no presente documento se refere a um método de produção sintética que pode produzir prontamente vetores de DNA que contêm alças em forma de gancho de círculo fechado, tais como, mas sem limitação, vetores de DNA próximos (vetores de ceDNA) em purezas e quantidades mais altas do que por meios convencionais, evitando as preocupações detalhadas acima.

[0012] A invenção descrita no presente documento fornece métodos de produção sintética para produzir vetores de DNA de extremidade fechada com o uso de um sistema de produção sintética, que pode ser um sistema livre de células. Em algumas modalidades, o vetor de

DNA de extremidade fechada é um vetor de ceDNA, que pode ser usado em métodos de controle de expressão gênica em uma célula, tecido ou sistema ou para introduzir material genético em uma célula, tecido ou sistema desejado. Em uma modalidade específica, a tecnologia descrita no presente documento se refere a métodos livres de células inovadores para produzir vectores de DNA que contêm sequências de repetição terminal invertidas (ITRs) de AAV modificado e, por exemplo, um ou mais transgenes expressíveis. Os métodos divulgados no presente documento podem ser usados para produzir qualquer vetor de DNA que contém uma alça em forma de gancho de extremidade fechada em um sistema livre de células, incluindo, mas sem limitação, moléculas de DNA duplex lineares e livres de capsídeos, aqui denominadas vetores de ceDNA, formados a partir de um único filamento de DNA com extremidades covaletemente fechadas (estrutura linear, contínua e não encapsidada).

[0013] Um método de produção sintética exemplificativo para gerar um vetor de DNA de extremidade fechada, exemplificado com o uso da produção de um vetor de ceDNA conforme divulgado no presente documento, se refere à excisão de toda a molécula que forma o vetor de DNA de extremidade fechada a partir de um construto de DNA de filamento duplo. Em tal modalidade, um construto de DNA de filamento duplo é fornecido, na ordem de 5' a 3': um primeiro sítio de endonuclease de restrição; uma ITR a montante; um cassete de expressão; uma ITR a jusante; e um segundo sítio de endonuclease de restrição. O construto de DNA de filamento duplo é, então, posto em contato com uma ou mais endonucleases de restrição para gerar quebras de filamento duplo em ambos os sítios de clivagem de endonuclease de restrição. Uma endonuclease pode alvejar ambos os sítios ou cada sítio pode ser alvejado por uma endonuclease diferente, desde que os sítios de restrição não estejam presentes na região de modelo vetorial

de extremidade fechada. Isso excisa a sequência entre os sítios de endonuclease de restrição do restante do construto de DNA de filamento duplo. Essa molécula excisada terá extremidades 5' e 3' livres, que são então ligadas para formar um vetor de ceDNA. Em alguns aspectos, a molécula excisada é primeiramente anelada para facilitar a formação em forma de gancho antes da ligação das extremidades 5' e 3' livres. Em alguns aspectos, a estrutura principal de construto de DNA de filamento duplo indesejada é clivada por uma ou mais endonucleases de restrição específicas para um sítio de clivagem exclusivo na estrutura principal, de modo que o mesmo seja degradado e mais facilmente eliminado durante a purificação.

[0014] Outro método exemplificativo de produção de um vetor de DNA, por exemplo, um vetor de ceDNA, utilizando o método de produção sintética conforme divulgado no presente documento, envolve a montagem de vários oligonucleotídeos para formar o vetor completo. Em tal modalidade, um vetor de DNA, por exemplo, o vetor de ceDNA, é produzido sintetizando-se um oligonucleotídeo 5' e um oligonucleotídeo de ITR 3', que em algumas modalidades estão em uma forma de gancho ou outra configuração tridimensional (por exemplo, configuração de junção de Holliday) e ligando os oligonucleotídeos de ITR 5' e 3' a um polinucleotídeo de filamento duplo que compreende um cassete de expressão ou sequência de ácidos nucleicos heterólogos. Opcionalmente, uma etapa é adicionada submetendo o oligonucleotídeo (ou oligonucleotídeos) a condições que facilitam a dobra do oligonucleotídeo em uma configuração tridimensional antes da etapa de ligação. A Figura 11B mostra um método exemplificativo de geração de um vetor de ceDNA que compreende a ligação de um oligonucleotídeo de ITR 5' e um oligonucleotídeo de ITR 3' a um polinucleotídeo de filamento duplo que compreende um cassete de expressão. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos de ITR 5' e 3' são oligonucleotídeos em

forma de gancho 5' e 3' ou têm uma estrutura em forma de gancho ou uma configuração tridimensional diferente (por exemplo, uma junção de Holliday em formato de T ou Y) e podem opcionalmente ser fornecidos por síntese de DNA *in vitro.* Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos de ITR 5' e 3' foram clivados com uma endonuclease de restrição para ter extremidades adesivas complementares ao polinucleotídeo de filamento duplo que tem extremidades adesivas de endonuclease de restrição correspondentes. Em algumas modalidades, a extremidade da forma de gancho do oligonucleotídeo de ITR 5' tem uma extremidade adesiva que é complementar ao filamento senso 5' e filamento antissenso 3' do polinucleotídeo de filamento duplo. Em algumas modalidades, a extremidade da forma de gancho de oligonucleotídeo de ITR 3' tem uma extremidade adesiva que é complementar ao filamento senso 3' e ao filamento antissenso 5' do polinucleotídeo de filamento duplo. Em algumas modalidades, as extremidades da forma de gancho do oligonucleotídeo de ITR 5' e do oligonucleotídeo de ITR 3' têm extremidades adesivas de endonuclease de restrição diferentes, de modo que a ligação direcionada a cada extremidade do polinucleotídeo de filamento duplo possa ser alcançada. Em algumas modalidades, as extremidades de um ou de ambos os oligonucleotídeos de ITR não apresentam cadeias secundárias e esse oligonucleotídeo (ou oligonucleotídeos) de ITR são ligados ao polinucleotídeo de filamento duplo por união de extremidade cega. Em alguns aspectos, a estrutura principal de polinucleotídeo de DNA de filamento duplo indesejada é clivada por uma ou mais endonucleases de restrição específicas para um sítio de clivagem exclusivo na estrutura principal, para que seja degradado e eliminado mais facilmente durante a purificação.

[0015] Outro método exemplificativo para produzir um vetor de DNA (por exemplo, vetor de ceDNA) envolve a formação de um DNA linear de filamento simples que compreende um cassete de expressão

e subsequentemente fecha a molécula de DNA com ligação. Nessa modalidade, o vetor de DNA é preparado sintetizando-se através de quaisquer meios conhecidos na técnica um DNA linear de filamento simples, que compreende na direção 5' a 3' uma primeira ITR de primeiro senso, uma sequência cassete de expressão senso, uma segunda ITR senso, uma segunda ITR antissenso, uma sequência cassete de expressão antissenso e uma primeira ITR antissenso e, em seguida, ligando-se extremidades livres para formar um vetor de ceDNA de extremidade fechada. Em uma modalidade, usando a produção de um vetor de ceDNA como um vetor de DNA exemplificativo a ser produzido, a molécula de DNA de filamento simples resultante para a produção de um vetor de ceDNA compreende, de 5' a 3':

[0016] uma primeira ITR senso;

[0017] uma sequência cassete de expressão senso;

[0018] uma segunda ITR senso;

[0019] uma segunda ITR antissenso;

[0020] uma sequência cassete de expressão antissenso; e

[0021] uma primeira ITR antissenso.

[0022] Nesse método exemplificativo, em uma modalidade, podem ser sintetizados oligonucleotídeos que abrangem uma ou mais das primeiras ITRs senso, a sequência cassete de expressão senso, a segunda ITR senso, a segunda ITR antissenso, a segunda ITR antissenso, a sequência cassete de expressão antissenso e a primeira ITR antissenso. Um ou mais desses oligonucleotídeos podem ser ligados de modo a formar a molécula de DNA de filamento simples, conforme mostrado acima. Uma vez formada a molécula de DNA de filamento simples, as extremidades 3' e 5' livres da molécula podem ser unidas por ligação, formando o vetor de ceDNA.

[0023] Outro método exemplificativo para produzir um vetor de DNA de extremidade fechada é por meio de síntese de uma sequência

de filamento simples que compreende pelo menos uma ITR que flanqueia uma sequência cassete de expressão e que também compreende uma sequência cassete de expressão antissenso. Em um exemplo não limitativo, o vetor de ceDNA é produzido pelo método da seguinte maneira.

[0024] Uma sequência de filamento simples que compreende na ordem de 5' a 3':

[0025] uma primeira ITR senso;

[0026] uma sequência cassete de expressão senso;

[0027] uma segunda ITR senso; e

[0028] uma sequência cassete de expressão antissenso

é fornecida. Em uma modalidade, a sequência de filamento simples pode ser sintetizada diretamente através de qualquer método conhecido na técnica. Em outra modalidade, a sequência de filamento simples pode ser construída juntando-se por meio de ligação dois ou mais oligos que compreendem um ou mais dentre a primeira ITR senso, sequência cassete de expressão senso, segunda ITR senso e sequência cassete de expressão antissenso.

[0029] Em ainda outra modalidade, a sequência de filamento simples pode ser obtida por excisão da sequência a partir de um construto de DNA de filamento duplo com subsequente separação dos filamentos do fragmento de filamento duplo excisado. Mais especificamente, é fornecido um construto de DNA de filamento duplo que compreende um primeiro sítio de restrição, a primeira ITR senso, a sequência cassete de expressão senso, a segunda ITR senso, a sequência cassete de expressão antissenso e um segundo sítio de restrição na ordem 5' a 3'. A região entre os dois sítios de clivagem de endonuclease de restrição é excisada por clivagem com pelo menos uma endonuclease de restrição que reconhece esse sítio (ou sítios) de clivagem. O fragmento de DNA de filamento duplo excisado resultante é tratado de modo

que os filamentos senso e antissenso sejam separados nos fragmentos de sequência de filamento simples desejados.

[0030] A sequência de filamento simples é submetida a uma etapa de anelamento para facilitar a formação de uma ou mais alças em forma de gancho pela primeira ITR senso e/ou pela segunda ITR senso e a ligação complementar da sequência cassete de expressão senso à sequência cassete de expressão antissenso. O resultado é uma estrutura de extremidade fechada que não exigiu ligação para se formar. Parâmetros e técnicas de anelamento são bem-conhecidos na técnica.

[0031] Em todos os aspectos dos métodos de produção sintética para gerar vetores de DNA, conforme divulgado no presente documento, a etapa de ligação pode ser uma etapa de ligação química ou uma etapa de ligação enzimática. Em algumas modalidades, a ligação pode ser conduzida com o uso de uma enzima competente em ligação, por exemplo, DNA ligase, por exemplo, para ligar cadeias secundárias adesivas 5' e 3' ou extremidades cegas. Em algumas modalidades, a enzima de ligação é uma enzima ligase diferente de uma proteína Rep. Em algumas modalidades, a enzima de ligação é uma proteína Rep de AAV.

[0032] Em todos os aspectos dos métodos sintéticos para gerar vetores de DNA, conforme divulgado no presente documento, o método é um método *in vitro*. Em uma modalidade preferencial, o método é um método livre de células, isto é, não realizado em, ou na presença de uma célula, por exemplo, uma célula de inseto.

[0033] Será observado por um indivíduo versado na técnica que uma ou mais enzimas para o método de produção sintética ou um ou mais dos componentes de oligonucleotídeos podem ser produzidos a partir de uma célula e usados nos métodos da invenção na forma purificada. Consequentemente, em algumas modalidades, o método de produção sintética é um método livre de células, no entanto, uma en-

zima de restrição e/ou enzima ligase pode ser produzida a partir de uma célula. Em uma modalidade, uma célula, tal como uma célula bacteriana, que compreende um vetor de expressão que expressa uma ou mais dentre as endonucleases de restrição ou as enzimas ligase, pode estar presente. Portanto, embora os métodos divulgados no presente documento sejam principalmente direcionados a métodos sintéticos livres de células para gerar os vetores de DNA divulgados neste documento, os métodos de produção sintética em que uma célula, por exemplo, célula bacteriana, mas não uma célula de inseto, está presente e pode ser usada para expressar uma ou mais das enzimas necessárias no método, também estão incluídos em uma modalidade.

[0034] Um aspecto da tecnologia descrita no presente documento é o uso dos métodos de produção sintética para gerar vetores de ceDNA. Os vetores de ceDNA descritos no presente documento são moléculas de DNA duplex lineares e livres de capsídeo, formadas a partir de um filamento contínuo de DNA complementar com extremidades fechadas covalentemente (estrutura linear, contínua e não encapsidada), que compreendem uma sequência de repetição terminal invertida (ITR) 5' e uma sequência de ITR 3', em que a ITR 5' e a ITR 3' podem ter a mesma organização tridimensional simétrica uma em relação à outra (ou seja, simétrica ou substancialmente simétrica) ou, alternativamente, a ITR 5' e a ITR 3' pode ter uma organização tridimensional diferente uma em relação à outra (isto é, ITRs assimétricas). Além disso, as ITRs podem ser do mesmo sorotipo ou de sorotipos diferentes. Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA pode compreender sequências de ITR que têm uma organização espacial tridimensional simétrica, de modo que a estrutura das mesmas tenha o mesmo formato no espaço geométrico, ou tenha as mesmas alças A, CC' e BB' no espaço 3D (isto é, sejam iguais ou sejam imagens espelhadas uma em relação à outra). Em algumas modalidades, uma ITR pode ser de um

sorotipo de AAV e a outra ITR pode ser de um sorotipo de AAV diferente.

[0035] Por conseguinte, alguns aspectos da tecnologia descrita no presente documento se referem à produção sintética de um vetor de ceDNA que compreende sequências de ITR selecionadas a partir de: (i) pelo menos uma WT-ITR e pelo menos uma repetição terminal invertida (ITR) de AAV modificada (por exemplo, ITRs modificadas assimétricas); (ii) duas ITRs modificadas em que o par de mod-ITR tem uma organização espacial tridimensional diferente uma em relação à outra (por exemplo, ITRs modificadas assimétricas) ou (iii) par de ITRs WT-WT simétricas ou substancialmente simétricas, em que cada WT-ITR tem a mesma organização espacial tridimensional, ou (iv) par de ITRs modificadas simétricas ou substancialmente simétricas, em que cada mod-ITR tem a mesma organização espacial tridimensional.

[0036] Aspectos da invenção se referem a métodos de produção sintética para produzir os vetores de ceDNA úteis para a expressão de um transgene desejado em uma célula, tecido, órgão, sistema ou sujeito, conforme descrito no presente documento. Em particular, são fornecidos no presente documento métodos para produzir vetores de DNA de extremidade fechada, incluindo, mas sem limitação, vetores de ceDNA em um ambiente livre de células, limitando assim a quantidade de impurezas e impedindo a introdução de contaminantes durante o processo de produção que podem afetar a eficácia e/ou a segurança de um determinado produto vetorial. Tais métodos podem ser usados para sintetizar um vetor de DNA, por exemplo, um vetor de ceDNA, expressando qualquer transgene desejado. Os transgenes podem ser selecionados para o tratamento de uma dada doença, promovendo saúde ideal, prevenção do início da doença, para fins de diagnóstico ou conforme desejado por um indivíduo versado na técnica para uma determinada aplicação.

[0037] Em outra modalidade deste aspecto e de todos os demais aspectos fornecidos no presente documento, o transgene codifica uma proteína de interesse, por exemplo, em que uma proteína de interesse é um receptor, uma toxina, um hormônio, uma enzima ou uma proteína de superfície celular. Em outra modalidade desse aspecto e em todos os outros aspectos fornecidos no presente documento, a proteína de interesse é um receptor. Em outra modalidade desse aspecto e em todos os outros aspectos fornecidos no presente documento, a proteína de interesse é uma enzima. Genes exemplificativos a serem alvejados e proteínas de interesse são descritos em detalhes nos métodos de uso e métodos de seções de tratamento do presente documento.

[0038] Em algumas modalidades, o presente pedido pode ser definido em qualquer um dos seguintes parágrafos:

[0039] 1. Um método para preparar um vetor de DNA de extremidade fechada que compreende: (i) fornecer uma primeira molécula de ITR de filamento simples que compreende uma primeira ITR; (ii) fornecer uma segunda molécula de ITR de filamento simples que compreende uma segunda ITR; (iii) fornecer um polinucleotídeo de filamento duplo que compreende uma sequência cassete de expressão; e ligar as extremidades 5' e 3' da primeira molécula de ITR a uma primeira extremidade da molécula de filamento duplo e ligar as extremidades 5' e 3' da segunda molécula de ITR à segunda extremidade da molécula de filamento duplo para formar o vetor de DNA.

[0040] 2. Método para preparar um vetor de DNA de extremidade fechada que compreende:

contatar um construto de DNA de filamento duplo que compreende: (i) um cassete de expressão; (ii) uma primeira ITR a montante (extremidade 5') do cassete de expressão; (iii) uma segunda ITR a jusante (extremidade 3') do cassete de expressão; (iii); e pelo menos dois sítios de clivagem de endonuclease de restrição que flanqueiam as

ITRs, de modo que as endonucleases de restrição estejam distais ao cassete de expressão.

com uma ou mais endonucleases de restrição que podem clivar o construto de DNA de filamento duplo nos sítios de clivagem de endonuclease de restrição para excisar as sequências entre os sítios de clivagem de endonuclease de restrição do construto de DNA de filamento duplo; e ligar as extremidades 5' e 3' da sequência excisada para formar um vetor de DNA de extremidade fechada.

[0041] 3. Um método para preparar um vetor de DNA que compreende:

[0042] sintetizar uma molécula de DNA de filamento simples, que compreende na ordem na direção de 5' a 3':

[0043] uma primeira ITR senso;

[0044] uma sequência cassete de expressão senso;

[0045] uma segunda ITR senso;

[0046] uma segunda ITR antissenso;

[0047] uma sequência cassete de expressão antissenso; e

[0048] uma primeira ITR antissenso;

[0049] formar um polinucleotídeo que compreende forma de gancho a partir da molécula de filamento simples; e ligar as extremidades 5' e 3' para formar o vetor de DNA de extremidade fechada.

[0050] 4. Um método para preparar um vetor de DNA de extremidade fechada que compreende:

[0051] sintetizar uma molécula de DNA de filamento simples, que compreende na ordem na direção de 5' a 3':

[0052] uma primeira ITR senso;

[0053] uma sequência cassete de expressão senso;

[0054] uma segunda ITR senso; e

[0055] uma sequência cassete de expressão antissenso;

[0056] e anelar a molécula.

[0057] 5. Um método para preparar um vetor de DNA de extremidade fechada que compreende:

[0058] fornecer um construto de DNA de filamento duplo que compreende na ordem na direção 5' a 3':

[0059] um primeiro sítio de clivagem de endonuclease de restrição;

[0060] uma primeira ITR senso;

[0061] uma sequência cassete de expressão senso;

[0062] uma segunda ITR senso;

[0063] uma sequência cassete de expressão antissenso; e

[0064] um segundo sítio de clivagem de endonuclease de restrição;

[0065] colocar o construto de DNA de filamento duplo em contato com uma ou mais endonucleases de restrição que podem clivar o construto de DNA de filamento duplo no primeiro sítio de clivagem de endonuclease de restrição e no segundo sítio de clivagem de endonuclease de restrição para excisar a sequência de filamento duplo entre os sítios de clivagem de endonuclease de restrição do polinucleotídeo de filamento duplo;

[0066] separar a sequência de filamento duplo excisada em um filamento senso e um filamento antissenso; e

[0067] realizar uma etapa de anelamento em que cada um dos filamentos senso e antissenso forma um vetor de DNA de extremidade fechada.

[0068] 6. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que o construto de DNA de filamento duplo é um bacmídeo, plasmídeo, minicírculo, ou uma molécula de DNA de filamento duplo.

[0069] 7. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que uma única endonuclease de restrição é usada para

efetuar a excisão.

[0070] 8. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que duas endonucleases de restrição diferentes são usadas para efetuar a excisão.

[0071] 9. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que pelo menos uma dentre a primeira ITR senso, a sequência cassete de expressão senso, a segunda ITR senso, a segunda ITR antissenso, a sequência cassete de expressão antissenso e a primeira ITR antissenso são sintetizadas.

[0072] 10. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a molécula de DNA de filamento simples é construída sintetizando-se uma ou mais dentre a primeira ITR senso, a sequência cassete de expressão senso, a segunda ITR senso, a segunda ITR antissenso, a sequência cassete de expressão antissenso e a primeira ITR antissenso como oligonucleotídeos e ligando-se tais oligonucleotídeos para formar a molécula de DNA de filamento simples.

[0073] 11. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a molécula de DNA de filamento simples é fornecida por excisão da molécula de um polinucleotídeo de DNA de filamento duplo, seguida por desnaturação do fragmento de filamento duplo excisado para produzir a molécula de DNA de filamento simples.

[0074] 12. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a etapa de formação de um polinucleotídeo que compreende forma de gancho a partir da molécula de filamento simples é efetuada pelo anelamento da molécula de filamento simples sob condições pelas quais uma ou mais das ITRs formam uma alça em forma de gancho.

[0075] 13. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que pelo menos uma dentre a primeiro ITR e a se-

gunda ITR é sintetizada.

[0076] 14. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a sequência cassete de expressão de filamento duplo foi obtida por excisão de um construto de DNA de filamento duplo que compreende a sequência cassete de expressão.

[0077] 15. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que dentro do construto de DNA de filamento duplo a sequência cassete de expressão é flanqueada na extremidade 5' por um primeiro sítio de clivagem de endonuclease de restrição e na extremidade 3' por um segundo sítio de clivagem de endonuclease de restrição.

[0078] 16. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que o construto de DNA de filamento duplo é um bacmídeo, plasmídeo, minicírculo ou uma molécula de DNA de filamento duplo linear.

[0079] 17. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a primeira endonuclease de restrição e a segunda endonuclease de restrição são a mesma endonuclease de restrição.

[0080] 18. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a primeira endonuclease de restrição e a segunda endonuclease de restrição são diferentes endonucleases de restrição.

[0081] 19. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que pelo menos uma dentre a primeira ITR e a segunda ITR é anelada antes da ligação à sequência cassete de expressão.

[0082] 20. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que pelo menos uma dentre a primeiro ITR e a segunda ITR compreendem uma região de cadeia secundária comple-

mentar à primeira extremidade de sequência cassete de expressão ou à segunda extremidade de sequência cassete de expressão, respectivamente.

[0083] 21. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a ligação é selecionada a partir de uma ligação química e uma ligação assistida por proteína.

[0084] 22. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a ligação é efetuada por T4 ligase ou uma proteína Rep de AAV.

[0085] 23. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a primeira ITR é selecionada a partir de uma ITR do tipo selvagem e uma ITR modificada.

[0086] 24. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a segunda ITR é selecionada a partir de uma ITR do tipo selvagem e uma ITR modificada.

[0087] 25. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que pelo menos uma dentre a primeira ITR e a segunda ITR compreendem pelo menos um sítio de RBE.

[0088] 26. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que pelo menos uma dentre a primeiro ITR e a segunda ITR é uma ITR de AAV ou uma ITR derivada de AAV.

[0089] 27. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a sequência da primeira ITR é selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ITR esquerda estabelecidas na Tabela 3, Tabela 4B ou Tabela 5 ou SEQ ID NO: 2, 5 a 9, 32 a 48.

[0090] 28. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a sequência da segunda ITR é selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ITR direita estabelecidas na Tabela 3, Tabela 4A ou Tabela 5 ou SEQ ID NO: 1, 3, 10 a 14, 15 a 31.

[0091] 29. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a sequência cassete de expressão compreende pelo menos um elemento cis-regulador.

[0092] 30. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que o elemento cis-regulador é selecionado a partir do grupo que consiste em um promotor, um intensificador, um elemento regulador pós-transcricional e um sinal de poliadenilação.

[0093] 31. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que o elemento regulador pós-transcricional compreende um elemento regulador pós-transcricional WHP (WPRE).

[0094] 32. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que o promotor é selecionado a partir do grupo que consiste em um promotor de CAG, um promotor de AAT, um promotor de LP1 e um promotor de EF1a.

[0095] 33. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a sequência cassete de expressão compreende uma sequência transgene.

[0096] 34. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a sequência transgene tem pelo menos 2.000 nucleotídeos de comprimento.

[0097] 35. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a sequência transgene codifica uma proteína.

[0098] 36. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a sequência transgene codifica uma proteína repórter, uma proteína terapêutica, um antígeno, uma proteína de edição de genes ou uma proteína citotóxica.

[0099] 37. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que a sequência transgene é uma sequência de nucleotídeo funcional.

[00100] 38. Um método, de acordo com qualquer um dos parágra-

fos anteriores, em que o vetor de DNA de extremidade fechada é um vetor de ceDNA.

[00101] 39. Um método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que o vetor de ceDNA é purificado.

[00102] 40. Um vetor de DNA de extremidade fechada gerado pelo método, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores.

[00103] 41. Uma composição farmacêutica que compreende o vetor de DNA de extremidade fechada, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores e, opcionalmente, um excipiente.

[00104] 42. Um vetor de DNA de extremidade fechada isolado obtido ou obtenível por um processo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 6 ou 6 a 39.

[00105] 43. Um medicamento genético que compreende um vetor de DNA de extremidade fechada isolado obtido pelo processo, de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores.

[00106] 44. Uma célula que compreende o vetor de DNA de extremidade fechada, de acordo com o parágrafo 40.

[00107] 45. Um animal transgênico que compreende o vetor de DNA de extremidade fechada, de acordo com o parágrafo 40.

[00108] 46. Um método para tratar um sujeito administrando-se um vetor de DNA de extremidade fechada obtido ou obtenível por um processo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 5 ou 6 a 39.

[00109] 47. Um método para entregar uma proteína terapêutica a um sujeito, em que o método compreende:

[00110] administrar a um sujeito uma composição que compreende um vetor de DNA de extremidade fechada, de acordo com a reivindicação 40, ou obtido por ou obtenível por um processo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 5 ou 6 a 39, em que pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga codifica um transgene ou uma proteína terapêutica.

[00111] 48. Um método, de acordo com o parágrafo 47, em que a proteína terapêutica é um anticorpo terapêutico, uma proteína repórter, uma proteína terapêutica, um antígeno, uma proteína de edição de genes ou uma proteína citotóxica.

[00112] 49. Um kit que compreende um vetor de DNA de extremidade fechada, de acordo com a reivindicação 40, ou obtido por ou obtenível por um processo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 5 ou 6 a 39, e um nanocarreador, embalado em um recipiente com um inserto de pacote.

[00113] 50. Um kit para produzir um vector de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 5 ou 6 a 39.

[00114] 51. Um kit para produzir um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 39, que compreende uma primeira molécula de ITR de filamento simples que compreende uma primeira ITR, uma segunda molécula de ITR de filamento simples que compreende uma segunda ITR e pelo menos um reagente para ligação da primeira molécula de ITR de filamento simples e da segunda molécula de ITR de filamento simples a uma molécula de polinucleotídeo de filamento duplo.

[00115] 52. Um kit para produzir um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo de acordo com qualquer um dos parágrafos 2 a 39, que compreende: (i) um construto de DNA de filamento duplo que compreende um cassete de expressão; uma primeira ITR a montante (extremidade 5') do cassete de expressão; uma segunda ITR a jusante (extremidade 3') do cassete de expressão; e pelo menos dois sítios de clivagem de endonuclease de restrição que flanqueiam as ITRs, de modo que as endonucleases de restrição estejam distais ao cassete de expressão, em que o cassete

de expressão tem um sítio de endonuclease de restrição para inserção de um transgene e (ii) pelo menos um reagente de ligação para ligação.

[00116] 53. Um kit para produzir um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 3 a 39, que compreende: (i) a molécula de DNA de filamento simples que compreende em ordem na direção 5' a 3': uma primeira ITR senso; uma sequência cassete de expressão senso; uma segunda ITR senso; uma segunda ITR antissenso; uma sequência cassete de expressão antissenso; e uma primeira ITR antissenso; em que a sequência cassete de expressão senso e a sequência cassete de expressão antissenso têm um sítio de endonuclease de restrição para inserção de um transgene e (i) pelo menos um reagente de ligação para ligação.

[00117] 54. Um kit para produzir um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 4 a 39, que compreende: (i) uma molécula de DNA de filamento simples que compreende, em ordem 5' a 3': uma primeira ITR senso; uma sequência cassete de expressão senso; uma segunda ITR senso; e uma sequência cassete de expressão antissenso; em que a sequência cassete de expressão senso e a sequência cassete de expressão antissenso têm um sítio de endonuclease de restrição para inserção de um transgene e (ii) pelo menos um reagente de ligação para ligação.

[00118] 55. Um kit para produzir um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo de acordo com qualquer um dos parágrafos 5 a 39, que compreende: (i) um construto de DNA de filamento duplo que compreende em ordem na direção 5' a 3': um primeiro sítio de clivagem de endonuclease de restrição; uma primeira ITR senso; uma sequência cassete de expressão senso; uma

segunda ITR senso; uma sequência cassete de expressão antissenso; e um segundo sítio de clivagem de endonuclease de restrição; em que a sequência cassete de expressão senso e a sequência cassete de expressão antissenso têm um sítio de endonuclease de restrição para inserção de um transgene e (ii) pelo menos um reagente de ligação para ligação.

[00119] 56. O kit, de acordo com qualquer dos parágrafos 49 a 55, em que o pelo menos um reagente para ligação é um reagente para ligação química.

[00120] 57. O kit, de acordo com qualquer um dos parágrafos 49 a 56, em que o pelo menos um reagente para a ligação é um reagente para ligação assistida por proteína.

[00121] 58. O kit, de acordo com qualquer um dos parágrafos 49 a 57, em que a ligação é efetuada por ligação de T4 ou uma proteína Rep de AAV.

[00122] 59. O kit, de acordo com qualquer um dos parágrafos 49 a 58, em que a primeira molécula de ITR de filamento simples e a segunda molécula de ITR de filamento simples compreendem um sítio de clivagem de endonuclease de restrição em suas extremidades.

[00123] 60. O kit, de acordo com qualquer um dos parágrafos 49 a 59, em que o kit compreende ainda pelo menos uma enzima de endonuclease de restrição.

[00124] Em algumas modalidades, um aspecto da tecnologia descrita no presente documento se refere a um vetor de DNA livre de capsídeo não viral produzido sinteticamente com extremidades fechadas covalentemente (vetor de ceDNA), em que o vetor de ceDNA compreende pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga, posicionada operacionalmente entre sequências de repetição terminal invertidas do tipo selvagem, em que opcionalmente a sequência de ácidos nucleicos heteróloga codifica um transgene e em que o vetor não está

em um capsídeo viral.

[00125] Em algumas modalidades, um aspecto da tecnologia descrita no presente documento se refere a um vetor de DNA livre de capsídeo não viral produzido sinteticamente com extremidades fechadas covalentemente (vetor de ceDNA), em que o vetor de ceDNA compreende pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga, operativamente posicionada entre sequências de repetição terminal invertidas assimétricas (ITRs assimétricas), em que pelo menos uma das ITRs assimétricas compreende um sítio de resolução terminal funcional e um sítio de ligação a Rep e, opcionalmente, a sequência de ácidos nucleicos heteróloga codifica um transgene, e em que o vetor não está no capsídeo viral.

[00126] Em algumas modalidades, um aspecto da tecnologia descrita no presente documento se refere a um vetor de DNA livre de capsídeo não viral produzido sinteticamente com extremidades fechadas covalentemente (vetor de ceDNA), em que o vetor de ceDNA compreende pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga, posicionada operacionalmente entre sequências de repetição terminal invertidas mutantes simétricas, em que pelo menos uma das ITRs compreende um sítio de resolução terminal funcional e um sítio de ligação a Rep, e opcionalmente a sequência de ácidos nucleicos heteróloga codifica um transgene e em que o vetor não está em um capsídeo viral.

[00127] Esses e outros aspectos da invenção são descritos em mais detalhes abaixo.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00128] Modalidades da presente descrição, brevemente resumidas acima e discutidas em mais detalhes abaixo, podem ser entendidas por referência às modalidades ilustrativas da descrição retratadas nos desenhos anexos. No entanto, os desenhos anexos ilustram apenas modalidades típicas da descrição e, portanto, não devem ser conside-

rados limitantes do escopo, pois a descrição pode admitir outras modalidades igualmente eficazes.

[00129] **A Figura 1A** ilustra uma estrutura exemplificativa de um vetor de ceDNA que compreende ITRs assimétricas. Nessa modalidade, o vetor de ceDNA exemplificativo compreende um cassete de expressão que contém o promotor de CAG, WPRE e BGHpA. Um quadro de leitura aberta (ORF) que codifica um transgene, por exemplo, um transgene de luciferase, é inserido no sítio de clonagem (R3/R4) entre o promotor de CAG e WPRE. O cassete de expressão é flanqueado por duas repetições terminais invertidas (ITRs) - a ITR de AAV2 do tipo selvagem a montante (extremidade 5') e a ITR modificada a jusante (extremidade 3') do cassete de expressão, portanto, as duas ITRs que flanqueiam o cassete de expressão são assimétricas entre si.

[00130] **A Figura 1B** ilustra uma estrutura exemplificativa de um vetor de ceDNA que compreende ITRs assimétricas com um cassete de expressão que contém o promotor de CAG, WPRE e BGHpA. Um quadro de leitura aberta (ORF) que codifica um transgene, por exemplo, um transgene de Luciferase, é inserido no sítio de clonagem entre o promotor de CAG e WPRE. O cassete de expressão é flanqueado por duas repetições terminais invertidas (ITRs) - uma ITR modificada a montante (extremidade 5') e uma ITR do tipo selvagem a jusante (extremidade 3') do cassete de expressão.

[00131] **A Figura 1C** ilustra uma estrutura exemplificativa de um vetor de ceDNA para compreender ITRs assimétricas, com um cassete de expressão que contém um intensificador/promotor, um transgene, um elemento pós-transcricional (WPRE) e um sinal de polyA. Um quadro de leitura aberta (ORF) permite a inserção de um transgene no sítio de clonagem entre o promotor de CAG e WPRE. O cassete de expressão é flanqueado por duas repetições terminais invertidas (ITRs) que são assimétricas uma em relação à outra; uma ITR modificada a

montante (extremidade 5') e uma ITR modificada a jusante (extremidade 3') do cassete de expressão, em que a ITR 5' e a ITR 3' são ambas ITRs modificadas, mas têm modificações diferentes (isto é, as mesmas não têm as mesmas modificações).

[00132] **A Figura 1D** ilustra uma estrutura exemplificativa de um vetor de ceDNA que compreende ITRs modificadas simétricas ou ITRs modificadas substancialmente simétricas conforme definido no presente documento, com um cassete de expressão que contém o promotor de CAG, WPRE e BGHpA. Um quadro de leitura aberta (ORF) que codifica um transgene, por exemplo, um transgene de Luciferase, é inserido no sítio de clonagem entre o promotor de CAG e WPRE. O cassete de expressão é flanqueado por duas repetições terminais invertidas modificadas (ITRs), em que a ITR modificada 5' e a ITR modificada 3' são simétricas ou substancialmente simétricas.

[00133] **A Figura 1E** ilustra uma estrutura exemplificativa de um vetor de ceDNA que compreende ITRs modificadas simétricas ou ITRs modificadas substancialmente simétricas, conforme definido no presente documento, com um cassete de expressão que contém um intensificador/promotor, um transgene, um elemento pós-transcricional (WPRE) e um sinal de polyA. Um quadro de leitura aberta (ORF) permite a inserção de um transgene no sítio de clonagem entre o promotor de CAG e WPRE. O cassete de expressão é flanqueado por duas repetições terminais invertidas modificadas (ITRs), em que a ITR modificada 5' e a ITR modificada 3' são simétricas ou substancialmente simétricas.

[00134] **A Figura 1F** ilustra uma estrutura exemplificativa de um vetor de ceDNA que compreende WT-ITRs simétricas ou WT-ITRs substancialmente simétricas, conforme definido no presente documento, com um cassete de expressão que contém o promotor de CAG, WPRE e BGHpA. Um quadro de leitura aberta (ORF) que codifica um trans-

gene, por exemplo, um transgene de Luciferase, é inserido no sítio de clonagem entre o promotor de CAG e WPRE. O cassete de expressão é flanqueado por duas repetições terminais invertidas do tipo selvagem (WT-ITRs), em que a WT-ITR 5' e a WT ITR 3' são simétricas ou substancialmente simétricas.

[00135] **A Figura 1G** ilustra uma estrutura exemplificativa de um vetor de ceDNA que compreende ITRs modificadas simétricas ou ITRs modificadas substancialmente simétricas, conforme definido no presente documento, com um cassete de expressão que contém um intensificador/promotor, um transgene, um elemento pós-transcricional (WPRE) e um sinal de polyA. Um quadro de leitura aberta (ORF) permite a inserção de um transgene no sítio de clonagem entre o promotor de CAG e WPRE. O cassete de expressão é flanqueado por duas repetições terminais invertidas do tipo selvagem (WT-ITRs), em que a WT-ITR 5' e a WT ITR 3' são simétricas ou substancialmente simétricas.

[00136] **A Figura 2A** fornece a estrutura de alça de haste em formato de T de uma ITR esquerda do tipo selvagem de AAV2 (SEQ ID NO: 52) com a identificação de braço A-A', braço B-B', braço C-C', dois sítios de ligação Rep (RBE e RBE') e também mostra o sítio de resolução de terminal (*trs*). O RBE contém uma série de 4 tetrâmeros duplex os quais acredita-se interagirem com Rep 78 ou Rep 68. Além disso, acredita-se que RBE' interaja com o complexo de Rep montado na ITR do tipo selvagem ou ITR mutada no construto. As regiões D e D' contêm sítios de ligação ao fator de transcrição e outra estrutura conservada. **A Figura 2B** mostra atividades de corte e ligação catalisadas por Rep propostas em uma ITR esquerda do tipo selvagem (SEQ ID NO: 53), incluindo a estrutura de alça de haste em formato de T da ITR esquerda do tipo selvagem de AAV2 com identificação de braço A-A', braço B-B', braço C-C', dois sítios de Ligação a Rep (RBE e RBE') e

também mostra o sítio de resolução terminal (*trs*) e a região de D e D' que compreende vários sítios de ligação ao fator de transcrição e outra estrutura conservada.

[00137] **A Figura 3A** fornece a estrutura primária (sequência de polinucleotídeos) (esquerda) e a estrutura secundária (direita) das porções que contêm RBE do braço A-A' e braço C-C' e B-B' da ITR de AAV2 esquerda do tipo selvagem (SEQ ID NO: 54). **A Figura 3B** mostra uma sequência de ITR mutada exemplificativa (também denominada como uma ITR modificada) para a ITR esquerda. É mostrada a estrutura primária (esquerda) e a estrutura secundária prevista (direita) da porção de RBE do braço A-A', braço C e braço B-B' de uma ITR esquerda mutada exemplificativa (ITR-1, esquerda) (SEQ ID NO: 113). **A Figura 3C** mostra a estrutura primária (esquerda) e a estrutura secundária (direita) da porção que contém RBE da alça de A-A' e os braços B-B' e C-C' da ITR de AAV2 direita do tipo selvagem (SEQ ID NO: 55). **A Figura 3D** mostra uma ITR modificada direita exemplificativa. É mostrada a estrutura primária (esquerda) e a estrutura secundária prevista (direita) da porção de RBE do braço A-A', do braço B-B' e do braço C de uma ITR direita mutante exemplificativa (ITR-1, direita) (SEQ ID NO: 114). Qualquer combinação de ITRs esquerda e direita (por exemplo, ITRs de AAV2 ou outro sorotipo viral ou ITR sintética) pode ser usada conforme ensinado no presente documento. Cada uma das sequências de polinucleotídeos das **Figuras 3A a 3D** se refere à sequência usada para produzir o ceDNA, conforme descrito no presente documento. Estruturas secundárias de ceDNA correspondentes inferidas a partir das configurações de vetor de ceDNA no genoma de plasmídeo ou bacmídeo/baculovírus e os valores de energia livre de Gibbs previstos também são incluídos em cada uma das **Figuras 3A a 3D**.

[00138] A **Figura 4A** é um esquema que ilustra uma modalidade de

síntese livre de células para produzir ceDNA. Os produtos do método da **Figura 4A** podem ser isolados e caracterizados de acordo com o processo a jusante da **Figura 4B**. A **Figura 4B** ilustra um método bioquímico não limitante para confirmar a produção de ceDNA. A **Figura 4C** e a **Figura 4D** são ilustrações esquemáticas que descrevem um processo para identificar a presença de ceDNA obtido durante o processo de produção de ceDNA sem células na Figura 4A. A **Figura 4C** mostra bandas esquemáticas esperadas para um ceDNA exemplificativo, deixado sem cortes ou digerido com uma endonuclease de restrição e, em seguida, submetido a eletroforese em um gel nativo ou em um gel de desnaturação. O esquema mais à esquerda é um gel nativo e mostra várias bandas sugerindo que, em sua forma duplex e sem cortes, o ceDNA existe em pelo menos estados monoméricos e diméricos, visíveis como um monômero menor de migração mais rápida e um dímero de migração mais lenta que é o dobro do tamanho do monômero. O segundo esquema da esquerda mostra que, quando o ceDNA é cortado com uma endonuclease de restrição, as bandas originais desaparecem e as bandas de migração mais rápida (por exemplo, menores) aparecem, correspondendo aos tamanhos de fragmentos esperados após a clivagem. Sob condições de desnaturação, o DNA duplex original é de filamento simples e migra como espécie duas vezes maior do que a observado no gel nativo, pois os filamentos complementares estão ligados de modo covalente. Assim, no segundo esquema da direita, o ceDNA digerido mostra uma distribuição de bandas similar à observada no gel nativo, mas as bandas migram como fragmentos duas vezes o tamanho de seus equivalentes de gel nativos. O esquema mais à direita mostra que o ceDNA sem cortes sob condições de desnaturação migra como um círculo aberto de filamento simples e, portanto, as bandas observadas têm o dobro do tamanho daquelas observadas sob condições nativas em que o círculo não está

aberto. Nessa figura, "kb" é usado para indicar o tamanho relativo das moléculas de nucleotídeo com base, dependendo do contexto, no comprimento de cadeia de nucleotídeos (por exemplo, para as moléculas de filamento simples observadas sob condições de desnaturação) ou no número de pares de bases (por exemplo, para moléculas de filamento duplo observadas sob condições nativas). A **Figura 4D** mostra o DNA que tem uma estrutura não contínua. O ceDNA pode ser cortado por uma endonuclease de restrição, que tem um único sítio de reconhecimento no vetor de ceDNA, e gerar dois fragmentos de DNA com tamanhos diferentes (de 1kb e 2kb) sob condições neutras e de desnaturação. A Figura 4D também mostra um ceDNA que tem uma estrutura linear e contínua. O vetor de ceDNA pode ser cortado pela endonuclease de restrição e gerar dois fragmentos de DNA que migram como 1kb e 2kb sob condições neutras, mas em condições de desnaturação, os suportes permanecem conectados e produzem filamentos únicos que migram como 2kb e 4kb.

[00139] A **Figura 5** é uma imagem exemplificativa de um gel de desnaturação que executa exemplos de vetores de ceDNA com (+) ou sem (-) digestão com endonucleases (EcoRI para construtos de ceDNA 1 e 2; BamH1 para construtos de ceDNA 3 e 4; SpeI para construtos de ceDNA 5 e 6 e XhoI para construtos de ceDNA 7 e 8). Os tamanhos de bandas destacadas com um asterisco foram determinados e fornecidos na parte inferior da imagem.

[00140] As **Figuras 6A a 6D** mostram ITRs exemplificativas e oligos exemplificativos para sintetizar ITRs para uso nas modalidades descritas no presente documento. A **Figura 6A** mostra um oligonucleotídeo exemplificativo (WT-L-oligo-1) para gerar uma WT-ITR 5' com sítios de restrição de ArvII. A Figura 6A divulga a sequência superior como SEQ ID NO: 156, a estrutura ideal como SEQ ID NOS 134, 158 e 157, respectivamente, na ordem em que aparecem, a estrutura prevista como

SEQ ID NO: 134 e WT-L-oligo-1 como SEQ ID NO: 134. A **Figura 6B** mostra um oligonucleotídeo exemplificativo (WT-L-oligo-2) para gerar uma WT-ITR 5' com sítios de restrição de ArvII. A Figura 6B divulga as SEQ ID NOS 135 e 135, respectivamente, na ordem em que aparecem. A **Figura 6C** mostra outro oligonucleotídeo exemplificativo (WT-R-oligo-3) para gerar uma WT-ITR 3' com sítios de restrição de SbfI. A Figura 6C divulga as SEQ ID NOS 159, 136, e 136, respectivamente, na ordem em que aparecem. A **Figura 6D** mostra outro oligonucleotídeo exemplificativo (MU-R-oligo-1) para gerar uma mod-ITR 3' com sítios de restrição de DraIII. A Figura 6D divulga as SEQ ID NOS 160, 137 e 137, respectivamente, na ordem em que aparecem.

[00141] As **Figuras 7A a 7E** mostram ITRs e oligos exemplificativos para sintetizar vetores de ceDNA com o uso da síntese livre de células, conforme descrito no presente documento. A **Figura 7A** mostra um oligonucleotídeo exemplificativo (WT-L-oligo-1) para gerar uma WT-ITR 5' com sítios de restrição de ArvII. A Figura 8A descreve as SEQ ID NOS 138 e 138, respectivamente, na ordem em que aparecem. A **Figura 7B** mostra um oligonucleotídeo exemplificativo (WT-L-oligo-2) para gerar uma WT-ITR 5' com sítios de restrição de ArvII. A Figura 8B divulga as SEQ ID NOS 161, 139 e 139, respectivamente, na ordem em que aparecem. A **Figura 7C** mostra outro oligonucleotídeo exemplificativo (WT-R-oligo-3) para gerar uma WT-ITR 3' com sítios de restrição de SbfI. A Figura 8C descreve as SEQ ID NOS 140 e 140, respectivamente, na ordem em que aparecem. A **Figura 7D** mostra outro oligonucleotídeo exemplificativo (MU-R-oligo-1) para gerar uma mod-ITR em 3' com sítios de restrição de DraIII. A Figura 8D divulga as SEQ ID NOS 141 e 141, respectivamente, na ordem em que aparecem. A **Figura 7E** mostra outro oligonucleotídeo exemplificativo (MU-R-oligo-6) (SEQ ID NO: 142) para gerar uma mod-ITR 3' com sítios de restrição de SbfI. A Figura 8E divulga as SEQ ID NOS 142 e

142, respectivamente, na ordem em que aparecem.

[00142] A **Figura 8** mostra um oligonucleotídeo exemplificativo usado para gerar uma ITR modificada 3'. A Figura 8 divulga as SEQ ID NOS 160 e 162, respectivamente, na ordem em que aparecem. A **Figura 9** retrata um diagrama de um vetor de DNA exemplificativo e sua montagem de acordo com determinadas modalidades descritas no presente documento. Em particular, um oligonucleotídeo de ITR 5' é ligado à extremidade 5' da molécula de DNA de filamento duplo, um oligonucleotídeo de ITR 3' é ligado à extremidade 3' da molécula de DNA de filamento duplo. As extremidades de oligonucleotídeo de ITR 5' são complementares ao filamento senso 5' e ao filamento antissenso 3' da molécula de DNA de filamento duplo (isto é, as mesmas têm o mesmo sítio de endonuclease de restrição) e de modo similar, as extremidades do oligonucleotídeo de ITR 3' são complementares ao filamento senso 3' e ao filamento antissenso 5' da molécula de DNA de filamento duplo. A Figura 9 divulga as SEQ ID NOS 134, 158 e 157, respectivamente, na ordem em que aparecem no lado esquerdo, e SEQ ID NOS 163, 137 e 164, respectivamente, na ordem em que aparecem no lado direito.

[00143] A **Figura 10A** fornece uma estrutura de energia mais baixa de uma ITR modificada ("ITR-6 (Esquerda)" SEQ ID NO: 111) e a **Figura 10B** fornece uma estrutura de energia mais baixa de uma ITR modificada ("ITR-6 (Direita)" SEQ ID NO: 112). Prevê-se que formem uma estrutura em forma de gancho com um único braço. Prevê-se que as energias livres de desdobramento de Gibbs sejam de -54,4 kcal/mol.

[00144] A **Figura 11A** é uma representação esquemática de um vetor de ceDNA, que mostra uma ITR que compreende duas alças em forma de gancho (as regiões B e C) e as regiões A e D que compreendem uma RPE e, opcionalmente, uma TRS que flanqueia ambos os

lados do cassete que compreende o gene de interesse, uma região promotora/intensificadora opcional, um elemento de resposta pós-transcricional opcional (por exemplo, o elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite da marmota (WPRE) e um sinal de poliadenilação opcional (por exemplo, do hormônio do crescimento bovino, BGHpA). A **Figura 11B** mostra uma representação esquemática dos diferentes oligos que são sintetizados e unidos para formar o vetor de ceDNA final.

[00145] A **Figura 12** é uma descrição esquemática de um método exemplificativo usado para preparar sinteticamente o vetor de ceDNA.

[00146] A **Figura 13A** retrata uma representação esquemática de um vetor de ceDNA com duas ITRs de AAV2 do tipo selvagem que são produzidas sinteticamente de acordo com o Exemplo 6. A **Figura 13B** é um cromatograma resultante da análise do bioanalisador do vetor de ceDNA purificado com ITRs WT/WT de acordo com o Exemplo 6. Os dados de cada um dos picos no cromatograma são apresentados na **Tabela 8**.

[00147] A **Figura 14A** retrata uma representação esquemática de um vetor de ceDNA com uma ITR de AAV2 do tipo selvagem esquerda e uma ITR mutante de truncamento direita que é produzida sinteticamente de acordo com o Exemplo 5. A **Figura 14B** é um cromatograma resultante da análise de bioanalisador do vetor de ceDNA purificado com ITRs WT/mutantes de acordo com o Exemplo 6. Os dados de cada um dos picos no cromatograma são apresentados na **Tabela 9**.

[00148] A **Figura 15A** representa uma representação esquemática de um vetor de ceDNA com uma ITR mutante de truncamento esquerda e uma ITR mutante de truncamento direita diferente que é produzido sinteticamente de acordo com o Exemplo 6. A **Figura 15B** é um cromatograma resultante da análise de bioanalisador do vetor de ceDNA purificado com ITRs mutantes/mutantes assimétricas de acordo

com o Exemplo 6. Os dados de cada um dos picos no cromatograma são apresentados na Tabela 10.

[00149] A **Figura 16A** retrata uma representação esquemática de um vetor de ceDNA com uma ITR de AAV2 do tipo selvagem esquerda e uma ITR mutante de truncamento direita que é produzida tradicionalmente com o uso da produção de células Sf9. A **Figura 16B** é um cromatograma resultante da análise de bioanalisador do vetor de ceDNA produzido tradicionalmente purificado com ITRs WT/mutantes. Os dados de cada um dos picos no cromatograma são apresentados na Tabela 11.

[00150] A **Figura 17** representa os resultados dos ensaios de expressão celular *in vitro* apresentados no Exemplo 7 em comparação com a expressão do transgene a partir de vetores de ceDNA produzidos sinteticamente com os dos vetores de ceDNA produzidos tradicionalmente por Sf9 em células HepaRG. Uma representação esquemática de cada construto usado é estabelecida imediatamente acima da imagem da microscopia de fluorescência para as células tratadas com esse vetor de ceDNA após 6 dias da introdução do vetor de ceDNA indicado por nucleofecção (manchas brancas representam populações celulares que expressam transgene de GFP).

[00151] A **Figura 18A** fornece um gráfico que mostra os resultados quantitativos dos dias 3 e 7 dos dados de imaginologia *in vivo* de camundongos tratados com vetores de ceDNA produzidos sinteticamente ou tradicionalmente, de acordo com o Exemplo 8. A **Figura 18B** fornece as imagens de IVIS brutas dos camundongos tratados (a partir das quais a quantificação foi feita para o gráfico da Figura 18A) no dia 7 após o tratamento e demonstra que a maioria da expressão de luciferase estava localizada no fígado conforme esperado, independentemente do método de produção do ceDNA usado para tratar os camundongos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00152] Os métodos e composições fornecidos no presente documento são baseados, em parte, na descoberta de um método de produção sintética útil para gerar vetores de DNA de extremidade fechada, incluindo, mas sem limitação, vetores de ceDNA que têm menos impurezas e/ou maior rendimento em comparação com os vetores de DNA produzidos em uma linhagem celular de insetos, tal como a linhagem celular de Sf9, e/ou em que o processo de produção é simplificado ou tornado mais eficiente ou econômico em relação aos métodos de produção baseados em células tradicionais. Em uma modalidade, células não são usadas para replicar os vetores de DNA e, portanto, a produção é livre de células. Por conseguinte, é fornecido no presente documento um método para sintetizar vetores de DNA de extremidade fechada sem usar células. Em algumas modalidades, é fornecido no presente documento um método para sintetizar vetores de DNA de extremidade fechada sem o uso de células de inseto. Também são fornecidas no presente documento composições de vetores de DNA de extremidade fechada produzidas com o uso dos métodos de produção sintética do presente documento, incluindo composições de vetores de ceDNA e uso desses vetores de DNA de extremidade fechada e vetores de ceDNA.

[00153] A presente invenção se refere a um processo *in vitro* para produção de vetores de DNA de extremidade fechada, produtos correspondentes a vetores de DNA produzidos pelos métodos do presente documento e usos dos mesmos, e oligonucleotídeos e kits úteis no processo da invenção.

[00154] Os vetores de DNA de extremidade fechada produzidos pelos métodos descritos no presente documento são vantajosos em relação a outros vetores, pois podem ser usados com mais segurança para expressar um transgene em uma célula, tecido ou sujeito. Isto é,

efeitos colaterais indesejáveis podem potencialmente ser minimizados gerando-se os vetores lineares por esses métodos livres de células, uma vez que os vetores resultantes são livres de contaminantes bacterianos ou de células de insetos. Os métodos de produção sintética também podem resultar em maior pureza do vetor desejado. O método de produção sintética também pode ser mais eficiente e/ou econômico do que os métodos de produção baseados em células tradicionais para esses vetores.

[00155] Os vetores sintetizados, conforme descrito no presente documento, podem expressar qualquer transgene desejado, por exemplo, um transgene para tratar ou curar uma determinada doença. Um indivíduo versado na técnica reconhecerá prontamente que qualquer transgene usado em métodos de terapia gênica convencionais com vetores recombinantes convencionais pode ser adaptado para expressão por, por exemplo, vetores de ceDNA produzidos pelos métodos sintéticos descritos no presente documento.

I. DEFINIÇÕES

[00156] A menos que definido de outra forma no presente documento, os termos científicos e técnicos usados relacionados ao presente pedido terão os significados que são comumente entendidos pelos versados na técnica a que essa descrição pertence. Deve ser entendido que esta invenção não está limitada à metodologia, protocolos e reagentes específicos, etc., descritos no presente documento e, sendo assim, pode variar. A terminologia usada no presente documento tem o objetivo de descrever apenas modalidades específicas, e não se destina a limitar o escopo da presente invenção, que é definido apenas pelas reivindicações. Definições de termos comuns em imunologia e biologia molecular podem ser encontradas em The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19ª Edição, publicado por Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3); Robert S. Porter *et*

al. (eds.), Fields Virology, 6ª Edição, publicado por Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, EUA (2013), Knipe, D.M. e Howley, P.M. (ed.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, publicada por Blackwell Science Ltd., 1.999 a 2.012 (ISBN 9783527600908); e Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology de Werner Luttmann, publicado por Elsevier, 2006; Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305); Lewin's Genes XI, publicado por Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055); Michael Richard Green e Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., EUA (2012) (ISBN 1936113414); Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, EUA (2012) (ISBN 044460149X); Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN047150338X, 9780471503385), Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005; e Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737), cujos conteúdos são todos incorporados ao presente documento a título de referência em suas totalidades.

[00157] Conforme usado no presente documento, os termos "produção livre de células", "produção de vetores de DNA de extremidade fechada sintéticos" e "produção sintética" e seus equivalentes gramaticalmente relacionados são usados de forma intercambiável e se refe-

rem à produção de uma ou mais moléculas em uma maneira que não envolva replicação ou outra multiplicação da molécula por uma célula ou dentro da mesma ou com o uso de um extrato celular. A produção sintética evita a contaminação da molécula produzida com contaminantes celulares (por exemplo, proteínas celulares ou ácidos nucleicos celulares) e ainda evita modificações específicas de célula indesejadas da molécula durante o processo de produção (por exemplo, metilação ou glicosilação ou outra modificação pós-tradução).

[00158] Conforme usado no presente documento, os termos "sequência de nucleotídeos heteróloga" e "transgene" são usados de forma intercambiável e se referem a um ácido nucleico de interesse (que não seja um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de capsídeo) que é incorporado e pode ser entregue e expresso por um vetor de ceDNA, conforme divulgado no presente documento.

[00159] Conforme usado no presente documento, os termos "cassete de expressão" e "cassete de transcrição" e "unidade de expressão gênica" são usados de forma intercambiável e se referem a um trecho linear de ácidos nucleicos que inclui um transgene que está operacionalmente ligado a um ou mais promotores ou outras sequências reguladoras suficientes para direcionar a transcrição do transgene, mas que não compreende sequências que codificam capsídeo, outras sequências de vetores ou regiões de repetição terminal invertidas. Um cassete de expressão pode adicionalmente compreender uma ou mais sequências que atuam em *cis* (por exemplo, promotores, intensificadores ou repressores), um ou mais íntrons e um ou mais elementos reguladores pós-transcricionais.

[00160] Os termos "polinucleotídeo" e "ácido nucleico", usados de forma intercambiável no presente documento, se referem a uma forma polimérica de nucleotídeos de qualquer comprimento, seja ribonucleotídeo ou desoxirribonucleotídeo. Assim, esse termo inclui DNA ou RNA

de filamento simples, duplo ou de múltiplos filamentos, DNA genômico, cDNA, híbridos de DNA-RNA ou um polímero que inclui bases de purina e pirimidina ou outras bases naturais, modificadas quimicamente ou bioquimicamente, não naturais ou de nucleotídeo derivatizado. "Oligonucleotídeo" geralmente se refere a polinucleotídeos entre cerca de 5 e cerca de 100 nucleotídeos de DNA de filamento simples ou duplo. No entanto, para os fins desta descrição, não há limite máximo para o comprimento de um oligonucleotídeo. Os oligonucleotídeos também são conhecidos como "oligômeros" ou "oligos" e podem ser isolados de genes ou sintetizados quimicamente por métodos conhecidos na técnica. Os termos "polinucleotídeo" e "ácido nucleico" devem ser entendidos como incluindo, conforme aplicável às modalidades descritas, polinucleotídeos de filamento simples (tal como senso ou antissenso) e de filamento duplo.

[00161] O termo "construto de ácido nucleico", conforme usado no presente documento, se refere a uma molécula de ácido nucleico, de filamento simples ou duplo, que é isolada de um gene de ocorrência natural ou que é modificada para conter segmentos de ácidos nucleicos em uma maneira que não existiria de outra forma na natureza ou que é sintética. O termo construto de ácido nucleico é sinônimo do termo "cassete de expressão" quando o construto de ácido nucleico contém as sequências de controle necessárias para a expressão de uma sequência de codificação da presente descrição. Um "cassete de expressão" inclui uma sequência de codificação de DNA operacionalmente ligada a um promotor.

[00162] Por "hibridizável" ou "complementar" ou "substancialmente complementar" significa que um ácido nucleico (por exemplo, RNA) inclui uma sequência de nucleotídeos que permite a ligação não covalente, isto é, formar pares de base de Watson-Crick e/ou pares de base de G/U, "anelamento" ou "hibridização" com outro ácido nucleico de

maneira antiparalela específica de sequência (isto é, um ácido nucleico se liga especificamente a um ácido nucleico complementar) sob as condições *in vitro* e/ou *in vivo* apropriadas de temperatura e força iônica de solução. Conforme é conhecido na técnica, o emparelhamento de base de Watson-Crick padrão inclui: emparelhamento de adenina (A) com timidina (T), emparelhamento de adenina (A) com uracila (U) e emparelhamento de guanina (G) com citosina (C). Além disso, também é conhecido na técnica que, para hibridização entre duas moléculas de RNA (por exemplo, dsRNA), bases de guanina (G) pareiam com uracila (U). Por exemplo, o emparelhamento de bases de G/U é parcialmente responsável pela degeneração (isto é, redundância) do código genético no contexto do emparelhamento de bases anticódon de tRNA com códons no mRNA. No contexto dessa descrição, uma guanina (G) de um segmento de ligação a proteínas (dsRNA duplex) de uma molécula de RNA que alveja DNA do sujeito é considerada complementar a uma uracila (U) e vice-versa. Sendo assim, quando um par de bases de G/U pode ser produzido, em uma determinada posição nucleotídica, um segmento de ligação a proteínas (dsRNA duplex) de uma molécula de RNA que alveja o DNA do sujeito, a posição não é considerada não complementar, mas em vez disso, é considerada complementar.

[00163] Os termos "peptídeo", "polipeptídeo" e "proteína" são usados no presente documento de forma intercambiável e se referem a uma forma polimérica de aminoácidos de qualquer comprimento, que pode incluir aminoácidos codificados e não codificados, aminoácidos derivados modificados quimicamente ou bioquimicamente e polipeptídeos que possuem estruturas principais de peptídeo modificadas.

[00164] Uma sequência de DNA que "codifica" um produto de gene de RNA ou proteína específico é uma sequência de ácidos nucleicos de DNA que é transcrita na proteína e/ou RNA específico. Um polinu-

cleotídeo de DNA pode codificar um RNA (mRNA) que é traduzido em proteína, ou um polinucleotídeo de DNA pode codificar um RNA que não é traduzido em proteína (por exemplo, tRNA, rRNA ou um RNA que alveja DNA; também denominado RNA "não codificante" ou "ncRNA").

[00165] Conforme usado no presente documento, o termo "gene de porto seguro genômico" ou "gene de porto seguro" se refere a um gene ou local em que uma sequência de ácido nucleico pode ser inserida de modo que a sequência possa integrar e funcionar de maneira previsível (por exemplo, expressar uma proteína de interesse) sem consequências negativas significativas para a atividade gênica endógena ou a promoção de câncer. Em algumas modalidades, um gene de porto seguro também é um local ou gene em que uma sequência de ácidos nucleicos inserida pode ser expressa de modo eficaz e em níveis mais altos do que um sítio não porto seguro.

[00166] Conforme usado no presente documento, o termo "entrega de genes" significa um processo pelo qual o DNA estranho é transferido para células hospedeiras para aplicações de terapia gênica.

[00167] Conforme usado no presente documento, o termo "repetição terminal" ou "TR" inclui qualquer repetição terminal viral ou sequência sintética que compreende pelo menos uma origem de replicação mínima necessária e uma região que compreende uma estrutura em forma de gancho palíndroma. Uma sequência de ligação à Rep ("RBS") (também conhecida como RBE (elemento de ligação à Rep)) e um sítio de resolução terminal ("TRS") juntos constituem uma "origem de replicação mínima necessária" e, portanto, a TR compreende pelo menos uma RBS e pelo menos um TRS. As TRs que são o complemento inverso entre si dentro de um determinado trecho de sequência de polinucleotídeos são tipicamente denominadas "repetição terminal invertida" ou "ITR". No contexto de um vírus, as ITRs medeiam a repli-

cação, empacotamento de vírus, integração e resgate pró-vírus. Conforme constatou-se de modo inesperado na invenção no presente documento, as TRs que não são complementos inversos em todo o seu comprimento ainda podem desempenhar as funções tradicionais das ITRs e, portanto, o termo ITR é usado no presente documento de modo a se referir a uma TR em um genoma de ceDNA ou vetor de ceDNA que é capaz de mediar a replicação de vetor de ceDNA. Será entendido por um indivíduo versado na técnica que em configurações complexas de vetor de ceDNA podem estar presentes mais de duas ITRs ou pares de ITRs assimétricos. A ITR pode ser uma ITR de AAV ou uma ITR não AAV ou pode ser derivada de uma ITR de AAV ou uma ITR não AAV. Por exemplo, a ITR pode ser derivada da família Parvoviridae, que abrange parvovírus e dependovírus (por exemplo, parvovírus canino, parvovírus bovino, parvovírus de camundongo, parvovírus suíno, parvovírus humano B-19) ou a forma de gancho de SV40 que serve como origem de replicação de SV40 pode ser usada como uma ITR, que pode ser modificada ainda mais por truncamento, deleção, inserção e/ou adição. Os vírus da família de Parvoviridae consistem em duas subfamílias: Parvovirinae, que infectam vertebrados, e Densovirinae, que infectam invertebrados. Os dependoparvovírus incluem a família viral dos vírus adenoassociados (AAV) que são capazes de replicação em hospedeiros vertebrados, incluindo, mas sem limitação, espécies humanas, primatas, bovinas, caninas, equinas e ovinas. Por conveniência no presente documento, uma ITR localizada em 5' a (a montante de) um cassete de expressão em um vetor de ceDNA é denominada "ITR 5'" ou "ITR esquerda" e uma ITR localizada em 3' a (a jusante de) um cassete de expressão em um vetor de ceDNA é denominada "ITR 3'" ou "ITR direita".

[00168] Uma "ITR do tipo selvagem" ou "WT-ITR" se refere à sequência de uma sequência de ITR de ocorrência natural em um AAV

ou outro dependovírus que retém, por exemplo, atividade de ligação à Rep e capacidade de corte de Rep. A sequência de nucleotídeos de uma WT-ITR de qualquer sorotipo de AAV pode variar ligeiramente da sequência de ocorrência natural canônica devido à degeneração do código genético ou deriva, e, portanto, as sequências de WT-ITR abrangidas para uso no presente documento incluem sequências de WT-ITR como resultado de alterações de ocorrência natural que ocorrem durante o processo de produção (por exemplo, um erro de replicação).

[00169] Conforme usado no presente documento, o termo "WT-ITRs substancialmente simétricas" ou "par de WT-ITRs substancialmente simétricas" se refere a um par de WT-ITRs em um único genoma de ceDNA ou vetor de ceDNA que são ambas ITRs do tipo selvagem que têm uma sequência de complemento inversa em todo o seu comprimento. Por exemplo, uma ITR pode ser considerada uma sequência do tipo selvagem, mesmo que tenha um ou mais nucleotídeos que se desviam da sequência de ocorrência natural canônica, desde que as alterações não afetem as propriedades e a estrutura tridimensional geral da sequência. Em alguns aspectos, os nucleotídeos divergentes representam alterações de sequência conservadoras. Como um exemplo não limitante, uma sequência que tem pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com a sequência canônica (conforme medido, por exemplo, com o uso de BLAST nas configurações padrão) e também tem uma organização espacial tridimensional simétrica para a outra WT-ITR, de modo que suas estruturas 3D tenham o mesmo formato no espaço geométrico. A WT-ITR substancialmente simétrica tem as mesmas alças A, C-C' e B-B' no espaço 3D. Uma WT-ITR substancialmente simétrica pode ser funcionalmente confirmada como WT, determinando que a mesma tem um sítio de ligação à Rep operacional (RBE ou RBE') e um sítio de resolu-

ção terminal (trs) que emparelha com a proteína Rep apropriada. Pode-se opcionalmente testar outras funções, incluindo a expressão de transgene sob condições permissivas.

[00170] Conforme usado no presente documento, as frases de "ITR modificada" ou "mod-ITR" ou "ITR mutante" são usadas de forma intercambiável e se referem a uma ITR que possui uma mutação em pelo menos um ou mais nucleotídeos em comparação com a WT-ITR do mesmo sorotipo. A mutação pode resultar em uma alteração em uma ou mais regiões A, C, C', B, B' na ITR e pode resultar em uma alteração na organização espacial tridimensional (isto é, sua estrutura 3D no espaço geométrico) em comparação com a organização espacial 3D de uma WT-ITR do mesmo sorotipo.

[00171] Conforme usado no presente documento, o termo "ITRs assimétricas" também denominadas "pares de ITRs assimétricas" se refere a um par de ITRs em um único genoma de ceDNA ou vetor de ceDNA que não são complementos inversos em todo o seu comprimento. Como um exemplo não limitante, um par de ITRs assimétricas não tem uma organização espacial tridimensional simétrica à ITR cognata, de modo que suas estruturas 3D tenham formatos diferentes no espaço geométrico. Em outras palavras, um par de ITRs assimétricas tem a estrutura geométrica geral diferente, isto é, as mesmas têm organização diferente de suas alças de A, C-C' e B-B' no espaço 3D (por exemplo, uma ITR pode ter um braço C-C' curto e/ou braço B-B' curto em comparação com a ITR cognata). A diferença na sequência entre as duas ITRs pode ser devido a um ou mais dentre adição, deleção, truncamento ou mutação pontual de nucleotídeos. Em uma modalidade, uma ITR do par de ITRs assimétricas pode ser uma sequência de ITR de AAV do tipo selvagem e a outra ITR uma ITR modificada, conforme definido no presente documento (por exemplo, uma sequência de ITR sintética ou do tipo não selvagem). Em outra modalidade, ne-

nhuma das ITRs do par de ITRs assimétricas é uma sequência de AAV do tipo selvagem, e as duas ITRs são ITRs modificadas que têm formatos diferentes no espaço geométrico (isto é, uma estrutura geométrica geral diferente). Em algumas modalidades, uma mod-ITR de um par de ITRs assimétricas pode ter um braço C-C' curto e a outra ITR pode ter uma modificação diferente (por exemplo, um braço único ou um braço B-B' curto etc.), de modo que tenham diferentes organizações espaciais tridimensionais em comparação com a mod-ITR assimétrica cognata.

[00172] Conforme usado no presente documento, o termo "ITRs simétricas" se refere a um par de ITRs dentro de um único genoma de ceDNA ou vetor de ceDNA que são mutados ou modificados em relação às sequências de ITR dependovirais do tipo selvagem e são complementos inversos em todo o seu comprimento. Nenhuma das ITRs é uma sequência de AAV2 de ITR do tipo selvagem (isto é, são uma ITR modificada, também denominada ITR mutante), e podem ter uma diferença na sequência da ITR do tipo selvagem devido à adição, deleção, substituição, truncamento ou mutação pontual de nucleotídeos. Por conveniência no presente documento, uma ITR localizada em 5' a (a montante de) um cassete de expressão em um vetor de ceDNA é denominada "ITR 5'" ou "ITR esquerda" e uma ITR localizada em 3' a (a jusante de) um cassete de expressão em um vetor de ceDNA é denominada "ITR 3'" ou "ITR direita".

[00173] Conforme usado no presente documento, os termos "ITRs modificadas substancialmente simétricas" ou "par de ITRs-mod substancialmente simétricas" se refere a um par de ITRs modificadas dentro de um único genoma de ceDNA ou vetor de ceDNA que têm uma sequência de complemento inverso em todo seu comprimento. Por exemplo, a ITR modificada pode ser considerada substancialmente simétrica, mesmo que tenha algumas sequências de nucleotídeos que

se desviem da sequência de complemento inverso, desde que as alterações não afetem as propriedades e o formato geral. Como um exemplo não limitante, uma sequência que tem pelo menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência da sequência canônica (conforme medido com o uso de BLAST nas configurações padrão), e também tem uma organização espacial tridimensional simétrica para sua ITR modificada cognata, de modo que suas estruturas 3D tenham o mesmo formato no espaço geométrico. Em outras palavras, um par de ITRs modificadas substancialmente simétricas tem as mesmas alças de A, C-C' e B-B' organizadas no espaço 3D. Em algumas modalidades, as ITRs de um par de mod-ITRs podem ter diferentes sequências de nucleotídeos de complemento reverso, mas ainda têm a mesma organização espacial tridimensional simétrica - ou seja, ambas as ITRs têm mutações que resultam no mesmo formato 3D geral. Por exemplo, uma ITR (por exemplo, ITR 5') em um par de mod-ITRs pode ser de um sorotipo e a outra ITR (por exemplo, ITR 3') pode ser de um sorotipo diferente, no entanto, ambas podem ter a mesma mutação correspondente (por exemplo, se a ITR 5' tiver uma deleção na região C, a ITR 3' modificada cognata de um sorotipo diferente tem uma deleção na posição correspondente na região C'), de modo que o par de ITRs modificadas tenha a mesma organização espacial tridimensional simétrica. Em tais modalidades, cada ITR em um par de ITRs modificadas pode ser de diferentes sorotipos (por exemplo, AAV1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12), tal como a combinação de AAV2 e AAV6, com a modificação em uma ITR refletida na posição correspondente na ITR cognata de um sorotipo diferente. Em uma modalidade, um par de ITRs modificadas substancialmente simétricas se refere a um par de ITRs modificadas (mod-ITRs), desde que a diferença nas sequências de nucleotídeos entre as ITRs não afete as propriedades ou o formato geral e tenham substancialmente o mesmo

formato no espaço 3D. Como um exemplo não limitante, uma mod-ITR que tem pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência à mod-ITR canônica, conforme determinado por meios padrão bem-conhecidos na técnica, tal como BLAST (Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básica) ou BLASTN nas configurações padrão e também possui uma organização espacial tridimensional simétrica, de modo que sua estrutura 3D tenha o mesmo formato no espaço geométrico. Um par de mod-ITRs substancialmente simétricas tem as mesmas alças de A, C-C' e B-B' no espaço 3D, por exemplo, se uma ITR modificada em um par de mod-ITRs substancialmente simétricas tiver uma deleção de um braço de C-C', então, a ITR tem a deleção correspondente da alça de C-C' e também tem uma estrutura 3D similar das demais alças A e B-B' do mesmo formato no espaço geométrico de sua mod-ITR cognata.

[00174] O termo "flanqueamento" se refere a uma posição relativa de uma sequência de ácidos nucleicos em relação à outra sequência de ácidos nucleicos. Geralmente, na sequência ABC, B é flanqueado por A e C. O mesmo vale para a disposição AxBxC. Assim, uma sequência flanqueadora precede ou segue uma sequência flanqueada, mas não precisa ser contígua ou imediatamente adjacente à sequência flanqueada. Em uma modalidade, o termo flanqueamento se refere a repetições terminais em cada extremidade do vetor de ceDNA duplex linear.

[00175] Conforme usado no presente documento, o termo "genoma de ceDNA" se refere a um cassete de expressão que incorpora ainda pelo menos uma região de repetição terminal invertida. Um genoma de ceDNA pode compreender ainda uma ou mais regiões espaçadoras. Em algumas modalidades, o genoma de ceDNA é incorporado como um polinucleotídeo duplex intermolecular de DNA em um plasmídeo ou genoma viral.

[00176] Conforme usado no presente documento, o termo "região espaçadora de ceDNA" se refere a uma sequência intermediária que separa elementos funcionais no vetor de ceDNA ou no genoma de ceDNA. Em algumas modalidades, as regiões espaçadoras de ceDNA mantêm dois elementos funcionais a uma distância desejada para a funcionalidade ideal. Em algumas modalidades, as regiões espaçadoras de ceDNA fornecem ou aumentam a estabilidade genética do genoma de ceDNA dentro, por exemplo, de um plasmídeo ou baculovírus. Em algumas modalidades, as regiões espaçadoras de ceDNA facilitam a manipulação genética pronta do genoma de ceDNA, fornecendo uma localização conveniente para sítios de clonagem e similares. Por exemplo, em determinados aspectos, um oligonucleotídeo "poliligante" que contém vários sítios de endonuclease de restrição, ou uma sequência de quadro de leitura não aberta projetada para não ter sítios de ligação à proteína conhecidos (por exemplo, fator de transcrição) podem ser posicionados no genoma de ceDNA para separar os fatores de ação *cis*, por exemplo, inserção de 6 meros, 12 meros, 18 meros, 24 meros, 48 meros, 86 meros, 176 meros, etc. entre o sítio de resolução terminal e o elemento regulador transcricional a montante. De modo similar, o espaçador pode ser incorporado entre a sequência de sinal de poliadenilação e o sítio de resolução terminal 3'.

[00177] Conforme usado no presente documento, os termos "sítio de ligação à Rep", "elemento de ligação à Rep", "RBE" e "RBS" são usados de forma intercambiável e se referem a um sítio de ligação à proteína Rep (por exemplo, Rep de AAV 78 ou Rep de AAV 68) que após a ligação por uma proteína Rep permite que a proteína Rep realize sua atividade de endonuclease específica para o sítio na sequência que incorpora a RBS. Uma sequência RBS e seu complemento inverso juntos formam uma única RBS. As sequências RBS são conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'

(SEQ ID NO: 60), uma sequência RBS identificada em AAV2. Qualquer sequência RBS conhecida pode ser usada nas modalidades da invenção, incluindo outras sequências RBS de AAV conhecidas e outras sequências RBS de ocorrência natural conhecidas ou sintéticas. Sem estar limitado à teoria, acredita-se que o domínio de nuclease de uma proteína Rep se liga à sequência de nucleotídeos duplex GCTC e, assim, as duas proteínas Rep de AAV conhecidas se ligam diretamente e são montadas de modo estável no oligonucleotídeo duplex, 5'-(GCGC)(GCTC)(GCTC)(GCTC)-3' (SEQ ID NO: 60). Além disso, os conformadores agregados solúveis (isto é, número indefinido de proteínas Rep interassociadas) se dissociam e se ligam a oligonucleotídeos que contêm sítios de ligação à Rep. Cada proteína Rep interage com as bases nitrogenadas e a estrutura principal de fosfodiéster em cada filamento. As interações com as bases nitrogenadas fornecem especificidade de sequência, enquanto as interações com a estrutura principal de fosfodiéster são não específicas ou menos específicas para a sequência e estabilizam o complexo de proteína-DNA.

[00178] Conforme usado no presente documento, os termos "sítio de resolução terminal" e "TRS" são usados de forma intercambiável no presente documento e se referem a uma região na qual Rep forma uma ligação de tirosina-fosfodiéster com a timidina 5' gerando um OH 3' que serve como substrato para extensão de DNA através de uma polimerase de DNA celular, por exemplo, DNA pol delta ou DNA pol épsilon. Alternativamente, o complexo de Rep-timidina pode participar de uma reação de ligação coordenada. Em algumas modalidades, um TRS abrange minimamente uma timidina não emparelhada com base. Em algumas modalidades, a eficiência de corte da TRS pode ser controlada pelo menos em parte por sua distância dentro da mesma molécula da RBS. Quando o substrato aceitador é a ITR complementar, o produto resultante é um duplex intramolecular. As sequências TRS são

conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, 5'-GGTTGA-3' (SEQ ID NO: 61), a sequência hexanucleotídica identificada em AAV2. Qualquer sequência TRS conhecida pode ser usada nas modalidades da invenção, incluindo outras sequências TRS de AAV conhecidas e outras sequências TRS naturalmente conhecidas ou sintéticas, tais como AGTT (SEQ ID NO: 62), GGTTGG (SEQ ID NO: 63), AGTTGG (SEQ ID NO: 64), AGTTGA (SEQ ID NO: 65) e outros motivos, tal como RRTTRR (SEQ ID NO: 66).

[00179] Conforme usado no presente documento, o termo "ceDNA-plasmídeo" se refere a um plasmídeo que compreende um genoma de ceDNA como um duplex intermolecular.

[00180] Conforme usado no presente documento, o termo "ceDNA-bacmídeo" se refere a um genoma de baculovírus infeccioso que compreende um genoma de ceDNA como um duplex intermolecular que é capaz de se propagar em *E. coli* como um plasmídeo e, portanto, pode operar como um vetor de transporte para baculovírus.

[00181] Conforme usado no presente documento, o termo "ceDNA-baculovírus" se refere a um baculovírus que compreende um genoma de ceDNA como um duplex intermolecular dentro do genoma de baculovírus.

[00182] Conforme usado no presente documento, os termos "célula de inseto infectada por ceDNA-baculovírus" e "ceDNA-BIIC" são usados de forma intercambiável e se referem a uma célula hospedeira de invertebrado (incluindo, mas sem limitação, uma célula de inseto (por exemplo, uma célula Sf9)) com um ceDNA-baculovírus.

[00183] Conforme usado no presente documento, o termo "vetor de DNA com extremidade fechada" se refere a um vetor de DNA livre de capsídeo com pelo menos uma extremidade fechada covalentemente e em que pelo menos parte do vetor tem uma estrutura duplex intramolecular.

[00184] Conforme usado no presente documento, os termos "vetor de ceDNA" e "ceDNA" são usados de forma intercambiável e se referem a um vetor de DNA de extremidade fechada que compreende pelo menos um palíndromo terminal. Em algumas modalidades, o ceDNA compreende duas extremidades fechadas covalentemente.

[00185] Conforme definido no presente documento, "repórteres" se referem a proteínas que podem ser usadas para fornecer leituras detectáveis. As repórteres geralmente produzem um sinal mensurável, tal como fluorescência, cor ou luminescência. As sequências codificadoras de proteínas repórter codificam proteínas cuja presença na célula ou no organismo é facilmente observada. Por exemplo, proteínas fluorescentes levam à fluorescência de célula quando a mesma é excitada com luz de um comprimento de onda específico, as luciferases fazem com que a célula catalise uma reação que produz luz, e enzimas, tal como β-galactosidase, convertem um substrato em um produto colorido. Polipeptídeos repórter exemplificativos úteis para fins experimentais ou de diagnóstico incluem, mas sem limitação, β-lactamase, β-galactosidase (LacZ), fosfatase alcalina (AP), timidina cinase (TK), proteína verde fluorescente (GFP) e outras proteínas fluorescentes, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), luciferase e outros bem-conhecidos na técnica.

[00186] Conforme usado no presente documento, o termo "proteína efetora" se refere a um polipeptídeo que fornece uma leitura detectável, tal como, por exemplo, um polipeptídeo repórter, ou mais apropriadamente, tal como um polipeptídeo que extermina uma célula, por exemplo, uma toxina ou um agente que torna uma célula suscetível à exterminação com um agente escolhido ou a falta do mesmo. Proteínas efetoras incluem qualquer proteína ou peptídeo que alveje ou danifique diretamente o DNA e/ou RNA da célula hospedeira. Por exemplo, proteínas efetoras podem incluir, mas sem limitação, uma endo-

nuclease de restrição que tem como alvo uma sequência de DNA de célula hospedeira (seja genômica ou em um elemento extracromossômico), uma protease que degrada um alvo polipeptídico necessário para a sobrevivência celular, um inibidor de DNA girase e uma toxina do tipo ribonuclease. Em algumas modalidades, a expressão de uma proteína efetora controlada por um circuito biológico sintético, conforme descrito no presente documento, pode participar como um fator de outro circuito biológico sintético, expandindo assim a faixa e a complexidade da capacidade de resposta de um sistema de circuitos biológicos.

[00187] Reguladores de transcrição se referem a ativadores e repressores de transcrição que ativam ou reprimem a transcrição de um gene de interesse. Os promotores são regiões de ácido nucleico que iniciam a transcrição de um gene específico. Os ativadores de transcrição geralmente se ligam próximos a promotores de transcrição e recrutam RNA polimerase para iniciar diretamente a transcrição. Os repressores se ligam aos promotores de transcrição e dificultam estericamente a iniciação de transcrição por RNA polimerase. Outros reguladores de transcrição podem servir como ativadores ou repressores, dependendo de onde se ligam e das condições celulares e ambientais. Exemplos não limitantes de classes reguladoras de transcrição incluem, mas sem limitação, proteínas de homeodomínio, proteínas de dedos de zinco, proteínas de hélice com abas (*forkhead*) e proteínas de zíper de leucina.

[00188] Conforme usado no presente documento, uma "proteína repressora" ou "proteína indutora" é uma proteína que se liga a um elemento de sequência reguladora e reprime ou ativa, respectivamente, a transcrição de sequências operacionalmente ligadas ao elemento de sequência reguladora. As proteínas repressoras e indutoras preferenciais, conforme descrito no presente documento, são sensíveis à

presença ou ausência de pelo menos um agente de entrada ou entrada ambiental. As proteínas preferenciais, conforme descrito no presente documento, são de forma modular, que compreende, por exemplo, elementos ou domínios de ligação ao DNA separáveis e ligação ao agente de entrada ou responsivos.

[00189] Conforme usado no presente documento, "carreador" inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, veículos, revestimentos, diluentes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardantes de absorção, tampões, soluções carreadoras, suspensões, coloides e similares. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmaceuticamente ativas é bem-conhecido na técnica. Os ingredientes ativos suplementares também podem ser incorporados às composições. A frase "farmaceuticamente aceitável" se refere a entidades e composições moleculares que não produzem uma reação indesejável tóxica, alérgica ou similar quando administradas a um hospedeiro.

[00190] Conforme usado no presente documento, um "domínio responsivo ao agente de entrada" é um domínio de um fator de transcrição que se liga ou responde a uma condição ou agente de entrada de uma maneira que torna um domínio de fusão de ligação a DNA ligado responsivo à presença dessa condição ou entrada. Em uma modalidade, a presença da condição ou entrada resulta em uma alteração conformacional no domínio responsivo ao agente de entrada ou em uma proteína na qual é fundido, que modifica a atividade de modulação de transcrição do fator de transcrição.

[00191] O termo "*in vivo*" se refere a ensaios ou processos que ocorrem em um organismo ou dentro do mesmo, tal como um animal multicelular. Em alguns dos aspectos descritos no presente documento, pode-se dizer que um método ou uso ocorre "*in vivo*" quando um organismo unicelular, tal como uma bactéria, é usado. O termo "*ex vi-*

vo" se refere a métodos e usos que são realizados com o uso de uma célula viva com uma membrana intacta que está fora do corpo de um animal ou planta multicelular, por exemplo, explantes, células cultivadas, incluindo células primárias e linhagens celulares, linhagens celulares transformadas e tecido ou células extraídos, incluindo células sanguíneas, entre outros. O termo "*in vitro"* se refere a ensaios e métodos que não exigem a presença de uma célula com uma membrana intacta, tais como extratos celulares, e podem se referir à introdução de um circuito biológico sintético programável em um sistema não celular, tal como um meio que não compreende células ou sistemas celulares, tais como extratos celulares.

[00192] O termo "promotor", conforme usado no presente documento, se refere a qualquer sequência de ácidos nucleicos que regula a expressão de outra sequência de ácidos nucleicos, conduzindo a transcrição da sequência de ácidos nucleicos, que pode ser um gene alvo heterólogo que codifica uma proteína ou um RNA. Os promotores podem ser constitutivos, indutíveis, repressíveis, específicos para tecido ou qualquer combinação dos mesmos. Um promotor é uma região de controle de uma sequência de ácidos nucleicos na qual são controladas a iniciação e a taxa de transcrição do restante de uma sequência de ácidos nucleicos. Um promotor também pode conter elementos genéticos nos quais proteínas e moléculas reguladoras podem se ligar, tais como RNA polimerase e outros fatores de transcrição. Em algumas modalidades dos aspectos descritos no presente documento, um promotor pode conduzir a expressão de um fator de transcrição que regula a expressão do próprio promotor. Dentro da sequência promotora, será encontrado um sítio de iniciação de transcrição, bem como domínios de ligação às proteínas responsáveis pela ligação de RNA polimerase. Os promotores eucarióticos contêm frequentemente, mas nem sempre, caixas "TATA" e caixas "CAT". Vários promotores, inclu-

indo promotores induzíveis, podem ser utilizados para conduzir a expressão de transgenes nos vetores de ceDNA divulgados no presente documento. Uma sequência de promotores pode ser limitada em seu terminal 3' pelo sítio de iniciação de transcrição e se estende a montante (na direção 5') para incluir o número mínimo de bases ou elementos necessários para iniciar a transcrição em níveis detectáveis acima do fundo.

[00193] O termo "intensificador", conforme usado no presente documento, se refere a uma sequência reguladora de ação cis (por exemplo, 50 a 1.500 pares de bases) que liga uma ou mais proteínas (por exemplo, proteínas ativadoras ou fator de transcrição) para aumentar a ativação transcricional de uma sequência de ácidos nucleicos. Os intensificadores podem ser posicionados em até 1.000.000 de pares de bases a montante do sítio de iniciação de gene ou a jusante do sítio de iniciação de gene que os mesmos regulam. Um intensificador pode ser posicionado dentro de uma região intrônica ou na região exônica de um gene não relacionado.

[00194] Pode-se dizer que um promotor conduz a expressão ou conduz a transcrição da sequência de ácidos nucleicos que regula. As frases "operacionalmente ligado", "operacionalmente posicionado", "operativamente ligado", "sob controle" e "sob controle transcricional" indicam que um promotor está em um local e/ou orientação funcionais corretos em relação a uma sequência de ácidos nucleicos que regula para controlar a iniciação de transcrição e/ou expressão dessa sequência. Um "promotor invertido", conforme usado na presente invenção, se refere a um promotor no qual a sequência de ácidos nucleicos está na orientação reversa, de modo que o que era o filamento codificador agora é o filamento não codificador e vice-versa. Sequências promotoras invertidas podem ser usadas em várias modalidades para regular o estado de uma chave. Além disso, em várias modalidades,

um promotor pode ser usado em conjunto com um intensificador.

[00195] Um promotor pode ser um naturalmente associado a um gene ou sequência, conforme pode ser obtido isolando-se as sequências não codificadoras 5' localizadas a montante do segmento de codificação e/ou éxon de um determinado gene ou sequência. Esse promotor pode ser denominado "endógeno". De modo similar, em algumas modalidades, um intensificador pode ser um naturalmente associado a uma sequência de ácidos nucleicos, localizada a jusante ou a montante dessa sequência.

[00196] Em algumas modalidades, um segmento de ácido nucleico codificador é posicionado sob o controle de um "promotor recombinante" ou "promotor heterólogo", ambos os quais se referem a um promotor que normalmente não está associado à sequência de ácidos nucleicos codificada à qual está operacionalmente ligado em seu ambiente natural. Um intensificador recombinante ou heterólogo se refere a um intensificador que normalmente não está associado a uma dada sequência de ácidos nucleicos em seu ambiente natural. Tais promotores ou intensificadores podem incluir promotores ou intensificadores de outros genes; promotores ou intensificadores isolados de qualquer outra célula procariótica, viral ou eucariótica; e promotores ou intensificadores sintéticos que não são "de ocorrência natural", isto é, compreendem diferentes elementos de diferentes regiões reguladoras de transcrição e/ou mutações que alteram a expressão através de métodos de modificação genética conhecidos na técnica. Além de produzir sequências de ácidos nucleicos de promotores e intensificadores sinteticamente, as sequências de promotores podem ser produzidas com o uso da tecnologia de clonagem recombinante e/ou de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo PCR, em conexão com os circuitos e módulos biológicos sintéticos divulgados no presente documento (consultar, por exemplo, Patente nº US 4.683.202, Patente nº US 5.928.906,

cada uma incorporada ao presente documento a título de referência). Além disso, contempla-se que sequências de controle que conduzem a transcrição e/ou expressão de sequências dentro de organelas não nucleares, tais como mitocôndrias, cloroplastos e similares, também possam ser empregadas.

[00197] Conforme descrito no presente documento, um "promotor induzível" é aquele que é caracterizado por iniciar ou intensificar a atividade transcricional quando na presença de, influenciado por ou posto em contato com um indutor ou agente indutor. Um "indutor" ou "agente indutor", conforme definido no presente documento, pode ser endógeno, ou uma proteína ou composto normalmente exógeno que é administrado de modo a ser ativo na indução de atividade transcricional do promotor induzível. Em algumas modalidades, o indutor ou agente indutor, isto é, um produto químico, um composto ou uma proteína, pode ser o resultado da transcrição ou expressão de uma sequência de ácidos nucleicos (isto é, um indutor pode ser uma proteína indutora expressa por outro componente ou módulo), que por si só pode estar sob o controle ou um promotor induzível. Em algumas modalidades, um promotor induzível é induzido na ausência de determinados agentes, tal como um repressor. Exemplos de promotores induzíveis incluem, mas sem limitação, tetraciclina, metalotionina, ecdisona, vírus de mamífero (por exemplo, o promotor tardio de adenovírus; e repetição terminal longa de vírus de tumor mamário de camundongo (MMTV-LTR)) e outros promotores responsivos a esteroides, promotores responsivos à rapamicina e similares.

[00198] Os termos "sequências reguladoras de DNA", "elementos de controle" e "elementos reguladores", usados de forma intercambiável no presente documento, se referem a sequências de controle transcricionais e translacionais, tais como promotores, intensificadores, sinais de poliadenilação, terminadores, sinais de degradação de prote-

ínas e similares, que fornecem e/ou regulam a transcrição de uma sequência não codificadora (por exemplo, RNA que alveja DNA) ou uma sequência codificadora (por exemplo, polipeptídeo modificador direcionado ao sítio ou polipeptídeo de Cas9/Csn1) e/ou regulam a tradução de um polipeptídeo codificado.

[00199] "Operacionalmente ligado" se refere a uma justaposição em que os componentes descritos estão em uma relação que lhes permite funcionar na maneira pretendida. Por exemplo, um promotor está operacionalmente ligado a uma sequência codificadora se o promotor afetar sua transcrição ou expressão. Um "cassete de expressão" inclui uma sequência de DNA heteróloga que está operacionalmente ligada a um promotor ou outra sequência reguladora suficiente para direcionar a transcrição do transgene no vetor de ceDNA. Promotores adequados incluem, por exemplo, promotores específicos para tecido. Os promotores também podem ser de origem de AAV.

[00200] O termo "sujeito", conforme usado no presente documento, se refere a um ser humano ou animal, a quem é fornecido tratamento, incluindo tratamento profilático, com o vetor de ceDNA de acordo com a presente invenção. Normalmente, o animal é um vertebrado, tal como, mas sem limitação, primata, roedor, animal doméstico ou animal de caça. Os primatas incluem, mas sem limitação, chimpanzés, macacos cinomolgos, macacos-aranha e macacos, por exemplo, Rhesus. Os roedores incluem camundongos, ratos, marmotas, furões, coelhos e hamsters. Os animais domésticos e de caça incluem, mas sem limitação, vacas, cavalos, porcos, veados, bisões, búfalos, espécies felinas, por exemplo, gato doméstico, espécies caninas, por exemplo, cachorro, raposa, lobo, espécies aviárias, por exemplo, galinha, ema, avestruz e peixe, por exemplo, truta, peixe-gato e salmão. Em determinadas modalidades dos aspectos descritos no presente documento, o sujeito é um mamífero, por exemplo, um primata ou um ser humano.

Um sujeito pode ser homem ou mulher. Além disso, um sujeito pode ser um bebê ou uma criança. Em algumas modalidades, o sujeito pode ser um recém-nascido ou não nascido, por exemplo, o sujeito está *in utero.* De preferência, o sujeito é um mamífero. O mamífero pode ser um primata humano, não humano, camundongo, rato, cachorro, gato, cavalo ou vaca, mas não está limitado a esses exemplos. Outros mamíferos que não seres humanos podem ser usados de modo vantajoso como sujeitos que representam modelos animais de doenças e distúrbios. Além disso, os métodos e composições descritos no presente documento podem ser usados para animais domesticados e/ou animais de estimação. Um sujeito humano pode ser de qualquer idade, sexo, raça ou grupo étnico, por exemplo, caucasiano (branco), asiático, africano, preto, afro-americano, africano europeu, hispânico, médio-oriental, etc. Em algumas modalidades, o sujeito pode ser um paciente ou outro sujeito em um ambiente clínico. Em algumas modalidades, o sujeito já está em tratamento. Em algumas modalidades, o sujeito é um embrião, um feto, um recém-nascido, uma criança pequena, uma criança, um adolescente ou um adulto. Em algumas modalidades, o sujeito é um feto humano, um neonato humano, uma criança pequena humana, uma criança humana, um adolescente humano ou um adulto humano. Em algumas modalidades, o sujeito é um embrião animal, ou embrião não humano ou embrião de primata não humano. Em algumas modalidades, o sujeito é um embrião humano.

[00201] Conforme usado no presente documento, o termo "célula hospedeira" inclui qualquer tipo de célula suscetível à transformação, transfecção, transdução e similares com uma construção de ácido nucleico ou vetor de expressão de ceDNA da presente descrição. Como exemplos não limitativos, uma célula hospedeira pode ser uma célula primária isolada, células-tronco pluripotentes, células $CD34^{+}$), células-tronco pluripotentes induzidas ou qualquer uma de várias linhagens

celulares imortalizadas (por exemplo, células HepG2). Alternativamente, uma célula hospedeira pode ser uma célula *in situ* ou *in vivo* em um tecido, órgão ou organismo.

[00202] O termo "exógeno" se refere a uma substância presente em uma célula que não seja a sua fonte nativa. O termo "exógeno", quando usado no presente documento, pode se referir a um ácido nucleico (por exemplo, um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo) ou um polipeptídeo que foi introduzido por um processo que envolve a mão do homem em um sistema biológico, tal como uma célula ou organismo em que normalmente não é encontrado e se deseja introduzir o ácido nucleico ou polipeptídeo em tal célula ou organismo. Alternativamente, "exógeno" pode se referir a um ácido nucleico ou um polipeptídeo que foi introduzido por um processo que envolve a mão do homem em um sistema biológico, tal como uma célula ou organismo no qual é encontrado em quantidades relativamente baixas e se deseja aumentar a quantidade do ácido nucleico ou polipeptídeo na célula ou organismo, por exemplo, para criar expressão ou níveis ectópicos. Em contrapartida, o termo "endógeno" se refere a uma substância que é nativa à célula ou sistema biológico.

[00203] O termo "identidade de sequência" se refere à relação entre duas sequências de nucleotídeos. Para os fins da presente descrição, o grau de identidade de sequência entre duas sequências de desoxirribonucleotídeos é determinado com o uso do algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman e Wunsch, 1970, supra), conforme implementado no programa Needle do pacote EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), de preferência, versão 3.0.0 ou posterior. Os parâmetros opcionais usados são penalidade de abertura de lacuna de 10, penalidade de extensão de lacuna de 0,5 e a matriz de substituição EDNAFULL (versão EMBOSS de NCBI NUC4.4). A saída de Needle denominada

"identidade mais longa" (obtida com o uso da opção -nobrief) é usada como a identidade percentual e é calculada da seguinte forma: (Desoxirribonucleotídeos idênticos x 100) / (Comprimento de Alinhamento - número total de lacunas no alinhamento). O comprimento do alinhamento é, de preferência, de pelo menos 10 nucleotídeos, de preferência, de pelo menos 25 nucleotídeos, com mais preferência, de 50 nucleotídeos e com a máxima preferência, de pelo menos 100 nucleotídeos.

[00204] O termo "homologia" ou "homólogo", conforme usado no presente documento, é definido como a porcentagem de resíduos de nucleotídeos no ramo de homologia que são idênticos aos resíduos de nucleotídeos na sequência correspondente no cromossomo-alvo, depois de alinhar as sequências e introduzir lacunas, se necessário, para atingir a porcentagem máxima de identidade de sequência. O alinhamento para fins de determinação da porcentagem de homologia de sequência de nucleotídeos pode ser alcançado de várias maneiras que estão dentro da habilidade da técnica, por exemplo, com o uso de software de computador publicamente disponível, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ClustalW2 ou Megalign (DNASTAR). Aqueles versados na técnica podem determinar parâmetros apropriados para alinhar sequências, incluindo quaisquer algoritmos necessários para alcançar o alinhamento máximo ao longo de todo o comprimento das sequências que são comparadas. Em algumas modalidades, uma sequência de ácidos nucleicos (por exemplo, sequência de DNA), por exemplo, um braço de homologia de um modelo de reparo, é considerada "homóloga" quando a sequência é pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou mais, idêntica à sequência de ácidos nucleicos (por

exemplo, sequência genômica) nativa ou não editada correspondente da célula hospedeira.

[00205] O termo "heterólogo", conforme usado no presente documento, significa uma sequência de nucleotídeos ou polinucleotídeos que não é encontrada no ácido nucleico ou proteína nativa, respectivamente. Uma sequência de ácidos nucleicos heteróloga pode ser ligada a uma sequência de ácidos nucleicos de ocorrência natural (ou uma variante da mesma) (por exemplo, por modificação genética) para gerar uma sequência de nucleotídeos quimérica que codifica um polipeptídeo quimérico. Uma sequência de ácidos nucleicos heteróloga pode ser ligada a um polipeptídeo variante (por exemplo, por modificação genética) para gerar uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo variante de fusão.

[00206] Um "vetor" ou "vetor de expressão" é um replicon, tal como plasmídeo, bacmídeo, fago, vírus, vírion ou cosmídeo, ao qual outro segmento de DNA, isto é, um "inserto", pode ser anexado de modo a provocar a replicação do segmento anexado em uma célula. Um vetor pode ser um construto de ácidos nucleicos projetado para entrega a uma célula hospedeira ou para transferência entre diferentes células hospedeiras. Conforme usado no presente documento, um vetor pode ser viral ou não viral na origem e/ou na forma final; no entanto, para os fins da presente descrição, um "vetor" geralmente se refere a um vetor de ceDNA, pois esse termo é usado no presente documento. O termo "vetor" abrange qualquer elemento genético que seja capaz de replicação quando associado aos elementos de controle adequados e que possa transferir sequências de genes para as células. Em algumas modalidades, um vetor pode ser um vetor de expressão ou vetor recombinante.

[00207] Conforme usado no presente documento, o termo "vetor de expressão" se refere a um vetor que direciona a expressão de um

RNA ou polipeptídeo a partir de sequências ligadas a sequências reguladoras de transcrição no vetor. As sequências expressas serão frequentemente, mas não necessariamente, heterólogas à célula. Um vetor de expressão pode compreender elementos adicionais, por exemplo, o vetor de expressão pode ter dois sistemas de replicação, permitindo que seja mantido em dois organismos, por exemplo, em células humanas para expressão e em um hospedeiro procariótico para clonagem e amplificação. O termo "expressão" se refere aos processos celulares envolvidos na produção de RNA e proteínas e, quando apropriado, proteínas secretoras, incluindo onde aplicável, mas sem limitação, por exemplo, transcrição, processamento de transcrição, tradução e dobragem, modificação e processamento de proteína. "Produtos de expressão" incluem RNA transcrito de um gene e polipeptídeos obtidos por tradução de mRNA transcrito a partir de um gene. O termo "gene" significa a sequência de ácidos nucleicos que é transcrita (DNA) para RNA *in vitro* ou *in vivo* quando ligada operacionalmente a sequências reguladoras apropriadas. O gene pode incluir ou não regiões que precedem e seguem a região de codificação, por exemplo, sequências não traduzidas 5' (5'UTR) ou "líderes" e sequências UTR 3' ou "trailer", bem como sequências intermediárias (íntrons) entre segmentos de codificação individuais (éxons).

[00208] Por "vetor recombinante" entende-se um vetor que inclui uma sequência de ácidos nucleicos heteróloga, ou "transgene" que é capaz de expressão *in vivo*. Deve ser entendido que os vetores descritos no presente documento podem, em algumas modalidades, ser combinados com outras composições e terapias adequadas. Em algumas modalidades, o vetor é epissomal. O uso de um vetor epissomal adequado fornece um meio de manter o nucleotídeo de interesse no sujeito em DNA cromossômico extra com alto número de cópias, eliminando desse modo possíveis efeitos potenciais de integração

cromossômica.

[00209] A frase "doença genética", conforme usada no presente documento, se refere a uma doença, parcial ou completamente, direta ou indiretamente, causada por uma ou mais anormalidades no genoma, especialmente uma presente desde o nascimento. A anormalidade pode ser uma mutação, uma inserção ou uma deleção. A anormalidade pode afetar a sequência de codificação do gene ou sua sequência reguladora. A doença genética pode ser, mas sem limitação, DMD, hemofilia, fibrose cística, coreia de Huntington, hipercolesterolemia familiar (defeito de receptor de LDL), hepatoblastoma, doença de Wilson, porfiria hepática congênita, distúrbios hereditários de metabolismo hepático, síndrome de Lesch Nyhan, anemia falciforme, talassemias, xeroderma pigmentoso, anemia de Fanconi, retinite pigmentosa, ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom, retinoblastoma e doença de Tay-Sachs.

[00210] Conforme usado no presente documento, o termo "que compreende (ou compreendem)" ou "compreendendo" é usado em referência a composições, métodos e respectivos componentes, que são essenciais para o método ou composição, mas abertos à inclusão de elementos não especificados, essenciais ou não.

[00211] Conforme usado no presente documento, o termo "que consiste essencialmente em" se refere aos elementos necessários para uma dada modalidade. O termo permite a presença de elementos que não afetam de modo relevante as características básicas e inovadoras ou funcionais dessa modalidade. O uso de "que compreende" indica inclusão e não limitação.

[00212] O termo "que consiste em" se refere a composições, métodos e respectivos componentes, conforme descrito no presente documento, que são exclusivos de qualquer elemento não recitado nessa descrição da modalidade.

[00213] Conforme usado no presente documento, o termo "que consiste essencialmente em" se refere aos elementos necessários para uma dada modalidade. O termo permite a presença de elementos adicionais que não afetam de modo relevante as características básicas e inovadoras ou funcionais dessa modalidade da invenção.

[00214] Conforme usado neste relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma" e "o/a" incluem referências plurais, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Assim, por exemplo, as referências ao "método" incluem um ou mais métodos e/ou etapas do tipo descrito no presente documento e/ou que se tornarão evidentes para as pessoas versadas na técnica após a leitura desta descrição e assim por diante. De modo similar, a palavra "ou" deve incluir "e", a menos que o contexto indique claramente o contrário. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos no presente documento possam ser usados na prática ou no teste desta descrição, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. A abreviatura "p. ex." é derivada do exemplo latino gratia e é usada no presente documento para indicar um exemplo não limitante. Assim, a abreviação "p. ex." é sinônimo do termo "por exemplo".

[00215] Além dos exemplos operacionais, ou onde indicado de outra forma, todos os números que expressam quantidades de ingredientes ou condições de reação usados no presente documento devem ser entendidos como modificados em todos os casos pelo termo "cerca de". O termo "cerca de" quando usado em conexão com porcentagens pode significar ± 1%. A presente invenção é adicionalmente explicada em detalhes pelos exemplos a seguir, mas o escopo da invenção não deve ser limitado aos mesmos.

[00216] Agrupamentos de elementos ou modalidades alternativos da invenção divulgada no presente documento não devem ser inter-

pretados como limitações. Cada membro do grupo pode ser referido e reivindicado individualmente ou em qualquer combinação com outros membros do grupo ou outros elementos encontrados no presente documento. Um ou mais membros de um grupo podem ser incluídos ou deletados de um grupo por razões de conveniência e/ou patenteabilidade. Quando qualquer inclusão ou deleção ocorre, considera-se no presente documento que o relatório descritivo contém o grupo modificado, cumprindo assim a descrição escrita de todos os grupos Markush usados nas reivindicações anexas.

[00217] Em algumas modalidades de qualquer um dos aspectos, a descrição descrita no presente documento não se refere a um processo de clonagem de seres humanos, processos para modificar a identidade genética de linhagem germinativa de seres humanos, uso de embriões humanos para fins industriais ou comerciais ou processos para modificar a identidade genética de animais que possam causar-lhes sofrimento sem qualquer benefício médico substancial para o homem ou para os animais e também animais resultantes de tais processos.

[00218] Outros termos são definidos no presente documento na descrição dos vários aspectos da invenção.

[00219] Todas as patentes e outras publicações; incluindo referências de literatura, patentes emitidas, pedidos de patentes publicados e pedidos de patente pendentes; citados ao longo deste pedido, são expressamente incorporados no presente documento a título de referência com o objetivo de descrever e divulgar, por exemplo, as metodologias descritas em tais publicações que podem ser usadas em conexão com a tecnologia descrita no presente documento. Essas publicações são fornecidas apenas para sua descrição antes da data de apresentação do presente pedido. Nada nesse sentido deve ser interpretado como uma admissão de que os inventores não têm o direito de ante-

ceder essa descrição em virtude da invenção anterior ou por qualquer outra razão. Todas as declarações quanto à data ou representação quanto ao conteúdo desses documentos são baseadas nas informações disponíveis para as requerentes e não constituem nenhuma admissão quanto à exatidão das datas ou do conteúdo desses documentos.

[00220] A descrição das modalidades da descrição não se destina a ser exaustiva ou a limitar a descrição à forma precisa divulgada. Embora modalidades específicas da descrição e exemplos da mesma sejam descritos para fins ilustrativos, várias modificações equivalentes são possíveis dentro do escopo da descrição, conforme reconhecerão os versados na técnica relevante. Por exemplo, embora as etapas ou funções do método sejam apresentadas em uma determinada ordem, modalidades alternativas podem executar funções em uma ordem diferente, ou funções podem ser executadas substancialmente simultaneamente. Os ensinamentos da descrição fornecidos no presente documento podem ser aplicados a outros procedimentos ou métodos, conforme apropriado. As várias modalidades descritas no presente documento podem ser combinadas para fornecer outras modalidades. Os aspectos da descrição podem ser modificados, se necessário, para empregar as composições, funções e conceitos das referências e aplicação acima para fornecer ainda outras modalidades da descrição. Além disso, devido a considerações de equivalência funcional biológica, algumas alterações podem ser feitas na estrutura da proteína sem afetar a ação biológica ou química em tipo ou quantidade. Essas e outras alterações podem ser feitas à descrição à luz da descrição detalhada. Todas essas modificações devem ser incluídas no escopo das reivindicações anexas.

[00221] Elementos específicos de qualquer uma das modalidades acima mencionadas podem ser combinados ou substituídos por ele-

mentos em outras modalidades. Além disso, embora as vantagens associadas a certas modalidades da descrição tenham sido descritas no contexto dessas modalidades, outras modalidades também poderão exibir essas vantagens, e nem todas as modalidades precisam necessariamente exibir essas vantagens para se enquadrarem no escopo da descrição.

[00222] A tecnologia descrita no presente documento é adicionalmente ilustrada pelos exemplos a seguir, que de modo algum devem ser interpretados como limitantes adicionais. Deve ser entendido que esta invenção não está limitada à metodologia, protocolos e reagentes específicos, etc., descritos no presente documento e, sendo assim, pode variar. A terminologia usada no presente documento tem o objetivo de descrever apenas modalidades específicas, e não se destina a limitar o escopo da presente invenção, que é definido apenas pelas reivindicações.

II. MÉTODO DE PRODUÇÃO SINTÉTICO DETALHADO DE VETORES DE DNA CIRCULARES, INCLUINDO VETORES DE ceDNA.

[00223] A tecnologia descrita no presente documento se refere, de modo geral, a métodos para gerar vetores de DNA de extremidade fechada na ausência de células ou linhagens celulares. Sendo assim, os vetores resultantes têm menos impurezas do que vetores comparáveis produzidos com o uso de metodologias de produção de células convencionais.

A. MÉTODO DE PRODUÇÃO SINTÉTICO EM GERAL

[00224] Em algumas modalidades, é divulgado no presente documento um processo para síntese de vetores de DNA de extremidade fechada, incluindo vetores de ceDNA, que não requer o uso de nenhuma etapa microbiológica. Em algumas modalidades, o processo permite a síntese de vetores de DNA de extremidade fechada em um

sistema utilizando-se etapas de clivagem enzimática com o uso de endonucleases de restrição e etapas de ligação para gerar os vetores de DNA de extremidade fechada. Em quase todas as modalidades, o sistema sintético para produção de vetores de DNA é um sistema livre de células. Em algumas modalidades, o sistema livre de células é um sistema livre de células de insetos.

[00225] Será entendido por um indivíduo versado na técnica que uma ou mais enzimas para o método de produção sintética ou um ou mais componentes de oligonucleotídeos podem ser produzidos a partir de uma célula e usados nos métodos da invenção em forma purificada. Por conseguinte, em algumas modalidades, o método de produção sintético é um método livre de células, no entanto, uma enzima de restrição e/ou enzima de ligase podem ser produzidas a partir de uma célula.

[00226] Em uma modalidade, uma endonuclease de restrição e/ou uma proteína competente para ligação podem ser expressas ou fornecidas a partir de um vetor de expressão em uma célula, por exemplo, célula bacteriana. Em uma modalidade, uma célula, tal como uma célula bacteriana, que compreende um vetor de expressão que expressa uma ou mais dentre as endonucleases de restrição ou as enzimas ligase, pode estar presente. Portanto, embora os métodos divulgados no presente documento sejam principalmente direcionados a métodos sintéticos livres de células para gerar os vetores de DNA divulgados neste documento, os métodos de produção sintética em que uma célula, por exemplo, célula bacteriana, mas não uma célula de inseto, está presente e pode ser usada para expressar uma ou mais das enzimas necessárias no método, também estão incluídos em uma modalidade. Em tais modalidades, a célula que expressa uma endonuclease de restrição e/ou proteína competente para ligação não é uma célula de inseto. Em todas as modalidades em que uma célula está presente e

expressa uma ou mais endonucleases de restrição ou proteínas competentes para ligação, a célula não replica o vetor de DNA de extremidade fechada. Em outras palavras, o mecanismo intracelular da célula não se replica ou não está envolvido na replicação do vetor de DNA.

[00227] Em algumas modalidades, a síntese de vetores de DNA de extremidade fechada (por exemplo, vetores de ceDNA) descritos no presente documento é realizada em um processo livre de células *in vitro* a partir de um construto de DNA de filamento duplo ou de um ou mais oligonucleotídeos. O construto de DNA de filamento duplo ou um ou mais oligonucleotídeos são clivados com endonucleases de restrição e ligados para formar as moléculas de DNA. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos podem ser sintetizados quimicamente, evitando assim o uso de grandes modelos de partida que codificam a totalidade da sequência desejada que normalmente precisa ser propagada em bactérias. Uma vez sintetizada uma sequência de DNA desejada, a mesma pode ser clivada e ligada a outros oligonucleotídeos, conforme divulgado no presente documento. O uso de múltiplos oligonucleotídeos na geração de vetores de DNA de extremidade fechada com o uso dos métodos divulgados no presente documento permite uma abordagem modular à geração de vetores de DNA, permitindo a adaptação e/ou seleção específica das repetições terminais, por exemplo, ITRs, bem como o espaçamento das repetições terminais e também seleção da sequência de ácidos nucleicos heteróloga nos vetores de DNA de extremidade fechada produzidos sinteticamente.

B. MÉTODO DA PRODUÇÃO SINTÉTICA DE VETORES DE DNA

[00228] Determinados métodos para a produção de um vetor de ceDNA que compreendem um com várias configurações de ITR com o uso de métodos baseados em células são descritos no Exemplo 1 dos Pedidos Internacionais PCT/US18/49996, depositado em 7 de setembro de 2018, e PCT/US2018/064242, depositado em 6 de dezembro

de 2018, cada um dos quais é incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

[00229] Em contrapartida, os métodos fornecidos no presente documento se referem a um método de produção sintética, por exemplo, em algumas modalidades, um método de produção livre de células, e também é denominado no presente documento "produção sintética de vetor de DNA de extremidade fechada" ou "produção sintética".

[00230] No presente documento, um método de produção sintética de um vetor de DNA de extremidade fechada é exemplificado e descrito utilizando a produção sintética de um vetor de ceDNA. Em algumas modalidades, o método de produção sintética é um método livre de células, por exemplo, método livre de células de insetos. Em algumas modalidades, o método de produção sintética ocorre na ausência de bacmídeos, ou baculovírus, ou ambos. Em modalidades alternativas, o método de produção sintética pode abranger o uso de células, por exemplo, células bacterianas, por exemplo, células que expressam uma endonuclease de restrição e/ou proteína Rep competente para ligação, ou similares. Em tal modalidade, as células podem ser uma linhagem celular que tem um modelo de vetor polinucleotídico integrado de forma estável e pode ser usada para introduzir uma proteína de endonuclease de restrição e/ou uma proteína competente para ligase, por exemplo, tal como, mas sem limitação, uma proteína Rep, à mistura de reação que compreende os oligonucleotídeos usados nos métodos de produção sintética descritos no presente documento.

[00231] Exemplos do processo para gerar e isolar vetores de ceDNA gerados com o uso do método de produção sintética, conforme divulgado no presente documento, são descritos nas **Figuras 4A a 4E** e os exemplos específicos na seção de Exemplos abaixo.

[00232] Em todos os aspectos dos métodos de produção sintéticos para gerar vetor de DNA de extremidade fechada, conforme descrito

no presente documento, a etapa de ligação pode ser uma etapa de ligação química ou uma etapa de ligação enzimática. Em algumas modalidades, a ligação pode ser conduzida com o uso de uma enzima competente em ligação, por exemplo, DNA ligase, por exemplo, para ligar cadeias secundárias adesivas 5' e 3' ou extremidades cegas. Em algumas modalidades, a enzima de ligação é uma enzima ligase diferente de uma proteína Rep. Em algumas modalidades, a enzima de ligação é uma proteína Rep de AAV.

[00233] Em todos os aspectos dos métodos sintéticos para gerar "vetores de DNA de extremidade fechada", conforme divulgado no presente documento, o método é um método *in vitro*. Em uma modalidade preferencial, o método é um método livre de células, isto é, não realizado em, ou na presença de uma célula, por exemplo, uma célula de inseto. Em modalidades alternativas, uma ou mais enzimas para o método de produção sintética podem ser produzidas a partir de, ou expressas a partir de, uma célula, por exemplo, uma célula que não seja de inseto. Por exemplo, em algumas modalidades, uma célula, tal como uma célula bacteriana, que compreende um vetor de expressão que expressa uma ou mais das endonucleases de restrição ou as enzimas ligase, pode estar presente. Portanto, embora os métodos divulgados no presente documento sejam principalmente direcionados a métodos sintéticos livres de células para gerar os vetores de DNA de extremidade fechada divulgados no presente documento, também estão incluídos os métodos de produção sintética em que uma célula, por exemplo, célula bacteriana, pode ser usada para expressar uma ou mais das enzimas necessárias no método.

(I) MÉTODO DE PRODUÇÃO SINTÉTICA A PARTIR DE UM CONSTRUTO DE DNA DE FILAMENTO DUPLO

[00234] Em um aspecto, um vetor de DNA de extremidade fechada é gerado pela remoção de toda a molécula que forma o vetor de DNA

de extremidade fechada a partir de um construto de DNA de filamento duplo, seguido pela ligação das extremidades para fechar a molécula. Em tal modalidade, um construto de DNA de filamento duplo é fornecido, na ordem de 5' a 3': um primeiro sítio de endonuclease de restrição; uma ITR a montante; um cassete de expressão; uma ITR a jusante; e um segundo sítio de endonuclease de restrição. O construto de DNA de filamento duplo é, então, posto em contato com uma ou mais endonucleases de restrição para gerar quebras de filamento duplo em ambos os sítios de clivagem de endonuclease de restrição. Uma endonuclease pode alvejar ambos os sítios ou cada sítio pode ser alvejado por uma endonuclease diferente, desde que os sítios de restrição não estejam presentes na região de modelo vetorial de extremidade fechada. Isso excisa a sequência entre os sítios de endonuclease de restrição do restante do construto de DNA de filamento duplo. Essa molécula excisada terá extremidades 5' e 3' livres, que são, então, ligadas para formar um vetor de DNA de extremidade fechada. A ligação pode ser efetuada com o uso de uma proteína com funções de ligação, tal como, por exemplo, proteína Rep ou fago, ou por ligação química. Em alguns aspectos, o comprimento de vetor na direção 5' para 3' é maior do que o comprimento máximo conhecido por ser encapsidado em um vírion de AAV. Em alguns aspectos, o comprimento é maior do que 4,6 kb, ou maior do que 5 kb, ou maior do que 6 kb. Em alguns aspectos, a molécula excisada é primeiramente anelada para facilitar a formação de forma de gancho antes da ligação das extremidades 5' e 3' livres. Em alguns aspectos, a estrutura principal de construto de DNA de filamento duplo indesejada é clivada por uma ou mais endonucleases de restrição específicas para um sítio de clivagem exclusivo na estrutura principal, de modo que o mesmo seja degradado e mais facilmente eliminado durante a purificação. Em alguns aspectos, o método acima pode compreender adicionalmente uma etapa

de aquecimento ou fusão da molécula de dsDNA excisada para formar polinucleotídeos de filamento simples antes da etapa de ligação. Em alguns aspectos, os dois sítios de endonuclease de restrição são idênticos em sequência. Em alguns aspectos, os dois sítios de endonucleases de restrição podem ser clivados para fornecer extremidades cegas.

(II) MÉTODO DE PRODUÇÃO SINTÉTICA A PARTIR DE UMA MOLÉCULA DE FILAMENTO SIMPLES (VARIANTE 1)

[00235] Outro método exemplificativo para produzir um vector de DNA de extremidade fechada, por exemplo, vector de ceDNA que usa o método de produção sintética, tal como divulgado no presente documento, usa um DNA linear de filamento simples com extremidades fechadas e compreende duas ITRs que flanqueiam um cassete de expressão, em primeiro lugar na direção senso seguida pela direção antissenso. Consequentemente, em algumas modalidades, o método compreende a) a síntese de uma molécula de filamento simples que contém, de 5' para 3': uma primeira ITR senso; uma sequência cassete de expressão senso; uma segunda ITR senso; uma segunda ITR antissenso; uma sequência cassete de expressão antissenso; e uma primeira ITR antissenso; b) facilitar a formação de pelo menos uma alça em forma de gancho dentro da molécula de filamento simples c) e ligar as extremidades 5' e 3' para formar o vetor de ceDNA. Vários métodos de síntese de oligonucleotídeos e polinucleotídeos são conhecidos na técnica, por exemplo, síntese *in vitro* ou *in silico* de oligonucleotídeos e qualquer método conhecido na técnica pode ser usado na etapa a). Os termos "senso" e "antissenso" no método acima mencionado se referem à orientação do elemento estrutural no polinucleotídeo. As versões senso e antissenso de um elemento são o complemento inverso uma do outra. Uma sequência de alça em forma de gancho pode ser qualquer sequência de nucleotídeos, de preferência,

uma que não hibridize para formar um dsDNA ao longo de todo o seu comprimento. Os métodos de ligação ao DNA para formar estruturas lineares de filamento duplo são conhecidos na técnica, exemplos não limitantes usam proteínas virais, por exemplo, Rep, ou fago, ou varíola, proteínas ou ligação química.

[00236] Nessa modalidade, o "vetor de DNA de extremidade fechada", por exemplo, o vetor de ceDNA, é produzido fornecendo-se uma sequência de DNA linear de filamento simples que codifica o cassete de expressão flanqueado por ITRs senso e antissenso que é, então, tornado de extremidade fechada por ligação. Usando a produção de um vetor de ceDNA como um vetor de DNA exemplificativo de extremidade fechada produzido, uma molécula de DNA de filamento simples para a produção de um vetor de ceDNA compreende, de 5' para 3':

uma primeira ITR senso;
uma sequência cassete de expressão senso;
uma segunda ITR senso;
uma segunda ITR antissenso;
uma sequência cassete de expressão antissenso; e
uma primeira ITR antissenso.

[00237] Nesse método exemplificativo, os oligonucleotídeos são ligados na ordem mostrada acima, e a primeira ITR antissenso complementar à primeira ITR senso e, da mesma forma, a segunda ITR antissenso e a sequência cassete de expressão antissenso, são complementares à segunda ITR senso e à sequência cassete de expressão senso, respectivamente. A etapa de ligação une as extremidades 5' e 3' livres e resulta na formação do vetor de DNA de extremidade fechada, ceDNA.

[00238] Em todos os aspectos dos métodos de produção sintética para gerar vetores de DNA de extremidade fechada, conforme divul-

gado no presente documento, a etapa de ligação pode ser uma etapa de ligação química ou uma etapa de ligação enzimática. Em algumas modalidades, a ligação pode ser conduzida com o uso de uma enzima competente em ligação, por exemplo, DNA ligase, por exemplo, para ligar cadeias secundárias adesivas 5' e 3' ou extremidades cegas. Em algumas modalidades, a enzima de ligação é uma enzima ligase diferente de uma proteína Rep. Em algumas modalidades, a enzima de ligação é uma proteína Rep de AAV.

(III) PRODUÇÃO SINTÉTICA COM O USO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE ITR 5' E 3'

[00239] Outro aspecto compreende: a) sintetizar (e/ou fornecer) uma primeira molécula de ITR de filamento simples que compreende uma primeira ITR; b) sintetizar (e/ou fornecer) uma segunda molécula de ITR de filamento simples que compreende uma segunda ITR; c) fornecer um polinucleotídeo de filamento duplo que compreende uma sequência cassete de expressão; e d) ligar as extremidades 5' e 3' da primeira molécula de ITR a uma primeira extremidade da molécula de filamento duplo, e ligar as extremidades 5' e 3' da segunda molécula de ITR à segunda extremidade da molécula de filamento duplo para formar o vetor de DNA. Antes da etapa de ligação, as moléculas de ITR e/ou o polinucleotídeo de filamento duplo podem entrar em contato com enzimas de restrição para gerar extremidades compatíveis, por exemplo, cadeias secundárias para garantir a ligação apropriada nos locais desejados. Em algumas modalidades, os três elementos são fornecidos com extremidades cegas. As ligações de cada ITR com o polinucleotídeo de filamento duplo podem ser sequenciais ou simultâneas. Em uma modalidade, a etapa de ligação envolve a ligação de um oligo 5' a 3' de filamento simples que forma um gancho.

[00240] Em tal modalidade, um vetor de DNA de extremidade fechada, por exemplo, vetor de ceDNA, é produzido pela síntese de uma

ITR 5' e uma ITR 3' de oligonucleotídeos, que em algumas modalidades, estão em um gancho ou outra configuração tridimensional (por exemplo, configuração de junção T- ou Y-Holliday) e ligação dos oligonucleotídeos de ITR 5' e 3' a um polinucleotídeo de filamento duplo que compreende um cassete de expressão ou sequência de ácidos nucleicos heteróloga. Opcionalmente, uma etapa é adicionada submetendo o oligonucleotídeo (ou oligonucleotídeos) a condições que facilitam a dobra do oligonucleotídeo em uma configuração tridimensional antes da etapa de ligação. A Figura 11B mostra um método exemplificativo de geração de um vetor de ceDNA que compreende a ligação de um oligonucleotídeo de ITR 5' e um oligonucleotídeo de ITR 3' a um polinucleotídeo de filamento duplo que compreende um cassete de expressão. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos de ITR 5' e 3' são oligonucleotídeos em forma de gancho 5' e 3' ou têm uma configuração tridimensional diferente (por exemplo, junção de Holliday) e podem opcionalmente ser fornecidos por síntese de DNA *in vitro*. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos de ITR 5' e 3' foram clivados com uma endonuclease de restrição para ter extremidades adesivas complementares ao polinucleotídeo de filamento duplo que tem extremidades adesivas de endonuclease de restrição correspondentes. Em algumas modalidades, as extremidades da forma de gancho do oligonucleotídeo de ITR 5' têm uma extremidade adesiva que é complementar ao filamento senso 5' e ao filamento antissenso 3' do polinucleotídeo de filamento duplo. Em algumas modalidades, a extremidade da forma de gancho de oligonucleotídeo de ITR 3' tem uma extremidade adesiva que é complementar ao filamento senso 3' e ao filamento antissenso 5' do polinucleotídeo de filamento duplo. Em algumas modalidades, as extremidades em forma de gancho do oligonucleotídeo de ITR 5' e do oligonucleotídeo de ITR 3' têm extremidades adesivas de endonuclease de restrição diferentes, de modo que a

ligação direta ao polinucleotídeo de filamento duplo possa ser alcançada. Em algumas modalidades, as extremidades de um ou de ambos os oligonucleotídeos de ITR não apresentam cadeias secundárias e esse oligonucleotídeo (ou oligonucleotídeos) de ITR são ligados ao polinucleotídeo de filamento duplo por união de extremidade cega. As moléculas de ITR no método anterior podem ser sintetizadas e/ou ligadas por qualquer método conhecido na técnica. Vários métodos de síntese de oligonucleotídeos e polinucleotídeos são conhecidos na técnica, por exemplo, síntese de DNA em fase sólida, síntese de DNA de fosforamidita e PCR. As moléculas de ITR também podem ser excisadas a partir de um construto de DNA que compreende a ITR. Vários métodos de ácidos nucleicos de ligação são conhecidos na técnica, por exemplo, ligação química ou ligação com proteína competente para ligação, por exemplo, uma ligase, Rep de AAV ou topoisomerase.

(IV) MÉTODO DE PRODUÇÃO SINTÉTICA QUE NÃO EXIGE LIGAÇÃO

[00241] Em algumas modalidades, a produção sintética de um vetor de DNA de extremidade fechada é por síntese de uma sequência de filamento simples que compreende pelo menos uma ITR que flanqueia uma sequência cassete de expressão e que também compreende uma sequência cassete de expressão antissenso. Em um exemplo não limitativo, o vetor de ceDNA é produzido pelo método da seguinte maneira.

[00242] Uma sequência de filamento simples que compreende na ordem de 5' a 3':

[00243] uma primeira ITR senso;

[00244] uma sequência cassete de expressão senso;

[00245] uma segunda ITR senso; e

[00246] uma sequência cassete de expressão antissenso

[00247] é fornecida. Em uma modalidade, a sequência de filamento

simples pode ser sintetizada diretamente através de qualquer método conhecido na técnica. Em outra modalidade, a sequência de filamento simples pode ser construída juntando-se por meio de ligação dois ou mais oligos que compreendem um ou mais dentre a primeira ITR senso, sequência cassete de expressão senso, segunda ITR senso e sequência cassete de expressão antissenso.

[00248] Em ainda outra modalidade, a sequência de filamento simples pode ser obtida por excisão da sequência a partir de um construto de DNA de filamento duplo com subsequente separação dos filamentos do fragmento de filamento duplo excisado. Mais especificamente, é fornecido um construto de DNA de filamento duplo que compreende um primeiro sítio de restrição, a primeira ITR senso, a sequência cassete de expressão senso, a segunda ITR senso, a sequência cassete de expressão antissenso e um segundo sítio de restrição na ordem 5' a 3'. A região entre os dois sítios de clivagem de endonuclease de restrição é excisada por clivagem com pelo menos uma endonuclease de restrição que reconhece esse sítio (ou sítios) de clivagem. O fragmento de DNA de filamento duplo excisado resultante é tratado de modo que os filamentos senso e antissenso sejam separados nos fragmentos de sequência de filamento simples desejados.

[00249] A sequência de filamento simples é submetida a uma etapa de anelamento para facilitar a formação de uma ou mais alças em forma de gancho pela primeira ITR senso e/ou pela segunda ITR senso e a ligação complementar da sequência cassete de expressão senso à sequência cassete de expressão antissenso. O resultado é uma estrutura de extremidade fechada que não exigiu ligação para se formar. Parâmetros e técnicas de anelamento são bem-conhecidos na técnica.

[00250] Em algumas modalidades, a ITR modificada compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 4, a ITR do tipo selvagem compre-

ende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 1.

[00251] Os vetores de DNA produzidos pelos métodos fornecidos no presente documento têm uma estrutura linear e contínua em vez de uma estrutura não contínua, conforme determinado pelo ensaio de digestão com enzimas de restrição (**Figura 4C**). Acredita-se que a estrutura linear e contínua seja mais estável a partir de ataque de endonucleases celulares, bem como menos provável de ser recombinada e causar mutagênese. Assim, os vetores na estrutura linear e contínua são preferenciais em algumas modalidades. Os vetores de DNA duplex intramoleculares de filamento simples, lineares e contínuos podem ter extremidades terminais ligadas covalentemente, sem sequências que codifiquem proteínas de capsídeo de AAV. Esses vetores de DNA são estruturalmente distintos dos plasmídeos, que são moléculas de ácido nucleico duplex circular de origem bacteriana. Os filamentos complementares de plasmídeos podem ser separados após desnaturação, enquanto que esses vetores de DNA têm filamentos complementares e são uma única molécula de DNA. De preferência, os vetores podem ser produzidos sem a metilação de base de DNA do tipo procariótico, ao contrário dos plasmídeos.

[00252] A **Figura 5** é um gel que confirma a produção de ceDNA a partir de múltiplos construtos de ceDNA-plasmídeo que usam o método descrito nos Exemplos. O ceDNA é confirmado por um padrão de banda característico no gel, conforme discutido em relação à Figura 4C acima nos Exemplos.

C. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE VETORES DE ceDNA:

[00253] Os métodos para gerar e isolar um vetor de ceDNA, que é um vetor de DNA de extremidade fechada exemplificativo, são descritos no presente documento. Por exemplo, um vetor de DNA de extremidade fechada, por exemplo, o vetor de ceDNA produzido pelos métodos sintéticos descritos no presente documento pode ser colhido ou

coletado em um momento apropriado após a última reação de ligação e pode ser otimizado para obter uma produção de alto rendimento dos vetores de ceDNA. O vetor de DNA de extremidade fechada, por exemplo, os vetores de ceDNA, podem ser purificados por qualquer meio conhecido pelos versados na técnica para purificação de DNA. Em uma modalidade, os vetores de ceDNA são purificados como moléculas de DNA. Geralmente, quaisquer métodos de purificação de ácido nucleico conhecidos na técnica podem ser adotados, bem como kits de extração de DNA comercialmente disponíveis.

[00254] Alternativamente, a purificação pode ser implementada submetendo-se uma mistura de reação à separação cromatográfica. Como um exemplo não limitante, o processo pode ser realizado carregando-se a mistura de reação em uma coluna de troca iônica (por exemplo, SARTOBIND Q®) que retém ácidos nucleicos, e eluindo-se (por exemplo, com uma solução de NaCl a 1,2 M) e realizando-se uma purificação de cromatografia adicional em uma coluna de filtração em gel (por exemplo, 6 GE de fluxo rápido). O vetor de DNA, por exemplo, o vetor de ceDNA é, então, recuperado por, por exemplo, precipitação.

[00255] A presença do vetor de ceDNA pode ser confirmada digerindo-se o DNA de vetor isolado das células com uma enzima de restrição com um único sítio de reconhecimento no vetor de DNA e analisando-se tanto o material de DNA digerido quanto o não digerido com o uso de eletroforese em gel para confirmar a presença de bandas características de DNA linear e contínuo em comparação com o DNA linear e não contínuo. A **Figura 4B** e a **Figura 4C** ilustram uma modalidade para identificar a presença dos vetores de ceDNA de extremidade fechada produzidos pelos processos descritos no presente documento.

[00256] A **Figura 5** do Pedido Internacional PCT/US18/49996 mostra um gel que confirma a produção de ceDNA a partir de múltiplos

construtos de ceDNA-plasmídeo com o uso do método descrito nos Exemplos. O ceDNA é confirmado por um padrão de banda característico no gel, conforme discutido em relação à **Figura 4C** nos Exemplos.

[00257] Em algumas modalidades, os vetores de DNA de extremidade fechada produzidos pelos métodos de produção sintética divulgados no presente documento podem ser entregues a uma célula-alvo *in vitro* ou *in vivo* por vários métodos adequados, conforme discutido no presente documento. Somente os vetores podem ser aplicados ou injetados. Os vetores podem ser entregues a uma célula sem a ajuda de um reagente de transfecção ou outros meios físicos. Alternativamente, os vetores podem ser entregues com o uso de um reagente de transfecção ou outros meios físicos que facilitam a entrada de DNA na célula, por exemplo, lipossomas, álcoois, compostos ricos em polilisina, compostos ricos em arginina, fosfato de cálcio, microvesículas, microinjeção e similares.

D. VETORES DE DNA CIRCULARES PRODUZIDOS COM O USO DO MÉTODO DE PRODUÇÃO SINTÉTICA

[00258] São fornecidos no presente documento vários métodos de produção *in vitro* de moléculas de DNA e vetores de DNA de extremidade fechada. Em algumas modalidades, o vetor de DNA de extremidade fechada é um vetor de ceDNA, conforme descrito no presente documento. Em modalidades alternativas, o vetor de DNA de extremidade fechada é, por exemplo, um vetor de DNA em formato de halteres ou um vetor de DNA em formato de osso de cão (consultar, por exemplo, o documento WO2010/0086626, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade).

(2017): 65.

III. VETOR DE ceDNA EM GERAL

[00259] Em algumas modalidades, um vetor de DNA de extremidade fechada produzido com o uso do processo sintético, conforme des-

crito no presente documento, é um vetor de ceDNA, incluindo vetores de ceDNA que podem expressar um transgene. Os vetores de ceDNA descritos no presente documento não são limitados pelo tamanho, permitindo, por exemplo, a expressão de todos os componentes necessários para a expressão de um transgene a partir de um único vetor. O vetor de ceDNA é, de preferência, duplex, por exemplo, autocomplementar, sobre pelo menos uma porção da molécula, tal como o cassete de expressão (por exemplo, ceDNA não é uma molécula circular de filamento duplo). O vector de ceDNA tem extremidades covalentemente fechadas, e, assim, é resistente à digestão com exonuclease (por exemplo, exonuclease I ou exonuclease III), por exemplo, por mais de uma hora a 37 °C.

[00260] Em geral, um vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético descrito no presente documento, compreende na direção de 5' a 3': uma primeira repetição terminal invertida (ITR) de vírus adenoassociado (AAV), uma sequência de nucleotídeos de interesse (por exemplo, um cassete de expressão, conforme descrito no presente documento) e uma segunda ITR de AAV. As sequências de ITR selecionadas a partir de qualquer um dentre: (i) pelo menos uma WT ITR e pelo menos uma repetição terminal invertida de AAV modificada (mod-ITR) (por exemplo, ITRs assimétricas modificadas); (ii) duas ITRs modificadas em que o par de mod-ITR tem uma organização espacial tridimensional diferente uma em relação à outra (por exemplo, ITRs modificadas assimétricas) ou (iii) par de WT-WT ITR simétrico ou substancialmente simétrico, em que cada WT-ITR tem a mesma organização espacial tridimensional, ou (iv) par de ITRs modificadas simétrico ou substancialmente simétrico, em que cada mod-ITR tem a mesma organização espacial tridimensional.

[00261] São abrangidos no presente documento métodos e composições que compreendem o vetor de ceDNA produzido com o uso do

processo sintético, conforme descrito no presente documento, que pode incluir ainda um sistema de entrega, tal como, mas sem limitação, um sistema de entrega de nanopartículas de lipossomas. Sistemas de nanopartículas de lipossomas exemplificativos não limitantes abrangidos para uso são divulgados no presente documento. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma nanopartícula lipídica que compreende ceDNA e um lipídeo ionizável. Por exemplo, uma formulação de nanopartículas lipídicas que é produzida e carregada com um vetor de ceDNA obtido pelo processo é divulgada no Pedido Internacional PCT/US2018/050042, depositado em 7 de setembro de 2018, que é incorporado ao presente documento.

[00262] Os vetores de ceDNA produzidos com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, não têm restrições de embalagem impostas pelo espaço limitante dentro do capsídeo viral. Isso permite a inserção de elementos de controle, por exemplo, chaves reguladoras, conforme divulgado no presente documento, grandes transgenes, múltiplos transgenes etc.

[00263] As **Figuras 1A a 1E** mostram esquemas de vetores de ceDNA exemplificativos não limitantes ou a sequência correspondente de plasmídeos de ceDNA. Os vetores de ceDNA são livres de capsídeo e podem ser obtidos a partir de um plasmídeo que codifica nessa ordem: uma primeira ITR, um cassete de expressão que compreende um transgene e uma segunda ITR. O cassete de expressão pode incluir uma ou mais sequências reguladoras que permitem e/ou controlam a expressão do transgene, por exemplo, em que o cassete de expressão pode compreender um ou mais dentre, nessa ordem: um intensificador/promotor, um repórter de ORF (transgene), um elemento regulador pós-transcrição (por exemplo, WPRE) e um sinal de poliadenilação e terminação (por exemplo, BGH polyA).

[00264] O cassete de expressão também pode compreender um

sítio de entrada no ribossomo interno (IRES) e/ou um elemento 2A. Os elementos cis-reguladores incluem, mas sem limitação, um promotor, uma chave de ribossomos, um isolador, um elemento regulável por mir, um elemento regulador pós-transcricional, um promotor específico para tipo de tecido e célula e um intensificador. Em algumas modalidades, a ITR pode atuar como o promotor do transgene. Em algumas modalidades, o vetor de ceDNA compreende componentes adicionais para regular a expressão do transgene, por exemplo, uma chave reguladora, que é descrita no presente documento na seção intitulada "Comutações reguladoras" para controlar e regular a expressão do transgene e pode incluir, se desejado, uma chave reguladora que é uma chave de exterminação para permitir a exterminação celular controlada de uma célula que compreende um vetor de ceDNA.

[00265] O cassete de expressão pode compreender mais de 4.000 nucleotídeos, 5.000 nucleotídeos, 10.000 nucleotídeos ou 20.000 nucleotídeos ou 30.000 nucleotídeos ou 40.000 nucleotídeos ou 50.000 nucleotídeos, ou qualquer faixa entre cerca de 4.000 a 10.000 nucleotídeos ou 10.000 a 50.000 nucleotídeos, ou mais de 50.000 nucleotídeos. Em algumas modalidades, o cassete de expressão pode compreender um transgene na faixa de 500 a 50.000 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, o cassete de expressão pode compreender um transgene na faixa de 500 a 75.000 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, o cassete de expressão pode compreender um transgene que está na faixa de 500 a 10.000 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, o cassete de expressão pode compreender um transgene que está na faixa de 1.000 a 10.000 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, o cassete de expressão pode compreender um transgene que está na faixa de 500 a 5.000 nucleotídeos de comprimento. Os vetores de ceDNA não têm as limitações de tamanho dos vetores de AAV encapsi-

dados, permitindo assim a entrega de um cassete de expressão de tamanho grande para fornecer transgene eficiente. Em algumas modalidades, o vetor de ceDNA é desprovido de metilação específica para procarionte.

[00266] Um cassete de expressão de ceDNA pode incluir, por exemplo, uma sequência exógena expressável (por exemplo, quadro de leitura aberta) ou transgene que codifica uma proteína que está ausente, inativa ou é insuficiente no sujeito receptor ou um gene que codifica uma proteína que tem um efeito biológico ou terapêutico desejado. O transgene pode codificar um produto genético que pode funcionar para corrigir a expressão de uma transcrição ou gene defeituoso. Em princípio, o cassete de expressão pode incluir qualquer gene que codifique uma proteína, polipeptídeo ou RNA que seja reduzido ou ausente devido a uma mutação ou que transmita um benefício terapêutico quando superexpresso, é considerado dentro do escopo da descrição.

[00267] O cassete de expressão pode compreender qualquer transgene útil para tratar uma doença ou distúrbio em um sujeito. Um vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser usado para fornecer e expressar qualquer gene de interesse no sujeito, que inclui, mas sem limitação, ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos ou ácidos nucleicos não codificadores (por exemplo, RNAi, miRs etc.), bem como genes exógenos e sequências de nucleotídeos, incluindo sequências de vírus no genoma de um sujeito, por exemplo, sequências de vírus de HIV e similares. De preferência, um vetor de ceDNA divulgado no presente documento é usado para fins terapêuticos (por exemplo, para uso médico, diagnóstico ou veterinário) ou polipeptídeos imunogênicos. Em determinadas modalidades, um vetor de ceDNA é útil para expressar qualquer gene de interesse no sujeito, que inclui um ou mais polipeptí-

deos, peptídeos, ribozimas, ácidos nucleicos de peptídeo, siRNAs, RNAis, oligonucleotídeos antissenso, polinucleotídeos antissenso, ou RNAs (codificadores ou não codificadores; por exemplo, siRNAs, shRNAs, micro-RNAs e seus equivalentes antissenso (por exemplo, antagoMiR)), anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno ou qualquer combinação dos mesmos.

[00268] O cassete de expressão também pode codificar polipeptídeos, oligonucleotídeos senso ou antissenso ou RNAs (codificadores ou não codificadores; por exemplo, siRNAs, shRNAs, micro-RNAs e seus equivalentes antissenso (por exemplo, antagoMiR)). Os cassetes de expressão podem incluir uma sequência exógena que codifica uma proteína repórter a ser usada para fins experimentais ou de diagnóstico, tais como β-lactamase, β-galactosidase (LacZ), fosfatase alcalina, timidina quinase, proteína fluorescente verde (GFP), cloranfenicol acetiltransferase (CAT), luciferase e outros bem-conhecidos na técnica.

[00269] As sequências fornecidas no cassete de expressão, construto de expressão de um vetor de ceDNA descrito no presente documento, podem ser otimizadas por códon para a célula hospedeira-alvo. Conforme usado no presente documento, o termo "códon otimizado" ou "otimização de códon" se refere ao processo de modificação de uma sequência de ácidos nucleicos para expressão intensificada nas células do vertebrado de interesse, por exemplo, camundongo ou ser humano, substituindo-se pelo menos um, mais de um, ou um número significativo de códons da sequência nativa (por exemplo, uma sequência procariótica) com códons que são mais frequentemente ou com a máxima frequência usados nos genes desse vertebrado. Várias espécies exibem viés particular para determinados códons de um aminoácido específico. Tipicamente, a otimização de códon não altera a sequência de aminoácidos da proteína traduzida original. Os códons otimizados podem ser determinados, por exemplo, com o uso da plata-

forma de otimização de códons e síntese genética personalizada Gene Forge® da Aptagen (Aptagen, Inc., 2190 Fox Mill Rd. Suite 300, Herndon, Va. 20171) ou outro banco de dados publicamente disponível.

[00270] Em algumas modalidades, um transgene expresso pelo vetor de ceDNA é um gene terapêutico. Em algumas modalidades, um gene terapêutico é um anticorpo, ou fragmento de anticorpo, ou seu fragmento de ligação a antígeno, por exemplo, um anticorpo neutralizante ou fragmento de anticorpo e similares.

[00271] Em particular, um gene terapêutico é um ou mais agentes terapêuticos, incluindo, mas sem limitação, por exemplo, proteína (ou proteínas), polipeptídeo (ou polipeptídeos), peptídeo (ou peptídeos), enzima (ou enzimas), anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno, bem como variantes, e/ou fragmentos ativos dos mesmos, para uso no tratamento, profilaxia e/ou amenização de um ou mais sintomas de uma doença, disfunção, lesão e/ou distúrbio. Genes terapêuticos exemplares são descritos no presente documento na seção intitulada "Método de Tratamento".

[00272] Há muitos recursos estruturais de vetores de ceDNA que diferem de vetores de expressão baseados em plasmídeos. Os vetores de ceDNA produzidos pelos métodos sintéticos contidos no presente documento podem possuir uma ou mais das seguintes características: a falta de DNA bacteriano original (isto é, não inserido), a falta de uma origem de replicação procariótica, ser autossuficiente, isto é, não exigir quaisquer sequências que não sejam as duas ITRs, incluindo os sítios de ligação à Rep e resolução terminal (RBS e TRS), e uma sequência exógena entre as ITRs, a presença de sequências de ITR que formam ganchos e a ausência de metilação de DNA do tipo bacteriano ou mesmo qualquer outra metilação associada à produção em um determinado tipo de célula e considerada anormal por um hospedeiro mamífero. Em geral, é preferível que os presentes vetores não

contenham DNA procariótico, mas contempla-se que algum DNA procariótico possa ser inserido como uma sequência exógena, como um exemplo não limitante em uma região promotora ou intensificadora. Outra característica importante que distingue vetores de ceDNA de vetores de expressão de plasmídeo é que os vetores de ceDNA são DNA linear de filamento simples que tem extremidades fechadas, enquanto os plasmídeos são sempre DNA de filamento duplo.

[00273] Os vetores de ceDNA produzidos pelos métodos sintéticos fornecidos no presente documento têm, de preferência, uma estrutura linear e contínua, em vez de uma estrutura não contínua, conforme determinado pelo ensaio de digestão com enzimas de restrição (**Figura 4C**). Acredita-se que a estrutura linear e contínua seja mais estável a partir de ataque de endonucleases celulares, bem como menos provável de ser recombinada e causar mutagênese. Assim, um vetor de ceDNA na estrutura linear e contínua é uma modalidade preferencial. O vetor de ceDNA duplex intramolecular, de filamento simples, linear e contínuo, pode ter extremidades terminais ligadas covalentemente, sem sequências que codificam proteínas de capsídeo de AAV. Esses vetores de ceDNA são estruturalmente distintos dos plasmídeos (incluindo plasmídeos de ceDNA descritos no presente documento), que são moléculas de ácido nucleico duplex circular de origem bacteriana. As cadeias complementares de plasmídeos podem ser separadas após a desnaturação para produzir duas moléculas de ácido nucleico, enquanto, por outro lado, os vetores de ceDNA, embora tenham filamentos complementares, são uma única molécula de DNA e, portanto, mesmo se desnaturados, permanecem uma molécula única. Em algumas modalidades, os vetores de ceDNA, conforme descrito no presente documento, podem ser produzidos sem a metilação de base de DNA do tipo procariótico, diferentemente dos plasmídeos. Portanto, os vetores de ceDNA e os plasmídeos de ceDNA são diferentes tanto em

termos de estrutura (em particular lineares *versus* circulares) quanto em vista dos métodos usados para produzir e purificar esses diferentes objetos (consultar abaixo) e também em vista de sua metilação de DNA, que é do tipo procariótico para plasmídeos de ceDNA e do tipo eucariótico para o vetor de ceDNA.

[00274] Há várias vantagens de usar um vetor de ceDNA, conforme descrito no presente documento, sobre vetores de expressão baseados em plasmídeos, tais vantagens incluem, mas sem limitação: 1) os plasmídeos contêm sequências de DNA bacterianas e estão sujeitos à metilação específica para procarióticos, por exemplo, metilação de 6-metil adenosina e 5-metil citosina, enquanto as sequências de vetores de AAV livre de capsídeo são de origem eucariótica e não sofrem metilação específica para procarióticos; como resultado, os vetores de AAV livres de capsídeo são menos propensos a induzir respostas inflamatórias e imunes em comparação com plasmídeos; 2) enquanto os plasmídeos exigem a presença de um gene de resistência durante o processo de produção, os vetores de ceDNA não exigem; 3) enquanto um plasmídeo circular não é entregue ao núcleo após a introdução em uma célula e exige sobrecarga para contornar a degradação por nucleases celulares, os vetores de ceDNA contêm cis-elementos virais, isto é, ITRs, que conferem resistência às nucleases e podem ser projetados para serem alvejados e entregues ao núcleo. Cogita-se a hipótese de que os elementos definidores mínimos indispensáveis para a função de ITR sejam um sítio de ligação à Rep (RBS; 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 60) para AAV2) e um sítio de resolução terminal (TRS; 5'-AGTTGG-3' (SEQ ID NO: 64) para AAV2) mais uma sequência palindrômica variável que permite a formação de gancho; e 4) os vetores de ceDNA não têm a superrepresentação de dinucleotídeos de CpG frequentemente encontrados em plasmídeos derivados de procariontes que supostamente se ligam a

um membro da família de receptores do tipo Toll, provocando uma resposta imune mediada por células T. Em contrapartida, as transduções com vetores de AAV livres de capsídeo divulgados no presente documento podem alvejar de modo eficiente tipos de células e tecidos que são difíceis de transduzir com vírions de AAV convencionais com o uso de vários reagentes de entrega.

IV. ITRs

[00275] Conforme divulgado no presente documento, os vetores de ceDNA contêm uma sequência de ácidos nucleicos de transgene ou heteróloga posicionada entre duas sequências de repetição terminal invertida (ITR), em que as sequências de ITR podem ser um par de ITRs assimétricas ou um par de ITRs simétricas ou substancialmente simétricas, visto que esses termos são definidos no presente documento. Um vetor de ceDNA conforme divulgado no presente documento pode compreender sequências de ITR que são selecionadas a partir de qualquer um dentre: (i) pelo menos uma WT ITR e pelo menos uma repetição terminal invertida de AAV modificada (mod-ITR) (por exemplo, ITRs modificadas assimétricas); (ii) duas ITRs modificadas em que o par de mod-ITR tem uma organização espacial tridimensional diferente uma em relação à outra (por exemplo, ITRs modificadas assimétricas) ou (iii) par de WT-WT ITR simétrico ou substancialmente simétrico, em que cada WT-ITR tem a mesma organização espacial tridimensional ou (iv) par de ITRs modificadas simétricas ou substancialmente simétricas, em que cada mod-ITR tem a mesma organização espacial tridimensional, em que os métodos da presente descrição podem incluir ainda um sistema de entrega, tal como, mas sem limitação, um sistema de entrega de nanopartículas de lipossomas.

[00276] Em algumas modalidades, a sequência de ITR pode ser de vírus da família de Parvoviridae, que inclui duas subfamílias: Parvovirinae, que infectam vertebrados, e Densovirinae, que infectam insetos.

A subfamília de Parvovirinae (denominada parvovírus) inclui o gênero de Dependovírus, cujos membros, na maioria das condições, exigem coinfecção com um vírus auxiliar, tal como adenovírus ou vírus da herpes, para infecção produtiva. O gênero de Dependovírus inclui vírus adenoassociado (AAV), que normalmente infecta seres humanos (por exemplo, sorotipos 2, 3A, 3B, 5 e 6) ou primatas (por exemplo, sorotipos 1 e 4) e vírus relacionados que infectam outros animais com sangue quente (por exemplo, vírus adenoassociados bovinos, caninos, equinos e ovinos). Os parvovírus e outros membros da família de Parvoviridae são geralmente descritos em Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Capítulo 69 em FIELDS VIROLOGY (3ª Ed. 1996).

[00277] Embora as ITRs exemplificadas no relatório descritivo e nos Exemplos contidos no presente documento sejam WT-ITRs de AAV2, um indivíduo de habilidade comum na técnica está ciente de que é possível, conforme indicado acima, usar ITRs de qualquer parvovírus conhecido, por exemplo, um dependovírus, tal como o AAV (por exemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, genoma AAVrh8, AAVrh10, AAV-DJ e AAV-DJ8. Por exemplo, NCBI: NC 002077; NC 001401; NC001729; NC001829; NC006152; NC 006260; NC 006261), ITRs quiméricas ou ITRs de qualquer AAV sintético. Em algumas modalidades, o AAV pode infectar animais de sangue quente, por exemplo, vírus adenoassociado aviário (AAAV), bovino (BAAV), canino, equino e ovino. Em algumas modalidades, a ITR é de parvovírus B19 (n.º de Acesso ao GenBank: NC 000883), Vírus Minuto de Camundongo (MVM) (n.º de Acesso ao GenBank NC 001510); parvovírus de ganso (n.º de Acesso ao GenBank NC 001701); parvovírus de cobra 1 (n.º de Acesso ao GenBank NC 006148). Em algumas modalidades, a WT-ITR 5' pode ser de um sorotipo e a WT-ITR 3' de um sorotipo diferente, conforme

discutido no presente documento.

[00278] Um especialista versado na técnica está ciente de que as sequências de ITR têm uma estrutura comum de uma junção de Holliday de filamento duplo, que normalmente é uma estrutura em forma de gancho em formato de T ou em formato de Y (consultar, por exemplo, **Figura 2A** e **Figura 3A**), em que cada WT-ITR é formada por dois braços ou alças palindrômicos (B-B' e C-C') embebidos em um braço palindrômico maior (A-A') e uma sequência D de filamento simples (em que a ordem dessas sequências palindrômicas define a orientação flip ou flop da ITR). Consultar, por exemplo, análise estrutural e comparação de sequências de ITR de diferentes sorotipos de AAV (AAV1 a AAV6) e descritas em Grimm et al., J. Virology, 2006; 80(1); 426 a 439; Yan *et al.,* J. Virology, 2005; 364 a 379; Duan et al., Virology 1999; 261; 8 a 14. Um indivíduo versado na técnica pode determinar facilmente sequências de WT-ITR de qualquer sorotipo de AAV para uso em um vetor de ceDNA ou ceDNA-plasmídeo com base nas sequências de ITR de AAV2 exemplificativas fornecidas no presente documento. Consultar, por exemplo, a comparação de sequências de ITR de diferentes sorotipos de AAV (AAV1 a AAV6 e AAV aviário (AAAV) e AAV bovino (BAAV)) descritos em Grimm et al., J. Virology, 2006; 80 (1); 426 a 439; que mostram a % de identidade da ITR esquerda de AAV2 para a ITR esquerda de outros sorotipos: AAV-1 (84%), AAV-3 (86%), AAV-4 (79%), AAV-5 (58%), AAV-6 (ITR esquerda) (100%) e AAV-6 (ITR direita) (82%).

A. PARES DE ITRS SIMÉTRICOS

[00279] Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA, conforme descrito no presente documento. compreende, na direção de 5' a 3': uma primeira repetição terminal invertida (ITR) de vírus adenoassociado (AAV), uma sequência de nucleotídeos de interesse (por exemplo, um cassete de expressão, conforme descrito no presente documento)

e uma segunda ITR de AAV, em que a primeira ITR (ITR 5') e a segunda ITR (ITR 3') são simétricas ou substancialmente simétricas uma com a outra - isto é, um vetor de ceDNA pode compreender sequências de ITR que têm uma organização espacial tridimensional simétrica, de modo que sua estrutura tenha o mesmo formato no espaço geométrico ou tenha as mesmas alças A, C-C' e B-B' no espaço 3D. Em tal modalidade, um par de ITRs simétricas ou um par de ITRs substancialmente simétricas podem ser ITRs modificadas (por exemplo, mod-ITRs) que não são ITRs do tipo selvagem. Um par de mod-ITR pode ter a mesma sequência que tem uma ou mais modificações de ITRs do tipo selvagem e são complementos inversos (invertidos) umas das outras. Em modalidades alternativas, um par de ITRs modificadas são substancialmente simétricas, conforme definido no presente documento, ou seja, o par de ITRs modificadas pode ter uma sequência diferente, mas tem o formato tridimensional simétrico correspondente ou igual.

(I) ITRS DO TIPO SELVAGEM

[00280] Em algumas modalidades, as ITRs simétricas, ou ITRs substancialmente simétricas, são do tipo selvagem (WT-ITRs), conforme descrito no presente documento. Ou seja, ambas as ITRs têm uma sequência do tipo selvagem, mas não necessariamente precisam ser WT-ITRs do mesmo sorotipo de AAV. Ou seja, em algumas modalidades, uma WT-ITR pode ser de um sorotipo de AAV e a outra WT-ITR pode ser de um sorotipo de AAV diferente. Em tal modalidade, um par de WT-ITRs são substancialmente simétricas, conforme definido no presente documento, ou seja, podem ter uma ou mais modificações de nucleotídeo conservadoras enquanto mantém-se ainda a organização espacial tridimensional simétrica.

[00281] Consequentemente, conforme divulgado no presente documento, os vetores de ceDNA contêm uma sequência de ácidos nu-

cleicos transgene ou heteróloga posicionada entre duas sequências de repetição terminal invertida do tipo selvagem (WT-ITR), que são o complemento inverso (invertido) uma da outra ou, alternativamente, são substancialmente simétricas uma em relação à outra - ou seja, um par de WT-ITRs tem organização espacial tridimensional simétrica. Em algumas modalidades, uma sequência de ITR do tipo selvagem (por exemplo, WT-ITR de AAV) compreende um sítio de ligação à Rep funcional (RBS; por exemplo, 5′-GCGCGCTCGCTCGCTC-3′ para AAV2, SEQ ID NO: 60) e um sítio de resolução terminal funcional (TRS; por exemplo, 5'-AGTT-3', SEQ ID NO: 62).

[00282] Em um aspecto, os vetores de ceDNA são obtidos a partir de um polinucleotídeo de vetor que codifica um ácido nucleico heterólogo posicionado operacionalmente entre duas sequências de repetição terminal invertida do tipo selvagem (WT-ITRs) (por exemplo, WT-ITRs de AAV). Ou seja, ambas as ITRs têm uma sequência do tipo selvagem, mas não necessariamente precisam ser WT-ITRs do mesmo sorotipo de AAV. Ou seja, em algumas modalidades, uma WT-ITR pode ser de um sorotipo de AAV e a outra WT-ITR pode ser de um sorotipo de AAV diferente. Em tal modalidade, o par de WT-ITRs são substancialmente simétricas, conforme definido no presente documento, ou seja, podem ter uma ou mais modificações de nucleotídeo conservadoras enquanto mantém-se ainda a organização espacial tridimensional simétrica. Em algumas modalidades, a WT-ITR 5' é de um sorotipo de AAV e a WT-ITR 3' é de um sorotipo de AAV igual ou diferente. Em algumas modalidades, a WT-ITR 5' e a WT-ITR 3' são imagens espelhadas entre si, ou seja, são simétricas. Em algumas modalidades, a WT-ITR 5' e a WT-ITR 3' são do mesmo sorotipo de AAV.

[00283] As WT ITRs são bem-conhecidas. Em uma modalidade, as duas ITRs são do mesmo sorotipo de AAV2. Em determinadas modalidades, pode-se usar WT de outros sorotipos. Existem vários sorotipos

homólogos, por exemplo, AAV2, AAV4, AAV6, AAV8. Em uma modalidade, podem ser usadas ITRs muito homólogas (por exemplo, ITRs com uma estrutura de alça similar). Em outra modalidade, pode-se usar WT ITRs de AAV que são mais diversas, por exemplo, AAV2 e AAV5, e ainda outra modalidade, pode-se usar uma ITR que é substancialmente WT - ou seja, tem a estrutura de alça básica WT, mas algumas alterações de nucleotídeo conservadoras que não alteram ou afetam as propriedades. Ao usar WT-ITRs do mesmo sorotipo viral, uma ou mais sequências reguladoras ainda podem ser usadas. Em determinadas modalidades, a sequência reguladora é uma chave reguladora que permite a modulação da atividade do ceDNA.

[00284] Em algumas modalidades, um aspecto da tecnologia descrito no presente documento se refere a um vetor de ceDNA produzido sinteticamente, em que o vetor de ceDNA compreende pelo menos uma sequência nucleotídica heteróloga, posicionada operacionalmente entre duas sequências de repetição terminal invertida do tipo selvagem (WT-ITRs), em que as WT-ITRs podem ser do mesmo sorotipo, sorotipos diferentes, ou substancialmente simétricas entre si (ou seja, têm a organização espacial tridimensional simétrica, de modo que suas estruturas tenham o mesmo formato no espaço geométrico ou as mesmas alças A, C-C' e B-B' no espaço 3D). Em algumas modalidades, as WT-ITRs simétricas compreendem um sítio de resolução terminal funcional e um sítio de ligação à Rep. Em algumas modalidades, a sequência heteróloga de ácido nucleico codifica um transgene e em que o vetor não está em um capsídeo viral.

[00285] Em algumas modalidades, as WT-ITRs são iguais, mas o complemento inverso umas das outras. Por exemplo, a sequência AACG na ITR 5' pode ser CGTT (isto é, o complemento inverso) na ITR 3' no sítio correspondente. Em um exemplo, o filamento senso de WT-ITR 5' compreende a sequência de ATCGATCG e o filamento

senso de WT-ITR 3' correspondente compreende CG**A** TCGAT (isto é, o complemento inverso de ATCGATCG). Em algumas modalidades, o ceDNA de WT-ITRs compreende adicionalmente um sítio de resolução terminal e um sítio de ligação à proteína de replicação (RPS) (às vezes denominado sítio de ligação à proteína replicativa), por exemplo, um sítio de ligação à Rep.

[00286] Sequências de WT-ITR exemplificativas para uso nos vetores de ceDNA que compreendem WT-ITRs são mostradas na **Tabela 2** do presente documento, que mostra pares de WT-ITRs (WT-ITR 5' e WT-ITR 3').

[00287] Como um exemplo, a presente descrição fornece um vetor de ceDNA produzido sinteticamente que compreende um promotor operacionalmente ligado a um transgene (por exemplo, sequência de ácidos nucleicos heteróloga), com ou sem a chave reguladora, em que o ceDNA é desprovido de proteínas de capsídeo e é: (a) produzido a partir de um ceDNA-plasmídeo (por exemplo, consultar **Figuras 1F a 1G**) que codifica WT-ITRs, em que cada WT-ITR tem o mesmo número de pares de bases duplexados intramolecularmente em sua configuração secundária em forma de gancho (de preferência, excluindo a deleção de qualquer alça terminal de AAA ou TTT nessa configuração em relação a essas sequências de referência), e (b) é identificado como ceDNA com o uso do ensaio para a identificação de ceDNA por eletroforese em gel de agarose sob condições de desnaturação e gel nativo no Exemplo 1.

[00288] Em algumas modalidades, as WT-ITRs de flanqueamento são substancialmente simétricas entre si. Nessa modalidade, a WT-ITR 5' pode ser de um sorotipo de AAV e a WT-ITR 3' de um sorotipo diferente de AAV, de modo que as WT-ITRs não sejam complementos inversos idênticos. Por exemplo, a WT-ITR 5' pode ser de AAV2 e a WT-ITR 3' de um sorotipo diferente (por exemplo, AAV1, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 11 e 12. Em algumas modalidades, as WT-ITRs podem ser selecionadas dentre dois parvovírus diferentes selecionados a partir de qualquer um dos seguintes: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, parvovírus de cobra (por exemplo, parvovírus royal python), parvovírus bovino, parvovírus de cabra, parvovírus aviário, parvovírus canino, parvovírus equino, parvovírus de camarão, parvovírus suíno ou AAV de inseto. Em algumas modalidades, essa combinação de WT ITRs é a combinação de WT-ITRs de AAV2 e AAV6. Em uma modalidade, as WT-ITRs substancialmente simétricas ocorrem quando uma ITR é invertida em relação à outra ITR pelo menos 90% idêntica, pelo menos 95% idêntica, pelo menos 96%..., 97%... 98%... 99%..., 99,5% e todos os pontos intermediários, e tem a mesma organização espacial tridimensional simétrica. Em algumas modalidades, um par de WT-ITRs são substancialmente simétricas, pois as mesmas têm organização espacial tridimensional simétrica, por exemplo, têm a mesma organização 3D de A, C-C'. Braços B-B' e D. Em uma modalidade, um par de WT-ITRs substancialmente simétricas são invertidas uma em relação à outra e são pelo menos 95% idênticas, pelo menos 96%..., 97%... 98%... 99%...,99,5% e todos os pontos intermediários, e uma WT-ITR retém o sítio de ligação à Rep (RBS) de 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3´ (SEQ ID NO: 60) e um sítio de resolução terminal (trs). Em algumas modalidades, um par de WT-ITRs substancialmente simétricas são invertidas uma em relação à outra e são pelo menos 95% idênticas, pelo menos 96%..., 97%... 98%... 99%..., 99,5% e todos os pontos intermediários entre si e uma WT-ITR retém o sítio de ligação à Rep (RBS) de 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 60) e um sítio de resolução terminal (trs) e, além de uma sequência palindrômica variável, permitindo a formação de estrutura secundária em forma de gancho. A homologia pode ser determinada por meios-padrão bem-conhecidos na

técnica, tal como BLAST (Ferramenta de Busca Básica de Alinhamento Local), BLASTN na configuração-padrão.

[00289] Em algumas modalidades, o elemento estrutural da ITR pode ser qualquer elemento estrutural que esteja envolvido na interação funcional da ITR com uma grande proteína Rep (por exemplo, Rep 78 ou Rep 68). Em determinadas modalidades, o elemento estrutural fornece seletividade para a interação de uma ITR com uma proteína Rep grande, isto é, determina pelo menos em cuja parte a proteína Rep interage funcionalmente com a ITR. Em outras modalidades, o elemento estrutural interage fisicamente com uma proteína Rep grande quando a proteína Rep está ligada à ITR. Cada elemento estrutural pode ser, por exemplo, uma estrutura secundária da ITR, uma sequência de nucleotídeos da ITR, um espaçamento entre dois ou mais elementos ou uma combinação de qualquer uma das alternativas acima. Em uma modalidade, os elementos estruturais são selecionados a partir do grupo que consiste em um braço A e A', um braço B e B', um braço C e C', um braço D, um sítio de ligação à Rep (RBE) e um RBE' (isto é, sequência de RBE complementar) e um sítio de resolução terminal (trs).

[00290] Apenas a título de exemplo, a **Tabela 1** indica combinações exemplificativas de WT-ITRs.

[00291] **Tabela 1**: combinações exemplificativas de wt-itrs do mesmo sorotipo ou de sorotipos diferentes ou parvovírus diferentes. A ordem mostrada não é indicativa da posição de ITR, por exemplo, "AAV1, AAV2" demonstra que o ceDNA pode compreender uma ITR WT-AAV1 na posição 5' e uma ITR WT-AAV2 na posição 3' ou vice-versa, uma ITR WT-AAV2 na posição 5' e uma ITR WT-AAV1 na posição 3'. Abreviações: sorotipo de AAV 1 (AAV1), sorotipo de AAV 2 (AAV2), sorotipo de AAV 3 (AAV3), sorotipo de AAV 4 (AAV4), sorotipo de AAV 5 (AAV5), sorotipo de AAV 6 (AAV6), sorotipo de AAV 7

(AAV7), sorotipo de AAV 8 (AAV8), sorotipo de AAV 9 (AAV9), sorotipo de AAV 10 (AAV10), sorotipo de AAV 11 (AAV11) ou sorotipo de AAV 12 (AAV12); genoma AAVrh8, AAVrh10, AAV-DJ e AAV-DJ8 (por exemplo, NCBI: NC 002077; NC 001401; NC001729; NC001829; NC006152; NC 006260; NC 006261), ITRs de animais de sangue quente (AAV aviário (AAAV), AAV bovino (BAAV), AAV canino, equino e ovino), ITRs de parvovírus B19 (n.º de Acesso ao GenBank: NC 000883), Vírus Minuto de camundongo (MVM) (n.º de Acesso ao GenBank NC 001510); Ganso: parvovírus de ganso (n.º de Acesso ao GenBank NC 001701); cobra: parvovírus de cobra 1 (n.º de Acesso ao GenBank NC 006148).

TABELA 1

AAV1,AAV1	AAV2,AAV2	AAV3,AAV3	AAV4,AAV4	AAV5,AAV5
AAV1,AAV2	AAV2,AAV3	AAV3,AAV4	AAV4,AAV5	AAV5,AAV6
AAV1,AAV3	AAV2,AAV4	AAV3,AAV5	AAV4,AAV6	AAV5,AAV7
AAV1,AAV4	AAV2,AAV5	AAV3,AAV6	AAV4,AAV7	AAV5,AAV8
AAV1,AAV5	AAV2,AAV6	AAV3,AAV7	AAV4,AAV8	AAV5,AAV9
AAV1,AAV6	AAV2,AAV7	AAV3,AAV8	AAV4,AAV9	AAV5,AAV10
AAV1,AAV7	AAV2,AAV8	AAV3,AAV9	AAV4,AAV10	AAV5,AAV11

AAV1,AAV8	AAV2,AAV9	AAV3,AAV10	AAV4,AAV11	AAV5,AAV12
AAV1,AAV9	AAV2,AAV10	AAV3,AAV11	AAV4,AAV12	AAV5,AAVRH8
AAV1,AAV10	AAV2,AAV11	AAV3,AAV12	AAV4,AAVRH8	AAV5,AAVRH10
AAV1,AAV11	AAV2,AAV12	AAV3,AAVRH8	AAV4,AAVRH10	AAV5,AAV13
AAV1,AAV12	AAV2,AAVRH8	AAV3,AAVRH10	AAV4,AAV13	AAV5,AAVDJ
AAV1,AAVRH8	AAV2,AAVRH10	AAV3,AAV13	AAV4,AAVDJ	AAV5,AAVDJ8
AAV1,AAVRH10	AAV2,AAV13	AAV3,AAVDJ	AAV4,AAVDJ8	AAV5, AVIÁRIO
AAV1,AAV13	AAV2,AAVDJ	AAV3,AAVDJ8	AAV4 AVIÁRIO	AAV5, BOVINO
AAV1,AAVDJ	AAV2,AAVDJ8	AAV3, AVIÁRIO	AAV4, BOVINO	AAV5, CANINO
AAV1,AAVDJ8	AAV2, AVIÁRIO	AAV3, BOVINO	AAV4, CANINO	AAV5, EQUINO
AAV1, AVIÁRIO	AAV2, BOVINO	AAV3, CANINO	AAV4, EQUINO	AAV5, DE CABRA
AAV1, BOVINO	AAV2, CANINO	AAV3, EQUINO	AAV4 DE CABRA	AAV5 DE CAMARÃO
AAV1, CANINO	AAV2, EQUINO	AAV3 DE CABRA	AAV4 DE CAMARÃO	AAV5, SUÍNO
AAV1, EQUINO	AAV2 DE CABRA	AAV3 DE CAMARÃO	AAV4 SUÍNO	AAV5 DE INSETO
AAV1 DE CABRA	AAV2 DE CAMARÃO	AAV3, SUÍNO	AAV4 DE INSETO	AAV5, OVINO
AAV1 DE CAMARÃO	AAV2, SUÍNO	AAV3 DE INSETO	AAV4 OVINO	AAV5,B19
AAV1, SUÍNO	AAV2 DE INSETO	AAV3, OVINO	AAV4,B19	AAV5,MVM
AAV1 DE INSETO	AAV2, OVINO	AAV3,B19	AAV4,MVM	AAV5 DE GANSO
AAV1, OVINO	AAV2,B19	AAV3,MVM	AAV4 DE GANSO	AAV5 DE COBRA
AAV1,B19	AAV2,MVM	AAV3 DE GANSO	AAV4 DE COBRA	
AAV1,MVM	AAV2 DE GANSO	AAV3 DE COBRA		
AAV1 DE GANSO	AAV2, DE COBRA			
AAV1 DE COBRA				
AAV6,AAV6	AAV7,AAV7	AAV8,AAV8	AAV9,AAV9	AAV10,AAV10
AAV6,AAV7	AAV7,AAV8	AAV8,AAV9	AAV9,AAV10	AAV10,AAV11
AAV6,AAV8	AAV7,AAV9	AAV8,AAV10	AAV9,AAV11	AAV10,AAV12
AAV6,AAV9	AAV7,AAV10	AAV8,AAV11	AAV9,AAV12	AAV10,AAVRH8
AAV6,AAV10	AAV7,AAV11	AAV8,AAV12	AAV9,AAVRH8	AAV10,AAVRH10
AAV6,AAV11	AAV7,AAV12	AAV8,AAVRH8	AAV9,AAVRH10	AAV10,AAV13
AAV6,AAV12	AAV7,AAVRH8	AAV8,AAVRH10	AAV9,AAV13	AAV10,AAVDJ
AAV6,AAVRH8	AAV7,AAVRH10	AAV8,AAV13	AAV9,AAVDJ	AAV10,AAVDJ8

AAV6,AAVRH10	AAV7,AAV13	AAV8,AAVDJ	AAV9,AAVDJ8	AAV10, AVIÁRIO
AAV6,AAV13	AAV7,AAVDJ	AAV8,AAVDJ8	AAV9, AVIÁRIO	AAV10, BOVINO
AAV6,AAVDJ	AAV7,AAVDJ8	AAV8, AVIÁRIO	AAV9, BOVINO	AAV10, CANINO
AAV6,AAVDJ8	AAV7, AVIÁRIO	AAV8, BOVINO	AAV9, CANINO	AAV10, EQUINO
AAV6, AVIÁRIO	AAV7, BOVINO	AAV8, CANINO	AAV9, EQUINO	AAV10 DE CABRA
AAV6, BOVINO	AAV7, CANINO	AAV8, EQUINO	AAV9 DE CABRA	AAV10 DE CAMARÃO
AAV6, CANINO	AAV7, EQUINO	AAV8 DE CABRA	AAV9 DE CAMARÃO	AAV10, SUÍNO
AAV6, EQUINO	AAV7 DE CABRA	AAV8 DE CAMARÃO	AAV9 SUÍNO	AAV10 DE INSETO
AAV6 DE CABRA	AAV7 DE CAMARÃO	AAV8, SUÍNO	AAV9 DE INSETO	AAV10, OVINO
AAV6 DE CAMARÃO	AAV7, SUÍNO	AAV8 DE INSETO	AAV9 OVINO	AAV10,B19
AAV6 SUÍNO	AAV7 DE INSETO	AAV8, OVINO	AAV9,B19	AAV10,MVM
AAV6 DE INSETO	AAV7, OVINO	AAV8,B19	AAV9,MVM	AAV10 DE GANSO
AAV6, OVINO	AAV7,B19	AAV8,MVM	AAV9 DE GANSO	AAV10 DE COBRA
AAV6,B19	AAV7,MVM	AAV8 DE GANSO	AAV9 DE COBRA	
AAV6,MVM	AAV7 DE GANSO	AAV8 DE COBRA		
AAV6, DE GANSO	AAV7 DE COBRA			
AAV6 DE COBRA				
AAV11,AAV11	AAV12,AAV12	AAVRH8,AAVRH8	AAVRH10,AAVRH10	AAV13,AAV13
AAV11,AAV12	AAV12,AAVRH8	AAVRH8,AAVRH10	AAVRH10,AAV13	AAV13,AAVDJ
AAV11,AAVRH8	AAV12,AAVRH10	AAVRH8,AAV13	AAVRH10,AAVDJ	AAV13,AAVDJ8
AAV11,AAVRH10	AAV12,AAV13	AAVRH8,AAVDJ	AAVRH10,AAVDJ8	AAV13, AVIÁRIO
AAV11,AAV13	AAV12,AAVDJ	AAVRH8,AAVDJ8	AAVRH10, AVIÁRIO	AAV13, BOVINO
AAV11,AAVDJ	AAV12,AAVDJ8	AAVRH8 AVIÁRIO	AAVRH10, BOVINO	AAV13, CANINO
AAV11,AAVDJ8	AAV12, AVIÁRIO	AAVRH8, BOVINO	AAVRH10, CANINO	AAV13, EQUINO
AAV11, AVIÁRIO	AAV12, BOVINO	AAVRH8, CANINO	AAVRH10, EQUINO	AAV13, DE CABRA
AAV11, BOVINO	AAV12, CANINO	AAVRH8,EQUINO	AAVRH10 DE CABRA	AAV13 DE CAMARÃO

AAV11, CANINO	AAV12, EQUINO	AAVRH8 DE CABRA	AAVRH10 . DE CAMARÃO	AAV13, SUÍNO
AAV11, EQUINO	AAV12 DE CABRA	AAVRH8 DE CAMARÃO	AAVRH10 SUÍNO	AAV13, DE INSETO
AAV11 DE CABRA	AAV12 DE CAMARÃO	AAVRH8 SUÍNO	AAVRH10 DE INSETO	AAV13, OVINO
AAV11 DE CAMARÃO	AAV12 SUÍNO	AAVRH8 DE INSETO	AAVRH10 OVINO	AAV13,B19
AAV11, SUÍNO	AAV12 DE INSETO	AAVRH8, OVINO	AAVRH10,B19	AAV13,MVM
AAV11 DE INSETO	AAV12, OVINO	AAVRH8,B19	AAVRH10,MVM	AAV13 DE GANSO
AAV11, OVINO	AAV12,B19	AAVRH8,MVM	AAVRH10 DE GANSO	AAV13 DE COBRA
AAV11,B19	AAV12,MVM	AAVRH8 DE GANSO	AAVRH10 DE COBRA	
AAV11,MVM	AAV12.DE GANSO	AAVRH8 DE COBRA		
AAV11, DE GANSO	AAV12 DE COBRA			
AAV11 DE COBRA				
AAVDJ,AAVDJ	AAVDJ8,AVVDJ 8	AVIÁRIO, AVIÁRIO	BOVINO, BOVINO	CANINO, CANINO
AAVDJ,AAVDJ8	AAVDJ8, AVIÁRIO	AVIÁRIO, BOVINO	BOVINO, CANINO	CANINO, EQUINO
AAVDJ, AVIÁRIO	AAVDJ8, BOVINO	AVIÁRIO,CANINO	BOVINO, EQUINO	CANINO, DE CABRA
AAVDJ, BOVINO	AAVDJ8, CANINO	AVIÁRIO, EQUINO	BOVINO, DE CABRA	CANINO, DE CAMARÃO
AAVDJ, CANINO	AAVDJ8, EQUINO	AVIÁRIO, DE CABRA	BOVINO, DE CAMARÃO	CANINO, SUÍNO
AAVDJ, EQUINO	AAVDJ8, DE CABRA	AVIÁRIO, DE CAMARÃO	BOVINO, SUÍNO	CANINO, DE INSETO
AAVDJ DE CABRA	AAVDJ8 DE CAMARÃO	AVIÁRIO, SUÍNO	BOVINO, DE INSETO	CANINO, OVINO
AAVDJ DE CAMARÃO	AAVDJ8, SUÍNO	AVIÁRIO, DE INSETO	BOVINO, OVINO	CANINO, B19
AAVDJ SUÍNO	AAVDJ8 DE INSETO	AVIÁRIO, OVINO	BOVINO, B19	CANINO, MVM

AAVDJ, DE INSETO	AAVDJ8, OVINO	AVIÁRIO, B19	BOVINO, MVM	CANINO, DE GANSO
AAVDJ, OVINO	AAVDJ8,B19	AVIÁRIO, MVM	BOVINO, DE GANSO	CANINO, DE COBRA
AAVDJ,B19	AAVDJ8,MVM	AVIÁRIO, DE GANSO	BOVINO, DE COBRA	
AAVDJ,MVM	AAVDJ8 DE GANSO	AVIÁRIO, DE COBRA		
AAVDJ, DE GANSO	AAVDJ8 DE COBRA			
AAVDJ, DE COBRA				
EQUINO EQUINO	CABRA, CABRA	CAMARÃO, CAMARÃO	SUÍNO, SUÍNO	INSETO, INSETO
EQUINO, DE CABRA	CABRA, CAMARÃO	CAMARÃO, SUÍNO	SUÍNO, DE INSETO	INSETO, OVINO
EQUINO, DE CAMARÃO	DE CABRA, SUÍNO	CAMARÃO, INSETO	SUÍNO, OVINO	INSETO, B19
EQUINO, SUÍNO	CABRA, INSETO	CAMARÃO, OVINO	SUÍNO, B19	INSETO, MVM
EQUINO, DE INSETO	CABRA, OVINO	CAMARÃO, B19	SUÍNO, MVM	INSETO, DE GANSO
EQUINO, OVINO	CABRA, B19	CAMARÃO, MVM	SUÍNO, DE GANSO	INSETO, COBRA
EQUINO, B19	CABRA, MVM	CAMARÃO, DE GANSO	SUÍNO, DE COBRA	
EQUINO, MVM	DE CABRA, DE GANSO	CAMARÃO, DE COBRA		
EQUINO, DE GANSO				
EQUINO, DE COBRA				
OVINO, OVINO	B19, B19	MVM, MVM	GANSO, GANSO	COBRA, COBRA
OVINO, B19	B19,MVM	MVM, DE GANSO	GANSO, COBRA	
OVINO, MVM	B19, GANSO	MVM, DE COBRA		
OVINO, DE GANSO	B19, COBRA			
OVINO, DE COBRA				

[00292] Apenas a título de exemplo, a **Tabela 2** mostra as sequências de WT-ITRs exemplificativas de alguns sorotipos de AAV diferentes.

TABELA 2

sorotipo de AAV	WT-ITR de 5' (ESQUERDA)	WT-ITR de 3' (DIREITA)
AAV1	5'- TTGCCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCGGTGGGGCCTGCGGACCAAA GGTCCGCAGACGGCAGAGGTCTCCTC TGCCGGCCCCACCGAGCGAGCGACGC GCGCAGAGAGGGAGTGGGCAACTCCA TCACTAGGGTAA-3' (SEQ ID NO: 5)	5'- TTACCCTAGTGATGGAGTTGCCCACTC CCTCTCTGCGCGCGTCGCTCGCTCGGT GGGGCCGGCAGAGGAGACCTCTGCCG TCTGCGGACCTTTGGTCCGCAGGCCCC ACCGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG GAGTGGGCAA-3' (SEQ ID NO: 10)
AAV2	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCG CTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCC CGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCAC TAGGGGTTCCT (SEQ ID NO: 2)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCA CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCC GACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGC CTGCAGG (SEQ ID NO: 1)
AAV3	5'- TTGGCCACTCCCTCTATGCGCACTCGC TCGCTCGGTGGGGCCTGGCGACCAAA GGTCGCCAGACGGACGTGGGTTTCCA CGTCCGGCCCCACCGAGCGAGCGAGT GCGCATAGAGGGAGTGGCCAACTCCA TCACTAGAGGTAT-3' (SEQ ID NO: 6)	5'- ATACCTCTAGTGATGGAGTTGGCCACT CCCTCTATGCGCACTCGCTCGCTCGGT GGGGCCGGACGTGGAAACCCACGTCC GTCTGGCGACCTTTGGTCGCCAGGCCC CACCGAGCGAGCGAGTGCGCATAGAG GGAGTGGCCAA-3' (SEQ ID NO: 11)
AAV4	5'- TTGGCCACTCCCTCTATGCGCGCTCGC TCACTCACTCGGCCCTGGAGACCAAA GGTCTCCAGACTGCCGGCCTCTGGCC GGCAGGGCCGAGTGAGTGAGCGAGC GCGCATAGAGGGAGTGGCCAACT-3' (SEQ ID NO: 7)	5'- AGTTGGCCACATTAGCTATGCGCGCTC GCTCACTCACTCGGCCCTGGAGACCAA AGGTCTCCAGACTGCCGGCCTCTGGCC GGCAGGGCCGAGTGAGTGAGCGAGCG CGCATAGAGGGAGTGGCCAA-3' (SEQ ID NO: 12)
AAV5	5'- TCCCCCCTGTCGCGTTCGCTCGCTCGC TGGCTCGTTTGGGGGGGCGACGGCCA	5'- CTTACAAAACCCCCTTGCTTGAGAGTG TGGCACTCTCCCCCCTGTCGCGTTCGCT

	GAGGGCCGTCGTCTGGCAGCTCTTTG AGCTGCCACCCCCCCAAACGAGCCAG CGAGCGAGCGAACGCGACAGGGGGG AGAGTGCCACACTCTCAAGCAAGGGG GTTTTGTAAG -3' (SEQ ID NO: 8)	CGCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGGGTGG CAGCTCAAAGAGCTGCCAGACGACGG CCCTCTGGCCGTCGCCCCCCCAAACGA GCCAGCGAGCGAGCGAACGCGACAGG GGGGA-3' (SEQ ID NO: 13)
AAV6	5'- TTGCCCACTCCCTCTAATGCGCGCTCG CTCGCTCGGTGGGGCCTGCGGACCAA AGGTCCGCAGACGGCAGAGGTCTCCT CTGCCGGCCCCACCGAGCGAGCGAGC GCGCATAGAGGGAGTGGGCAACTCCA TCACTAGGGGTAT-3' (SEQ ID NO: 9)	5'- ATACCCCTAGTGATGGAGTTGCCCACT CCCTCTATGCGCGCTCGCTCGCTCGGT GGGGCCGGCAGAGGAGACCTCTGCCG TCTGCGGACCTTTGGTCCGCAGGCCCC ACCGAGCGAGCGAGCGCGCATTAGAG GGAGTGGGCAA (SEQ ID NO: 14)

[00293] Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos da sequência de WT-ITRs pode ser modificada (por exemplo, modificando-se 1, 2, 3, 4 ou 5 ou mais nucleotídeos ou qualquer faixa na entre os mesmos), em que a modificação é uma substituição de um nucleotídeo complementar, por exemplo, G por um C e vice-versa e T por um A e vice-versa.

[00294] Em determinadas modalidades da presente invenção, o vetor de ceDNA produzido sinteticamente não possui uma WT-ITR que consiste na sequência de nucleotídeos selecionada a partir de qualquer uma dentre as: SEQ ID NOs: 1, 2, 5 a 14. Em modalidades alternativas da presente invenção, se um vetor de ceDNA tiver uma WT-ITR que compreende a sequência de nucleotídeos selecionada a partir de qualquer uma das: SEQ ID NOs: 1, 2, 5 a 14, a ITR flanqueadora também será WT e o vetor de ceDNA compreenderá uma chave reguladora, por exemplo, conforme divulgado no presente documento e no pedido internacional PCT/US18/49996 (por exemplo, consultar a Tabela 11 do documento PCT/US18/49996). Em algumas modalidades, o vetor de ceDNA compreende uma chave reguladora, conforme divulgado no presente documento, e uma WT-ITR selecionada que tem a sequência de nucleotídeos selecionada a partir de qualquer um dos

grupos que consiste em: SEQ ID NO: 1, 2, 5 a 14.

[00295] O vetor de ceDNA descrito no presente documento pode incluir estruturas de WT-ITR que retêm uma porção de RBE, trs e RBE' operável. A **Figura 2A** e **Figura 2B**, utilizando ITRs do tipo selvagem para fins exemplificativos, mostra um mecanismo possível para a operação de um sítio de trs dentro de uma porção de estrutura de ITR do tipo selvagem de um vetor de ceDNA. Em algumas modalidades, o vetor de ceDNA contém uma ou mais sequências de polinucleotídeos de WT-ITR funcionais que compreendem um sítio de ligação à Rep (RBS; 5′-GCGCGCTCGCTCGCTC-3′ (SEQ ID NO: 60) para AAV2) e um sítio de resolução terminal (TRS; 5'-AGTT (SEQ ID NO: 62)). Em algumas modalidades, pelo menos uma WT-ITR é funcional. Em modalidades alternativas, em que um vetor de ceDNA compreende duas WT-ITRs que são substancialmente simétricas entre si, pelo menos uma WT-ITR é funcional e pelo menos uma WT-ITR é não funcional.

B. ITRS MODIFICADAS (MOD-ITRS) EM GERAL PARA VETORES DE ceDNA QUE COMPREENDEM PARES DE ITRS ASSIMÉTRICAS OU PARES DE ITRS SIMÉTRICAS

[00296] Conforme discutido no presente documento, um vetor de ceDNA produzido sinteticamente pode compreender um par de ITRs simétricas ou um par de ITRs assimétricas. Em ambos os casos, uma ou ambas as ITRs podem ser ITRs modificadas - a diferença é que, no primeiro caso (isto é, mod-ITRs simétricas), as mod-ITRs têm a mesma organização espacial tridimensional (isto é, têm as mesmas configurações de braço A-A', C-C' e B-B'), enquanto que no segundo caso (isto é, mod-ITRs assimétricas), as mod-ITRs têm uma organização espacial tridimensional diferente (isto é, têm uma configuração diferente de braços A-A', C-C' e B-B').

[00297] Em algumas modalidades, uma ITR modificada é uma ITR que é modificada por deleção, inserção e/ou substituição em compara-

ção com uma sequência de ITR do tipo selvagem (por exemplo, ITR de AAV). Em algumas modalidades, pelo menos uma das ITRs no vetor de ceDNA compreende um sítio de ligação à Rep funcional (RBS; por exemplo, 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' para AAV2, SEQ ID NO: 60) e um sítio de resolução terminal funcional (TRS; por exemplo, 5'-AGTT-3', SEQ ID NO: 62). Em uma modalidade, pelo menos uma das ITRs é uma ITR não funcional. Em uma modalidade, as ITRs diferentes ou modificadas não são ITRs do tipo selvagem de diferentes sorotipos.

[00298] Alterações e mutações específicas nas ITRs são descritas em detalhes no presente documento, mas no contexto das ITRs, "alterada" ou "mutada" ou "modificada" indicam que nucleotídeos foram inseridos, deletados e/ou substituídos em relação à sequência de ITR original, do tipo selvagem ou referência. A ITR alterada ou mutada pode ser uma ITR geneticamente modificada. Conforme usado no presente documento, "geneticamente modificado" se refere ao aspecto de ter sido manipulado pela mão do homem. Por exemplo, um polipeptídeo é considerado "geneticamente modificado" quando pelo menos um aspecto do polipeptídeo, por exemplo, sua sequência, foi manipulado pela mão do homem para diferir do aspecto que existe na natureza.

[00299] Em algumas modalidades, uma mod-ITR pode ser sintética. Em uma modalidade, uma ITR sintética é baseada em sequências de ITR de mais de um sorotipo de AAV. Em outra modalidade, uma ITR sintética não inclui sequência baseada em AAV. Em ainda outra modalidade, uma ITR sintética preserva a estrutura de ITR descrita acima, embora tenha apenas alguma ou nenhuma sequência originada de AAV. Em alguns aspectos, uma ITR sintética pode interagir, de preferência, com uma Rep do tipo selvagem ou uma Rep de um sorotipo específico ou, em alguns casos, não será reconhecida por uma Rep do

tipo selvagem e será reconhecida apenas por uma Rep mutada.

[00300] O especialista na técnica pode determinar a sequência correspondente em outros sorotipos por meios conhecidos. Por exemplo, determinar se a alteração está nas regiões A, A', B, B', C, C' ou D e determinar a região correspondente em outro sorotipo. Pode-se usar BLAST® (Ferramenta de Busca Básica de Alinhamento Local) ou outros programas de alinhamento de homologia no estado padrão para determinar a sequência correspondente. A invenção fornece ainda populações e pluralidades de vetores de ceDNA que compreendem mod-ITRs de uma combinação de diferentes sorotipos de AAV - ou seja, uma mod-ITR pode ser de um sorotipo de AAV e a outra mod-ITR pode ser de um sorotipo diferente. Sem desejar estar limitado à teoria, em uma modalidade, uma ITR pode ser de ou com base em uma sequência de ITR de AAV2 e a outra ITR do vetor de ceDNA pode ser de ou com base em qualquer uma ou mais sequências dentre ITRs de sorotipo de AAV 1 (AAV1), sorotipo de AAV 4 (AAV4), sorotipo de AAV 5 (AAV5), sorotipo de AAV 6 (AAV6), sorotipo de AAV 7 (AAV7), sorotipo de AAV 8 (AAV8), sorotipo de AAV 9 (AAV9), sorotipo de AAV 10 (AAV10), sorotipo de AAV 11 (AAV11) ou sorotipo de AAV 12 (AAV12).

[00301] Qualquer ITR de parvovírus pode ser usada como uma ITR ou como uma ITR de base para modificação. De preferência, o parvovírus é um dependovírus. Com mais preferência, AAV. O sorotipo escolhido pode ser baseado no tropismo tecidual do sorotipo. O AAV2 tem um amplo tropismo tecidual, o AAV1 tem como alvo preferencial os músculos neuronais e esqueléticos e o AAV5 tem como alvo preferencial epitélios neuronais, pigmentados da retina e fotorreceptores. O AAV6 tem como alvos preferenciais músculo esquelético e pulmão. O AAV8 tem como alvos preferenciais os tecidos hepáticos, de músculo esquelético, de coração e pancreáticos. O AAV9 tem como alvos pre-

ferenciais tecido hepático, esquelético e pulmonar. Em uma modalidade, a ITR modificada é baseada em uma ITR de AAV2.

[00302] Mais especificamente, a capacidade de um elemento estrutural para interagir funcionalmente com uma determinada proteína Rep grande pode ser alterada modificando-se o elemento estrutural. Por exemplo, a sequência de nucleotídeos do elemento estrutural pode ser modificada em comparação com a sequência do tipo selvagem da ITR. Em uma modalidade, o elemento estrutural (por exemplo, braço A, braço A', braço B, braço B', braço C, braço C', braço D, RBE, RBE' e trs) de uma ITR pode ser removido e substituído com um elemento estrutural do tipo selvagem de um parvovírus diferente. Por exemplo, a estrutura de substituição pode ser de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, parvovírus de cobra (por exemplo, parvovírus python royal), parvovírus bovino, parvovírus de cabra, parvovírus aviário, parvovírus canino, parvovírus equino, parvovírus de camarão, parvovírus suíno ou AAV de inseto. Por exemplo, a ITR pode ser uma ITR de AAV2 e o braço A ou A' ou RBE pode ser substituído por um elemento estrutural de AAV5. Em outro exemplo, a ITR pode ser uma ITR de AAV5 e os braços C ou C', RBE e trs podem ser substituídos por um elemento estrutural de AAV2. Em outro exemplo, a ITR de AAV pode ser uma ITR de AAV5 com os braços B e B' substituídos pelos braços B e B' de ITR de AAV2.

[00303] Apenas a título de exemplo, a **Tabela 3** indica modificações exemplificativas de pelo menos um nucleotídeo (por exemplo, uma deleção, inserção e/ou substituição) nas regiões de uma ITR modificada, em que X é indicativo de uma modificação de pelo menos um ácido nucleico (por exemplo, uma deleção, inserção e/ou substituição) nessa seção em relação à ITR do tipo selvagem correspondente. Em algumas modalidades, qualquer modificação de pelo menos um nucleotí-

deo (por exemplo, uma deleção, inserção e/ou substituição) em qualquer uma das regiões de C e/ou C' e/ou B e/ou B' retém três nucleotídeos T sequenciais (isto é, TTT) em pelo menos uma alça terminal. Por exemplo, se a modificação resultar em qualquer uma dentre: uma ITR de braço único (por exemplo, um único braço C-C' ou um único braço B-B'), ou um braço C-B' modificado ou um braço C'-B ou uma ITR de dois braços com pelo menos um braço truncado (por exemplo, um braço C-C' truncado e/ou braço B-B' truncado), pelo menos o único braço ou pelo menos um dos braços de uma ITR de dois braços (em que um braço pode ser truncado) retém três nucleotídeos T sequenciais (isto é, TTT) em pelo menos uma alça terminal. Em algumas modalidades, um braço C-C' truncado e/ou um braço B-B' truncado têm três nucleotídeos T sequenciais (isto é, TTT) na alça terminal.

[00304] **Tabela 3:** combinações exemplificativas de modificações de pelo menos um nucleotídeo (por exemplo, uma deleção, inserção e/ou substituição) em diferentes regiões B-B' e C-C' ou braços de ITRs (X indica uma modificação de nucleotídeos, por exemplo, adição, deleção ou substituição) de pelo menos um nucleotídeo na região).

Região B	Região B'	Região C	Região C'
x			
	x		
x	x		
		x	
			x
		x	x
x		x	
x			x
	x	x	
	x		x
x	x	x	
x	x		x

Região B	Região B'	Região C	Região C'
x		x	x
	x	x	x
x	x	x	x

[00305] Em algumas modalidades, mod-ITR para uso em um vetor de ceDNA produzido sinteticamente que compreende um par de ITRs assimétricas ou um par de mod-ITRs simétricas, conforme divulgado no presente documento, pode compreender qualquer uma das combinações de modificações mostradas na **Tabela 3** e também uma modificação de pelo menos um nucleotídeo em qualquer uma ou mais das regiões selecionadas dentre: entre A' e C, entre C e C', entre C' e B, entre B e B' e entre B' e A. Em algumas modalidades, qualquer modificação de pelo menos um nucleotídeo (por exemplo, uma deleção, inserção e/ou substituição) nas regiões C ou C' ou B ou B' ainda preserva a alça terminal da haste-alça. Em algumas modalidades, qualquer modificação de pelo menos um nucleotídeo (por exemplo, uma deleção, inserção e/ou substituição) entre C e C' e/ou B e B' retém três nucleotídeos T sequenciais (isto é, TTT) em pelo menos uma alça terminal. Em modalidades alternativas, qualquer modificação de pelo menos um nucleotídeo (por exemplo, uma deleção, inserção e/ou substituição) entre C e C' e/ou B e B' retém três nucleotídeos A sequenciais (isto é, AAA) em pelo menos uma alça terminal. Em algumas modalidades, uma ITR modificada para uso no presente documento pode compreender qualquer uma das combinações de modificações mostradas na Tabela 3, e também uma modificação de pelo menos um nucleotídeo (por exemplo, uma deleção, inserção e/ou substituição) em qualquer uma ou mais das regiões selecionadas dentre: A', A e/ou D. Por exemplo, em algumas modalidades, uma ITR modificada para uso no presente documento pode compreender qualquer uma das combinações de modificações mostradas na **Tabela 3**, e também uma modificação de pelo menos um nucleotídeo (por exemplo, uma deleção,

inserção e/ou substituição) na região A. Em algumas modalidades, uma ITR modificada para uso no presente documento pode compreender qualquer uma das combinações de modificações mostradas na **Tabela 3**, e também uma modificação de pelo menos um nucleotídeo (por exemplo, uma deleção, inserção e/ou substituição) na região A'. Em algumas modalidades, uma ITR modificada para uso no presente documento pode compreender qualquer uma das combinações de modificações mostradas na **Tabela 3**, e também uma modificação de pelo menos um nucleotídeo (por exemplo, uma deleção, inserção e/ou substituição) na região A e/ou A'. Em algumas modalidades, uma ITR modificada para uso no presente documento pode compreender qualquer uma das combinações de modificações mostradas na **Tabela 3**, e também uma modificação de pelo menos um nucleotídeo (por exemplo, uma deleção, inserção e/ou substituição) na região D.

[00306] Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos do elemento estrutural pode ser modificada (por exemplo, modificando-se 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 ou mais nucleotídeos ou qualquer faixa dentre os mesmos) para produzir um elemento estrutural modificado. Em uma modalidade, as modificações específicas nas ITRs são exemplificadas no presente documento (por exemplo, SEQ ID NOS: 3, 4, 15 a 47, 101 a 116 ou 165 a 187, ou mostradas nas Figuras 7A e 7B do documento PCT/US2018/064242, depositado em 6 de dezembro de 2018 (por exemplo, SEQ ID NOS 97 e 98, 101 a 103, 105 a 108, 111 e 112, 117 a 134, 545 a 554 no documento PCT/US2018/064242). Em algumas modalidades, uma ITR pode ser modificada (por exemplo, modificando-se 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 ou mais nucleotídeos ou qualquer faixa dentre os mesmos). Em outras modalidades, a ITR pode ter pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo

menos 99% ou mais de identidade de sequência com uma das ITRs modificadas de SEQ ID NOS: 3, 4, 15 a 47, 101 a 116 ou 165 a 187, ou a seção que contém RBE dos braços A-A' e braços C-C' e B-B' de SEQ ID NOs: 3, 4, 15 a 47, 101 a 116 ou 165 a 187, ou mostradas nas Tabelas 2 a 9 (isto é, SEQ ID NO: 110 a 112, 115 a 190, 200 a 468) do pedido internacional PCT/US18/49996, que é incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

[00307] Em algumas modalidades, uma ITR modificada pode, por exemplo, compreender a remoção ou deleção de todo um braço específico, por exemplo, todo ou parte do braço A-A', ou todo ou parte do braço B-B' ou todo ou parte do braço C-C' ou, alternativamente, a remoção de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais pares de bases que formam a haste da alça, desde que a alça final que cobre a haste (por exemplo, braço único) ainda esteja presente (por exemplo, consultar ITR-21 na **Figura 7A** do documento PCT/US2018/064242, depositado em 6 de dezembro de 2018). Em algumas modalidades, uma ITR modificada pode compreender a remoção de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais pares de bases do braço B-B'. Em algumas modalidades, uma ITR modificada pode compreender a remoção de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais pares de bases do braço C-C' (consultar, por exemplo, ITR-1 na Figura 3B ou ITR-45 na **Figura 7A** do documento PCT/US2018/064242, depositado em 6 de dezembro de 2018). Em algumas modalidades, uma ITR modificada pode compreender a remoção de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais pares de bases do braço C-C' e a remoção de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais pares de bases do braço B-B'. Está prevista qualquer combinação de remoção de pares de bases, por exemplo, 6 pares de bases podem ser removidos no braço C-C' e 2 pares de bases no braço B-B'. Como um exemplo ilustrativo, a **Figura 3B** mostra uma ITR modificada exemplificativa com pelo menos 7 pares de bases deletados de cada porção C e porção C', uma substituição de um nucleotí-

deo na alça entre a região C e C' e pelo menos uma deleção de pares de bases de cada uma dentre a região B e a região B', de modo que a ITR modificada compreenda dois braços, em que pelo menos um braço (por exemplo, C-C') é truncado. Em algumas modalidades, a ITR modificada também compreende pelo menos uma deleção de pares de bases de cada uma das regiões B e B', de modo que o braço B-B' também seja truncado em relação à WT ITR.

[00308] Em algumas modalidades, uma ITR modificada pode ter entre 1 e 50 (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50) deleções de nucleotídeos em relação a uma sequência de ITR do tipo selvagem de comprimento total. Em algumas modalidades, uma ITR modificada pode ter entre 1 e 30 deleções de nucleotídeos em relação a uma sequência de ITR do tipo selvagem de comprimento total. Em algumas modalidades, uma ITR modificada tem entre 2 e 20 deleções de nucleotídeos em relação a uma sequência de ITR do tipo selvagem de comprimento total.

[00309] Em algumas modalidades, uma ITR modificada não contém deleções de nucleotídeos na porção que contém RBE das regiões A ou A', de modo a não interferir na replicação de DNA (por exemplo, ligação a um RBE pela proteína Rep ou corte em um sítio de resolução terminal). Em algumas modalidades, uma ITR modificada abrangida para uso no presente documento tem uma ou mais deleções nas regiões B, B', C e/ou C, conforme descrito no presente documento.

[00310] Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido sinteticamente que compreende um par de ITRs simétricas ou par de ITRs assimétricas compreende uma chave reguladora, conforme divulgado no presente documento, e pelo menos uma ITR modificada selecionada que tem a sequência de nucleotídeos selecionada a partir

de qualquer um dos grupos que consiste em: SEQ ID NO: 3, 4, 15 a 47, 101 a 116 ou 165 a 187.

[00311] Em outra modalidade, a estrutura do elemento estrutural pode ser modificada. Por exemplo, o elemento estrutural altera a altura da haste e/ou o número de nucleotídeos na alça. Por exemplo, a altura da haste pode ser de cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 nucleotídeos ou mais ou qualquer faixa dentre os mesmos. Em uma modalidade, a altura de haste pode ser de cerca de 5 nucleotídeos a cerca de 9 nucleotídeos e interage funcionalmente com Rep. Em outra modalidade, a altura de haste pode ser de cerca de 7 nucleotídeos e interage funcionalmente com Rep. Em outro exemplo, a alça pode ter 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos ou mais ou qualquer faixa dentre os mesmos.

[00312] Em outra modalidade, o número de sítios de ligação à GAGY ou sítios de ligação relacionados à GAGY no RBE ou no RBE estendido pode ser aumentado ou diminuído. Em um exemplo, o RBE ou RBE estendido pode compreender 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ou mais sítios de ligação a GAGY ou qualquer faixa dentre os mesmos. Cada sítio de ligação a GAGY pode ser independentemente uma sequência de GAGY exata ou uma sequência similar à GAGY, desde que a sequência seja suficiente para se ligar a uma proteína Rep.

[00313] Em outra modalidade, o espaçamento entre dois elementos (tal como, sem limitação, o RBE e um gancho) pode ser alterado (por exemplo, aumentado ou diminuído) para alterar a interação funcional com uma grande proteína Rep. Por exemplo, o espaçamento pode ser de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21 nucleotídeos ou mais ou qualquer faixa dentre os mesmos.

[00314] O vetor de ceDNA produzido sinteticamente descrito no presente documento pode incluir uma estruturaITR que é modificada em relação à estrutura ITR de AAV2 do tipo selvagem divulgada no

presente documento, mas ainda mantém uma porção de RBE, trs e RBE' operável. A **Figura 2A** e a **Figura 2B** mostram um mecanismo possível para a operação de um sítio de trs dentro de uma porção da estrutura ITR do tipo selvagem de um vetor de ceDNA. Em algumas modalidades, o vetor de ceDNA contém uma ou mais sequências de polinucleotídeos ITRs funcionais que compreendem um sítio de ligação à Rep (RBS; 5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO: 60) para AAV2) e um sítio de resolução terminal (TRS; 5'-AGTT (SEQ ID NO: 62)). Em algumas modalidades, pelo menos uma ITR (ITR WT ou modificada) é funcional. Em modalidades alternativas, em que um vetor de ceDNA compreende duas ITRs modificadas que são diferentes ou assimétricas entre si, pelo menos uma ITR modificada é funcional e pelo menos uma ITR modificada não é funcional.

[00315] Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido sinteticamente não tem uma ITR modificada selecionada a partir de qualquer sequência que consiste em: ou consiste essencialmente em: SEQ ID NOs: 500 a 529, conforme fornecido no presente documento. Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA não tem uma ITR que é selecionada a partir de qualquer sequência selecionada a partir de SEQ ID NOs: 500 a 529.

[00316] Em algumas modalidades, a ITR modificada (por exemplo, a ITR esquerda ou direita) do vetor de ceDNA produzido sinteticamente descrito no presente documento tem modificações dentro do braço de alça, do braço truncado ou do espaçador. Sequências exemplificativas de ITRs que têm modificações dentro do braço de alça, braço truncado ou espaçador estão listadas na Tabela 2 (isto é, SEQ ID NOS: 135 a 190, 200 a 233); Tabela 3 (por exemplo, SEQ ID NOs: 234 a 263); Tabela 4 (por exemplo, SEQ ID NOs: 264 a 293); Tabela 5 (por exemplo, SEQ ID NOs: 294 a 318 aqui); Tabela 6 (por exemplo, SEQ ID NOs: 319 a 468); e Tabelas 7 a 9 (por exemplo, SEQ ID NOs: 101 a

110, 111 a 112, 115 a 134) ou Tabela 10A ou 10B (por exemplo, SEQ ID NOs: 9, 100, 469 a 483, 484 a 499) do pedido internacional PCT/US18/49996, que é incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

[00317] Em algumas modalidades, a ITR modificada para uso em um vetor de ceDNA produzido sinteticamente que compreende um par de ITRs assimétricas ou par de mod-ITRs simétricas é selecionada a partir de qualquer uma ou uma combinação daquelas mostradas nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10A a 10B do pedido internacional PCT/US18/49996, que é incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

[00318] Exemplos de ITRs modificadas adicionais para uso em um vetor de ceDNA produzido sinteticamente que compreende um par de ITRs assimétricas ou par de mod-ITRs simétricas em cada uma das classes acima são fornecidos nas Tabelas 4A e 4B. A estrutura secundária prevista das ITRs modificadas à direita na Tabela 4A é mostrada na **Figura 7A do** Pedido Internacional PCT/US2018/064242, depositado em 6 de dezembro de 2018, e a estrutura secundária prevista das ITRs modificadas à esquerda na Tabela 4B são mostradas na **Figura 7B** do Pedido Internacional PCT/US2018/064242, depositado em 6 de dezembro de 2018, que é incorporado ao presente documento em sua totalidade.

[00319] **A Tabela 4A e a Tabela 4B** mostram ITRs modificadas à direita e à esquerda exemplificativas.

[00320] TABELA 4A: ITRS MODIFICADAS À DIREITA EXEMPLIFICATIVAS Essas ITRs modificadas exemplificativas podem compreender o RBE de GCGCGCTCGCTCGCTC-3′ (SEQ ID NO: 60), espaçador de ACTGAGGC (SEQ ID NO: 69), o complemento de espaçador GCCTCAGT (SEQ ID NO: 70) e RBE' (isto é, complemento para RBE) de GAGCGAGCGAGCGCGC (SEQ ID NO: 71).

Tabela 4A: ITRs modificadas à Direita Exemplificativas

Construto de ITR	Sequência	SEQ ID NO:
ITR-18 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCGCACGCCCGGGTTTCCCGGGCGGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	15
ITR-19 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	16
ITR-20 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGG CGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	17
ITR-21 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCTTTGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGC TGCCTGCAGG	18
ITR-22 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACAAAGTCGCCCGACGCCCGGGCT TTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGC AGG	19
ITR-23 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAAAATCGCCCGACGCCCGGGCTTT GCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAG G	20
ITR-24 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGAAACGCCCGACGCCCGGGCTTTGC CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	21
ITR-25 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCAAAGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCC GGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	22
ITR-26 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGG TTTCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGC AGG	23
ITR-27 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGT TTCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAG G	24
ITR-28 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGTT TCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	25

ITR-29 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCTTT GGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	26
ITR-30 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCTTTG GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	27
ITR-31 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCTTTGC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	28
ITR-32 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGTTTCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	29
ITR-49 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	30
ITR-50 Direita	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGG CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	31

[00321] **Tabela 4B**: ITRs modificadas à esquerda exemplificativas. Essas ITRs modificadas à esquerda exemplificativas podem compreender o RBE de GCGCGCTCGCTCGCTC-3′ (SEQ ID NO: 60), espaçador de ACTGAGGC (SEQ ID NO: 69), o complemento espaçador GCCTCAGT (SEQ ID NO: 70) e complemento de RBE (RBE') de GAGCGAGCGAGCGCGC (SEQ ID NO: 71).

Tabela 4B: ITRs modificadas à esquerda exemplificativas

ITR-33 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG AAACCCGGGCGTGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAG GGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	32
ITR-34 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGTCGGGC GACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA GGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	33
ITR-35 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG CAAAGCCCGGGCGTCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAG AGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	34

ITR-36 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCCCGGGC GTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	35
ITR-37 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCAAAGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCA CTAGGGGTTCCT	36
ITR-38 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG CAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACTTTGTCGCCCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGT TCCT	37
ITR-39 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG CAAAGCCCGGGCGTCGGGCGATTTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTC CT	38
ITR-40 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG CAAAGCCCGGGCGTCGGGCGTTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	39
ITR-41 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG CAAAGCCCGGGCGTCGGGCTTTGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	40
ITR-42 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG AAACCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGT TCCT	41
ITR-43 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGA AACCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTC CT	42
ITR-44 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGAA ACGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	43
ITR-45 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCAAA GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	44

ITR-46 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAG GCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	45
ITR-47 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCAAAGC GTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	46
ITR-48 Esquerda	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGAAACGT CGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	47

[00322] Em uma modalidade, um vetor de ceDNA produzido sinteticamente compreende, na direção de 5' a 3': uma primeira repetição terminal invertida (ITR) de vírus adenoassociado (AAV), uma sequência de nucleotídeos de interesse (por exemplo, um cassete de expres-

são conforme descrito no presente documento) e uma segunda ITR de AAV, em que a primeira ITR (ITR 5') e a segunda ITR (ITR 3') são assimétricas entre si - ou seja, têm configurações espaciais 3D diferentes uma da outra. Como uma modalidade exemplificativa, a primeira ITR pode ser uma ITR do tipo selvagem e a segunda ITR pode ser uma ITR mutada ou modificada, ou vice-versa, em que a primeira ITR pode ser uma ITR mutada ou modificada e a segunda ITR uma ITR do tipo selvagem. Em alguma modalidade, a primeira ITR e a segunda ITR são ambas mod-ITRs, mas têm sequências diferentes ou têm modificações diferentes e, portanto, não são as mesmas ITRs modificadas e têm configurações espaciais 3D diferentes. Em outras palavras, um vetor de ceDNA com ITRs assimétricas compreende ITRs em que quaisquer alterações em uma ITR em relação à WT-ITR não são refletidas na outra ITR; ou, alternativamente, em que as ITRs assimétricas têm um par de ITRs assimétricas modificadas que podem ter uma sequência diferente e um formato tridimensional diferente entre si. ITRs assimétrias exemplificativas no vetor de ceDNA e para uso na geração de ceDNA-plasmídeo são mostradas nas **Tabelas 4A e 4B.**

[00323] Em uma modalidade alternativa, um vetor de ceDNA produzido sinteticamente compreende duas mod-ITRs simétricas - ou seja, as duas ITRs têm a mesma sequência, mas são complementos inversos (invertidos) uma da outra. Em algumas modalidades, um par de mod-ITRs simétricas compreende pelo menos uma dentre ou qualquer combinação de uma deleção, inserção ou substituição em relação à sequência de ITR do tipo selvagem do mesmo sorotipo de AAV. As adições, deleções ou substituições na ITR simétrica são iguais, mas o complemento inverso uma da outra. Por exemplo, uma inserção de 3 nucleotídeos na região C da ITR 5' é refletida na inserção de 3 nucleotídeos de complemento inverso na seção correspondente na região C' da ITR 3'. Apenas para fins ilustrativos, se a adição for AACG na ITR

5', a adição será CGTT na ITR 3' no sítio correspondente. Por exemplo, se o filamento senso de ITR 5' for ATC**GA**TCG com uma adição de *AACG* entre G e A para resultar na sequência ATC**G***AACG***A**TCG (SEQ ID NO: 51). O filamento de ITR 3' correspondente é CGA**TC**GAT (o complemento inverso de ATC**GA**TCG) com uma adição de *CGTT* (isto é, o complemento inverso de AACG) entre T e C para resultar na sequência CGA**T***CGTT***C**GAT (SEQ ID NO: 49) (o complemento inverso de ATC**G***AACG***A**TCG) (SEQ ID NO: 51).

[00324] Em modalidades alternativas, o par de ITRs modificadas são substancialmente simétricas conforme definido no presente documento - ou seja, o par de ITRs modificadas podem ter uma sequência diferente, mas têm o formato tridimensional simétrico correspondente ou igual. Por exemplo, uma ITR modificada pode ser de um sorotipo e a outra ITR modificada pode ser de um sorotipo diferente, mas as mesmas têm a mesma mutação (por exemplo, inserção, deleção ou substituição de nucleotídeos) na mesma região. Em outras palavras, apenas para fins ilustrativos, uma mod-ITR 5' pode ser de AAV2 e ter uma deleção na região C, e a mod-ITR 3' pode ser de AAV5 e ter a deleção correspondente na região C', e desde que a mod-ITR 5' e a mod-ITR 3' tenham a mesma organização espacial tridimensional ou simétrica, as mesmas são abrangidas para uso no presente documento como um par de ITRs modificadas.

[00325] Em algumas modalidades, um par de mod-ITRs substancialmente simétricas tem as mesmas alças A, C-C' e B-B' no espaço 3D, por exemplo, se uma ITR modificada em um par de mod-ITRs substancialmente simétricas tiver uma deleção de um braço C-C', então, a mod-ITR cognata terá a deleção correspondente da alça C-C' e também terá uma estrutura 3D similar das demais alças A e B-B' do mesmo formato no espaço geométrico de sua mod-ITR cognata. Apenas a título de exemplo, as ITRs substancialmente simétricas podem ter uma

organização espacial simétrica, de modo que sua estrutura tenha o mesmo formato no espaço geométrico. Isso pode ocorrer, por exemplo, quando um par de G-C é modificado, por exemplo, para um par de C-G ou vice-versa, ou o par A-T é modificado para um par de T-A ou vice-versa. Portanto, usando o exemplo acima de ITR 5' modificada como uma ATC**G***AACG* **A**TCG (SEQ ID NO: 51) e ITR 3' modificada como CGA**T***CGTT* **C**GAT (SEQ ID NO: 49) (isto é, o complemento inverso de ATC**G***AACG* **A**TCG (SEQ ID NO: 51)), essas ITRs modificadas ainda seriam simétricas se, por exemplo, a ITR 5' tivesse a sequência ATC**G***AAC<u>C</u>***A**TCG (SEQ ID NO: 50), em que G na adição é modificado para C, e a ITR 3' substancialmente simétrica tem a sequência CGA**T***CGTT* **C**GAT (SEQ ID NO: 49), sem a modificação correspondente de T na adição a. Em algumas modalidades, um par de ITRs modificadas são substancialmente simétricas, pois o par de ITRs modificadas têm estereoquímica simétrica.

[00326] **A Tabela 5** mostra pares de ITRs modificadas simétricas exemplificativas (isto é, uma ITR modificada esquerda e a ITR modificada direita simétrica). A porção em negrito (vermelho) das sequências identifica sequências de ITR parciais (isto é, sequências de alças A-A', C-C' e B-B'), também mostradas nas Figuras 31A a 46B. Essas ITRs modificadas exemplificativas podem compreender o RBE de GCGCGCTCGCTCGCTC-3′ (SEQ ID NO: 60), espaçador de ACTGAGGC (SEQ ID NO: 69), o complemento espaçador de GCCTCAGT (SEQ ID NO: 70) e RBE' (isto é, complemento de RBE) de GAGCGAGCGAGCGCGC (SEQ ID NO: 71).

Tabela 5: pares de ITRs modificadas simétricas exemplificativos

ITR modificada à ESQUERDA (ITR de 5' modificada)		ITR modificada à DIREITA simétrica (ITR de 3' modificada)	
SEQ ID NO:32 (ITR-33 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCCGGGAAA CCCGGGCGTGCGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGC**AGAGAGGGAGTGG CCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 15 (ITR-18, direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CGCACGCCCGGGTTTCCCGG GCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGC**AGCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO: 33 (ITR-34 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGTCGGGCGAC CTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGC**AGAGAGGGAGT GGCCAACTCCATCACTAGGGGTTC CT	SEQ ID NO: 48 (ITR-51, direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGC**AGCTGCCTGCA GG
SEQ ID NO: 34 (ITR-35 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAA AGCCCGGGCGTCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGC**AGAGAGGGAGT GGCCAACTCCATCACTAGGGGTTC CT	SEQ ID NO: 16 (ITR-19, direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGACGCCCGGGCTTTGCCC GGGCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGC**AGCTGCCTGCA GG
SEQ ID NO: 35 (ITR-36 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCGCCCGGGCGTC GGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC**AGAG AGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA GGGGTTCCT	SEQ ID NO: 17 (ITR-20, direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCCGGGCGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGC**AGCT GCCTGCAGG
SEQ ID NO: 36 (ITR-37 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCAAAGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGC**AGAGAGGG AGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCT	SEQ ID NO: 18 (ITR-21, direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CTTTGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGC**AGCTGCCTGCAG G

SEQ ID NO: 37 (ITR-38 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT** **CGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAA** **AGCCCGGGCGTCGGGCGACTTTGT** **CGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA** **GCGCGC**AGAGAGGGAGTGGCCAAC TCCATCACTAGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 19 (ITR-22 direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG** **CGCTCGCTCGCTCACTGAGG** **CCGGGCGACAAAGTCGCCCG** **ACGCCCGGGCTTTGCCCGGG** **CGGCCTCAGTGAGCGAGCGA** **GCGCGC**AGCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO: 38 (ITR-39 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT** **CGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAA** **AGCCCGGGCGTCGGGCGATTTTCG** **CCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC** **GCGC**AGAGAGGGAGTGGCCAACTC CATCACTAGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 20 (ITR-23, direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG** **CGCTCGCTCGCTCACTGAGG** **CCGGGCGAAAATCGCCCGAC** **GCCCGGGCTTTGCCCGGGCG** **GCCTCAGTGAGCGAGCGAGC** **GCGC**AGCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO: 39 (ITR-40 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT** **CGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAA** **AGCCCGGGCGTCGGGCGTTTCGCC** **CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC** **GC**AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCA TCACTAGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 21 (ITR-24, direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG** **CGCTCGCTCGCTCACTGAGG** **CCGGGCGAAACGCCCGACGC** **CCGGGCTTTGCCCGGGCGGC** **CTCAGTGAGCGAGCGAGCGC** **GC**AGCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO: 40 (ITR-41 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT** **CGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAA** **AGCCCGGGCGTCGGGCTTTGCCCG** **GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC** AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATC ACTAGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 22 (ITR-25 direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG** **CGCTCGCTCGCTCACTGAGG** **CCGGGCAAAGCCCGACGCCC** **GGGCTTTGCCCGGGCGGCCT** **CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC** AGCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO: 41 (ITR-42 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT** **CGCTCACTGAGGCCGCCCGGGAAA** **CCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGT** **CGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA** **GCGCGC**AGAGAGGGAGTGGCCAAC TCCATCACTAGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 23 (ITR-26 direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG** **CGCTCGCTCGCTCACTGAGG** **CCGGGCGACCAAAGGTCGCC** **CGACGCCCGGGTTTCCCGGG** **CGGCCTCAGTGAGCGAGCGA** **GCGCGC**AGCTGCCTGCAGG

SEQ ID NO: 42(ITR-43 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCCGGAAAC CGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCG CCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGC**AGAGAGGGAGTGGCCAACTC CATCACTAGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 24 (ITR-27 direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCCGGTTTCCGGGCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGC**AGCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO: 43 (ITR-44 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCCGAAACG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GC**AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCA TCACTAGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 25 (ITR-28 direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCCGTTTCGGGCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GC**AGCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO:44 (ITR-45 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCCAAAGGG CGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC** AGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATC ACTAGGGGTTCCT	SEQ ID NO:26 (ITR-29, direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCCTTTGGGCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC** AGCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO:45 (ITR-46 esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCAAAGGCG TCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC**AG AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCAC TAGGGGTTCCT	SEQ ID NO: 27(ITR-30, direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCTTTGGCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGC**AG CTGCCTGCAGG
SEQ ID NO: 46 (ITR-47, esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCAAAGCGTC GGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGC**AGAG AGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA GGGGTTCCT	SEQ ID NO: 28 (ITR-31, direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCTTTGCGGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGC**AGCT GCCTGCAGG
SEQ ID NO: 47 (ITR-48, esquerda)	CCTGCAGGCAGCT**GCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGAAACGTCGG GCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGC**AGAGAG GGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG GGTTCCT	SEQ ID NO: 29 (ITR-32 direita)	AGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTCT**GCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGTTTCGGCCTCAGTGA GCGAGCGAGCGCGC**AGCTGC CTGCAGG

[00327] Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA que compreende um par de ITRs assimétricas pode compreender uma ITR com uma modificação correspondente a qualquer uma das modificações nas sequências de ITR ou sequências parciais de ITR mostradas em qualquer uma ou mais das Tabelas 4A a 4B do presente documen-

to ou nas sequências mostradas nas **Figuras 7A ou 7B** do Pedido Internacional PCT/US2018/064242, depositado em 6 de dezembro de 2018, que é incorporado ao presente documento em sua totalidade ou divulgado nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10A e 10B do pedido internacional PCT/US18/49996, depositado em 7 de setembro de 2018, que é incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

V. VETORES DE ceDNA EXEMPLIFICATIVOS

[00328] Conforme descrito acima, a presente descrição se refere a vetores de expressão de ceDNA recombinantes produzidos sinteticamente e vetores de ceDNA que codificam um transgene que compreende qualquer um dentre: um par de ITRs assimétricas, um par de ITRs simétricas ou par de ITRs substancialmente simétricas, conforme descrito acima. Em determinadas modalidades, a descrição se refere a vetores de ceDNA recombinantes produzidos sinteticamente com sequências de ITR de flanqueamento e um transgene, em que as sequências de ITR são assimétricas, simétricas ou substancialmente simétricas em relação uma à outra, conforme definido no presente documento, e o ceDNA compreende adicionalmente uma sequência de nucleotídeos de interesse (por exemplo, um cassete de expressão que compreende o ácido nucleico de um transgene) localizada entre as ITRs de flanqueamento, em que a dita molécula de ácido nucleico é desprovida de sequências codificadoras de proteína de capsídeo viral.

[00329] O vetor de expressão de ceDNA produzido sinteticamente pode ser qualquer vetor de ceDNA que possa ser convenientemente submetido a procedimentos de DNA recombinante, incluindo sequência (ou sequências) de nucleotídeos, conforme descrito no presente documento, desde que pelo menos uma ITR seja alterada. Os vetores de ceDNA produzidos sinteticamente da presente descrição são compatíveis com a célula hospedeira na qual o vetor de ceDNA deve ser

introduzido. Em determinadas modalidades, os vetores de ceDNA produzidos sinteticamente podem ser lineares. Em determinadas modalidades, os vetores de ceDNA produzidos sinteticamente podem existir como uma entidade extracromossômica. Em determinadas modalidades, os vetores de ceDNA produzidos sinteticamente da presente descrição podem conter um elemento (ou elementos) que permite a integração de uma sequência doadora no genoma da célula hospedeira. Conforme usado no presente documento, "transgene" e "sequência de nucleotídeos heteróloga" são sinônimos.

[00330] Com referência agora às **Figuras 1A a 1G,** são mostrados esquemas dos componentes funcionais de dois plasmídeos não limitantes úteis na produção sintética dos vetores de ceDNA da presente descrição. As **Figuras 1A, 1B, 1D, 1F** mostram o construto de vetores de ceDNA ou as sequências correspondentes de plasmídeos de ceDNA, em que a primeira e a segunda sequências de ITR são assimétricas, simétricas ou substancialmente simétricas uma em relação à outra, conforme definido no presente documento. Em algumas modalidades, o cassete transgene expressível inclui, conforme necessário: um intensificador/promotor, um ou mais braços de homologia, uma sequência doadora, um elemento regulador pós-transcrição (por exemplo, WPRE, por exemplo, SEQ ID NO: 67)) e um sinal de poliadenilação e terminação (por exemplo, BGH polyA, por exemplo, SEQ ID NO: 68).

[00331] A **Figura 5** é um gel que confirma a produção de vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento e nos Exemplos. A geração de um vetor de ceDNA é confirmada por um padrão de banda característico no gel, conforme discutido em relação à **Figura 4B** acima e nos Exemplos.

A. ELEMENTOS REGULADORES.

[00332] Os vetores de ceDNA, conforme descrito no presente do-

cumento e produzidos com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, podem compreender um par de ITRs assimétricas ou um par de ITRs simétricas, conforme definido no presente documento, podem compreender ainda uma combinação específica de elementos cis-reguladores. Os elementos cis-reguladores incluem, mas sem limitação, um promotor, uma chave de ribossomos, um isolador, um elemento regulável por mir, um elemento regulador pós-transcricional, um promotor específico para tipo de tecido e célula e um intensificador. Em algumas modalidades, a ITR pode atuar como o promotor do transgene. Em algumas modalidades, o vetor de ceDNA compreende componentes adicionais para regular a expressão do transgene, por exemplo, chaves reguladoras, como descrito no presente documento, para regular a expressão do transgene, ou uma chave de exterminação, que pode exterminar uma célula que compreende o vetor de ceDNA. Os elementos reguladores, incluindo chaves reguladoras que podem ser usadas na presente invenção, são discutidos mais detalhadamente no pedido internacional PCT/US18/49996, que é incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

[00333] Nas modalidades, a segunda sequência de nucleotídeos inclui uma sequência reguladora e uma sequência de nucleotídeos que codifica uma nuclease. Em determinadas modalidades, a sequência reguladora de gene está operacionalmente ligada à sequência de nucleotídeos que codifica a nuclease. Em determinadas modalidades, a sequência reguladora é adequada para controlar a expressão da nuclease em uma célula hospedeira. Em determinadas modalidades, a sequência reguladora inclui uma sequência promotora adequada, sendo capaz de direcionar a transcrição de um gene operacionalmente ligado à sequência promotora, tal como uma sequência de nucleotídeos que codifica a nuclease (ou nucleases) da presente descrição.

Em determinadas modalidades, a segunda sequência de nucleotídeos inclui uma sequência de íntrons ligada ao terminal 5' da sequência de nucleotídeos que codifica a nuclease. Em determinadas modalidades, uma sequência potenciadora é fornecida a montante do promotor para aumentar a eficácia do promotor. Em determinadas modalidades, a sequência reguladora inclui um intensificador e um promotor, em que a segunda sequência de nucleotídeos inclui uma sequência de íntrons a montante da sequência de nucleotídeos que codifica uma nuclease, em que o íntron inclui um ou mais locais de clivagem da nuclease e em que o promotor está operacionalmente ligado à sequência de nucleotídeos que codifica a nuclease.

[00334] Os vetores de ceDNA produzidos com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, podem compreender ainda uma combinação específica de elementos cis-reguladores, tal como o elemento regulador pós-transcricional WHP (WPRE) (por exemplo, SEQ ID NO: 67) e BGH polyA (SEQ ID NO: 68). Cassetes de expressão adequados para uso em construtos de expressão não são limitados pela restrição de embalagem imposta pelo capsídeo viral.

(I). PROMOTORES:

[00335] Será observado por um indivíduo de habilidade comum na técnica que os promotores usados nos vetores de ceDNA produzidos sinteticamente da invenção devem ser adaptados conforme apropriado para as sequências específicas que estão promovendo. Por exemplo, um RNA-guia pode não exigir um promotor, uma vez que sua função é formar um duplex com uma sequência-alvo específica no DNA nativo para efetuar um evento de recombinação. Por outro lado, uma nuclease codificada pelo vetor de ceDNA se beneficia de um promotor para que o mesmo possa ser eficientemente expresso a partir do vetor - e, opcionalmente, de maneira regulável.

[00336] Os cassetes de expressão da presente invenção incluem um promotor, que pode influenciar os níveis gerais de expressão, bem como a especificidade celular. Para expressão de transgene, os mesmos podem incluir um promotor precoce imediato derivado de vírus altamente ativo. Os cassetes de expressão podem conter promotores eucarióticos específicos de tecido para limitar a expressão do transgene a tipos celulares específicos e reduzir efeitos tóxicos e respostas imunes resultantes de expressão ectópica não regulada. Em modalidades preferenciais, um cassete de expressão pode conter um elemento regulador sintético, tal como um promotor de CAG (SEQ ID NO: 72). O promotor de CAG compreende (i) o elemento intensificador precoce de citomegalovírus (CMV), (ii) o promotor, o primeiro éxon e o primeiro íntron do gene da beta-actina de galinha e (iii) o aceitador de splice do gene de beta-globina de coelho. Alternativamente, um cassete de expressão pode conter um promotor de alfa-1-antitripsina (AAT) (SEQ ID NO: 73 ou SEQ ID NO: 74), um promotor específico para fígado (LP1) (SEQ ID NO: 75 ou SEQ ID NO: 76) ou um promotor de fator-1 de alongamento humano alfa (EF1a) (por exemplo, SEQ ID NO: 77 ou SEQ ID NO: 78). Em algumas modalidades, o cassete de expressão inclui um ou mais promotores constitutivos, por exemplo, um promotor de LTR retroviral de vírus de sarcoma de Rous (RSV) (opcionalmente com o intensificador de RSV) ou um promotor precoce imediato de citomegalovírus (CMV) (opcionalmente com o intensificador de CMV, por exemplo, SEQ ID NO: 79). Alternativamente, pode ser usado um promotor induzível, um promotor nativo para um transgene, um promotor específico para tecido ou vários promotores conhecidos na técnica.

[00337] Promotores adequados, incluindo os descritos acima, podem ser derivados de vírus e, portanto, podem ser referidos como promotores virais, ou podem ser derivados de qualquer organismo,

incluindo organismos procarióticos ou eucarióticos. Promotores adequados podem ser usados para direcionar a expressão por qualquer RNA polimerase (por exemplo, pol I, pol II, pol III). Promotores exemplificativos incluem, mas sem limitação, promotor inicial de SV40, promotor de repetição terminal longa (LTR) de vírus de tumor mamário de camundongo; principal promotor tardio de adenovírus (Ad MLP); um promotor de vírus da herpes simplex (HSV), um promotor do citomegalovírus (CMV), tal como a região de promotor precoce de CMV (CMVIE), um promotor de vírus de sarcoma de Rous (RSV), um pequeno promotor nuclear U6 humano (U6, por exemplo, SEQ ID NO: 80) (Miyagishi *et al*., *Nature Biotechnology* 20, 497 a 500 (2002)), um promotor U6 intensificado (por exemplo, Xia *et al* ., *Nucleic Acids Res*. 2003, 1 de setembro de 2003; 31 (17)), um promotor H1 humano (H1) (por exemplo, SEQ ID NO: 81 ou SEQ ID NO: 155), um promotor de CAG, um promotor de alfa 1-antitipsina humana (HAAT) (por exemplo, SEQ ID NO: 82) e similares. Em determinadas modalidades, esses promotores são alterados na extremidade que contém íntron a jusante para incluir um ou mais sítios de clivagem de nuclease. Em determinadas modalidades, o DNA que contém os sítios de clivagem de nuclease é estranho ao DNA de promotor.

[00338] Em uma modalidade, o promotor usado é o promotor nativo do gene que codifica a proteína terapêutica. Os promotores e outras sequências reguladoras para os respectivos genes que codificam as proteínas terapêuticas são conhecidos e foram caracterizados. A região promotora usada pode incluir ainda uma ou mais sequências reguladoras adicionais (por exemplo, nativas), por exemplo, intensificadores (por exemplo, SEQ ID NO: 79 e SEQ ID NO: 83).

[00339] Exemplos não limitantes de promotores adequados para uso de acordo com a presente invenção incluem o promotor de CAG de, por exemplo, (SEQ ID NO: 72), o promotor de HAAT (SEQ ID NO:

82), o promotor de EF1-α humano (SEQ ID NO: 77) ou um fragmento do promotor de EF1a (SEQ ID NO: 78), promotor de IE2 (por exemplo, SEQ ID NO: 84) e o promotor de EF1-α de rato (SEQ ID NO: 85) ou fragmento de promotor 1E1 (SEQ ID NO: 125).

(II) SEQUÊNCIAS DE POLIADENILAÇÃO:

[00340] Uma sequência que codifica uma sequência de poliadenilação pode ser incluída no vetor de ceDNA produzido sinteticamente para estabilizar um mRNA expresso a partir do vetor de ceDNA e para auxiliar na exportação e tradução nuclear. Em uma modalidade, o vetor de ceDNA produzido sinteticamente não inclui uma sequência de poliadenilação. Em outras modalidades, o vetor inclui pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 45, pelo menos 50 ou mais dinucleotídeos de adenina. Em algumas modalidades, a sequência de poliadenilação compreende cerca de 43 nucleotídeos, cerca de 40 a 50 nucleotídeos, cerca de 40 a 55 nucleotídeos, cerca de 45 a 50 nucleotídeos, cerca de 35 a 50 nucleotídeos ou qualquer intervalo entre os mesmos.

[00341] Os cassetes de expressão podem incluir uma sequência de poliadenilação conhecida na técnica ou uma variação da mesma, tal como uma sequência de ocorrência natural isolada de BGHpA bovino (por exemplo, SEQ ID NO: 68) ou um SV40pA de vírus (por exemplo, SEQ ID NO: 86) ou uma sequência sintética (por exemplo, SEQ ID NO: 87). Alguns cassetes de expressão também podem incluir a sequência de intensificador a montante de sinal polyA tardio de SV40 (USE). Em algumas modalidades, o USE pode ser usado em combinação com SV40pA ou sinal poly-A heterólogo.

[00342] Os cassetes de expressão também podem incluir um elemento pós-transcricional para aumentar a expressão de um transgene. Em algumas modalidades, o elemento regulador pós-transcricional

(WPRE) do Vírus da Hepatite da Marmota (WHP) (por exemplo, SEQ ID NO: 67) é usado para aumentar a expressão de um transgene. Outros elementos de processamento pós-transcricionais, tal como o elemento pós-transcricional do gene de timidina-quinase do vírus da herpes simplex ou do vírus da hepatite B (HBV), podem ser usados. Sequências secretoras podem ser ligadas aos transgenes, por exemplo, sequências de VH-02 e VK-A26, por exemplo, SEQ ID NO: 88 e SEQ ID NO: 89.

(III) SEQUÊNCIAS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR

[00343] Em algumas modalidades, o vetor que codifica uma endonuclease guiada por RNA compreende uma ou mais sequências de localização nuclear (NLSs), por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais NLSs. Em algumas modalidades, as uma ou mais NLSs estão localizadas no ou próximo ao terminal amino, terminal carbóxi, ou uma combinação dos mesmos (por exemplo, uma ou mais NLSs no terminal amino e/ou uma ou mais NLSs no terminal carbóxi). Quando mais de uma NLS está presente, cada uma pode ser selecionada independentemente das outras, de modo que uma única NLS esteja presente em mais de uma cópia e/ou em combinação com uma ou mais NLSs presentes em uma ou mais cópias. Exemplos não limitantes de NLSs são mostrados na **Tabela 6.**

TABELA 6: SINAIS DE LOCALIZAÇÃO NUCLEAR

FONTE	SEQUÊNCIA	*SEQ ID NO.*
antígeno T grande de vírus SV40	PKKKRKV (codificada por CCCAAGAAGAAGAGGAAGGTG; SEQ ID NO: 91)	90
nucleoplasmina	KRPAATKKAGQAKKKK	92
c-myc	PAAKRVKLD	93
	RQRRNELKRSP	94
hRNPA1 M9	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY	95
domínio IBB de importin-alfa	RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV	96
proteína T de mioma	VSRKRPRP	97
	PPKKARED	98
p53 humano	PQPKKKPL	99

c-abl IV de camundongo	SALIKKKKKMAP	100
NS1 de vírus da gripe	DRLRR	117
	PKQKKRK	118
antígeno delta de vírus da hepatite	RKLKKKIKKL	119
proteína Mx 1 de camundongo	REKKKFLKRR	120
poli(ADP-ribose) polimerase humana	KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK	121
glicocorticoide de receptores de hormônio de esteroide	RKCLQAGMNLEARKTKK	122

E. COMPONENTES ADICIONAIS DE VETORES DE ceDNA

[00344] Os vetores de ceDNA produzidos com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, podem conter nucleotídeos que codificam outros componentes para expressão gênica. Por exemplo, para selecionar eventos de alvejamento de genes específicos, um shRNA protetor pode ser incorporado a um microRNA e inserido em um vetor de ceDNA recombinante projetado para integrar com especificidade de sítio ao local altamente ativo, tal como um local de albumina. Tais modalidades podem fornecer um sistema para seleção e expansão *in vivo* de hepatócitos modificados por genes em qualquer contexto genético, conforme descrito em Nygaard *et al*., *A universal system to select gene-modified hepatocytes in vivo, Gene Therapy*, 8 de junho de 2016. Os vetores de ceDNA da presente descrição podem conter um ou mais marcadores selecionáveis que permitem a seleção de células transformadas, transfectadas, transduzidas ou similares. Um marcador selecionável é um gene cujo produto fornece resistência a biocidas ou vírus, resistência a metais pesados, prototrofia a auxotróficos, NeoR e similares. Em terminadas modalidades, marcadores de seleção positiva são incorporados nas sequências doadoras, tal como NeoR. Marcadores de seleções negativas podem ser incorporados a jusante das sequências doadoras, por exemplo, uma sequência de ácido nucleico HSV-tk que codifica um marcador de seleção negativa pode ser incorporada em um construto de ácido nuclei-

co a jusante da sequência doadora.

[00345] Em modalidades, o vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético descrito no presente documento pode ser usado para edição de genes, por exemplo, conforme divulgado no Pedido Internacional PCT/US2018/064242, depositado em 6 de dezembro de 2018, que é incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência e pode incluir um ou mais dentre: um braço de homologia 5', um braço de homologia 3', um sítio de poliadenilação a montante e próximo ao braço de homologia 5'. Os braços de homologia exemplificativos são os braços de homologia de albumina 5' e 3' (SEQ ID NO: 151 e 152) ou os braços de homologia com CCR5 5' e 3' (por exemplo, SEQ ID NO: 153, 154).

F. CHAVES REGULADORAS

[00346] Uma chave reguladora molecular é aquela que gera uma alteração mensurável de estado em resposta a um sinal. Tais chaves reguladoras podem ser utilmente combinadas com os vetores de ceDNA produzidos com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, para controlar a saída da expressão do transgene a partir do vetor de ceDNA. Em algumas modalidades, o vetor de ceDNA compreende uma chave reguladora que serve para ajustar a expressão do transgene. Por exemplo, a mesma pode servir como uma função de biocontenção do vetor de ceDNA. Em algumas modalidades, a chave é uma chave "ATIVADA/DESATIVADA" que é projetada para iniciar ou parar (isto é, interromper) a expressão do gene de interesse no ceDNA em um modo controlável e regulável. Em algumas modalidades, a chave pode incluir uma "chave de exterminação" que pode instruir a célula que compreende o vetor de ceDNA a sofrer morte programada por célula uma vez que a chave é ativada. Trocas reguladoras exemplificativas abrangidas para uso em um vetor de ceDNA podem ser usadas para regular a expressão de um transgene e são

discutidas mais detalhadamente no pedido internacional PCT/US18/49996, que é incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

(I) CHAVES REGULADORAS BINÁRIAS

[00347] Em algumas modalidades, o vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, compreende uma chave reguladora que pode servir para modular controlavelmente a expressão do transgene. Por exemplo, o cassete de expressão localizado entre as ITRs do vetor de ceDNA pode compreender adicionalmente uma região reguladora, por exemplo, um promotor, elemento cis, repressor, intensificador etc., que está operacionalmente ligado ao gene de interesse, em que a região reguladora é regulada por um ou mais cofatores ou agentes exógenos. Apenas a título de exemplo, as regiões reguladoras podem ser moduladas por chaves de pequenas moléculas ou promotores induzíveis ou repressíveis. Exemplos não limitantes de promotores induzíveis são promotores induzíveis por hormônios ou induzíveis por metais. Outros elementos promotores/intensificadores induzíveis exemplificativos incluem, mas sem limitação, um promotor induzível por RU486, um promotor induzível por ecdisona, um promotor induzível por rapamicina e um promotor de metalotioneína.

(II) CHAVES REGULADORAS DE MOLÉCULAS PEQUENAS

[00348] Uma variedade de chaves reguladoras baseadas em moléculas pequenas conhecidas na técnica é conhecida na técnica e pode ser combinada com os vetores de ceDNA produzidos sinteticamente divulgados no presente documento para formar um vetor de ceDNA controlado por chave reguladora. Em algumas modalidades, a chave reguladora pode ser selecionada a partir de qualquer um dentre ou uma combinação de: um par de ligante ortogonal/receptor nuclear, por exemplo, variante de receptor de retinoide/LG335 e GRQCIMFI, jun-

tamente com um promotor artificial que controla a expressão do transgene operacionalmente ligado, como o divulgado em Taylor et al. BMC Biotechnology 10 (2010): 15; receptores de esteroides geneticamente modificados, por exemplo, receptor de progesterona modificado com um truncamento de C-terminal que não pode se ligar à progesterona, mas se liga a RU486 (mifepristona) (Patente nº US 5.364.791); um receptor de ecdisona de *Drosophila* e seus ligantes de ecdisteroides (Saez, et al., PNAS, 97 (26) (2000), 14.512 a 14.517; ou uma chave controlada pelo antibiótico trimetoprima (TMP)), conforme descrito em Sando R 3ª; Nat Methods. 2013, 10(11): 1.085 a 1.088. Em algumas modalidades, a chave reguladora para controlar o transgene ou expressa pelo vetor de ceDNA é uma chave de ativação de pró-fármaco, como a divulgada nas Patentes nºs US 8.771.679 e 6.339.070.

(III) CHAVES REGULADORAS DE "SENHA DE ACESSO"

[00349] Em algumas modalidades, a chave reguladora pode ser uma "chave de senha de acesso" ou "circuito de senha de acesso". As chaves de senha de acesso permitem o ajuste fino do controle da expressão do transgene a partir do vetor de ceDNA produzido sinteticamente quando ocorrem condições específicas - isto é, uma combinação de condições precisa estar presente para a expressão e/ou repressão de transgene ocorrer. Por exemplo, para a expressão de um transgene ocorrer, pelo menos as condições A e B devem ocorrer. Uma chave reguladora de senha de acesso pode ser qualquer número de condições, por exemplo, pelo menos 2 ou pelo menos 3 ou pelo menos 4 ou pelo menos 5 ou pelo menos 6 ou pelo menos 7 ou mais condições presentes para a expressão de transgene ocorrer. Em algumas modalidades, pelo menos 2 condições (por exemplo, condições A, B) precisam ocorrer e em algumas modalidades, pelo menos 3 condições precisam ocorrer (por exemplo, A, B e C, ou A, B e D). Apenas a título de exemplo, para que ocorra a expressão gênica de um ceDNA

que tenha uma chave reguladora "ABC" de senha de acesso, as condições A, B e C devem estar presentes. As condições A, B e C podem ser as seguintes; a condição A é a presença de uma afecção ou doença, a condição B é uma resposta hormonal e a condição C é uma resposta à expressão de transgene. Por exemplo, se o transgene edita um gene de EPO defeituoso, a Condição A é a presença de Doença Renal Crônica (DRC), a Condição B ocorre se o sujeito tiver afecções hipóxicas nos rins, a Condição C é que o recrutamento de células produtoras de eritropoietina (CEP) no rim está comprometido; ou, alternativamente, a ativação de HIF-2 está prejudicada. Quando os níveis de oxigênio aumentam ou o nível desejado de EPO é alcançado, o transgene desliga novamente até que ocorram 3 condições, ligando-o novamente.

[00350] Em algumas modalidades, uma chave reguladora de senha de acesso ou "circuito de senha de acesso" abrangido para uso no vetor de ceDNA produzido sinteticamente compreende fatores de transcrição híbridos (TFs) para expandir o alcance e a complexidade de sinais ambientais usados para definir condições de biocontenção. Ao contrário de uma chave de morte que aciona a morte celular na presença de uma condição predeterminada, o "circuito de senha de acesso" permite a sobrevivência de células ou expressão de transgene na presença de uma "senha de acesso" específica e pode ser facilmente reprogramado para permitir a expressão de transgene e/ou sobrevivência celular somente quando a condição ou a senha de acesso predeterminada estiver presente.

[00351] Todas e quaisquer combinações de chaves reguladoras divulgadas no presente documento, por exemplo, chaves de moléculas pequenas, chaves baseadas em ácidos nucleicos, chaves híbridas de moléculas pequenas-ácidos nucleicos, chaves de regulação de transgene pós-transcricionais, regulação pós-traducional, chaves controla-

das por radiação, chaves mediadas por hipóxia e outras chaves reguladoras conhecidas por pessoas de habilidade comum na técnica, conforme divulgado no presente documento, podem ser usadas em uma chave reguladora de senha de acesso, conforme divulgado no presente documento. Chaves reguladoras abrangidas para uso também são discutidas no artigo de revisão Kis et al., J R Soc Interface. 12: 20141000 (2015) e resumidas na Tabela 1 de Kis. Em algumas modalidades, uma chave reguladora para uso em um sistema de senha de acesso pode ser selecionada a partir de qualquer uma dentre as chaves da Tabela 11 ou uma combinação das mesmas.

(IV) *Chaves reguladoras baseadas em ácidos nucleicos para controlar a expressão de transgene*

[00352] Em algumas modalidades, a chave reguladora para controlar o transgene expresso pelo vetor de ceDNA produzido sinteticamente é baseada em um mecanismo de controle baseado em ácido nucleico. Mecanismos de controle de ácido nucleico exemplificativos são conhecidos na técnica e estão previstos para uso. Por exemplo, tais mecanismos incluem chaves de ribossomos, como as divulgadas em, por exemplo, US2009/0305253, US2008/0269258, US2017/0204477, WO2018026762A1, Patente nº US 9.222.093 e pedido EP EP288071, e também divulgadas na revisão de Villa JK et al. Microbiol Spectr. maio de 2018; 6(3). Também estão incluídos os biossensores de transcrição responsivos ao metabolito, como os divulgados nos documentos WO2018/075486 e WO2017/147585. Outros mecanismos conhecidos na técnica previstos para uso incluem o silenciamento do transgene com uma molécula de siRNA ou RNAi (por exemplo, miR, shRNA). Por exemplo, o vetor de ceDNA pode compreender uma chave reguladora que codifica uma molécula de RNAi que é complementar ao transgene expresso pelo vetor de ceDNA. Quando esse RNAi é expresso mesmo que o transgene seja expresso pelo vetor de ceDNA,

o mesmo será silenciado pela molécula de RNAi complementar, e quando o RNAi não for expresso quando o transgene for expresso pelo vetor de ceDNA, o transgene não será silenciado pelo RNAi.

[00353] Em algumas modalidades, a chave reguladora é uma chave reguladora autoinativadora específica para tecido, por exemplo, conforme divulgado no documento US2002/0022018, em que a chave reguladora desativa deliberadamente a expressão de transgene em um sítio onde a expressão de transgene pode, de outra forma, ser desvantajosa. Em algumas modalidades, a chave reguladora é um sistema de expressão gênica reversível por recombinase, por exemplo, conforme divulgado no documento US2014/0127162 e Patente nº US 8.324.436.

(V) CHAVES REGULADORAS PÓS-TRANSCRICIONAIS E PÓS-TRADUCIONAIS.

[00354] Em algumas modalidades, a chave reguladora para controlar o transgene ou gene de interesse expresso pelo vetor de ceDNA produzido sinteticamente é um sistema de modificação pós-transcricional. Por exemplo, essa chave reguladora pode ser uma chave de ribossomos de aptazima sensível à tetraciclina ou teofilina, conforme divulgado nos documentos US2018/0119156, GB201107768, WO2001/064956A3, patente EP 2707487 e Beilstein et al., ACS Synth. Biol., 2015, 4 (5), pp 526 a 534; Zhong et al., Elife. 2 de novembro de 2016; 5. pii: e18858. Em algumas modalidades, prevê-se que uma pessoa de habilidade comum na técnica possa codificar o transgene e um siRNA inibitório que contém um aptâmero sensível a ligante (chave de DESATIVAÇÃO), em que o resultado líquido é uma chave de ATIVAÇÃO sensível a ligante.

(VI) OUTRAS CHAVES REGULADORAS EXEMPLIFICATIVAS

[00355] Qualquer chave reguladora conhecida pode ser usada no vetor de ceDNA produzido sinteticamente para controlar a expressão gênica do transgene expresso pelo vetor de ceDNA, incluindo aqueles

desencadeados por mudanças ambientais. Exemplos adicionais incluem, mas sem limitação; o método de BOC de Suzuki et al., Scientific Reports 8; 10.051 (2018); expansão do código genético e um aminoácido não fisiológico; chaves de ativação/desativação controladas por radiação ou controladas por ultrassom (consultar, por exemplo, Scott S *et al*., Gene Ther. julho de 2000; 7(13):1.121 a 1.125; patentes n.^{os} US 5.612.318; 5.571.797; 5.770.581; 5.817.636 e WO1999/025385A1. Em algumas modalidades, a chave reguladora é controlada por um sistema implantável, por exemplo, conforme divulgado na Patente nº US 7.840.263; US2007/0190028A1 em que a expressão gênica é controlada por uma ou mais formas de energia, incluindo energia eletromagnética, que ativa promotores operativamente ligados ao transgene no vetor de ceDNA.

[00356] Em algumas modalidades, uma chave reguladora prevista para uso no vetor de ceDNA produzido sinteticamente é uma chave mediada por hipóxia ou ativada por estresse, por exemplo, como as divulgadas nos documentos WO1999060142A2, Patentes US 5.834.306; 6.218.179; 6.709.858; US2015/0322410; Greco et al., (2004) Targeted Cancer Therapies 9, S368, bem como elementos FROG, TOAD e NRSE e elementos de silêncio condutivamente induzíveis, incluindo elementos de resposta de hipóxia (HREs), elementos de resposta inflamatória (IREs) e elementos ativados por estresse de cisalhamento (SSAEs), por exemplo, conforme divulgado na Patente US 9.394.526. Tal modalidade é útil para ativar a expressão do transgene a partir do vetor de ceDNA após isquemia ou em tecidos isquêmicos e/ou tumores.

(IV) <u>CHAVES DE EXTERMINAÇÃO</u>

[00357] Outras modalidades da invenção se referem a um vetor de ceDNA produzido sinteticamente que compreende uma chave de exterminação. Uma chave de exterminação, conforme divulgado no pre-

sente documento, permite que uma célula que compreende o vetor de ceDNA seja exterminada ou sofra morte celular programada como um meio para remover de modo permanente um vetor de ceDNA introduzido do sistema do sujeito. Será entendido por um indivíduo versado na técnica que o uso de chaves de exterminação nos vetores de ceDNA produzidos sinteticamente da invenção seria tipicamente acoplado ao alvejamento do vetor de ceDNA a um número limitado de células que o sujeito pode perder ou um tipo de célula em que a apoptose é desejável (por exemplo, células cancerígenas). Em todos os aspectos, uma "chave de exterminação", conforme divulgado no presente documento, é projetada para fornecer morte celular rápida e robusta da célula que compreende o vetor de ceDNA na ausência de um sinal de sobrevivência de entrada ou outra condição especificada. Em outras palavras, uma chave de exterminação codificada por um vetor de ceDNA no presente documento pode restringir a sobrevivência celular de uma célula que compreende um vetor de ceDNA a um ambiente definido por sinais de entrada específicos. Tais chaves de exterminação servem como uma função de biocontenção biológica, caso seja desejável remover o vetor de ceDNA produzido sinteticamente de um sujeito ou garantir que o mesmo não expresse o transgene codificado.

VI. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[00358] Em outro aspecto, são fornecidas composições farmacêuticas. A composição farmacêutica compreende um vetor de DNA de extremidade fechada, por exemplo, vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético conforme descrito no presente documento, e um carreador ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[00359] Um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser incorporado a composições farmacêuticas adequadas para administração a um sujeito para entre-

ga *in vivo* a células, tecidos ou órgãos do sujeito. Tipicamente, a composição farmacêutica compreende um vetor de ceDNA, conforme divulgado no presente documento, e um carreador farmaceuticamente aceitável. Por exemplo, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser incorporado a uma composição farmacêutica adequada para uma via desejada de administração terapêutica (por exemplo, administração parenteral). A transdução passiva de tecido por infusão intravenosa ou intra-arterial de alta pressão, bem como injeção intracelular, tal como microinjeção intranuclear ou injeção intracitoplasmática, também são contempladas. As composições farmacêuticas para fins terapêuticos podem ser formuladas como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossomas ou outra estrutura ordenada adequada para um alto vetor de DNA de extremidade fechada produzido sinteticamente, por exemplo, concentração de vetor de ceDNA. Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando-se o vetor de DNA de extremidade fechada produzido sinteticamente, por exemplo, composto de vetor de ceDNA à quantidade necessária em um tampão apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido de esterilização filtrada incluindo um vetor de ceDNA que pode ser formulado para entregar um transgene do ácido nucleico às células de um receptor, resultando na expressão terapêutica do transgene ou sequência doadora do mesmo. A composição também pode incluir um carreador farmaceuticamente aceitável.

[00360] As composições farmaceuticamente ativas que compreendem um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, podem ser formuladas para entregar um transgene para vários propósitos à célula, por exemplo, células de um

sujeito.

[00361] As composições farmacêuticas para fins terapêuticos normalmente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossomas ou outra estrutura ordenada adequada para um vetor de DNA de extremidade fechada com alta produção sintética, por exemplo, concentração de vetor de ceDNA. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando-se o vetor de DNA de extremidade fechada produzido sinteticamente, por exemplo, composto de vetor de ceDNA, na quantidade necessária em um tampão apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido de esterilização filtrada.

[00362] Um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento como aqui divulgado, pode ser incorporado a uma composição farmacêutica adequada para administração tópica, sistêmica, intra-amniótica, intratecal, intracraniana, intra-arterial, intravenosa, intralinfática, intraperitoneal, subcutânea, traqueal, intratecidual (por exemplo, intramuscular, intracardíaco, intra-hepático, intrarrenal, intracerebral), intratecal, intravesical, conjuntival (por exemplo, extraorbital, intraorbital, retro-orbital, intrarretiniana, sub-retiniana, coroidal, subcoroidal, intraestromal, intracameral e intravítrea), intracoclear e mucosal (por exemplo, oral, retal, nasal). A transdução passiva de tecido por infusão intravenosa ou intra-arterial de alta pressão, bem como injeção intracelular, tal como microinjeção intranuclear ou injeção intracitoplasmática, também são contempladas.

[00363] Em alguns aspectos, os métodos fornecidos no presente documento compreendem a entrega de um ou mais vetores de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com

o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, para uma célula hospedeira. Também são fornecidas no presente documento células produzidas por esses métodos e organismos (tais como animais, plantas ou fungos) que compreendem ou são produzidos a partir dessas células. Os métodos de administração de ácidos nucléicos podem incluir lipofecção, nucleofecção, microinjeção, biolística, lipossomas, imunolipossomas, policátion ou lipídeo: conjugados de ácidos nucleicos, DNA puro e captação de DNA intensificada por agente. A lipofecção é descrita em, por exemplo, Pat. 5.049.386, 4.946.787; e 4.897.355) e os reagentes de lipofecção são vendidos comercialmente (por exemplo, Transfectam™ e Lipofectin™). A entrega pode ser em células (por exemplo, administração *in vitro* ou *ex vivo*) ou tecidos-alvo (por exemplo, administração *in vivo*).

[00364] Várias técnicas e métodos são conhecidos na técnica para entregar ácidos nucleicos às células. Por exemplo, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser formulado em nanopartículas lipídicas (LNPs), lipidoides, lipossomas, nanopartículas lipídicas, lipoplexos ou nanopartículas de núcleo-invólucro. Normalmente, os LNPs são compostos de moléculas de ácido nucleico (por exemplo, ceDNA), um ou mais lipídios ionizáveis ou catiônicos (ou sais dos mesmos), um ou mais lipídios não iônicos ou neutros (por exemplo, um fosfolipídio), uma molécula que impede a agregação (por exemplo, PEG ou um conjugado de lipídio de PEG) e, opcionalmente, um esterol (por exemplo, colesterol).

[00365] Outro método para entregar um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, para uma célula, é conjugando-se o ácido nucleico com um ligante que é internalizado pela célula. Por exemplo, o ligante pode se ligar a um

receptor na superfície celular e internalizado através de endocitose. O ligante pode ser covalentemente ligado a um nucleotídeo no ácido nucleico. Conjugados exemplificativos para a entrega de ácidos nucleicos em uma célula são descritos, por exemplo, nos documentos WO2015/006740, WO2014/025805, WO2012/037254, WO2009/082606, WO2009/073809, WO2009/018332, WO2006/112872, WO2004/090108, WO2004/091515 e WO2017/177326.

[00366] Os ácidos nucleicos e o vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, também podem ser entregues a uma célula por transfecção. Métodos de transfecção úteis incluem, mas sem limitação, transfecção mediada por lipídios, transfecção catiônica mediada por polímero ou precipitação de fosfato de cálcio. Os reagentes de transfecção são bem-conhecidos na técnica e incluem, mas sem limitação, Reagente de Transfecção TurboFect (Thermo Fisher Scientific), Reagente Pro-Ject (Thermo Fisher Scientific), Reagente de Transfecção de Proteína TRANSPASS™ P (New England Biolabs), Reagente de Entrega de Proteína CHARIOT™ (Motivo Ativo), Reagente de Transfecção de Proteínas PROTEOJUICE™ (EMD Millipore), 293fectina, LIPOFECTAMINE™ 2000, LIPOFECTAMINE™ 3000 (Thermo Fisher Scientific), LIPOFECTAMINE™ (Thermo Fisher Scientific), LIPOFECTIN™ (Thermo Fisher Scientific), DMRI -C, CELLFECTIN™ (Thermo Fisher Scientific), OLIGOFECTAMINE™ (Thermo Fisher Scientific), LIPOFECTACE™, FUGENE™ (Roche, Basileia, Suíça), FUGENE™ HD (Roche), TRANSFECTAM™ (Transfectam, Promega, Madison, Wis.), TFX-10™ (Promega), TFX-20™ (Promega), TFX-50™ (Promega), TRANSFECTIN™ (BioRad, Hercules, Califórnia), SILENTFECT™ (Bio-Rad), Effectene™ (Qiagen, Valencia, Califórnia), DC-chol (Lipídios Polares Avanti), GENEPOR-

TER™ (Gene Therapy Systems, San Diego, Califórnia), DHARMAFECT 1™ (Dharmacon, Lafayette, Colorado), DHARMAFECT 2™ (Dharmacon), DHARMAFECT 3™ (Dharmacon), DHARMAFECT 4™ (Dharmacon), ESCORT™ III (Sigma, St. Louis, Mo.) e ESCORT™ IV (Sigma Chemical Co.). Os ácidos nucléicos, tal como ceDNA, também podem ser entregues a uma célula através de métodos microfluídicos conhecidos pelos versados na técnica.

[00367] Um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, também pode ser administrado diretamente a um organismo para a transdução de células *in vivo*. A administração é realizada por qualquer uma das vias normalmente usadas para introduzir uma molécula no contato final com células sanguíneas ou teciduais, incluindo, mas sem limitação, injeção, infusão, aplicação tópica e eletroporação. Os métodos adequados para administrar esses ácidos nucleicos estão disponíveis e são bem-conhecidos pelos especialistas na técnica e, embora mais de uma via possa ser usada para administrar uma composição específica, uma via específica pode frequentemente fornecer uma reação mais imediata e mais eficaz do que outra via.

[00368] Os métodos para introdução de um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, podem ser entregues em células-tronco hematopoiéticas, por exemplo, pelos métodos descritos, por exemplo, na Patente nº US 5.928.638.

[00369] Um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser adicionado aos lipossomas para entrega a uma célula ou órgão-alvo em um sujeito. Lipossomas são vesículas que possuem pelo menos uma bicamada lipídica. Os

lipossomas são tipicamente usados como carreadores para entrega de fármacos/produtos terapêuticos no contexto de desenvolvimento farmacêutico. Os mesmos trabalham fundindo-se com uma membrana celular e reposicionando-se sua estrutura lipídica para entregar um fármaco ou ingrediente farmacêutico ativo (API). As composições de lipossomas para essa distribuição são compostas por fosfolipídios, especialmente compostos que têm um grupo fosfatidilcolina, no entanto, essas composições também podem incluir outros lipídios. Exemplos de lipossomas e formulações de lipossomas são divulgados no Pedido Internacional PCT/US2018/050042, depositado em 7 de setembro de 2018, e no Pedido Internacional PCT/US2018/064242, depositado em 6 de dezembro de 2018, por exemplo, consultar a seção intitulada "Pharmaceutical Formulations".

[00370] Vários métodos de entrega conhecidos na técnica ou modificações dos mesmos podem ser utilizados para entregar um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento *in vitro* ou *in vivo.* Por exemplo, em algumas modalidades, os vetores de ceDNA são entregues através da penetração transitória na membrana celular por energia mecânica, elétrica, ultrassônica, hidrodinâmica ou baseada em laser, para facilitar a entrada de DNA nas células-alvo. Por exemplo, um vetor de ceDNA pode ser entregue interrompendo-se transitoriamente a membrana celular pressionando-se a célula através de um canal de tamanho restrito ou por outros meios conhecidos na técnica. Em alguns casos, um vetor de ceDNA isoladamente é injetado diretamente como DNA puro na pele, timo, músculo cardíaco, músculo esquelético ou células hepáticas. Em alguns casos, um vetor de ceDNA é entregue por pistola de genes. Partículas esféricas de ouro ou tungstênio (com 1 a 3 μm de diâmetro) revestidas com vetores de AAV livres de capsídeo podem ser aceleradas em alta

velocidade por gás pressurizado para penetrar nas células-alvo do tecido.

[00371] As composições que compreendem um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, e um veículo farmaceuticamente aceitável, são especificamente contemplados no presente documento. Em algumas modalidades, o vetor de ceDNA é formulado com um sistema de entrega de lipídios, por exemplo, lipossomos, conforme descrito no presente documento. Em algumas modalidades, essas composições são administradas por qualquer via desejada por um especialista versado. As composições podem ser administradas a um sujeito por diferentes vias, incluindo via oral, parenteral, sublingual, transdérmica, retal, transmucosal, tópica, através de inalação, através de administração bucal, intrapleural, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, intranasal, intratecal, e intra-articular ou combinações dos mesmos. Para uso veterinário, a composição pode ser administrada como uma formulação adequadamente aceitável de acordo com a prática veterinária normal. O veterinário pode determinar rapidamente o regime de dosagem e a via de administração mais apropriada para um animal em particular. As composições podem ser administradas por seringas tradicionais, dispositivos de injeção sem agulha, "pistolas de genes de bombardeio de microprojéteis" ou outros métodos físicos, tais como eletroporação ("EP"), métodos hidrodinâmicos ou ultrassom.

[00372] Em alguns casos, um vetor de DNA fechado, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético descrito no presente documento, é entregue por injeção hidrodinâmica, que é um método simples e altamente eficiente para a entrega intracelular direta de quaisquer compostos e partículas solúveis em água a órgãos internos e músculo esquelético em um membro inteiro.

[00373] Em alguns casos, um vetor de DNA fechado, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético descrito no presente documento, é entregue por ultrassom, produzindo-se poros nanoscópicos na membrana para facilitar a entrega intracelular de partículas de DNA nas células de órgãos ou tumores internos, de modo que o tamanho e a concentração do vetor de DNA fechado tenham um grande papel na eficiência do sistema. Em alguns casos, vetores de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzidos com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, são entregues por magnetofecção com o uso de campos magnéticos para concentrar partículas que contêm ácido nucleico nas células-alvo.

[00374] Em alguns casos, os sistemas de entrega química podem ser usados, por exemplo, com o uso de complexos nanoméricos, que incluem a compactação de ácido nucleico carregado negativamente por partículas nanoméricas policatiônicas, pertencentes a lipossomos catiônicos/micelas ou polímeros catiônicos. Os lipídios catiônicos usados para o método de entrega incluem, mas sem limitação, lipídios catiônicos monovalentes, lipídios catiônicos polivalentes, compostos que contêm guanidina, compostos derivados de colesterol, polímeros catiônicos (por exemplo, poli(etilenimina), poli-L-lisina, protamina, outros polímeros catiônicos) e híbrido lipídio-polímero.

A. EXOSSOMOS:

[00375] Em algumas modalidades, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, é entregue por ser empacotado em um exossomo. Os exossomos são pequenas vesículas de membrana de origem endocítica que são liberadas no ambiente extracelular após a fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática. Sua superfície consiste em uma bica-

mada lipídica da membrana celular da célula doadora, os mesmos contêm citosol da célula que produziu o exossomo e exibem proteínas de membrana da célula parental na superfície. Os exossomos são produzidos por vários tipos de células, incluindo células epiteliais, linfócitos B e T, mastócitos (MC) e células dendríticas (DC). Algumas modalidades, exossomos com diâmetro entre 10 nm e 1 μm, entre 20 nm e 500 nm, entre 30 nm e 250 nm, entre 50 nm e 100 nm, estão previstas para uso. Os exossomos podem ser isolados para entrega às células-alvo com o uso de suas células doadoras ou introduzindo-se ácidos nucleicos específicos nas mesmas. Várias abordagens conhecidas na técnica podem ser usadas para produzir exossomos que contêm vetores de AAV livres de capsídeo da presente invenção.

B. MICROPARTÍCULAS/NANOPARTÍCULAS:

[00376] Em algumas modalidades, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, é entregue por uma nanopartícula lipídica. De modo geral, nanopartículas lipídicas compreendem um aminolipídio ionizável (por exemplo, 4-(dimetilamino)butanoato de heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ila, DLin-MC3-DMA, uma fosfatidilcolina (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, DSPC), colesterol e um lipídio de revestimento (polietileno glicol-dimiristolglicerol, PEG-DMG), por exemplo, conforme divulgado por Tam *et al.* (2013). *Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA delivery*. Pharmaceuticals 5(3): 498 a 507.

[00377] Em algumas modalidades, uma nanopartícula lipídica tem um diâmetro médio entre cerca de 10 e cerca de 1.000 nm. Em algumas modalidades, uma nanopartícula lipídica tem um diâmetro inferior a 300 nm. Em algumas modalidades, uma nanopartícula lipídica tem um diâmetro entre cerca de 10 e cerca de 300 nm. Em algumas modalidades, uma nanopartícula lipídica tem um diâmetro inferior a 200 nm.

Em algumas modalidades, uma nanopartícula lipídica tem um diâmetro entre cerca de 25 e cerca de 200 nm. Em algumas modalidades, uma preparação de nanopartículas lipídicas (por exemplo, composição que compreende uma pluralidade de nanopartículas lipídicas) tem uma distribuição de tamanho na qual o tamanho médio (por exemplo, diâmetro) é de cerca de 70 nm a cerca de 200 nm e, mais tipicamente, o tamanho médio é de cerca de 100 nm ou menos.

[00378] Várias nanopartículas lipídicas conhecidas na técnica podem ser usadas para fornecer um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento. Por exemplo, vários métodos de administração com o uso de nanopartículas lipídicas são descritos nas Patentes nºs US 9.404.127, 9.006.417 e 9.518.272.

[00379] Em algumas modalidades, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético conforme descrito, é entregue por uma nanopartícula de ouro. Geralmente, um ácido nucleico pode ser covalentemente ligado a uma nanopartícula de ouro ou não covalentemente a uma nanopartícula de ouro (por exemplo, ligado por uma interação carga-carga), por exemplo, conforme descrito por Ding *et al.* (2014). *Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery*. Mol. Ther. 22(6); 1.075 a 1.083. Em algumas modalidades, os conjugados de nanopartículas de ouro-ácido nucleico são produzidos com o uso de métodos descritos, por exemplo, na Patente nº US 6.812.334.

C. CONJUGADOS

[00380] Em algumas modalidades, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento como aqui divulgado, é conjugado (por exemplo, ligado covalentemente) a um agente que aumenta a captação celular. Um "agente que aumenta

a captação celular" é uma molécula que facilita o transporte de um ácido nucleico através de uma membrana lipídica. Por exemplo, um ácido nucleico pode ser conjugado a um composto lipofílico (por exemplo, colesterol, tocoferol, *etc.*), um peptídeo de penetração celular (CPP) (por exemplo, penetratina, TAT, Syn1B, *etc.*) e poliaminas (por exemplo, espermina). Outros exemplos de agentes que aumentam a captação celular são divulgados, por exemplo, em Winkler (2013). *Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications*. Ther. Deliv. 4(7); 791 a 809.

[00381] Em algumas modalidades, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento como aqui divulgado, é conjugado com um polímero (por exemplo, uma molécula polimérica) ou uma molécula de folato (por exemplo, molécula de ácido fólico). Geralmente, a entrega de ácidos nucleicos conjugados com polímeros é conhecida na técnica, por exemplo, conforme descrito nos documentos WO2000/34343 e WO2008/022309. Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA como divulgado no presente documento é conjugado com um polímero de poli(amida), por exemplo, como descrito pela Patente nº US 8.987.377. Em algumas modalidades, um ácido nucleico descrito pela descrição é conjugado com uma molécula de ácido fólico como descrito na Patente nº US 8.507.455.

[00382] Em algumas modalidades, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético conforme descrito no presente documento como aqui divulgado, é conjugado com um carboidrato, por exemplo, conforme descrito na Patente nº US 8.450.467.

D. NANOCÁPSULA

[00383] Alternativamente, podem ser utilizadas formulações de na-

nocápsulas de um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, como aqui divulgado. As nanocápsulas geralmente podem aprisionar substâncias de maneira estável e reproduzível. Para evitar efeitos colaterais devido à sobrecarga polimérica intracelular, essas partículas ultrafinas (dimensionadas em torno de 0,1 μm) devem ser projetadas com o uso de polímeros capazes de serem degradados *in vivo*. Nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradáveis que atendem a essas exigências são contempladas para uso.

E. LIPOSSOMAS

[00384] Um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser adicionado aos lipossomas para entrega a uma célula ou órgão-alvo em um sujeito. Lipossomas são vesículas que possuem pelo menos uma bicamada lipídica. Os lipossomas são tipicamente usados como carreadores para entrega de fármacos/produtos terapêuticos no contexto de desenvolvimento farmacêutico. Os mesmos trabalham fundindo-se com uma membrana celular e reposicionando-se sua estrutura lipídica para entregar um fármaco ou ingrediente farmacêutico ativo (API). As composições de lipossomas para essa distribuição são compostas por fosfolipídios, especialmente compostos que têm um grupo fosfatidilcolina, no entanto, essas composições também podem incluir outros lipídios.

[00385] A formação e a utilização de lipossomas é geralmente conhecida pelos versados na técnica. Os lipossomas foram desenvolvidos com melhor estabilidade sérica e meios-tempos de circulação (Patente nº US 5.741.516). Além disso, vários métodos de lipossoma e preparações semelhantes à lipossomas como carreadores de fármacos potenciais foram descritos (Pat nºs U.S. 5.567.434; 5.552.157;

5.565.213; 5.738.868 e 5.795.587).

F. COMPOSIÇÕES DE LIPOSSOMAS E NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (LNP) EXEMPLIFICATIVAS

[00386] Um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser adicionado aos lipossomas para entrega a uma célula, por exemplo, uma célula que precisa de expressão do transgene. Lipossomas são vesículas que possuem pelo menos uma bicamada lipídica. Os lipossomas são tipicamente usados como carreadores para entrega de fármacos/produtos terapêuticos no contexto de desenvolvimento farmacêutico. Os mesmos trabalham fundindo-se com uma membrana celular e reposicionando-se sua estrutura lipídica para entregar um fármaco ou ingrediente farmacêutico ativo (API). As composições de lipossomas para essa distribuição são compostas por fosfolipídios, especialmente compostos que têm um grupo fosfatidilcolina, no entanto, essas composições também podem incluir outros lipídios.

[00387] Nanopartículas lipídicas (LNPs) que compreendem ceDNA são divulgadas no Pedido Internacional PCT/US2018/050042, depositado em 7 de setembro de 2018, e no Pedido Internacional PCT/US2018/064242, depositado em 6 de dezembro de 2018, que são cada um incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade e previstos para uso nos métodos e composições divulgados no presente documento.

[00388] Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que inclui um ou mais compostos com um grupo funcional de polietilenoglicol (PEG) (os denominados "compostos PEGuilados") que podem reduzir a imunogenicidade/antigenicidade de, fornecer hidrofilicidade e hidrofobicidade ao composto (ou compostos) e reduzir a frequência de dosagem. Ou a formulação de lipossoma sim-

plesmente inclui polímero de polietilenoglicol (PEG) como um componente adicional. Em tais aspectos, o peso molecular do grupo funcional de PEG ou PEG pode ser de 62 Da a cerca de 5.000 Da.

[00389] Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que fornecerá um API com perfil de liberação prolongada ou liberação controlada durante um período de horas a semanas. Em alguns aspectos relacionados, a formulação de lipossoma pode compreender câmaras aquosas que são ligadas por bicamadas lipídicas. Em outros aspectos relacionados, a formulação de lipossoma encapsula um API com componentes que passam por uma transição física à temperatura elevada que libera o API durante um período de horas a semanas.

[00390] Em alguns aspectos, a formulação de lipossoma compreende esfingomielina e um ou mais lipídios divulgados no presente documento. Em alguns aspectos, a formulação de lipossoma compreende optissomas.

[00391] Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que inclui um ou mais lipídios selecionados a partir de: sal de sódio de N-(carbonil-metoxipolietilenoglicol 2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (diestearoil-sn-glicerofosfoetanolamina), lipídio conjugado com MPEG (metóxi polietilenoglicol), HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada); PEG (polietilenoglicol); DSPE (diestearoil-sn-glicerofosfoetanolamina); DSPC (diestearoilfosfatidilcolina); DOPC (dioleoilfosfatidilcolina); DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol); EPC (fosfatidilcolina de ovo); DOPS (dioleoilfosfatidilserina); POPC (palmitoiloleoilfosfatidilcolina); SM (esfingomielina); MPEG (metóxi polietileno glicol); DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina); DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol); DSPG (distearoilfosfatidilglicerol); DEPC (dierucoilfosfatidilcolina); DOPE (dioleol-sn-glicerofosfoetanolamina), sulfato de colesterila (CS), dipalmitoilfosfati-

dilglicerol (DPPG), DOPC (dioleoli-sn-glicerofosfatidilcolina) ou qualquer combinação dos mesmos.

[00392] Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que compreende fosfolipídio, colesterol e um lipídio PEG-uilado em uma razão molar de 56:38:5. Em alguns aspectos, o conteúdo lipídico geral da formulação de lipossoma é de 2 a 16 mg/ml. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que compreende um lipídio que contém um grupo funcional de fosfatidilcolina, um lipídio que contém um grupo funcional de etanolamina e um lipídio PEG-uilado. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que compreende um lipídio que contém um grupo funcional de fosfatidilcolina, um lipídio que contém um grupo funcional de etanolamina e um lipídio PEG-uilado em uma razão molar de 3:0,015:2, respectivamente. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que compreende um lipídio que contém um grupo funcional de fosfatidilcolina, colesterol e um lipídeo PEG-uilado. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que compreende um lipídio que contém um grupo funcional de fosfatidilcolina e colesterol. Em alguns aspectos, o lipídio PEG-uilado é PEG-2000-DSPE. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que compreende DPPG, PC de soja, conjugado lipídico de MPEG-DSPE e colesterol.

[00393] Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que compreende um ou mais lipídios que contêm um grupo funcional de fosfatidilcolina e um ou mais lipídios que contêm um grupo funcional de etanolamina. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que compreende um ou mais: lipídios que contêm um grupo funcional de fosfatidilcolina, lipídios que contêm um grupo funcional de etanolamina e esteróis, por exemplo, colesterol. Em alguns aspectos, a formulação de lipossoma compre-

ende DOPC/DEPC; e DOPE.

[00394] Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que compreende ainda um ou mais excipientes farmacêuticos, por exemplo, sacarose e/ou glicina.

[00395] Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que é de estrutura unilamelar ou multilamelar. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que compreende partículas multivesiculares e/ou partículas à base de espuma. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que é maior quanto ao tamanho relativo às nanopartículas comuns e tem um tamanho de cerca de 150 a 250 nm. Em alguns aspectos, a formulação de lipossoma é um pó liofilizado.

[00396] Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que é produzida e carregada com vetores de ceDNA divulgados ou descritos no presente documento, adicionando-se uma base fraca a uma mistura com o ceDNA isolado fora do lipossoma. Essa adição aumenta o pH fora dos lipossomas para aproximadamente 7,3 e conduz o API ao lipossoma. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma que tem um pH ácido no interior do lipossoma. Nesses casos, o interior do lipossoma pode estar em pH 4 a 6,9 e, com mais preferência, em pH 6,5. Em outros aspectos, a descrição fornece uma formulação de lipossoma produzida com o uso da tecnologia de estabilização de fármacos intralipossômica. Nesses casos, são utilizados ânions poliméricos ou não poliméricos de alta carga e agentes de captura intralipossômicos, por exemplo, polifosfato ou octassulfato de sacarose.

[00397] Em alguns aspectos, a descrição fornece uma nanopartícula lipídica que compreende um vetor de DNA, incluindo um vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético conforme descrito no presente documento e um lipídio ionizável. Por exemplo, uma for-

mulação de nanopartículas lipídicas que é produzida e carregada com ceDNA obtido pelo processo, conforme divulgado no Pedido Internacional PCT/US2018/050042, depositado em 7 de setembro de 2018, que é incorporado ao presente documento. Isso pode ser realizado através da mistura de alta energia de lipídios etanólicos com ceDNA aquoso a pH baixo, que protona o lipídio ionizável e fornece energia favorável para a associação de ceDNA/lipídio e nucleação de partículas. As partículas podem ser ainda mais estabilizadas através de diluição aquosa e remoção do solvente orgânico. As partículas podem ser concentradas no nível desejado.

[00398] Geralmente, as partículas lipídicas são preparadas na proporção total de lipídios/ceDNA (massa ou peso) de cerca de 10:1 a 30:1. Em algumas modalidades, a razão de lipídio/ceDNA (razão de massa/massa; razão de p/p) pode estar na faixa de cerca de 1:1 a cerca de 25:1, de cerca de 10:1 a cerca de 14:1, de cerca de 3:1 a cerca de 15:1, de cerca de 4:1 a cerca de 10:1, de cerca de 5:1 a cerca de 9:1 ou cerca de 6:1 a cerca de 9:1. As quantidades de lipídios e ceDNA podem ser ajustadas para fornecer uma razão de N/P desejada, por exemplo, razão de N/P de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou superior. Geralmente, o teor de lipídios geral da formulação de partículas de lipídios pode variar de cerca de 5 mg/ml a cerca de 30 mg/ml.

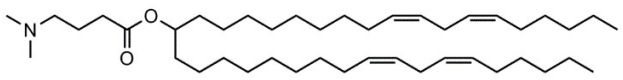
[00399] O lipídio ionizável é tipicamente empregado para condensar a carga de ácido nucleico, por exemplo, ceDNA, a pH baixo e conduzir a associação e fusogenicidade de membrana. Geralmente, lipídios ionizáveis são lipídios que compreendem pelo menos um grupo amino que é carregado positivamente ou se torna protonado sob condições ácidas, por exemplo, a pH de 6,5 ou menos. Os lipídios ionizáveis também são denominados no presente documento como lipídios catiônicos.

[00400] Os lipídios ionizáveis exemplificativos são descritos nas pu-

blicações de patente PCT Internacionais WO2015/095340, WO2015/199952, WO2018/011633, WO2017/049245, WO2015/061467, WO2012/040184, WO2012/000104, WO2015/074085, WO2016/081029, WO2017/004143, WO2017/075531, WO2017/117528, WO2011/022460, WO2013/148541, WO2013/116126, WO2011/153120, WO2012/044638, WO2012/054365, WO2011/090965, WO2013/016058, WO2012/162210, WO2008/042973, WO2010/129709, WO2010/144740, WO2012/099755, WO2013/049328, WO2013/086322, WO2013/086373, WO2011/071860, WO2009/132131, WO2010/048536, WO2010/088537, WO2010/054401, WO2010/054406, WO2010/054405, WO2010/054384, WO2012/016184, WO2009/086558, WO2010/042877, WO2011/000106, WO2011/000107, WO2005/120152, WO2011/141705, WO2013/126803, WO2006/007712, WO2011/038160, WO2005/121348, WO2011/066651, WO2009/127060, WO2011/141704, WO2006/069782, WO2012/031043, WO2013/006825, WO2013/033563, WO2013/089151, publicações de patente WO2017/099823, WO2015/095346 e WO2013/086354 e Patente US2016/0311759, US2015/0376115, US2016/0151284, US2017/0210697, US2015/0140070, US2013/0178541, US2013/0303587, US2015/0141678, US2015/0239926, US2016/0376224, US2017/0119904, US2012/0149894, US2015/0057373, US2013/0090372, US2013/0274523, US2013/0274504, US2013/0274504, US2009/0023673, US2012/0128760, US2010/0324120, US2014/0200257, US2015/0203446, US2018/0005363, US2014/0308304, US2013/0338210, US2012/0101148, US2012/0027796, US2012/0058144, US2013/0323269, US2011/0117125,

US2011/0256175, US2012/0202871, US2011/0076335, US2006/0083780, US2013/0123338, US2015/0064242, US2006/0051405, US2013/0065939, US2006/0008910, US2003/0022649, US2010/0130588, US2013/0116307, US2010/0062967, US2013/0202684, US2014/0141070, US2014/0255472, US2014/0039032, US2018/0028664, US2016/0317458 e US2013/0195920, cujos conteúdos são incorporados ao presente documento a título de referência em suas totalidades.

[00401] Em algumas modalidades, o lipídio ionizável é MC3 (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il-4-(dimetilamino)butanoato (DLin-MC3-DMA ou MC3) com a seguinte estrutura:



DLin-M-C3-DMA ("MC3")

[00402] O lipídio DLin-MC3-DMA é descrito em Jayaraman *et al.* Angew. Chem. Int. Ed Engl. (2012), 51 (34): 8.529 a 8.533, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00403] Em algumas modalidades, o lipídio ionizável é o lipídio ATX-002, conforme descrito no documento WO2015/074085, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00404] Em algumas modalidades, o lipídio ionizável é *(*13*Z*,16*Z*)-*N,N*-dimetil-*3*-nonildocosa-13,16-dien-1-amina (Composto 32), tal como descrito no documento WO2012/040184, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00405] Em algumas modalidades, o lipídio ionizável é o Composto 6 ou o Composto 22, conforme descrito no documento

WO2015/199952, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00406] Sem limitações, o lipídio ionizável pode compreender de 20 a 90% (mol) do lipídio total presente na nanopartícula lipídica. Por exemplo, o teor molar lipídico ionizável pode ser de 20 a 70% (mol), 30 a 60% (mol) ou 40 a 50% (mol) do lipídio total presente na nanopartícula lipídica. Em algumas modalidades, o lipídio ionizável compreende de cerca de 50% em mol a cerca de 90% em mol do lipídio total presente na nanopartícula lipídica.

[00407] Em alguns aspectos, a nanopartícula lipídica pode compreender ainda um lipídio não catiônico. Os lipídios não iônicos incluem lipídios anfipáticos, lipídios neutros e lipídios aniônicos. Por conseguinte, o lipídio não catiônico pode ser um "lipídio neutro não carregado, zwitteriônico ou aniônico". Lipídios não catiônicos são tipicamente empregados para aumentar a fusogenicidade.

[00408] Lipídios não catiônicos exemplificativos previstos para uso nos métodos e composições que compreendem um vetor de DNA, incluindo um vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, são descritos no Pedido Internacional PCT/US2018/050042, depositado em 7 de setembro de 2018, e PCT/US2018/064242, depositado em 6 de dezembro de 2018, que é incorporado ao presente documento em sua totalidade.

[00409] Os lipídios não catiônicos exemplificativos são descritos na Publicação de pedido internacional WO2017/099823 e na publicação de patente US US2018/0028664, cujo conteúdo de ambas é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00410] O lipídio não catiônico pode compreender de 0 a 30% (em mol) do lipídio total presente na nanopartícula lipídica. Por exemplo, o teor lipídico não catiônico é de 5 a 20% (em mol) ou de 10 a 15% (em mol) do lipídio total presente na nanopartícula lipídica. Em várias mo-

dalidades, a razão molar de lipídio ionizável para lipídio neutro varia de cerca de 2:1 a cerca de 8:1.

[00411] Em algumas modalidades, as nanopartículas lipídicas não compreendem fosfolipídios. Em alguns aspectos, a nanopartícula lipídica adicional pode compreender um componente, tal como um esterol, para fornecer integridade de membrana.

[00412] Um esterol exemplificativo que pode ser usado na nanopartícula lipídica é o colesterol e derivados do mesmo. Exemplos de derivados de colesterol são descritos no pedido internacional WO2009/127060 e na publicação de patente US US2010/0130588, cujo conteúdo de ambas é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00413] O componente que fornece integridade da membrana, tal como um esterol, pode compreender de 0 a 50% (em mol) do lipídio total presente na nanopartícula lipídica. Em algumas modalidades, esse componente é 20 a 50% (em mol) ou 30 a 40% (em mol) do teor lipídico total da nanopartícula lipídica.

[00414] Em alguns aspectos, a nanopartícula lipídica pode compreender ainda um polietilenoglicol (PEG) ou uma molécula lipídica conjugada. Geralmente, esses são usados para inibir a agregação de nanopartículas lipídicas e/ou fornecer estabilização estérica. Lipídios conjugados exemplificativos incluem, mas sem limitação, conjugados de PEG-lipídio, conjugados de polioxazolina (POZ)-lipídio, conjugados de poliamida-lipídio (tais como conjugados de ATTA-lipídio), conjugados de lipídio catiônico-polímero (CPL), e misturas dos mesmos. Em algumas modalidades, a molécula lipídica conjugada é um conjugado de PEG-lipídio, por exemplo, um lipídio conjugado com (metóxi polietilenoglicol). Exemplos de conjugados de PEG-lipídio incluem, mas sem limitação, PEG-diacilglicerol (DAG) (tal como 1-(monometóxi-polietilenoglicol)-2,3-dimiristoilglicerol (PEG-DMG)), PEG-

dialquiloxipropila (DAA), PEG-fosfolipídico, PEG-ceramida (Cer), uma fosfatidiletanoloamina PEGuilada (PEG-PE), succinato diacilglicerol de PEG (PEGS-DAG) (tal como 4-O-(2',3'-di(tetradecanoilóxi)propil-1-O-(w-metóxi(polietóxi)etil)butanodioato (PEG-S-DMG)), PEG dialcoxipropilcarbame, sal de N-(carbonil-metoxipolietilenoglicol 2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina sódico, ou uma mistura dos mesmos. Exemplos adicionais de conjugados de PEG-lipídio são descritos, por exemplo, nos documentos US5.885.613, US6.287.591, US2003/0077829, US2003/0077829, US2005/0175682, US2008/0020058, US2011/0117125, US2010/0130588, US2016/0376224 e US2017/0119904, cujos conteúdos são incorporados ao presente documento a título de referência em suas totalidades.

[00415] Em algumas modalidades, um lipídio-PEG é um composto divulgado no documento US2018/0028664, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00416] Em algumas modalidades, um PEG-lipídio é divulgado no documento US20150376115 ou no documento US2016/0376224, cujos conteúdos são incorporados ao presente documento a título de referência em suas totalidades.

[00417] O conjugado de PEG-DAA pode ser, por exemplo, PEG-dilauriloxipropila, PEG-dimiristiloxipropila, PEG-dipalmitiloxipropila ou PEG-diestеariloxipropila. O PEG-lipídio pode ser um ou mais dentre PEG-DMG, PEG-dilaurilglicerol, PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-diesterilglicerol, PEG-dilaurilglicamida, PEG-dimiristilglicamida, PEG-dipalmitoilglicamida, PEG-diesterilglicamida, PEG-colesterol (1-[8'-(Colest-5-en-3[beta]-óxi)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil] carbamoil-[ômega]-metil-poli(etileno glicol), PEG-DMB (3,4-Ditetradecoxilbenzil-[ômega]-metil-poli(etileno glicol)éter) e 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metóxi(polietileno glicol)-2000]. Em alguns exemplos, o lipídio de PEG pode ser selecionado a partir do grupo que con-

siste em PEG-DMG, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metóxi (polietilenoglicol)-2000].

[00418] Os lipídios conjugados com uma molécula diferente de um PEG também podem ser usados no lugar do lipídio de PEG. Por exemplo, conjugados de polioxazolina (POZ)-lipídio, conjugados de poliamida-lipídio (tais como conjugados de ATTA-lipídios) e conjugados de polímero-lipídio catiônicos (CPL) podem ser usados no lugar ou em adição ao PEG-lipídio. Lipídios conjugados exemplificativos, isto é, PEG-lipídios, conjugados de (POZ)-lipídios, conjugados de ATTA-lipídios e polímeros-lipídios catiônicos são descritos nas publicações de pedido de patente internacionais WO 1996/010392, WO1998/051278, W02002/087541, W02005/026372, WO2008/147438, W02009/086558, WO2012/000104, WO2017/117528, WO2017/099823, WO2015/199952, W02017/004143, WO2015/095346, W02012/000104, W02012/000104 e WO2010/006282, publicações de pedido de patente US US2003/0077829, US2005/0175682, US2008/0020058, US2011/0117125, US2013/0303587, US2018/0028664, US2015/0376115, US2016/0376224, US2016/0317458, US2013/0303587, US2013/0303587 e US20110123453 e patentes US US5.885.613, US6.287.591, US6.320.017 e US6.586.559, cujos conteúdos integrais são incorporados ao presente documento a título de referência em suas totalidades.

[00419] Em algumas modalidades, o um ou mais compostos adicionais podem ser um agente terapêutico. O agente terapêutico pode ser selecionado a partir de qualquer classe adequada para o objetivo terapêutico. Em outras palavras, o agente terapêutico pode ser selecionado a partir de qualquer classe adequada ao objetivo terapêutico. Em outras palavras, o agente terapêutico pode ser selecionado de acordo com o objetivo de tratamento e a ação biológica desejada. Por exem-

plo, se o ceDNA no LNP for útil para o tratamento de câncer, o composto adicional pode ser um agente anticâncer (por exemplo, um agente quimioterapêutico, uma terapia de câncer direcionada (incluindo, mas sem limitação, uma molécula pequena, um anticorpo ou um conjugado de anticorpo-fármaco)). Em outro exemplo, se o LNP que contém o ceDNA for útil no tratamento de uma infecção, o composto adicional poderá ser um agente antimicrobiano (por exemplo, um composto antibiótico ou antiviral). Em ainda outro exemplo, se o LNP que contém o ceDNA for útil no tratamento de uma doença ou distúrbio imunológico, o composto adicional poderá ser um composto que modula uma resposta imune (por exemplo, um imunossupressor, composto imunoestimulador ou composto que modula uma ou mais vias imunes específicas). Em algumas modalidades, diferentes coquetéis de diferentes nanopartículas lipídicas que contêm diferentes compostos, tal como um ceDNA que codifica uma proteína diferente ou um composto diferente, tal como um agente terapêutico, podem ser utilizados nas composições e métodos da invenção.

[00420] Em algumas modalidades, o composto adicional é um agente modulador imunológico. Por exemplo, o composto adicional é um imunossupressor. Em algumas modalidades, o composto adicional é um agente estimulador imune.

[00421] Também é fornecida uma composição farmacêutica que compreende o vetor de ceDNA sintético produzido por nanopartículas lipídicas e um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

[00422] Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de nanopartículas lipídicas que compreende ainda um ou mais excipientes farmacêuticos. Em algumas modalidades, a formulação de nanopartículas lipídicas compreende ainda sacarose, tris, trealose e/ou glicina.

[00423] Um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um

vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser complexado com a porção de lipídio da partícula ou encapsulado na porção de lipídio da nanopartícula lipídica. Em algumas modalidades, um vetor de DNA, incluindo um vetor de ceDNA produzido com o uso do processo de síntese, tal como descrito no presente documento, pode ser totalmente encapsulado na posição lipídica das nanopartículas lipídicas, desse modo protegendo-o da degradação por uma nuclease, por exemplo, em uma solução aquosa. Em algumas modalidades, um vetor de DNA, incluindo um vetor de ceDNA produzido com o uso do processo de síntese, tal como descrito no presente documento, na nanopartícula lipídica, não é substancialmente degradado após a exposição das nanopartículas lipídicas a uma nuclease, a 37 °C por pelo menos 20, 30, 45 ou 60 minutos. Em algumas modalidades, o ceDNA na nanopartícula lipídica não é substancialmente degradado após a incubação da partícula no soro a 37 °C por pelo menos cerca de 30, 45 ou 60 minutos ou pelo menos cerca de 2, 3, 4, 5, 6 , 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 ou 36 horas.

[00424] Em determinadas modalidades, as nanopartículas lipídicas são substancialmente não tóxicas para um sujeito, por exemplo, para um mamífero, tal como um ser humano. Em alguns aspectos, a formulação de nanopartículas lipídicas é um pó liofilizado.

[00425] Em algumas modalidades, nanopartículas lipídicas são partículas de núcleo sólidas que possuem pelo menos uma bicamada lipídica. Em outras modalidades, as nanopartículas lipídicas têm uma estrutura não bicamada, isto é, uma morfologia não lamelar (isto é, não bicamada). Sem limitações, a morfologia não bicamada pode incluir, por exemplo, tubos tridimensionais, hastes, simetrias cúbicas etc. Por exemplo, a morfologia das nanopartículas lipídicas (lamelar *vs.* não lamelar) pode ser facilmente avaliada e caracterizada utilizando-se,

por exemplo, análise Cryo-TEM conforme descrito no documento US2010/0130588, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00426] Em algumas modalidades adicionais, as nanopartículas lipídicas que têm uma morfologia não lamelar são densas em elétrons. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma nanopartícula lipídica que é de estrutura unilamelar ou multilamelar. Em alguns aspectos, a descrição fornece uma formulação de nanopartículas lipídicas que compreende partículas multivesiculares e/ou partículas à base de espuma.

[00427] Controlando-se a composição e a concentração dos componentes lipídicos, pode-se controlar a taxa na qual o conjugado lipídico é retirado, por troca, da partícula lipídica e, por sua vez, a taxa na qual a nanopartícula lipídica se torna fusogênica. Além disso, outras variáveis, incluindo, por exemplo, pH, temperatura ou força iônica, podem ser usadas para variar e/ou controlar a taxa na qual a nanopartícula lipídica se torna fusogênica. Outros métodos que podem ser usados para controlar a taxa na qual a nanopartícula lipídica se torna fusogênica serão evidentes para aqueles versados na técnica com base nesta descrição. Também será evidente que, controlando-se a composição e a concentração do conjugado lipídico, pode-se controlar o tamanho das partículas lipídicas.

[00428] A pKa de lipídios catiônicos formulados pode ser correlacionada com a eficácia dos LNPs na entrega de ácidos nucleicos (consultar Jayaraman et al., Angewandte Chemie, Edição Internacional (2012), 51 (34), 8.529 a 8.533; Semple et al., Nature Biotechnology 28, 172 a 176 (2010), os quais são incorporados a título de referência em suas totalidades). A faixa preferencial de pKa é de aproximadamente 5 a aproximadamente 7. A pKa do lipídio catiônico pode ser determinada em nanopartículas lipídicas com o uso de um ensaio baseado na fluo-

rescência de ácido 2-(p-toluidino)-6-naftaleno sulfônico (TNS).

VII. MÉTODOS DE ENTREGA DE VETORES DE DNA DE EXTREMIDADE FECHADA

[00429] Em algumas modalidades, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser entregue a uma célula-alvo *in vitro* ou *in vivo* por vários métodos adequados. Um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento isoladamente, pode ser aplicado ou injetado. Um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser entregue a uma célula sem a ajuda de um reagente de transfecção ou outros meios físicos. Alternativamente, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser entregue com o uso de qualquer reagente de transfecção conhecido na técnica ou outros meios físicos conhecidos na técnica que facilitam a entrada de DNA em uma célula, por exemplo, lipossomas, álcoois, compostos ricos em polilisina, compostos ricos em arginina, fosfato de cálcio, microvesículas, microinjeção, eletroporação e similares.

[00430] Em outra modalidade, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, é administrado ao CNS (por exemplo, ao cérebro ou ao olho). O vetor, por exemplo, ceDNA pode ser introduzido na medula espinhal, tronco cerebral (medula oblonga, ponte), mesencéfalo (hipotálamo, tálamo, epitálamo, glândula pituitária, substância negra, glândula pineal), cerebelo, telencéfalo (corpo estriado, cérebro, incluindo os lóbulos occipital,

temporal, parietal e frontal, córtex, gânglios basais, hipocampo e porta-amígdala), sistema límbico, neocórtex, corpo estriado, cérebro e colículo inferior. O vetor de ceDNA também pode ser administrado em diferentes regiões do olho, tais como retina, córnea e/ou nervo óptico. O vetor de ceDNA pode ser entregue no líquido cefalorraquidiano (por exemplo, por punção lombar). O vetor de ceDNA pode ainda ser administrado por via intravascular ao CNS em situações em que a barreira hematoencefálica foi perturbada (por exemplo, tumor cerebral ou infarto cerebral).

[00431] Em algumas modalidades, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser administrado à região (ou regiões) desejada do CNS por qualquer via conhecida na técnica, incluindo, mas sem limitação, intratecal, intraocular, intracerebral, intraventricular, intravenosa (por exemplo, na presença de açúcar, tal como manitol), intranasal, intra-aural, intraocular (por exemplo, intravítreo, sub-retiniana, câmara anterior) e entrega periocular (por exemplo, região sub-Tenon), bem como entrega intramuscular com entrega retrógrada a neurônios motores.

[00432] Em algumas modalidades, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, é administrado em uma formulação líquida por injeção direta (por exemplo, injeção estereotática) na região ou compartimento desejado no CNS. Em outras modalidades, por exemplo, o vetor de ceDNA produzido sinteticamente pode ser fornecido por aplicação tópica na região desejada ou por administração intranasal de uma formulação de aerossol. A administração ocular pode ser por aplicação tópica de gotículas de líquido. Como alternativa adicional, o vetor, por exemplo, ceDNA pode ser administrado como uma formulação sólida de liberação lenta (con-

sultar, por exemplo, Patente nº US 7.201.898). Em modalidades ainda adicionais, por exemplo, o vetor de ceDNA produzido sinteticamente pode ser usado para transporte retrógrado para tratar, amenizar e/ou prevenir doenças e distúrbios que envolvem neurônios motores (por exemplo, esclerose lateral amiotrófica (ELA); atrofia muscular espinhal (SMA), etc.). Por exemplo, o vetor de ceDNA produzido sinteticamente pode ser entregue ao tecido muscular a partir do qual pode migrar para os neurônios.

VIII. USOS ADICIONAIS DOS VETORES DE ceDNA

[00433] As composições e o vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo vetores de ceDNA, produzidos com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, podem ser usados para expressar um gene ou transgene-alvo para vários propósitos. Em algumas modalidades, o transgene resultante codifica uma proteína ou RNA funcional que se destina a ser usado para fins de pesquisa, por exemplo, para criar um modelo animal transgênico somático que abriga o transgene, por exemplo, para estudar a função do produto de transgene. Em outro exemplo, o transgene codifica uma proteína ou RNA funcional que se destina a ser usado para criar um modelo animal de doença. Em algumas modalidades, o transgene resultante codifica um ou mais peptídeos, polipeptídeos ou proteínas, que são úteis para o tratamento, prevenção ou amenização de distúrbios ou estados de doenças em um sujeito mamífero. O transgene resultante pode ser transferido a (por exemplo, expresso em) um sujeito em quantidade suficiente para tratar uma doença associada à expressão reduzida, falta de expressão ou disfunção do gene. Em algumas modalidades, o transgene resultante pode ser expresso em um sujeito em quantidade suficiente para tratar uma doença associada ao aumento de expressão, atividade do produto gênico ou regulação positiva inadequada de um gene que o transgene resultante suprime ou causa a expressão a

ser reduzida. Em ainda outras modalidades, o transgene resultante substitui ou suplementa uma cópia defeituosa do gene nativo. Será entendido por um versado na técnica que o transgene pode não ser um quadro de leitura aberta de um gene a ser transcrito; em vez disso, pode ser uma região promotora ou região repressora de um gene alvo, e o vetor de ceDNA pode modificar essa região com o resultado de modular a expressão de um gene de interesse.

[00434] Em algumas modalidades, o transgene codifica uma proteína ou RNA funcional que se destina a ser usado para criar um modelo animal de doença. Em algumas modalidades, o transgene codifica um ou mais peptídeos, polipeptídeos ou proteínas, que são úteis para o tratamento ou prevenção de estados de doença em um sujeito mamífero. O transgene pode ser transferido a (por exemplo, expresso em) um paciente em quantidade suficiente para tratar uma doença associada à expressão reduzida, falta de expressão ou disfunção do gene.

IX. MÉTODOS DE USO

[00435] Um vetor de DNA de extremidade fechada produzido sinteticamente, por exemplo, vetor de ceDNA, conforme divulgado no presente documento, também pode ser usado em um método para a entrega de uma sequência de nucleotídeos de interesse (por exemplo, um transgene) a uma célula-alvo (por exemplo, uma célula hospedeira). O método pode, em particular, ser um método para entregar um transgene a uma célula de um sujeito em necessidade do mesmo e tratar uma doença de interesse. A invenção permite a expressão *in vivo* de um transgene, por exemplo, uma proteína, anticorpo, ácido nucleico, tal como miRNA etc., codificado no vetor de ceDNA em uma célula de um sujeito de tal modo que ocorra efeito terapêutico da expressão do transgene. Esses resultados são vistos com os modos *in vivo* e *in vitro* de entrega de vetor de DNA de extremidade fechada (por exemplo, vetor de ceDNA).

[00436] Além disso, a invenção fornece um método para a entrega de um transgene em uma célula de um sujeito em necessidade do mesmo, que compreende múltiplas administrações do vetor de DNA de extremidade fechada (por exemplo, vetor de ceDNA) produzido sinteticamente da invenção que compreende o dito ácido nucleico ou transgene de interesse. Uma vez que o vetor de ceDNA da invenção não induz uma resposta imune como aquela normalmente observada contra vetores virais encapsidados, essa estratégia de administração múltipla provavelmente terá maior sucesso em um sistema baseado em ceDNA.

[00437] O ácido nucleico (ou ácidos nucleicos) do vetor de DNA de extremidade fechada (por exemplo, vetor de ceDNA) produzido sinteticamente é administrado em quantidades suficientes para transfectar as células de um tecido desejado e para fornecer níveis suficientes de transferência e expressão gênica sem efeitos adversos indevidos. As vias de administração convencionais e farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas sem limitação, intravenosa (por exemplo, em uma formulação de lipossoma), entrega direta ao órgão selecionado (por exemplo, entrega intraportal ao fígado), via intramuscular e outras vias de administração parentais. As vias de administração podem ser combinadas, se desejado.

[00438] A entrega de vetor de DNA de extremidade fechada (por exemplo, vetor de ceDNA) não se limita às substituições de gene de entrega. Por exemplo, os vetores de DNA de extremidade fechada (por exemplo, vetores de ceDNA) produzidos sinteticamente, conforme descrito no presente documento, podem ser usados com outros sistemas de entrega fornecidos para fornecer uma porção da terapia gênica. Um exemplo não limitante de um sistema que pode ser combinado com os vetores de ceDNA produzidos sinteticamente, de acordo com a presente descrição, inclui sistemas que entregam separadamente um

ou mais cofatores ou supressores imunológicos para expressão gênica eficaz do transgene.

[00439] A invenção também fornece um método de tratamento de uma doença em um sujeito que compreende a introdução em uma célula-alvo em necessidade do mesmo (em particular, uma célula muscular ou tecido) do sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz de um vetor de DNA de extremidade fechada (por exemplo, vetor de ceDNA) produzido sinteticamente, opcionalmente com um carreador farmaceuticamente aceitável. Embora, por exemplo, o vetor de ceDNA produzido sinteticamente possa ser introduzido na presença de um carreador, esse carreador não é necessário. O vetor de ceDNA, por exemplo, produzido sinteticamente, selecionado compreende uma sequência nucleotídica de interesse útil para o tratamento da doença. Em particular o vetor de ceDNA, por exemplo, produzido sinteticamente, pode compreender uma sequência de DNA exógena desejada operacionalmente ligada a elementos de controle capazes de direcionar a transcrição do polipeptídeo, proteína ou oligonucleotídeo desejado codificado pela sequência de DNA exógeno quando introduzido no sujeito. Por exemplo, o vetor de ceDNA produzido sinteticamente pode ser administrado por qualquer via adequada, conforme fornecido acima, e em outras partes do presente documento.

[00440] As composições e vetores produzidos sinteticamente fornecidos no presente documento podem ser usados para fornecer um transgene para vários propósitos. Em algumas modalidades, o transgene codifica uma proteína ou RNA funcional que se destina a ser usado para fins de pesquisa, por exemplo, para criar um modelo animal transgênico somático que abriga o transgene, por exemplo, para estudar a função do produto de transgene. Em outro exemplo, o transgene codifica uma proteína ou RNA funcional que se destina a ser usado para criar um modelo animal de doença. Em algumas modali-

dades, o transgene codifica um ou mais peptídeos, polipeptídeos ou proteínas, que são úteis para o tratamento ou prevenção de estados de doença em um sujeito mamífero. O transgene pode ser transferido a (por exemplo, expresso em) um paciente em quantidade suficiente para tratar uma doença associada à expressão reduzida, falta de expressão ou disfunção do gene.

[00441] Em princípio, o cassete de expressão, que pode incluir um ácido nucleico ou qualquer transgene que codifique uma proteína ou polipeptídeo que seja reduzido ou ausente devido a uma mutação ou que transmita um benefício terapêutico quando superexpresso, é considerado como estando dentro do escopo da invenção.

[00442] Um vetor de ceDNA produzido sinteticamente não se limita a uma espécie de vetor de ceDNA. Sendo assim, em outro aspecto, vários vetores de ceDNA que compreendem diferentes transgenes ou o mesmo transgene, mas operacionalmente ligados a diferentes promotores ou elementos cis-reguladores, podem ser entregues simultaneamente ou sequencialmente à célula, tecido, órgão ou sujeito-alvo. Portanto, essa estratégia pode permitir a terapia gênica ou a entrega de genes de múltiplos genes simultaneamente. Também é possível separar partes diferentes do transgene em vetores de ceDNA separados (por exemplo, domínios e/ou cofatores diferentes necessários para a funcionalidade do transgene) que podem ser administrados simultaneamente ou em momentos diferentes e podem ser reguláveis separadamente, desse modo, adicionando um nível adicional de controle da expressão do transgene. A entrega também pode ser realizada várias vezes e, principalmente para terapia gênica no cenário clínico, em doses subsequentes crescentes ou decrescentes, dada a falta de uma resposta imune do hospedeiro anticapsídeo devido à ausência de um capsídeo viral. Prevê-se que não ocorra resposta anticapsídeo, pois não há capsídeo.

[00443] A invenção também fornece um método para tratar uma doença em um sujeito que compreende administrar em uma célula-alvo em necessidade do mesmo (em particular uma célula muscular ou tecido) do sujeito, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um vetor de ceDNA produzido sinteticamente, conforme divulgado no presente documento, opcionalmente com um carreador farmaceuticamente aceitável. Embora o vetor de ceDNA possa ser introduzido na presença de um carreador, esse carreador não é necessário. O vetor de ceDNA implementado compreende uma sequência de nucleotídeos de interesse útil no tratamento da doença. Em particular, o vetor de ceDNA pode compreender uma sequência de DNA exógena desejada operacionalmente ligada a elementos de controle capazes de direcionar a transcrição do polipeptídeo, proteína ou oligonucleotídeo desejado codificado pela sequência de DNA exógena quando introduzido no sujeito. O vetor de ceDNA produzido sinteticamente pode ser administrado por qualquer via adequada, conforme fornecido acima, e em outras partes do presente documento.

X. MÉTODOS DE TRATAMENTO

[00444] A tecnologia descrita no presente documento também demonstra métodos para a produção, bem como métodos de uso dos vetores de ceDNA produzidos sinteticamente divulgados de várias maneiras, incluindo, por exemplo, aplicações *ex situ*, *in vitro* e *in vivo*, metodologias, procedimentos de diagnóstico e/ou regimes de terapia gênica.

[00445] É fornecido no presente documento um método para tratar uma doença ou distúrbio em um sujeito que compreende administrar em uma célula-alvo em necessidade do mesmo (por exemplo, uma célula ou tecido muscular ou outro tipo de célula afetada) do sujeito, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um vetor de ceDNA produzido sinteticamente, opcionalmente com um carreador farmaceuti-

camente aceitável. Embora o vetor de ceDNA possa ser introduzido na presença de um carreador, esse carreador não é necessário. O vetor de ceDNA produzido sinteticamente implementado compreende uma sequência de nucleotídeos de interesse útil para o tratamento da doença. Em particular, o vetor de ceDNA produzido sinteticamente pode compreender uma sequência de DNA exógeno desejada operacionalmente ligada a elementos de controle capazes de direcionar a transcrição do polipeptídeo, proteína ou oligonucleotídeo desejado codificado pela sequência de DNA exógeno quando introduzido no sujeito. O vetor de ceDNA produzido sinteticamente pode ser administrado por qualquer via adequada, conforme fornecido acima, e em outras partes do presente documento.

[00446] São divulgadas no presente documento composições e formulações de vetores de ceDNA que incluem um ou mais dos vetores de ceDNA produzidos sinteticamente da presente invenção, juntamente com um ou mais tampões, diluentes ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis. Tais composições podem ser incluídas em um ou mais kits de diagnóstico ou terapêuticos, para diagnosticar, prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas de uma doença, lesão, distúrbio, trauma ou disfunção. Em um aspecto, a doença, lesão, distúrbio, trauma ou disfunção é uma doença, lesão, distúrbio, trauma ou disfunção humana.

[00447] Outro aspecto da tecnologia descrita no presente documento fornece um método para fornecer a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade diagnóstica ou terapeuticamente eficaz de um vetor de ceDNA produzido sinteticamente, em que o método compreende fornecer a uma célula, tecido ou órgão de um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade do vetor de ceDNA produzido sinteticamente, conforme divulgado no presente documento; e por um tempo eficaz para permitir a expressão do transgene a partir do vetor de

ceDNA, assim, fornecendo ao sujeito uma quantidade diagnóstica ou terapeuticamente eficaz da proteína, peptídeo, ácido nucleico expresso pelo vetor de ceDNA. Em outro aspecto, o sujeito é ser humano.

[00448] Outro aspecto da tecnologia descrita no presente documento fornece um método para diagnosticar, prevenir, tratar ou melhorar pelo menos um ou mais sintomas de uma doença, um distúrbio, uma disfunção, uma lesão, uma condição anormal ou trauma em um sujeito. Em um sentido global e geral, o método inclui pelo menos a etapa de administrar a um sujeito em necessidade dos mesmos um ou mais dos vetores de ceDNA produzidos sinteticamente divulgados, em uma quantidade e por um tempo suficiente para diagnosticar, prevenir, tratar ou amenizar o um ou mais sintomas da doença, distúrbio, disfunção, lesão, condição anormal ou trauma no sujeito. Em outro aspecto, o sujeito é ser humano.

[00449] Outro aspecto é o uso do vetor de ceDNA produzido sinteticamente como uma ferramenta para tratar ou reduzir um ou mais sintomas de uma doença ou estados de doença. Há uma série de doenças hereditárias nas quais os genes defeituosos são conhecidos e geralmente se enquadram em duas classes: estados de deficiência, geralmente de enzimas, que geralmente são herdados de maneira recessiva, e estados desequilibrados, que podem envolver proteínas reguladoras ou estruturais, e que são tipicamente, mas nem sempre, herdados de maneira dominante. Para doenças em estado de deficiência, os vetores de ceDNA produzidos sinteticamente podem ser usados para entregar transgenes para trazer um gene normal aos tecidos afetados para terapia de substituição, bem como, em algumas modalidades, para criar modelos animais para a doença com o uso de mutações antissenso. Para estados de doença desequilibrados, vetores de ceDNA produzidos sinteticamente podem ser usados para criar um estado de doença em um sistema modelo, que pode ser usado em

esforços para combater o estado de doença. Assim, os vetores e métodos de ceDNA produzidos sinteticamente divulgados no presente documento permitem o tratamento de doenças genéticas. Conforme usado no presente documento, um estado de doença é tratado por remediar parcial ou totalmente a deficiência ou desequilíbrio que causa a doença ou a torna mais grave.

A. CÉLULAS HOSPEDEIRAS:

[00450] Em algumas modalidades, o vetor de ceDNA produzido sinteticamente entrega o transgene em uma célula hospedeira em questão. Em algumas modalidades, a célula hospedeira em questão é uma célula hospedeira humana, incluindo, por exemplo, células sanguíneas, células-tronco, células hematopoiéticas, células $CD34^+$, células hepáticas, células cancerígenas, células vasculares, células musculares, células pancreáticas, células neurais, oculares ou células da retina, células epiteliais ou endoteliais, células dendríticas, fibroblastos ou qualquer outra célula de origem mamífera, incluindo, sem limitação, células hepáticas (isto é, fígado), células pulmonares, células cardíacas, células pancreáticas, células intestinais, células diafragmáticas, células renais (isto é, rim), células neurais, células sanguíneas, células da medula óssea ou qualquer um ou mais tecidos selecionados de um sujeito para o qual a terapia gênica é contemplada. Em um aspecto, a célula hospedeira em questão é uma célula hospedeira humana.

[00451] A presente descrição também se refere a células hospedeiras recombinantes, conforme acima mencionado, incluindo vetores de ceDNA produzidos sinteticamente, como descrito no presente documento. Assim, pode-se usar múltiplas células hospedeiras, dependendo da finalidade, como é aparente para o especialista versado na técnica. Um construto ou vetor de ceDNA produzido sinteticamente, incluindo a sequência doadora, é introduzido em uma célula hospedeira, de modo que a sequência doadora seja mantida como um integrador

cromossômico, conforme descrito anteriormente. O termo célula hospedeira abrange qualquer progênie de uma célula progenitora que não é idêntica à célula progenitora devido a mutações que ocorrem durante a replicação. A escolha de uma célula hospedeira dependerá em grande parte da sequência do doador e de sua fonte. A célula hospedeira também pode ser um eucarioto, tal como uma célula de mamífero, inseto, planta ou fungo. Em uma modalidade, a célula hospedeira é uma célula humana (por exemplo, uma célula primária, uma célula-tronco ou uma linhagem celular imortalizada). Em algumas modalidades, a célula hospedeira pode ser administrada *ex vivo* do vetor de ceDNA sinteticamente produzido e depois entregue ao sujeito após o evento de terapia gênica. Uma célula hospedeira pode ser qualquer tipo de célula, por exemplo, uma célula somática ou célula-tronco, uma célula-tronco pluripotente induzida ou uma célula sanguínea, por exemplo, células T ou células B ou células da medula óssea. Em determinadas modalidades, a célula hospedeira é uma célula alogênica. Por exemplo, a modificação genética de genoma de células T é útil para imunoterapias de câncer, modulação de doenças, tal como terapia de HIV (por exemplo, knock out de receptor, tais como CXCR4 e CCR5) e terapias de imunodeficiência. Os receptores de MHC em células B podem ser direcionados para imunoterapia. Em algumas modalidades, células hospedeiras modificadas por genes, por exemplo, células-tronco da medula óssea, por exemplo, células $CD34^+$ ou células-tronco pluripotentes induzidas, podem ser transplantadas de volta para um paciente para expressão de uma proteína terapêutica.

B. DOENÇAS A SEREM TRATADAS COM UM VETOR DE ceDNA E TRANSGENES EXEMPLIFICATIVOS

[00452] Um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, também é útil para corrigir um gene

defeituoso. Como um exemplo não limitante, o gene de DMD de Distrofia Muscular de Duchene pode ser entregue com o uso dos vetores de ceDNA produzidos sinteticamente, conforme divulgado no presente documento.

[00453] Um vetor de ceDNA produzido sinteticamente ou uma composição do mesmo pode ser usada no tratamento de qualquer doença hereditária. Como um exemplo não limitante, o vetor de ceDNA produzido sinteticamente ou uma composição do mesmo, por exemplo, pode ser usado no tratamento da amiloidose de transtirretina (ATTR), uma doença órfã em que a proteína mutante se dobra e se agrega em nervos, no coração, no sistema gastrointestinal, etc. É contemplado no presente documento que a doença pode ser tratada por deleção do gene de doença mutante (mutTTR) com o uso dos sistemas de vetor de ceDNA produzidos sinteticamente descritos no presente documento. Tais tratamentos de doenças hereditárias podem interromper a progressão da doença e podem permitir a regressão de uma doença estabelecida ou a redução de pelo menos um sintoma da doença em pelo menos 10%.

[00454] Em outra modalidade, um vetor de ceDNA produzido sinteticamente ou uma composição do mesmo pode ser usado no tratamento da deficiência de ornitina transcarbamilase (deficiência de OTC), hiperamonemia ou outros distúrbios de ciclo de ureia, que prejudicam a capacidade do neonato ou da criança pequena de desintoxicar a amônia. Como em todas as doenças de metabolismo congênito, é contemplado no presente documento que mesmo uma restauração parcial de atividade enzimática em comparação com os controles do tipo selvagem (por exemplo, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 99%) possa ser suficiente para a redução de pelo menos um

sintoma de OTC e/ou uma melhoria na qualidade de vida para um sujeito que tem deficiência de OTC. Em uma modalidade, um ácido nucleico que codifica OTC pode ser inserido atrás do promotor endógeno de albumina para substituição de proteínas *in vivo*.

[00455] Em outra modalidade, um vetor de ceDNA produzido sinteticamente ou uma composição do mesmo pode ser usada no tratamento de fenilcetonúria (PKU), entregando-se uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma enzima fenilalanina hidroxilase para reduzir o acúmulo de fenilalanina na dieta, que pode ser tóxico para quem sofre de PKU. Como em todas as doenças de metabolismo congênito, contempla-se no presente documento que mesmo uma restauração parcial de atividade enzimática em comparação com os controles do tipo selvagem (por exemplo, de pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 99%) possa ser suficiente para a redução de pelo menos um sintoma de PKU e/ou uma melhoria na qualidade de vida para um sujeito que tem PKU. Em uma modalidade, um ácido nucleico que codifica a fenilalanina hidroxilase pode ser inserido atrás do promotor endógeno de albumina para substituição de proteína *in vivo*.

[00456] Em outra modalidade, um vetor de ceDNA produzido sinteticamente ou uma composição do mesmo pode ser usado no tratamento de doença de armazenamento de glicogênio (GSD), entregando-se uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma enzima para corrigir a síntese ou a decomposição aberrante de glicogênio em sujeitos que têm GSD. Exemplos não limitantes de enzimas que podem ser entregues e expressas com o uso dos vetores e métodos de ceDNA produzidos sinteticamente, conforme descrito no presente documento, incluem glicogênio sintase, glicose-6-fosfatase, alfa-glucosidase ácida, enzima de desramificação de glicogênio, enzima de

ramificação de glicogênio, fosforilase de glicogênio muscular, glicogênio fosforilase hepática, fosforofructoquinase muscular, fosforilase quinase, transportador-2 de glicose (GLUT-2), aldolase A, beta-enolase, fosfoglucomutase-1 (PGM-1) e glicogenina-1. Como em todas as doenças de metabolismo congênitas, contempla-se no presente documento que mesmo uma restauração parcial de atividade enzimática em comparação com os controles do tipo selvagem (por exemplo, de pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 99%) possa ser suficiente para a redução de pelo menos um sintoma de GSD e/ou uma melhoria na qualidade de vida para um sujeito que tem GSD. Em uma modalidade, um ácido nucleico que codifica uma enzima para corrigir o armazenamento aberrante de glicogênio pode ser inserido atrás do promotor endógeno de albumina para substituição de proteínas *in vivo*.

[00457] Os vetores de ceDNA produzidos sinteticamente descritos no presente documento também são contemplados para uso no tratamento de qualquer um dentre; amaurose congênita de Leber (LCA), doenças de poliglutamina, incluindo repetições de poliQ e deficiência de alfa-1 antitripsina (A1AT). A LCA é uma doença ocular congênita rara que resulta em cegueira, que pode ser causada por uma mutação em qualquer um dos seguintes genes: GUCY2D, RPE65, SPATA7, AIPL1, LCA5, RPGRIP1, CRX, CRB1, NMNAT1, CEP290, IMPDH1, RD3, RDH12, LRAT, TULP1, KCNJ13, GDF6 e/ou PRPH2. Contempla-se no presente documento que os vetores, composições e métodos de ceDNA aqui descritos possam ser adaptados para a entrega de um ou mais dos genes associados à LCA, a fim de corrigir um erro no gene (ou genes) responsável pelos sintomas de LCA. As doenças de poliglutamina incluem, mas sem limitação: atrofia dentorrubropalidoluisiana, doença de Huntington, atrofia muscular espinhal e bulbar e

ataxia espinocerebelar dos tipos 1, 2, 3 (também denominada doença de Machado-Joseph), 6, 7 e 17. A deficiência de A1AT é um distúrbio genético que causa produção defeituosa de alfa-1 antitripsina, levando à diminuição da atividade da enzima no sangue e nos pulmões, que por sua vez podem levar ao enfisema ou doença pulmonar obstrutiva crônica nos sujeitos afetados. O tratamento de um sujeito com uma deficiência de A1AT é especificamente contemplado no presente documento, com o uso de vetores de ceDNA ou composições dos mesmos, conforme descrito no presente documento. Contempla-se no presente documento que um vetor de ceDNA que compreende um ácido nucleico que codifica uma proteína desejada para o tratamento de LCA, doenças de poliglutamina ou deficiência de A1AT possa ser administrado a um sujeito em necessidade de tratamento.

[00458] Em outras modalidades, as composições que compreendem um vetor de ceDNA produzido sinteticamente, conforme descrito no presente documento, podem ser usadas para fornecer uma sequência viral, uma sequência de patógenos, uma sequência cromossômica, uma junção de translocação (por exemplo, uma translocação associada ao câncer), uma sequência de RNA ou gene de RNA não codificante, um gene associado à doença, entre outros.

[00459] Qualquer ácido nucleico ou gene-alvo de interesse pode ser entregue ou expresso por um vetor de ceDNA produzido sinteticamente, conforme divulgado no presente documento. Os ácidos nucleicos-alvo e os genes-alvo incluem, mas sem limitação, ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos ou ácidos nucleicos não codificadores (por exemplo, RNAi, miRs etc.), de preferência, polipeptídeos terapêuticos (por exemplo, para uso médico, diagnóstico ou veterinário) ou imunogênicos (por exemplo, para vacinas). Em determinadas modalidades, os ácidos nucleicos-alvo ou genes-alvo que são direcionados pelos vetores de ceDNA produzidos sinteticamente, conforme descrito no

presente documento, codificam um ou mais polipeptídeos, peptídeos, ribozimas, ácidos nucleicos peptídicos, siRNAs, RNAis, oligonucleotídeos antissenso, polinucleotídeos antissenso, anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno ou qualquer combinação dos mesmos.

[00460] Em particular, um alvo genético ou transgene para expressão pelo vetor de ceDNA produzido sinteticamente, conforme divulgado no presente documento, pode codificar, por exemplo, mas sem limitação, proteína (ou proteínas), polipeptídeo (ou polipeptídeos), peptídeo (peptídeos), enzima (enzimas), anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno, bem como variantes e/ou fragmentos ativos dos mesmos, para uso no tratamento, profilaxia e/ou melhoria de um ou mais sintomas de uma doença, disfunção, lesão e/ou distúrbio. Em um aspecto, a doença, disfunção, trauma, lesão e/ou distúrbio é uma doença, disfunção, trauma, lesão e/ou distúrbio humano.

[00461] O cassete de expressão também pode codificar polipeptídeos, oligonucleotídeos senso ou antissenso ou RNAs (codificadores ou não codificadores; por exemplo, siRNAs, shRNAs, micro-RNAs e seus equivalentes antissenso (por exemplo, antagoMiR)). Os cassetes de expressão podem incluir uma sequência exógena que codifica uma proteína repórter a ser usada para fins experimentais ou de diagnóstico, tais como β-lactamase, β-galactosidase (LacZ), fosfatase alcalina, timidina quinase, proteína fluorescente verde (GFP), cloranfenicol acetiltransferase (CAT), luciferase e outros bem-conhecidos na técnica.

[00462] As sequências fornecidas no cassete de expressão, construto de expressão de um vetor de ceDNA descrito no presente documento, podem ser otimizadas por códon para a célula hospedeira. Conforme usado no presente documento, o termo "códon otimizado" ou "otimização de códon" se refere ao processo de modificação de uma sequência de ácidos nucleicos para expressão intensificada nas células do vertebrado de interesse, por exemplo, camundongo ou ser

humano, substituindo-se pelo menos um, mais de um, ou um número significativo de códons da sequência nativa (por exemplo, uma sequência procariótica) com códons que são mais frequentemente ou com a máxima frequência usados nos genes desse vertebrado. Várias espécies exibem viés particular para determinados códons de um aminoácido específico. Tipicamente, a otimização de códon não altera a sequência de aminoácidos da proteína traduzida original. Os códons otimizados podem ser determinados, por exemplo, com o uso da plataforma de otimização de códons e síntese genética personalizada Gene Forge® da Aptagen (Aptagen, Inc., 2190 Fox Mill Rd. Suite 300, Herndon, Va. 20171) ou outro banco de dados publicamente disponível.

[00463] Muitos organismos exibem uma tendência para o uso de códons específicos para codificar a inserção de um aminoácido específico em uma cadeia peptídica crescente. A preferência de códon ou o viés de códon, diferenças no uso de códons entre organismos, são proporcionadas pela degeneração do código genético e são bem-documentadas entre muitos organismos. O viés de códon geralmente se correlaciona com a eficiência da tradução do RNA mensageiro (mRNA), que por sua vez considera-se ser dependente, *inter alia*, das propriedades dos códons que são traduzidos e da disponibilidade de moléculas de RNA de transferência (tRNA) específicas. A predominância de tRNAs selecionados em uma célula é geralmente um reflexo dos códons usados com mais frequência na síntese de peptídeos. Consequentemente, os genes podem ser adaptados para a expressão gênica ideal em um determinado organismo com base na otimização de códons.

[00464] Dado o grande número de sequências de genes disponíveis para uma grande variedade de espécies animais, vegetais e microbianas, é possível calcular as frequências relativas do uso de códons (Nakamura, Y., et al. "Codon usage tabulated from the international

DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000)).

[00465] Conforme observado no presente documento, um vetor de ceDNA produzido sinteticamente, conforme divulgado no presente documento, pode codificar uma proteína ou peptídeo, ou sequência de ácido nucleico terapêutico ou agente terapêutico, incluindo, mas sem limitação, um ou mais agonistas, antagonistas, fatores antiapoptose, inibidores, receptores, citocinas, citotoxinas, agentes eritropoiéticos, glicoproteínas, fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, hormônios, receptores hormonais, interferons, interleucinas, receptores de interleucina, fatores de crescimento de nervos, peptídeos neuroativos, receptores de peptídeos neuroativos, proteases, inibidores de protease, proteínas descarboxilases, proteínas quinases, proteínas inibidoras de quinase, enzimas, proteínas de ligação a receptores, proteínas de transporte ou um ou mais inibidores dos mesmos, receptores de serotonina ou um ou mais inibidores de captação dos mesmos, serpinas, receptores de serpinas, supressores de tumores, moléculas de diagnóstico, agentes quimioterapêuticos, citotoxinas ou qualquer combinação dos mesmos.

[00466] Os vetores de ceDNA produzidos sinteticamente também são úteis para ablação de expressão gênica. Por exemplo, em uma modalidade, um vetor de ceDNA pode ser usado para expressar um ácido nucleico antissenso ou RNA funcional para induzir o knockdown de um gene-alvo. Como um exemplo não limitante, a expressão de CXCR4 e CCR5, receptores de HIV, foi eliminada com sucesso em células T humanas primárias, consultar Schumann *et al.* (2015), *PNAS* 112 (33): 10.437 a 10.442, incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Outro gene para inibição direcionada é PD-1, em que o vetor de ceDNA produzido sinteticamente pode expressar um ácido nucleico inibidor ou RNAi ou RNA funcional para ini-

bir a expressão de PD-1. PD-1 expressa um receptor de superfície celular de ponto de verificação imune em células T cronicamente ativas que ocorre em malignidade. Consultar Schumann et al. *supra.*

[00467] Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido sinteticamente é útil para corrigir um gene defeituoso, expressando-se um transgene que tem como alvo o gene adoecido. Exemplos não limitantes de doenças ou distúrbios passíveis de tratamento por um vetor de ceDNA produzido sinteticamente, conforme divulgado no presente documento, estão listados nas Tabelas A C, juntamente com seus genes e os genes associados à publicação de Patente nº US 2014/0170753, a qual é incorporada ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00468] Em modalidades alternativas, os vetores de ceDNA produzidos sinteticamente são usados para inserção de um cassete de expressão para expressão de uma proteína terapêutica ou proteína repórter em um gene de porto seguro, por exemplo, em um íntron inativo. Em determinadas modalidades, um cassete sem promotor é inserido no gene de porto seguro. Em tais modalidades, um cassete sem promotor pode obter vantagens dos elementos reguladores do gene de porto seguro (promotores, intensificadores e peptídeos de sinalização), um exemplo não limitante de inserção no local de porto seguro é a inserção no local de albumina que é descrito em *Blood* (2015) 126 (15): 1.777 a 1.784, que é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade. A inserção na Albumina tem o benefício de permitir a secreção do transgene no sangue (consultar, por exemplo, Exemplo 22). Além disso, um local de porto seguro genômico pode ser determinado com o uso de técnicas conhecidas na técnica e descrito em, por exemplo, Papapetrou, ER & Schambach, A. *Molecular Therapy* 24 (4): 678 a 684 (2016) ou Sadelain et al. *Nature Reviews Cancer* 12: 51 a 58 (2012), cujo conteúdo é incorporado ao presente

documento a título de referência em sua totalidade. É especificamente contemplado no presente documento que sítios de porto seguro em um genoma do vírus adenoassociado (AAV) (por exemplo, sítio de porto seguro AAVS1) podem ser usados com os métodos e composições descritos no presente documento (consultar, por exemplo, Oceguera-Yanez et al. *Methods* 101:43 a 55 (2016) ou Tiyaboonchai, A et al. *Stem Cell Res* 12(3):630 a 637 (2014), cujos conteúdos são incorporados a título de referência em suas totalidades). Por exemplo, o sítio de porto seguro genômico de AAVS1 pode ser usado com os vetores e composições de ceDNA descritos no presente documento para os fins de silenciamento de gene e expressão de transgene com especificidade hematopoiética em células-tronco embrionárias (por exemplo, células-tronco embrionárias humanas) ou células-tronco pluripotentes induzidas (células de iPS). Além disso, contempla-se no presente documento que modelos de doadores de reparo direcionados por homologia sintéticos ou comercialmente disponíveis para inserção em um sítio de porto seguro de AASV1 no cromossomo 19 podem ser usados com os vetores ou composições de ceDNA descritos no presente documento. Por exemplo, modelos de reparo direcionados à homologia e RNA-guia podem ser adquiridos comercialmente, por exemplo, junto à System Biosciences, Palo Alto, CA, e clonados em um vetor de ceDNA.

[00469] Em algumas modalidades, os vetores de ceDNA produzidos sinteticamente são usados para expressar um transgene, realizar knock out ou diminuir a expressão de um gene alvo em uma célula T, por exemplo, para modificar geneticamente a célula T para melhorar a transferência de célula adotiva e/ou terapias CAR-T (consultar, por exemplo, Exemplo 24). Em algumas modalidades, o vetor de ceDNA conforme descrito no presente documento pode expressar transgenes que realizam knock out de genes. Exemplos não limitantes de eventos de knock out terapeuticamente relevantes de células T são descritos

em PNAS (2015) 112(33):10.437 a 10.442, o qual é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

C. DOENÇAS ADICIONAIS PARA TERAPIA GÊNICA:

[00470] Em geral, o vetor de ceDNA produzido pelos métodos sintéticos, conforme divulgado no presente documento, pode ser usado para entregar qualquer transgene de acordo com a descrição acima para tratar, prevenir ou amenizar os sintomas associados a qualquer distúrbio relacionado à expressão gênica. Os estados de doença ilustrativos incluem, mas sem limitação: fibrose cística (e outras doenças pulmonares), hemofilia A, hemofilia B, talassemia, anemia e outras doenças do sangue, AIDS, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, epilepsia e outros distúrbios neurológicos, câncer, diabetes mellitus, distrofias musculares (por exemplo, Duchenne, Becker), doença de Hurler, deficiência de adenosina desaminase, defeitos metabólicos, doenças degenerativas da retina (e outras doenças oculares), mitocondriopatias (por exemplo, neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON), síndrome de Leigh e encefalopatia de esclerosante subaguda), miopatias (por exemplo, miopatia facioescapulo-umeral (FSHD) e cardiomiopatias), doenças de órgãos sólidos (por exemplo, cérebro, fígado, rim, coração) e similares. Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode ser usado vantajosamente no tratamento de indivíduos com distúrbios metabólicos (por exemplo, deficiência de ornitina transcarbamilase).

[00471] Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode ser usado para tratar, amenizar e/ou prevenir uma doença ou distúrbio causado por mutação em um gene ou produto gênico. Doenças ou distúrbios exemplificativos que podem ser tratados

com vetores de ceDNA incluem, mas sem limitação, doenças ou distúrbios metabólicos (por exemplo, doença de Fabry, doença de Gaucher, fenilcetonúria (PKU), doença de armazenamento de glicogênio); doenças ou distúrbios de ciclo de ureia (por exemplo, deficiência de ornitina transcarbamilase (OTC)); doenças ou distúrbios de armazenamento lisossômico (por exemplo, leucodistrofia metacromática (DLM), mucopolissacaridose tipo II (MPSII; síndrome de Hunter)); doenças ou distúrbios hepáticos (por exemplo, colestase intra-hepática familiar progressiva (PFIC); doenças ou distúrbios no sangue (por exemplo, hemofilia (A e B), talassemia e anemia); cânceres e tumores e doenças ou distúrbios genéticos (por exemplo, fibrose cística).

[00472] Como ainda um aspecto adicional, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode ser empregado para fornecer uma sequência nucleotídica heteróloga em situações nas quais é desejável regular o nível de expressão de transgene (por exemplo, transgenes que codificam hormônios ou fatores de crescimento, conforme descrito no presente documento).

[00473] Por conseguinte, em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode ser usado para corrigir um nível e/ou função anormais de um produto genético (por exemplo, uma ausência ou defeito de uma proteína) que resulta na doença ou distúrbio. O vetor de ceDNA pode produzir uma proteína funcional e/ou modificar os níveis da proteína para aliviar ou reduzir os sintomas resultantes de, ou conferir benefício a, uma doença ou distúrbio específico causado pela ausência ou defeito na proteína. Por exemplo, o tratamento de deficiência de OTC pode ser alcançado através da produção de enzima OTC funcional; o tratamento de hemofilia A e B pode ser alcançado modificando-se os níveis do Fator VIII, Fator IX e Fator X; o trata-

mento de PKU pode ser alcançado modificando-se os níveis de enzima fenilalanina hidroxilase; o tratamento de doença de Fabry ou Gaucher pode ser alcançado através da produção de alfa galactosidase funcional ou beta glucocerebrosidase, respectivamente; o tratamento de MLD ou MPSII pode ser alcançado produzindo-se arilsulfatase A funcional ou iduronato-2-sulfatase, respectivamente; o tratamento de fibrose cística pode ser alcançado produzindo-se um regulador de condutância de transmembrana de fibrose cística funcional; o tratamento de doença de armazenamento de glicogênio pode ser alcançado restaurando-se a função funcional da enzima G6Pase; e o tratamento de PFIC pode ser alcançado através da produção dos genes funcionais ATP8B1, ABCB11, ABCB4 ou TJP2.

[00474] Em modalidades alternativas, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode ser usado para fornecer um ácido nucleico antissenso a uma célula *in vitro* ou *in vivo.* Por exemplo, onde o transgene é uma molécula de RNAi, a expressão do ácido nucleico antissenso ou RNAi na célula-alvo diminui a expressão de uma proteína específica pela célula. Consequentemente, os transgenes que são moléculas de RNAi ou ácidos nucleicos antissenso podem ser administrados para diminuir a expressão de uma proteína específica em um sujeito em necessidade da mesma. Os ácidos nucleicos antissenso também podem ser administrados às células *in vitro* para regular a fisiologia celular, por exemplo, para otimizar os sistemas de cultura de células ou tecidos.

[00475] Em algumas modalidades, os transgenes exemplificativos codificados por um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, incluem, mas sem limitação: X, enzimas lisossômicas (por exemplo, hexosaminidase A, associada à doença de Tay-Sachs ou iduronato sulfatase,

associada, com síndrome de Hunter/MPS II), eritropoietina, angiostatina, endostatina, superóxido dismutase, globina, leptina, catalase, tirosina hidroxilase, bem como citocinas (por exemplo, interferon, β-interferon, interferon-γ, interleucina-2, interleucina-4, interleucina 12, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, linfotoxina e similares), fatores de crescimento de peptídeos e hormônios (por exemplo, somatotropina, insulina, fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento de nervos (NGF), fator neurotrófico 3 e 4, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento derivado glial (GDNF), fator de crescimento transformador-α e -β, e similares), receptores (por exemplo, receptor de fator de necrose tumoral). Em algumas modalidades exemplificativas, o transgene codifica um anticorpo monoclonal específico para um ou mais alvos desejados. Em algumas modalidades exemplificativas, mais de um transgene é codificado pelo vetor de ceDNA. Em algumas modalidades exemplificativas, o transgene codifica uma proteína de fusão que compreende dois polipeptídeos de interesse diferentes. Em algumas modalidades, o transgene codifica um anticorpo, incluindo um anticorpo completo ou fragmento de anticorpo, conforme definido no presente documento. Em algumas modalidades, o anticorpo é um domínio de ligação a antígeno ou uma sequência de domínio variável de imunoglobulina, conforme definido no presente documento. Outras sequências transgênicas ilustrativas codificam produtos de genes suicidas (timidina-quinase, citosina-desaminase, toxina de difteria, citocromo P450, desoxicitidina-quinase e fator de necrose tumoral), proteínas que conferem resistência a um medicamento usado na terapia de câncer e produtos de genes supressores de tumores.

[00476] Em uma modalidade representativa, o transgene expresso

por um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode ser usado para o tratamento de distrofia muscular em um sujeito em necessidade do mesmo, em que o método compreende: administrar uma quantidade de vetor de ceDNA descrito no presente documento eficaz para tratamento, amenização ou prevenção, em que o vetor de ceDNA compreende um ácido nucleico heterólogo que codifica distrofina, uma minidistrofina, uma microdistrofina, propeptídeo de miostatina, folistatina, receptor solúvel de ativina tipo II, IGF-1, polipeptídeos anti-inflamatórios, tais como o mutante Ikappa B dominante, sarcospano, utrofina, uma microdistrofina, laminina-α2, α-sarcoglicano, β-sarcoglicano, γ-sarcoglicano, δ-sarcoglicano, IGF-1, um anticorpo ou fragmento de anticorpo contra miostatina ou propeptídeo de miostatina e/ou RNAi contra miostatina. Em modalidades específicas, o vetor de ceDNA produzido sinteticamente pode ser administrado ao músculo esquelético, de diafragma e/ou cardíaco, conforme descrito em outras partes deste documento.

[00477] Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode ser usado para entregar um transgene ao músculo esquelético, cardíaco ou de diafragma, para produção de um polipeptídeo (por exemplo, uma enzima) ou RNA funcional (por exemplo, RNAi, microRNA, RNA antissenso) que normalmente circula no sangue ou para entrega sistêmica a outros tecidos para tratar, amenizar e/ou prevenir um distúrbio (por exemplo, um distúrbio metabólico, tal como diabetes (por exemplo, insulina), hemofilia (por exemplo, VIII), um distúrbio mucopolissacarídico (por exemplo, síndrome de Sly, síndrome de Hurler, síndrome de Scheie, síndrome de Hurler-Scheie, síndrome de Hunter, síndrome de Sanfilippo A, B, C, D, síndrome de Morquio, síndrome de Maroteaux-Lamy, etc.) ou um distúrbio de arma-

zenamento lisossômico (tal como doença de Gaucher [glucocerebrosidase], doença de Pompe [ácido lisossômico alfa-glucosidase] ou doença de Fabry [alfa-galactosidase A]) ou distúrbio de armazenamento de glicogênio (tal como doença de Pompe [ácido lisossômico a glucosidase]). Outras proteínas adequadas para o tratamento, amenização e/ou prevenção de distúrbios metabólicos são descritas acima.

[00478] Em outras modalidades, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode ser usado para entregar um transgene em um método de tratamento, amenização e/ou prevenção de um distúrbio metabólico em um sujeito em necessidade do mesmo. Distúrbios metabólicos e transgenes ilustrativos que codificam polipeptídeos são descritos no presente documento. Opcionalmente, o polipeptídeo é secretado (por exemplo, um polipeptídeo que é um polipeptídeo secretado em seu estado nativo ou que foi projetado para ser secretado, por exemplo, por associação operável com uma sequência de sinal secretora, como é conhecido na técnica).

[00479] Outro aspecto da invenção se refere a um método de tratamento, amenização e/ou prevenção de insuficiência cardíaca congênita ou DAP em um sujeito em necessidade do mesmo, em que o método compreende administrar um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, a um sujeito mamífero, em que o vetor de ceDNA compreende um transgene que codifica, por exemplo, uma Ca^{2+}-ATPase (SERCA2a) de endorretículo sarcoplasmático, um fator angiogênico, inibidor de fosfatase I (I-1), RNAi contra fosfolamban; uma molécula inibidora de fosfolamban ou negativa dominante, tal como fosfolamban S16E, uma proteína de dedo de zinco que regula o gene de fosfolamban, receptor β2-adrenérgico, receptor de quinase 2-adrenérgico (BARK), PI3 quinase, calsarcan, um inibidor de receptor de quinase beta-adrenérgico

(βARKct), inibidor 1 de proteína fosfatase 1, S100A1, parvalbumina, adenilil ciclase tipo 6, uma molécula que afeta receptor de quinase tipo 2 acoplado à proteína G, tal como um βARKct constitutivamente ativo truncado, Pim-1, PGC-1a, SOD-1, SOD-2, EC-SOD, calicreína, HIF, timosina-β4, mir-1, mir -133, mir-206 e/ou mir-208.

[00480] Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode ser administrado aos pulmões de um sujeito por qualquer meio adequado, opcionalmente administrando-se uma suspensão de aerossol de partículas respiráveis que compreendem os vetores de ceDNA, que o sujeito inala. As partículas respiráveis podem ser líquidas ou sólidas. Os aerossóis de partículas líquidas que compreendem os vetores de ceDNA podem ser produzidos por qualquer meio adequado, tal como com um nebulizador de aerossol acionado por pressão ou um nebulizador ultrassônico, conforme é conhecido pelos versados na técnica. Consultar, por exemplo, Pat. 4.501.729. Aerossóis de partículas sólidas que compreendem um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, podem também ser produzidos com qualquer gerador de aerossóis de medicamentos em partículas sólidas, por técnicas conhecidas na técnica farmacêutica.

[00481] Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode ser administrado aos tecidos do CNS (por exemplo, cérebro, olho). Em modalidades específicas, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode ser administrado para tratar, melhorar ou prevenir doenças do CNS, incluindo distúrbios genéticos, distúrbios neurodegenerativos, distúrbios psiquiátricos e tumores. As doenças ilustrativas do CNS incluem, mas sem limitação, doença de Alzheimer,

doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Canavan, doença de Leigh, doença de Refsum, síndrome de Tourette, esclerose lateral primária, esclerose lateral amiotrófica, atrofia muscular progressiva, doença de Pick, distrofia muscular, esclerose múltipla, miastenia grave, doença de Binswanger, traumatismo por lesão medular ou na cabeça, doença de Tay Sachs, doença de Lesch-Nyan, epilepsia, infartos cerebrais, distúrbios psiquiátricos, incluindo distúrbios de humor (por exemplo, depressão, distúrbio afetivo bipolar, distúrbio afetivo persistente, distúrbio de humor secundário), esquizofrenia, dependência de drogas (por exemplo, alcoolismo e outras dependências de substâncias), neuroses (por exemplo, ansiedade, distúrbio obsessivo, distúrbio somatoforme, distúrbio dissociativo, angústia, depressão pós-parto), psicose (por exemplo, alucinações e delírios), demência, paranoia, distúrbio de déficit de atenção, distúrbios psicossexuais, distúrbios do sono, distúrbios de dor, e distúrbios alimentares ou de peso (por exemplo, obesidade, caquexia, anorexia nervosa e bulimia) e câncer e tumores (por exemplo, tumores da hipófise) do CNS.

[00482] Os distúrbios oculares que podem ser tratados, amenizados ou prevenidos com um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, incluem distúrbios oftálmicos que envolvem a retina, trato posterior e nervo óptico (por exemplo, retinite pigmentosa, retinopatia diabética e outras doenças degenerativas da retina, uveíte, degeneração macular relacionada à idade, glaucoma). Muitas doenças e distúrbios oftálmicos estão associados a um ou mais dos três tipos de indicações: (1) angiogênese, (2) inflamação e (3) degeneração. Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode ser empregado para fornecer fatores antiangiogênicos; fatores anti-inflamatórios; fatores que retardam a degeneração celular, promovem a economia de célu-

las ou promovem o crescimento e combinações de células dos itens acima mencionados. A retinopatia diabética, por exemplo, é caracterizada pela angiogênese. A retinopatia diabética pode ser tratada pela administração de um ou mais fatores antiangiogênicos, intraocularmente (por exemplo, no vítreo) ou periocularmente (por exemplo, na região de sub-Tenon). Um ou mais fatores neurotróficos também podem ser entregues conjuntamente, intraocularmente (por exemplo, por via intravítrea) ou periocularmente. As doenças oculares adicionais que podem ser tratadas, amenizadas ou prevenidas com os vetores de ceDNA da invenção incluem atrofia geográfica, degeneração macular vascular ou "úmida", doença de Stargardt, Amaurose Congênita de Leber (LCA), síndrome de Usher, pseudoxantoma elástico (PXE), retinite pigmentar ligada a x (XLRP), retinosquise ligada a x (XLRS), coroideremia, neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON), Arquomatopsia, distrofia de cone-haste, distrofia da córnea endotelial de Fuchs, edema macular diabético e câncer ocular e tumores.

[00483] Em algumas modalidades, doenças ou distúrbios oculares inflamatórios (por exemplo, uveíte) podem ser tratados, amenizados ou prevenidos por um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento. Um ou mais fatores anti-inflamatórios podem ser expressos pela administração intraocular (por exemplo, câmara anterior ou vítrea) de um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento. Em outras modalidades, doenças ou distúrbios oculares caracterizados por degeneração da retina (por exemplo, retinite pigmentosa) podem ser tratados, amenizados ou prevenidos pelos vetores de ceDNA da invenção. Intraocular (por exemplo, administração vítrea) de um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, que codifica um ou mais fatores neurotróficos, pode ser usado para

tratar essas doenças baseadas em degeneração da retina. Em algumas modalidades, doenças ou distúrbios que envolvem tanto a angiogênese quanto a degeneração da retina (por exemplo, degeneração macular relacionada à idade) podem ser tratados com um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento. A degeneração macular relacionada à idade pode ser tratada pela administração de um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, que codifica um ou mais fatores neurotróficos intraocularmente (por exemplo, vítreo) e/ou um ou mais fatores antiangiogênicos intraocularmente ou periocularmente (por exemplo, na região de sub-Tenon). O glaucoma é caracterizado por aumento da pressão ocular e perda de células ganglionares da retina. Os tratamentos para o glaucoma incluem a administração de um ou mais agentes neuroprotetores que protegem as células contra danos excitotóxicos com o uso do vetor de ceDNA, conforme divulgado no presente documento. Consequentemente, esses agentes incluem antagonistas de N-metil-D-aspartato (NMDA), citocinas, e fatores neurotróficos, podem ser entregues por via intraocular, opcionalmente, intravítrea, com o uso de um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento.

[00484] Em outras modalidades, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode ser usado para tratar convulsões, por exemplo, para reduzir o início, a incidência ou a gravidade de convulsões. A eficácia de um tratamento terapêutico para convulsões pode ser avaliada por meios comportamentais (por exemplo, tremores, tiques nos olhos ou na boca) e/ou eletrográficos (a maioria das convulsões tem anormalidades eletrográficas marcadas). Assim, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente

documento, também pode ser usado para tratar a epilepsia, que é marcada por múltiplas convulsões ao longo do tempo. Em uma modalidade representativa, a somatostatina (ou um fragmento ativo da mesma) é administrada ao cérebro com o uso de um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, para tratar um tumor da hipófise. De acordo com esta modalidade, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, codificando somatostatina (ou um fragmento ativo da mesma) é administrado por microinfusão na hipófise. Da mesma forma, esse tratamento pode ser usado para tratar a acromegalia (secreção de hormônio de crescimento anormal da hipófise). O ácido nucleico (por exemplo, nº de Acesso ao GenBank J00306) e o aminoácido (por exemplo, nº de Acesso ao GenBank P01166; contém peptídeos ativos processados somatostatin-28 e somatostatin-14) sequências de somatostatinas, como são conhecidos na técnica. Em modalidades particulares, o vetor de ceDNA pode codificar um transgene que compreende um sinal secretório, conforme descrito na Patente US 7.071.172.

[00485] Outro aspecto da invenção se refere ao uso de um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, para produzir RNA antissenso, RNAi ou outro RNA funcional (por exemplo, uma ribozima) para entrega sistêmica a um sujeito *in vivo.* Por conseguinte, em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode compreender um transgene que codifica um ácido nucleico antissenso, uma ribozima (por exemplo, conforme descrito na Patente nº US 5.877.022), RNAs que afetam trans-splicing mediado por spliceossoma (consultar Puttaraju et al., (1999) Nature Biotech. 17:246; US 6.013.487; US 6.083.702), RNAs interferentes (RNAi) que interferem no silenciamento

de genes (consultar Sharp et al., (2000) Science 287: 2.431) ou outros RNAs não traduzidos, tais como RNAs "guia" (Gorman et al., (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. EUA 95:4.929; Patente US nº 5.869.248 de Yuan et al.) e similares.

[00486] Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, também pode compreender um transgene que codifica um polipeptídeo repórter (por exemplo, uma enzima como a Proteína Verde Fluorescente ou a fosfatase alcalina). Em algumas modalidades, um transgene que codifica uma proteína repórter útil para fins experimentais ou de diagnósticos é selecionado a partir de qualquer um dentre: β-lactamase, β-galactosidase (LacZ), fosfatase alcalina, timidina cinase, proteína verde fluorescente (GFP), cloranfenicol acetiltransferase (CAT), luciferase e outros bem-conhecidos na técnica. Em alguns aspectos, vetores de ceDNA produzidos sinteticamente que compreendem um transgene que codifica um polipeptídeo repórter podem ser usados para fins de diagnóstico ou como marcadores da atividade do vetor de ceDNA no sujeito ao qual são administrados.

[00487] Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode compreender um transgene ou uma sequência nucleotídica heteróloga que compartilha homologia com, e se recombina com, um local no cromossomo hospedeiro. Essa abordagem pode ser utilizada para corrigir um defeito genético na célula hospedeira.

[00488] Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produzido pelos métodos de produção sintéticos, conforme descrito no presente documento, pode compreender um transgene que pode ser usado para expressar um polipeptídeo imunogênico em um sujeito, por exemplo, para vacinação. O transgene pode codificar qualquer imunógeno de interesse conhecido na técnica, incluindo, mas sem limitação,

imunógenos de vírus de imunodeficiência humana, vírus da gripe, proteínas gag, antígenos tumorais, antígenos de câncer, antígenos bacterianos, antígenos virais e similares.

D. TESTE DE EXPRESSÃO GÊNICA BEM-SUCEDIDA COM O USO DE UM VETOR DE ceDNA

[00489] Os ensaios bem-conhecidos na técnica podem ser usados para testar a eficiência de entrega de genes por um vetor de ceDNA produzido sinteticamente e podem ser realizados em modelos *in vitro* e *in vivo*. A penetração ou a eliminação de um transgene desejado por um ceDNA produzido sinteticamente podem ser avaliadas por um versado na técnica, medindo-se os níveis de mRNA e de proteína do transgene desejado (por exemplo, PCR de transcrição reversa, análise de *Western Blot*) e ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA)). As alterações de ácidos nucleicos pelo ceDNA produzido sinteticamente (por exemplo, mutações pontuais ou deleção de regiões de DNA) podem ser avaliadas por sequenciamento profundo de DNA-alvo genômico. Em uma modalidade, o ceDNA produzido sinteticamente compreende uma proteína repórter que pode ser usada para avaliar a expressão do transgene desejado, por exemplo, examinando-se a expressão da proteína repórter por microscopia de fluorescência ou um leitor de placa de luminescência. Para aplicações *in vivo*, podem ser utilizados ensaios de função proteica para testar a funcionalidade de um determinado gene e/ou produto gênico para determinar se a expressão gênica ocorreu de modo bem-sucedido. Por exemplo, prevê-se que uma mutação pontual no gene regulador de condutância de transmembrana de fibrose cística (CFTR) iniba a capacidade de CFTR de mover ânions (por exemplo, Cl^-) através do canal de ânion, pode ser corrigida entregando-se um gene de CFTR funcional (isto é, não mutado) ao sujeito com um vetor de ceDNA. Após a administração de um vetor de ceDNA, uma pessoa versada na técnica pode avaliar a

capacidade de ânions de se moverem através do canal aniônico para determinar se o gene de CFTR foi entregue e expresso. Uma pessoa versada na técnica será capaz de determinar o melhor teste para medir a funcionalidade de uma proteína *in vitro* ou *in vivo.*

[00490] Contempla-se no presente documento que os efeitos da expressão gênica do transgene a partir do vetor de ceDNA em uma célula ou sujeito podem durar pelo menos 1 mês, pelo menos 2 meses, pelo menos 3 meses, pelo menos quatro meses, pelo menos 5 meses, pelo menos seis meses, pelo menos 10 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 2 anos, pelo menos 5 anos, pelo menos 10 anos, pelo menos 20 anos, ou pode ser permanente.

[00491] Em algumas modalidades, um transgene no cassete de expressão, construto de expressão ou vetor de ceDNA descrito no presente documento pode ser otimizado por códon para a célula hospedeira. Conforme usado no presente documento, o termo "códon otimizado" ou "otimização de códon" se refere ao processo de modificação de uma sequência de ácido nucleico para expressão melhorada nas células do vertebrado de interesse, por exemplo, camundongo ou ser humano (por exemplo, humanizado), substituindo-se pelo menos um, mais de um ou um número significativo de códons da sequência nativa (por exemplo, uma sequência procariótica) com códons que são mais frequentemente ou com a máxima frequência usados nos genes desse vertebrado. Várias espécies exibem viés particular para determinados códons de um aminoácido específico. Tipicamente, a otimização de códon não altera a sequência de aminoácidos da proteína traduzida original. Os códons otimizados podem ser determinados utilizando, por exemplo, a plataforma de otimização de códons Gene Forge® da Aptagen e síntese genética personalizada (Aptagen, Inc.) ou outro banco de dados publicamente disponível.

XI. ADMINISTRAÇÃO

[00492] Em modalidades específicas, mais de uma administração (por exemplo, duas, três, quatro ou mais administrações) pode ser empregada para atingir o nível desejado de expressão gênica durante um período de vários intervalos, por exemplo, diário, semanal, mensal, anual, etc.

[00493] Exemplos de modos de administração de um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, inclui via oral, retal, transmucosal, intranasal, inalação (por exemplo, via aerossol), bucal (por exemplo, sublingual), vaginal, intratecal, intraocular, transdérmica, intraendotelial, *in utero* (ou *in ovo*), parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intradérmica, intracraniana, intramuscular [incluindo administração no músculo esquelético, de diafragma e/ou cardíaco], intrapleural, intracerebral e intra-articular), tópica (por exemplo, tanto na pele como nas superfícies de mucosas, incluindo as vias aéreas e administração transdérmica), intralinfática e similares, bem como injeção direta de tecido ou órgão (por exemplo, fígado, olho, músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo de diafragma ou cérebro).

[00494] A administração de um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser em qualquer sítio em um sujeito, incluindo, sem limitação, um sítio selecionado a partir do grupo que consiste no cérebro, um músculo esquelético, músculo liso, coração, diafragma, epitélio das vias aéreas, fígado, rim, baço, pâncreas, pele e olhos. A administração do vetor de ceDNA produzido sinteticamente também pode ser em um tumor (por exemplo, em ou próximo a um tumor ou um linfonodo). A via mais adequada em qualquer caso dependerá da natureza e gravidade da afecção a ser tratada, amenizada e/ou impedida e da natureza do vetor de ceD-

NA específico que está sendo usado. Além disso, um vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, permite administrar mais de um transgene em um único vetor ou vários vetores de ceDNA (por exemplo, um coquetel de ceDNA).

[00495] A administração de um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, para o músculo esquelético, de acordo com a presente invenção, inclui, mas sem limitação, a administração ao músculo esquelético nos membros (por exemplo, parte superior do braço, parte inferior do braço, parte superior da perna e/ou parte inferior da perna), costas, pescoço, cabeça (por exemplo, língua), tórax, abdômen, pelve/períneo e/ou digitais. O vetor de ceDNA produzido sinteticamente pode ser entregue ao músculo esquelético por administração intravenosa, administração intra-arterial, administração intraperitoneal, perfusão de membro (opcionalmente, perfusão de membro isolada de uma perna e/ou braço; consultar, por exemplo, Arruda et al., (2005) Blood 105: 3.458 a 3.464) e/ou injeção intramuscular direta. Em modalidades específicas, o vetor de ceDNA conforme divulgado no presente documento é administrado a um membro (braço e/ou perna) de um sujeito (por exemplo, um sujeito com distrofia muscular, tal como DMD) por perfusão de membro, perfusão de membro opcionalmente isolada (por exemplo, por via intravenosa ou administração intra-articular. Em determinadas modalidades, um vetor de DNA, incluindo um vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser administrado sem o emprego de técnicas "hidrodinâmicas".

[00496] A administração de um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, no músculo

cardíaco, inclui a administração no átrio esquerdo, átrio direito, ventrículo esquerdo, ventrículo direito e/ou septo. O vetor de ceDNA produzido sinteticamente, conforme descrito no presente documento, pode ser entregue ao músculo cardíaco por administração intravenosa, administração intra-arterial, tal como administração intra-aórtica, injeção cardíaca direta (por exemplo, em átrio esquerdo, átrio direito, ventrículo esquerdo, ventrículo direito) e/ou perfusão da artéria coronária. A administração ao músculo do diafragma pode ser por qualquer método adequado, incluindo administração intravenosa, administração intra-arterial e/ou administração intraperitoneal. A administração ao músculo liso pode ser por qualquer método adequado, incluindo administração intravenosa, administração intra-arterial e/ou administração intraperitoneal. Em uma modalidade, a administração pode ser em células endoteliais presentes no músculo, próximo e/ou no músculo liso.

[00497] Em algumas modalidades, um vetor de DNA, incluindo um vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético descrito no presente documento, é administrado ao músculo esquelético, músculo do diafragma e/ou músculo cardíaco (por exemplo, para tratar, amenizar e/ou prevenir distrofia muscular ou doença cardíaca (por exemplo, PAD ou insuficiência cardíaca congestiva).

A. TRATAMENTO *EX VIVO*

[00498] Em algumas modalidades, as células são removidas de um sujeito, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, é introduzido no mesmo, e as células são, então, substituídas de volta no sujeito. Os métodos de remoção de células do sujeito para tratamento *ex vivo*, seguidos de introdução ao sujeito, são conhecidos na técnica (consultar, por exemplo, Patente nº US 5.399.346; cuja descrição é incorporada ao presente documento em sua totalidade). Alternativamente, um vetor de DNA de extremida-

de fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético conforme descrito no presente documento, é introduzido em células de outro sujeito, em células cultivadas ou em células de qualquer outra fonte adequada, e as células são administradas a um sujeito em necessidade.

[00499] As células transduzidas com um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, são, de preferência, administradas ao sujeito em uma "quantidade terapeuticamente eficaz" em combinação com um carreador farmacêutico. Aqueles de habilidade comum na técnica compreenderão que os efeitos terapêuticos não precisam ser completos ou curativos, desde que seja fornecido algum benefício ao sujeito.

[00500] Em algumas modalidades, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode codificar um transgene (às vezes denominado sequência de nucleotídeos heteróloga) que é qualquer polipeptídeo que seja desejavelmente produzido em uma célula *in vitro, ex vivo* ou *in vivo*. Por exemplo, em contraste com o uso dos vetores de ceDNA em um método de tratamento, conforme discutido anteriormente no presente documento, em algumas modalidades um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser introduzido em células cultivadas e o produto gênico expresso isolado a partir das mesmas, por exemplo, para a produção de antígenos ou vacinas.

[00501] Um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser usado em aplicações veterinárias e médicas. Os sujeitos adequados para os métodos de entre-

ga de genes *ex vivo*, conforme descrito acima, incluem tanto aves (por exemplo, galinhas, patos, gansos, codornas, perus e faisões) quanto mamíferos (por exemplo, seres humanos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, felinos, caninos e lagomorfos), sendo preferenciais os mamíferos. Os seres humanos são os preferidos. Os seres humanos incluem recém-nascidos, bebês, jovens e adultos.

[00502] Um aspecto da tecnologia descrita no presente documento se refere a um método de entrega de um transgene a uma célula. Tipicamente, para métodos *in vitro*, um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser introduzido na célula com o uso dos métodos como aqui divulgados, bem como outros métodos conhecidos na técnica. Um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento aqui divulgado, é, de preferência, administrado à célula em uma quantidade biologicamente eficaz. Se um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, for administrado a uma célula *in vivo* (por exemplo, a um sujeito), uma quantidade biologicamente eficaz do vetor de ceDNA será uma quantidade que é suficiente para resultar na transdução e expressão do transgene em uma célula-alvo.

B. FAIXAS DE DOSES

[00503] Ensaios *in vivo* e/ou *in* vitro podem ser opcionalmente empregados para ajudar a identificar faixas de dosagem ideais para uso do vetor de ceDNA produzido sinteticamente. A dose exata a ser empregada na formulação também dependerá da via de administração e da gravidade da condição, e deve ser decidida de acordo com o julgamento da pessoa versada na técnica e das circunstâncias de cada

sujeito. As doses efetivas podem ser extrapoladas a partir de curvas de dose-resposta derivadas de sistemas de teste *in vitro* ou em modelo animal.

[00504] Um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, é administrado em quantidades suficientes para transfectar as células de um tecido desejado e para fornecer níveis suficientes de transferência e expressão gênica sem efeitos adversos indevidos. As vias de administração convencionais e farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas sem limitação, as descritas acima na seção "Administração", como entrega direta ao órgão selecionado (por exemplo, entrega intraportal ao fígado), oral, inalação (incluindo administração intranasal e intratraqueal), intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intradérmica, intratumoral e outras vias de administração parentais. As vias de administração podem ser combinadas, se desejado.

[00505] A dose da quantidade de um vetor de ceDNA produzido sinteticamente necessária para obter um "efeito terapêutico" específico variará com base em vários fatores, incluindo, mas sem limitação: a via de administração de ácido nucleico, o nível de expressão de gene ou RNA necessário para alcançar um efeito terapêutico, a doença ou distúrbio específico a ser tratado e a estabilidade do gene (ou genes), produto (ou produtos) de RNA ou proteína (ou proteínas) expressa resultante. Um indivíduo versado na técnica pode determinar rapidamente um intervalo de dose do vetor de ceDNA produzido sinteticamente para tratar um paciente que tem uma doença ou distúrbio específico com base nos fatores acima mencionados, bem como outros fatores bem-conhecidos na técnica.

[00506] O regime de dosagem pode ser ajustado para fornecer a resposta terapêutica ideal. Por exemplo, o oligonucleotídeo pode ser

administrado repetidamente, por exemplo, várias doses podem ser administradas diariamente ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. Um versado na técnica será capaz de determinar prontamente doses e esquemas de administração apropriados dos oligonucleotídeos-objeto, se os oligonucleotídeos tiverem que ser administrados às células ou aos sujeitos.

[00507] Uma "dose terapeuticamente eficaz" cairá em uma faixa relativamente ampla que pode ser determinada através de ensaios clínicos e dependerá da aplicação específica (as células neurais exigirão quantidades muito pequenas, enquanto a injeção sistêmica exigirá grandes quantidades). Por exemplo, para injeção direta *in vivo* no músculo esquelético ou cardíaco de um sujeito humano, uma dose terapeuticamente eficaz será da ordem de cerca de 1 µg a 100 g do vetor de ceDNA. Se exossomos ou micropartículas forem usadas para entregar um vetor de DNA, incluindo um vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, uma dose terapeuticamente eficaz pode ser determinada experimentalmente, mas espera-se que entregue de 1 µg a cerca de 100 g de vetor. Além disso, uma dose terapeuticamente eficaz é uma quantidade de vetor de ceDNA que expressa uma quantidade suficiente do transgene para ter um efeito sobre o sujeito que resulte em uma redução em um ou mais sintomas da doença, mas não resulta em perda significativa ou efeitos colaterais adversos significativos.

[00508] A formulação de excipientes e soluções carreadoras farmaceuticamente aceitáveis é bem-conhecida pelos indivíduos de habilidade na técnica, assim como o desenvolvimento de regimes de dosagem e tratamento adequados para usar as composições específicas descritas no presente documento em uma variedade de regimes de tratamento.

[00509] Para transfecção *in vitro*, uma quantidade eficaz de um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético descrito no presente documento para ser entregue às células (1 x 10^6 células) será da ordem de 0,1 a 100 μg de vetor de ceDNA, de preferência, 1 a 20 μg, e com mais preferência, 1 a 15 μg ou 8 a 10 μg. Vetores de ceDNA maiores exigirão doses mais altas. Se forem utilizados exossomos ou micropartículas, uma dose eficaz *in vitro* pode ser determinada experimentalmente, mas se destina a fornecer geralmente a mesma quantidade do vetor de ceDNA.

[00510] O tratamento pode envolver a administração de uma dose única ou de múltiplas doses. Em algumas modalidades, mais de uma dose pode ser administrada a um sujeito; de fato, múltiplas doses podem ser administradas conforme necessário, pois o vetor de ceDNA produzido sinteticamente desencadeia não desencadeia uma resposta imune do hospedeiro antidesmídeo devido à ausência de um capsídeo viral, e sua formulação não contém contaminantes celulares indesejados devido à sua produção sintética. Sendo assim, um indivíduo de habilidade na técnica pode determinar rapidamente um número apropriado de doses. O número de doses administradas pode, por exemplo, ser da ordem de 1 a 100, de preferência, 2 a 20 doses.

[00511] Sem desejar estar vinculado a nenhuma teoria em particular, a falta de resposta imune antiviral típica provocada pela administração de um vetor de ceDNA produzido sinteticamente, conforme descrito na descrição (isto é, a ausência de componentes de capsídeo) permite que o vetor de ceDNA produzido sinteticamente seja administrado a um hospedeiro em várias ocasiões. Em algumas modalidades, o número de ocasiões em que um ácido nucleico heterólogo é entregue a um sujeito varia de 2 a 10 vezes (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 vezes) Em algumas modalidades, um vetor de ceDNA produ-

zido sinteticamente é entregue a um sujeito mais de 10 vezes.

[00512] Em algumas modalidades, uma dose de um vetor de ceDNA produzido sinteticamente é administrada a um sujeito somente uma vez ao dia (por exemplo, um período de 24 horas). Em algumas modalidades, uma dose de um vetor de ceDNA produzido sinteticamente é administrada a um sujeito não mais do que uma vez a cada 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dias corridos. Em algumas modalidades, uma dose de um vetor de ceDNA produzido sinteticamente é administrada a um sujeito não mais do que uma vez por semana (por exemplo, 7 dias corridos). Em algumas modalidades, uma dose de um vetor de ceDNA produzido sinteticamente é administrada a um sujeito não mais do que bissemanalmente (por exemplo, uma vez em um período de duas semanas). Em algumas modalidades, uma dose de um vetor de ceDNA produzido sinteticamente é administrada a um sujeito não mais do que uma vez por mês (por exemplo, uma vez em 30 dias corridos). Em algumas modalidades, uma dose de um vetor de ceDNA produzido sinteticamente é administrada a um sujeito não mais do que uma vez a cada seis meses. Em algumas modalidades, uma dose de um vetor de ceDNA produzido sinteticamente é administrada a um sujeito não mais do que uma vez por ano (por exemplo, 365 dias ou 366 dias em um ano bissexto).

C. FORMAS FARMACÊUTICAS UNITÁRIAS

[00513] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas podem ser convenientemente apresentadas na forma de dosagem unitária. Uma forma de dosagem unitária será tipicamente adaptada a uma ou mais vias de administração específicas da composição farmacêutica. Em algumas modalidades, a forma de dosagem unitária é adaptada para administração por inalação. Em algumas modalidades, a forma de dosagem unitária é adaptada para administração por um vaporizador. Em algumas modalidades, a forma de dosagem unitária é

adaptada para administração por um nebulizador. Em algumas modalidades, a forma de dosagem unitária é adaptada para administração por um aerossolizador. Em algumas modalidades, a forma de dosagem unitária é adaptada para administração oral, para administração bucal ou para administração sublingual. Em algumas modalidades, a forma de dosagem unitária é adaptada para administração intravenosa, intramuscular ou subcutânea. Em algumas modalidades, a forma de dosagem unitária é adaptada para administração intratecal ou intracerebroventricular. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é formulada para administração tópica. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material carreador para produzir uma forma de dosagem única será geralmente a quantidade do composto que produz um efeito terapêutico.

XII. VÁRIAS APLICAÇÕES

[00514] As composições e o vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo vetores de ceDNA, produzidos com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, podem ser usados para fornecer um transgene para vários propósitos, conforme descrito acima. Em algumas modalidades, um transgene pode codificar uma proteína ou ser um RNA funcional e, em algumas modalidades, pode ser uma proteína ou RNA funcional que é modificado para fins de pesquisa, por exemplo, para criar um modelo animal transgênico somático que abrigue uma ou mais mutações ou uma sequência de genes corrigida, por exemplo, para estudar a função do gene-alvo. Em outro exemplo, o transgene codifica uma proteína ou RNA funcional para criar um modelo animal de doença.

[00515] Em algumas modalidades, o transgene codifica um ou mais peptídeos, polipeptídeos ou proteínas, que são úteis para o tratamento, melhoria ou prevenção de estados de doença em um mamífero. O transgene expresso pelo vetor de ceDNA produzido sinteticamente é

administrado a um paciente em quantidade suficiente para tratar uma doença associada a uma sequência genética anormal, que pode resultar em um ou mais dos seguintes: expressão reduzida, falta de expressão ou disfunção do gene-alvo.

[00516] Em algumas modalidades, um vetor de DNA, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, é previsto para uso em métodos de diagnóstico e triagem, nos quais um transgene é expresso de forma transitória ou estável em um sistema de cultura de células ou, alternativamente, um modelo animal transgênico.

[00517] Outro aspecto da tecnologia descrita no presente documento fornece um método de transdução de uma população de células de mamíferos. Em um sentido global e geral, o método inclui pelo menos a etapa de introdução em uma ou mais células da população, uma composição que compreende uma quantidade eficaz de um ou mais do ceDNA produzido sinteticamente divulgado no presente documento.

[00518] Além disso, a presente invenção fornece composições, bem como kits terapêuticos e/ou de diagnóstico, que incluem um ou mais dos vetores de DNA de extremidade fechada divulgados, incluindo uma composição de vetor de ceDNA, produzida com o uso do processo sintético conforme descrito no presente documento, formulado com um ou mais ingredientes adicionais ou preparados com uma ou mais instruções de uso.

[00519] Uma célula a ser administrada um vetor de DNA de extremidade fechada, incluindo um vetor de ceDNA, produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser de qualquer tipo, incluindo, mas sem limitação, a células neurais (incluindo células dos sistemas nervoso periférico e central, em células cerebrais), células pulmonares, células da retina, células epiteliais (por exemplo, células epiteliais do intestino e respiratórias), células muscu-

lares, células dendríticas, células pancreáticas (incluindo células das ilhotas), células hepáticas, células do miocárdio, células ósseas (por exemplo, células-tronco da medula óssea), células-tronco hematopoiéticas, células do baço, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células da próstata, células germinativas e similares. Alternativamente, a célula pode ser qualquer célula progenitora. Como alternativa adicional, a célula pode ser uma célula-tronco (por exemplo, célula-tronco neural, célula-tronco hepática). Ainda como alternativa adicional, a célula pode ser uma célula de câncer ou tumor. Além disso, as células podem ser de qualquer espécie de origem, conforme indicado acima.

[00520] Em algumas modalidades, o presente pedido pode ser definido em qualquer um dos seguintes parágrafos:

[00521] 1. Um método para preparar um vetor de DNA que compreende:

[00522] entrar em contato com um construto de DNA de filamento duplo que compreende:

[00523] um cassete de expressão;

[00524] uma ITR a montante (extremidade 5') do cassete de expressão;

[00525] uma ITR a jusante (extremidade 3') do cassete de expressão;

[00526] e pelo menos dois sítios de endonucleases de restrição que flanqueiam as ITRs, de modo que as endonucleases de restrição estejam distais ao cassete de expressão

[00527] com uma ou mais endonucleases de restrição que podem clivar o construto de DNA de filamento duplo nos sítios de endonuclease de restrição para extirpar as sequências entre os sítios de endonuclease de restrição do construto de DNA; e

[00528] ligar as extremidades 5' e 3' da sequência excisada para formar um vetor de DNA, em que pelo menos uma ITR é uma ITR mo-

dificada.

[00529] 2. O método, de acordo com o parágrafo 1, em que o construto de DNA de filamento duplo é um bacmídeo, plasmídeo, minicírculo ou uma molécula de DNA linear de filamento duplo.

[00530] 3. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 ou 2, em que a ITR a montante do cassete de expressão é uma ITR do tipo selvagem.

[00531] 4. O método, de acordo com o parágrafo 3, em que a ITR do tipo selvagem compreende um polinucleotídeo das SEQ ID NO: 1, 2 ou 5 a 14.

[00532] 5. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 4, em que a ITR a jusante do cassete de expressão é uma ITR modificada.

[00533] 6. Um método, de acordo com o parágrafo 5, em que a ITR modificada compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 3.

[00534] 7. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 ou 2, em que a ITR a montante do cassete de expressão é uma ITR modificada.

[00535] 8. O método, de acordo com o parágrafo 7, em que a ITR modificada compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 4.

[00536] 9. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 7 ou 8, em que a ITR a jusante do cassete de expressão é uma ITR do tipo selvagem.

[00537] 10. O método, de acordo com o parágrafo 9, em que a ITR do tipo selvagem compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 1.

[00538] 11. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 10, em que a ITR é competente para replicação.

[00539] 12. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 11, em que a ITR é uma ITR de AAV.

[00540] 13. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos

1 a 12, em que o cassete de expressão compreende um elemento cis-regulador.

[00541] 14. O método, de acordo com o parágrafo 13, em que o elemento cis-regulador é selecionado a partir do grupo que consiste em um elemento regulador pós-transcricional e um sinal BGH poli-A.

[00542] 15. O método, de acordo com o parágrafo 14, em que o elemento regulador pós-transcrição compreende um elemento regulador pós-transcrição WHP (WPRE).

[00543] 16. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 15, em que o cassete de expressão compreende adicionalmente um promotor selecionado a partir do grupo que consiste no promotor de CAG, promotor de AAT, promotor de LP1 e promotor de EF1a.

[00544] 17. O método, de acordo com o parágrafo 16, em que o dito cassete de expressão compreende polinucleotídeos de SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 123 ou SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 67 e SEQ ID NO: 68.

[00545] 18. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 17, em que o dito cassete de expressão compreende ainda uma sequência exógena.

[00546] 19. O método, de acordo com os parágrafos 1 a 18, em que a sequência exógena compreende pelo menos 2.000 ou 5.000 nucleotídeos.

[00547] 20. O método, de acordo com o parágrafo 19, em que a sequência exógena codifica uma proteína.

[00548] 21. O método, de acordo com o parágrafo 20, em que a sequência exógena codifica uma proteína repórter, proteína terapêutica, um antígeno, uma proteína de edição de genes ou uma proteína citotóxica.

[00549] 22. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 21, em que o vetor de DNA tem uma estrutura linear e contínua.

[00550] 23. Um vetor de DNA gerado pelo método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 22.

[00551] 24. Uma composição farmacêutica que compreende: o vetor de DNA, de acordo com o parágrafo 23; e opcionalmente, um excipiente.

[00552] 25. Um polinucleotídeo para gerar um vetor de DNA que compreende:

[00553] um cassete de expressão;

[00554] uma ITR a montante (extremidade 5') do cassete de expressão;

[00555] uma ITR a jusante (extremidade 3') do cassete de expressão;

[00556] e pelo menos dois sítios de endonucleases de restrição que flanqueiam as ITRs, de modo que as endonucleases de restrição estejam distais ao cassete de expressão, em que pelo menos uma ITR é uma ITR modificada.

[00557] 26. O polinucleotídeo, de acordo com o parágrafo 25, em que o polinucleotídeo é um bacmídeo, plasmídeo, minicírculo ou uma molécula de DNA linear de filamento duplo.

[00558] 27. O polinucleotídeo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 25 ou 26, em que a ITR a montante do cassete de expressão é uma ITR do tipo selvagem.

[00559] 28. O polinucleotídeo, de acordo com o parágrafo 27, em que a ITR do tipo selvagem compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 2.

[00560] 29. O polinucleotídeo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 25 a 28, em que a ITR a jusante do cassete de expressão é uma ITR modificada.

[00561] 30. O polinucleotídeo, de acordo com o parágrafo 29, em que a ITR modificada compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO:

3.

[00562] 31. O polinucleotídeo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 25 ou 26, em que a ITR a montante do cassete de expressão é uma ITR modificada.

[00563] 32. O polinucleotídeo, de acordo com o parágrafo 31, em que a ITR modificada compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 4.

[00564] 33. O polinucleotídeo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 31 ou 32, em que a ITR a jusante do cassete de expressão é uma ITR do tipo selvagem.

[00565] 34. O polinucleotídeo, de acordo com o parágrafo 33, em que a ITR do tipo selvagem compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 1.

[00566] 35. O polinucleotídeo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 25 a 34, em que o ITR do tipo selvagem é competente para replicação.

[00567] 36. O polinucleotídeo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 25 a 35, em que a ITR é uma ITR de AAV.

[00568] 37. O polinucleotídeo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 25 a 36, em que o cassete de expressão compreende um elemento cis-regulador.

[00569] 38. O polinucleotídeo, de acordo com o parágrafo 37, em que o elemento cis-regulador é selecionado a partir do grupo que consiste em um elemento regulador pós-transcricional e um sinal BGH poli-A.

[00570] 39. O polinucleotídeo, de acordo com o parágrafo 38, em que o elemento regulador pós-transcricional compreende um elemento regulador pós-transcricional WHP (WPRE).

[00571] 40. O polinucleotídeo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 25 a 39, em que o cassete de expressão compreende ainda

um promotor selecionado a partir do grupo que consiste no promotor de CAG, no promotor de AAT, no promotor de LP1 e no promotor de EF1a.

[00572] 41. O polinucleotídeo, de acordo com o parágrafo 40, em que o dito cassete de expressão compreende polinucleotídeos de SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 123 ou SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 67 e SEQ ID NO: 68.

[00573] 42. O polinucleotídeo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 25 a 41, em que o dito cassete de expressão compreende ainda uma sequência exógena.

[00574] 43. O polinucleotídeo, de acordo com o parágrafo 42, em que a sequência exógena compreende pelo menos 5.000 nucleotídeos.

[00575] 44. O polinucleotídeo, de acordo com o parágrafo 43, em que a sequência exógena codifica uma proteína.

[00576] 45. O polinucleotídeo, de acordo com o parágrafo 44, em que a sequência exógena codifica uma proteína repórter, proteína terapêutica, um antígeno, uma proteína de edição de genes ou uma proteína citotóxica.

[00577] 46. O polinucleotídeo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 25 a 45, em que o vetor de DNA tem uma estrutura linear e contínua.

[00578] 47. Um método para preparar um vetor de DNA que compreende:

[00579] sintetizar uma molécula de filamento simples que compreende, de 5' a 3':

[00580] uma primeira ITR senso;

[00581] uma sequência cassete de expressão senso;

[00582] uma segunda ITR senso;

[00583] uma sequência em forma de gancho;

[00584] uma segunda ITR antissenso;

[00585] uma sequência cassete de expressão antissenso; e

[00586] uma primeira ITR antissenso;

[00587] formar um polinucleotídeo em forma de gancho a partir da molécula de filamento simples;

[00588] e ligar as extremidades 5' e 3' para formar o vetor de DNA, em que uma pelo menos uma ITR é uma ITR modificada.

[00589] 48. O método, de acordo com o parágrafo 47, em que a primeira ITR é uma ITR do tipo selvagem.

[00590] 49. O método, de acordo com o parágrafo 48, em que a ITR do tipo selvagem compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 2.

[00591] 50. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 47 a 49, em que a segunda ITR é uma ITR modificada.

[00592] 51. O método, de acordo com o parágrafo 50, em que a ITR modificada compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 3.

[00593] 52. O método, de acordo com o parágrafo 47, em que a primeira ITR a montante é uma ITR modificada.

[00594] 53. O método, de acordo com o parágrafo 52, em que a ITR modificada compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 4.

[00595] 54. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 52 ou 53, em que a segunda ITR é uma ITR do tipo selvagem.

[00596] 55. O método, de acordo com o parágrafo 54, em que a ITR do tipo selvagem compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 1.

[00597] 56. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 47 a 55, em que a ITR do tipo selvagem é competente para replicação.

[00598] 57. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 47 a 56, em que a ITR é uma ITR de AAV.

[00599] 58. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 47 a 57, em que o cassete de expressão compreende um elemento cis-regulador.

[00600] 59. O método, de acordo com o parágrafo 58, em que o elemento cis-regulador é selecionado a partir do grupo que consiste em um elemento regulador pós-transcricional e um sinal BGH poli-A.

[00601] 60. O método, de acordo com o parágrafo 59, em que o elemento regulador pós-transcricional compreende um elemento regulador pós-transcricional WHP (WPRE).

[00602] 61. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 47 a 60, em que o cassete de expressão compreende adicionalmente um promotor selecionado a partir do grupo que consiste no promotor de CAG, no promotor de AAT, no promotor de LP1 e no promotor de EF1a.

[00603] 62. O método, de acordo com o parágrafo 61, em que o dito cassete de expressão compreende polinucleotídeos de SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 123 ou SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 67 e SEQ ID NO: 68.

[00604] 63. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 47 a 62, em que o dito cassete de expressão compreende ainda uma sequência exógena.

[00605] 64. O método, de acordo com o parágrafo 63, em que a sequência exógena compreende pelo menos 2.000 nucleotídeos.

[00606] 65. O método, de acordo com o parágrafo 63, em que a sequência exógena codifica uma proteína.

[00607] 66. O método, de acordo com o parágrafo 65, em que a sequência exógena codifica uma proteína repórter, proteína terapêutica, um antígeno, uma proteína de edição de genes ou uma proteína citotóxica.

[00608] 67. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 47 a 66, em que o vetor de DNA tem uma estrutura linear e contínua.

[00609] 68. Um vetor de DNA gerado pelo método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 47 a 67.

[00610] 69. Uma composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende:

[00611] o vetor de DNA de acordo com o parágrafo 68; e

[00612] opcionalmente, um excipiente.

[00613] 70. Um método para preparar um vetor de DNA que compreende:

[00614] sintetizar uma primeira molécula de ITR de filamento simples que compreende uma primeira ITR;

[00615] sintetizar uma segunda molécula de ITR de filamento simples que compreende uma segunda ITR;

[00616] fornecer um polinucleotídeo de filamento duplo que compreende uma sequência cassete de expressão; e

[00617] ligar as extremidades 5' e 3' da primeira molécula de ITR a uma primeira extremidade da molécula de filamento duplo e ligar as extremidades 5' e 3' da segunda molécula de ITR à segunda extremidade da molécula de filamento duplo para formar o vetor de DNA.

[00618] 71. O método, de acordo com o parágrafo 70, em que o polinucleotídeo de filamento duplo é fornecido através da excisão da molécula de filamento duplo de um construto de DNA de filamento duplo.

[00619] 72. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 70 ou 71, em que a primeira ITR é uma ITR do tipo selvagem.

[00620] 73. O método, de acordo com o parágrafo 72, em que a ITR do tipo selvagem compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 2.

[00621] 74. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 70 a 73, em que a segunda ITR é uma ITR modificada.

[00622] 75. O método, de acordo com o parágrafo 74, em que a ITR modificada compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 3.

[00623] 76. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 70 ou 71, em que a primeira ITR a montante é uma ITR modificada.

[00624] 77. O método, de acordo com o parágrafo 76, em que a ITR

modificada compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 4.

[00625] 78. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 76 ou 77, em que a segunda ITR é uma ITR do tipo selvagem.

[00626] 79. O método, de acordo com o parágrafo 78, em que a ITR do tipo selvagem compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 1.

[00627] 80. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 70 a 79, em que a ITR do tipo selvagem é competente para replicação.

[00628] 81. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 70 a 80, em que a ITR é uma ITR de AAV.

[00629] 82. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 70 a 81, em que o cassete de expressão compreende um elemento cis-regulador.

[00630] 83. O método, de acordo com o parágrafo 82, em que o elemento cis-regulador é selecionado a partir do grupo que consiste em um elemento regulador pós-transcricional e um sinal de BGH poli-A.

[00631] 84. O método, de acordo com o parágrafo 83, em que o elemento regulador pós-transcricional compreende um elemento regulador pós-transcricional WHP (WPRE).

[00632] 85. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 70 a 84, em que o cassete de expressão compreende ainda um promotor selecionado a partir do grupo que consiste em promotor de CAG, promotor de AAT, promotor de LP1 e promotor de EF1a.

[00633] 86. O Método, de acordo com os parágrafos 70 a 85, em que o dito cassete de expressão compreende polinucleotídeos de SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 123 ou SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 67, e SEQ ID NO: 68.

[00634] 87. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 70 a 86, em que o dito cassete de expressão compreende ainda uma sequência exógena.

[00635] 88. O método, de acordo com os parágrafos 70 a 87, em que a sequência exógena compreende pelo menos 2.000 nucleotídeos.

[00636] 89. O método, de acordo com o parágrafo 88, em que a sequência exógena codifica uma proteína.

[00637] 90. O método, de acordo com o parágrafo 88, em que a sequência exógena codifica uma proteína repórter, proteína terapêutica, um antígeno, uma proteína de edição de genes ou uma proteína citotóxica.

[00638] 91. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 70 a 90, em que o vetor de DNA tem uma estrutura linear e contínua.

[00639] 92. Um vetor de DNA gerado pelo método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 70 a 91.

[00640] 93. Uma composição farmacêutica que compreende: o vetor de DNA, de acordo com o parágrafo 92; e

[00641] opcionalmente, um excipiente.

[00642] 94. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 22, 47 a 67 e 70 a 91, em que a etapa de ligação compreende ligação química.

[00643] 95. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 22, 47 a 67 e 70 a 91, em que a etapa de ligação compreende a ligação com uma proteína competente para ligação.

[00644] 96. O método, de acordo com o parágrafo 95, em que a proteína competente para ligação é Rep de AAV.

[00645] 97. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1, 25, 47 e 70, em que as ITRs são selecionadas a partir de um par de ITRs selecionadas a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 101 e SEQ ID NO: 102; SEQ ID NO: 103 e SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105 e SEQ ID NO: 106; SEQ ID NO: 107 e SEQ ID NO: 108; SEQ ID NO: 109 e SEQ ID NO: 110; SEQ ID NO: 111 e SEQ ID NO: 112; SEQ

ID NO: 113 e SEQ ID NO: 114; e SEQ ID NO: 115 e SEQ ID NO: 116 ou qualquer uma das SEQ ID NO: 1 a 48 SEQ ID NO: 165 a 187, ou a partir das sequências listadas em qualquer uma das Tabelas 2, 4A, 4B ou 5.

[00646] 98. Um vetor de DNA isolado obtido por ou obtenível por um processo que compreende as etapas de um ou mais métodos divulgados no presente documento.

[00647] 99. Um vetor de DNA isolado obtido por um método que compreende as etapas, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 22.

[00648] 100. Um vetor de DNA isolado obtenível por um método que compreende as etapas, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 22.

[00649] 101. Um vetor de DNA isolado obtido por um método que compreende as etapas, de acordo com qualquer um dos parágrafos 47 a 67.

[00650] 102. Um vetor de DNA isolado obtenível por um método que compreende as etapas, de acordo com qualquer um dos parágrafos 47 a 67.

[00651] 103. Um vetor de DNA isolado obtido por um método que compreende as etapas, de acordo com qualquer um dos parágrafos 70 a 96.

[00652] 104. Um vetor de DNA isolado obtenível por um método que compreende as etapas, de acordo com qualquer um dos parágrafos 70 a 96.

[00653] 105. Um medicamento genético que compreende um vetor de DNA isolado, conforme divulgado no presente documento.

[00654] 106. Um medicamento genético que compreende um vetor de DNA isolado, de acordo com qualquer um dos parágrafos 23 a 46.

[00655] 107. Um medicamento genético que compreende o vetor de

DNA isolado, de acordo com qualquer um dos parágrafos 97 a 103.

EXEMPLOS

[00656] Os exemplos a seguir são fornecidos a título de ilustração, não de limitação. Será observado por um versado na técnica que um vetor de DNA, incluindo um vetor de ceDNA produzido com o uso do processo sintético, conforme descrito no presente documento, pode ser construído a partir de qualquer uma das configurações de ITR simétricas ou assimétricas, que compreendem qualquer uma das ITRs do tipo selvagem ou modificadas, conforme descrito no presente documento, e que os seguintes métodos exemplificativos podem ser usados para construir e avaliar a atividade de tais vetores de ceDNA. Embora os métodos sejam exemplificados com determinados vetores de ceDNA, os mesmos são aplicáveis a qualquer vetor de DNA, incluindo qualquer vetor de ceDNA, de acordo com a descrição.

EXEMPLO 1: CONSTRUTO DE VETORES DE ceDNA COM O USO DO MÉTODO BASEADO EM CÉLULAS DE INSETO

[00657] Para fins comparativos, o Exemplo 1 descreve a produção de vetores de ceDNA com o uso de um método baseado em células de inseto e um modelo de construto de polinucleotídeo, e também é descrito no Exemplo 1 do documento PCT/US18/49996, que é incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência. Por exemplo, um modelo de construto de polinucleotídeo usado para gerar os vetores de ceDNA da presente invenção de acordo com o Exemplo 1 pode ser um ceDNA–plasmídeo, um ceDNA-Bacmídeo e/ou um ceDNA-baculovírus. Sem se limitar à teoria, em uma célula hospedeira permissiva, na presença de, por exemplo, Rep, o modelo de construto de polinucleotídeo com duas ITRs simétricas e um construto de expressão, em que pelo menos uma das ITRs é modificada em relação a uma sequência de ITR do tipo selvagem, replica para produzir vetores de ceDNA. A produção de vetor de ceDNA passa por

duas etapas: primeiramente, a excisão ("resgate") do modelo a partir do modelo de estrutura principal (por exemplo, genoma de ceDNA-plasmídeo, ceDNA-bacmídeo, ceDNA-baculovírus etc.) por meio de proteínas Rep e, segundo, a replicação mediada por Rep do vetor de ceDNA excisado.

[00658] Um método exemplificativo para produzir vetores de ceDNA em um método com o uso de células de inseto é de um ceDNA-plasmídeo, conforme descrito no presente documento. Com referência às **Figuras 1A e 1B**, o modelo de construto de polinucleotídeo de cada um dos plasmídeos de ceDNA inclui uma ITR modificada à esquerda e uma ITR modificada à direita com o seguinte entre as sequências de ITR: (i) um intensificador/promotor; (ii) um sítio de clonagem para um transgene; (iii) um elemento de resposta pós-transcricional (por exemplo, o elemento regulador pós-transcricional de vírus de hepatite da marmota) (WPRE); e (iv) um sinal de poliadenilação (por exemplo, do gene de hormônio de crescimento bovino (BGHpA). Sítios de reconhecimento de endonucleases de restrição únicos (R1 a R6) (mostrados na **Figura 1A** e na **Figura 1B**) também foram introduzidos entre cada componente para facilitar a introdução de novos componentes genéticos nos sítios específicos do construto. Os sítios de enzimas R3 (PmeI) GTTTAAAC (SEQ ID NO: 123) e R4 (PacI) TTAATTAA (SEQ ID NO: 124) são projetados no sítio de clonagem para introduzir um quadro de leitura aberta de um transgene. Essas sequências foram clonadas em um plasmídeo pFastBac HT B obtido da ThermoFisher Scientific.

PRODUÇÃO DE ceDNA-BACMÍDEOS:

[00659] As células competentes DH10Bac (células competentes MAX EFFICIENCY® DH10Bac™, Thermo Fisher) foram transformadas com plasmídeos de teste ou controle, seguindo um protocolo de acordo com as instruções do fabricante. A recombinação entre o plasmídeo

e um vetor de transporte de baculovírus nas células DH10Bac foi induzida para gerar ceDNA-bacmídeos recombinantes. Os bacmídeos recombinantes foram selecionados por triagem de uma seleção positiva baseada na triagem azul-branca em *E. coli* (o marcador Φ80dlacZΔM15 fornece a complementação α do gene de β-galactosidase do vetor de bacmídeo) em uma placa de ágar bacteriana que contém X-gal e IPTG com antibióticos para selecionar transformantes e manutenção dos plasmídeos de bacmídeos e transposases. Colônias brancas causadas por transposição que rompe o gene indicador de β-galactosídeo foram colhidas e cultivadas em 10 ml de meios.

[00660] Os ceDNA-bacmídeos recombinantes foram isolados a partir de *E. coli* e transfectados para células de inseto Sf9 ou Sf21 com o uso de FugeneHD para produzir baculovírus infeccioso. As células de inseto aderentes Sf9 ou Sf21 foram cultivadas em 50 ml de meio em frascos T25 a 25 °C. Quatro dias depois, o meio de cultura (que contém o vírus P0) foi removido das células, filtrado através de um filtro de 0,45 μm, separando as partículas infecciosas de baculovírus das células ou detritos celulares.

[00661] Opcionalmente, a primeira geração do baculovírus (P0) foi amplificada através da infecção de células de inseto Sf9 ou Sf21 não infectadas em 50 a 500 ml de meio. As células foram mantidas em culturas em suspensão em uma incubadora com agitação orbital a 130 rpm a 25 °C, monitorando o diâmetro e a viabilidade das células, até as células atingirem um diâmetro de 18 a 19 nm (a partir de um diâmetro de 14 a 15 nm) e uma densidade de aproximadamente 4,0E + 6 células/ml. Entre 3 e 8 dias após a infecção, as partículas de baculovírus P1 no meio foram coletadas após centrifugação, para remover células e detritos, e então filtração, através de um filtro de 0,45 μm.

[00662] Os ceDNA-baculovírus que compreendem os construtos de

teste foram coletados e a atividade infecciosa, ou titulação, do baculovírus foi determinada. Especificamente, quatro x 20 ml de culturas de células Sf9 a 2,5E + 6 células/ml foram tratadas com baculovírus P1 nas seguintes diluições: 1/1.000, 1/10.000, 1/50.000, 1/100.000 e incubadas a 25 a 27 °C. A infectividade foi determinada pela taxa de aumento de diâmetro celular e interrupção de ciclo celular, e alteração na viabilidade celular todos os dias, durante 4 a 5 dias.

[00663] Um "plasmídeo de Rep" foi produzido em um vetor de expressão pFASTBAC™-Dual (ThermoFisher) que compreende Rep78 (SEQ ID NO: 131 ou 133) ou Rep68 (SEQ ID NO: 130) e Rep52 (SEQ ID NO: 132) ou Rep40 (SEQ ID NO: 129). O plasmídeo Rep foi transformado nas células competentes DH10Bac (células competentes MAX EFFICIENCY® DH10Bac™ (Thermo Fisher)) seguindo um protocolo fornecido pelo fabricante. A recombinação entre o plasmídeo de Rep e um vetor de transporte de baculovírus nas células DH10Bac foi induzida a gerar bacmídeos recombinantes ("Rep-bacmídeos"). Os bacmídeos recombinantes foram selecionados por uma seleção positiva que incluiu ~~triagem~~ azul-branca em *E. coli* (marcador ac80dlacZΔM15 fornece a complementação α do gene de β-galactosidase do vetor de bacmídeo) em uma placa de ágar bacteriana que contém X-gal e IPTG. Colônias brancas isoladas foram colhidas e inoculadas em 10 ml de meio de seleção (canamicina, gentamicina, tetraciclina em caldo LB). Os bacmídeos recombinantes (Rep-bacmídeos) foram isolados a partir de *E. coli* e os Rep-bacmídeos foram transfectados em células de inseto Sf9 ou Sf21 para produzir baculovírus infeccioso.

[00664] As células de inseto Sf9 ou Sf21 foram cultivadas em 50 ml de meio por 4 dias e os baculovírus recombinantes infecciosos ("Rep-baculovírus") foram isolados da cultura. Opcionalmente, os Rep-baculovírus de primeira geração (P0) foram amplificados infectando-se

células de inseto Sf9 ou Sf21 não infectadas e cultivadas em 50 a 500 ml de meio. Entre 3 e 8 dias após a infecção, as partículas de baculovírus P1 no meio foram coletadas pela separação de células por centrifugação ou filtração ou outro processo de fracionamento. Os Rep-baculovírus foram coletados e a atividade infecciosa do baculovírus foi determinada. Especificamente, quatro culturas de células Sf9 x 20 ml a 2,5 x 10^6 células/ml foram tratadas com baculovírus PI nas seguintes diluições, 1/1.000, 1/10.000, 1/50.000, 1/100.000 e incubadas. A infectividade foi determinada pela taxa de aumento de diâmetro celular e interrupção de ciclo celular, e alteração na viabilidade celular todos os dias, durante 4 a 5 dias.

GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VETOR DE ceDNA

[00665] Os meios de cultura de células de inseto Sf9 que contêm (1) uma amostra que contém um ceDNA-bacmídeo ou um ceDNA-baculovírus e (2) Rep-baculovírus descritos acima foram adicionados a uma nova cultura de células Sf9 (2,5E + 6 células/ml, 20 ml) na razão de 1:1.000 e 1:10.000, respectivamente. As células foram, então, cultivadas a 130 rpm a 25 °C. 4 a 5 dias após a coinfecção, o diâmetro e a viabilidade celular são detectados. Quando os diâmetros celulares atingiram 18 a 20 nm com uma viabilidade de aproximadamente 70 a 80%, as culturas celulares foram centrifugadas, o meio foi removido e os péletes celulares foram coletados. Os sedimentos celulares são primeiro ressuspensos em um volume adequado de meio aquoso, água ou tampão. O vetor de ceDNA foi isolado e purificado a partir das células com o uso do protocolo de purificação Qiagen MIDI PLUS™ (Qiagen, 0,2 mg de massa de grânulos de células processadas por coluna).

[00666] Os rendimentos dos vetores de ceDNA produzidos e purificados a partir das células de inseto Sf9 foram determinados inicialmente com base na absorbância de UV a 260 nm. Os vetores de ceD-

NA purificados podem ser avaliados quanto à configuração final adequada, com o uso da metodologia eletroforética descrita no Exemplo 5.

EXEMPLO 2: PRODUÇÃO DE ceDNA ATRAVÉS DE EXCISÃO A PARTIR DE UMA MOLÉCULA DE DNA DE FILAMENTO DUPLO

[00667] Um método exemplificativo de produção de um vetor de ceDNA com o uso de um método sintético que envolve a excisão de uma molécula de DNA de filamento duplo. Em suma, um vetor de ceDNA pode ser gerado com o uso de um construto de DNA de filamento duplo, por exemplo, consultar Figuras 7A a 8E. Em algumas modalidades, o construto de DNA de filamento duplo é um ceDNA-plasmídeo, por exemplo, consultar, por exemplo, a Figura 6 no pedido de patente internacional PCT/US2018/064242, depositado em 6 de dezembro de 2018).

[00668] Em algumas modalidades, um construto para fazer um vetor de ceDNA compreende uma chave reguladora, conforme descrito no presente documento.

[00669] Para fins ilustrativos, o Exemplo 3 descreve a produção de vetores de ceDNA como vetores de DNA de extremidade fechada exemplificativos gerados com o uso deste método. No entanto, embora os vetores de ceDNA sejam exemplificados neste exemplo para ilustrar métodos de produção sintética *in vitro* para gerar um vetor de DNA de extremidade fechada por excisão de um polinucleotídeo de filamento duplo que compreende as ITRs e o cassete de expressão (por exemplo, sequência heteróloga de ácido nucleico) seguida por ligação das extremidades 3' e 5' livres, conforme descrito no presente documento, um indivíduo de habilidade comum na técnica está ciente de que é possível, conforme ilustrado acima, modificar a molécula de polinucleotídeo de DNA de filamento duplo, de modo que seja gerado qualquer vetor de DNA fechado desejado, incluindo, sem limitação, DNA em formato de ossos de cachorro, DNA em formato de halteres e

similares. Exemplos de vetores de DNA que podem ser produzidos pelo método de produção sintética descrito no Exemplo 3 são discutidos nas seções intituladas "II D. DNA vectors produced using the synthetic production method", "III. ceDNA vectors in general" e "IV. Exemplary ceDNA vectors".

[00670] O método envolve (i) excisar uma sequência que codifica o cassete de expressão de um construto de DNA de filamento duplo e (ii) formar estruturas em forma de gancho em uma ou mais ITRs e (iii) unir as extremidades livres 5' e 3' por ligação, por exemplo, por DNA T4 ligase.

[00671] O construto de DNA de filamento duplo compreende, na ordem 5' a 3': um primeiro sítio de endonuclease de restrição; uma ITR a montante; um cassete de expressão; uma ITR a jusante; e um segundo sítio de endonuclease de restrição. O construto de DNA de filamento duplo é, então, posto em contato com uma ou mais endonucleases de restrição para gerar quebras de filamento duplo em ambos os sítios de endonuclease de restrição. Uma endonuclease pode ter como alvo os dois sítios ou cada sítio pode ser alvejado por uma endonuclease diferente, desde que os sítios de restrição não estejam presentes no modelo de vetor de ceDNA. A mesma excisa a sequência entre os sítios de endonuclease de restrição do restante do construto de DNA de filamento duplo (consultar Figura 9). Após a ligação, um vetor de DNA fechado é formado.

[00672] Uma ou ambas as ITRs usadas no método podem ser ITRs do tipo selvagem. As ITRs modificadas também podem ser usadas, em que a modificação pode incluir exclusão, inserção ou substituição de um ou mais nucleotídeos da ITR do tipo selvagem nas sequências que formam o braço B e B' e/ou o braço C e C' (consultar, por exemplo, Figuras 6 a 8 e 10), e pode ter duas ou mais alças em forma de gancho (consultar, por exemplo, Figuras 6 a 8) ou uma única alça em

forma de gancho (consultar, por exemplo, Figura 10A a 10B). A ITR modificada com alça em forma de gancho pode ser gerada por modificação genética de um oligo existente ou por síntese biológica e/ou química de novo.

[00673] Em um exemplo não limitante, a ITR-6 esquerda e direita fornecidas nas **Figuras 10A e 10B** (SEQ ID NOS: 111 e 112), incluem 40 deleções de nucleotídeos nos braços B-B' e C-C' da ITR do tipo selvagem de AAV2. Prevê-se que os nucleotídeos restantes na ITR modificada formem uma única estrutura em forma de gancho. A energia livre de Gibbs de desdobramento da estrutura é de cerca de -54,4 kcal/mol. Outras modificações na ITR também podem ser feitas, incluindo a exclusão opcional de um sítio de ligação Rep funcional ou de um sítio de Trs.

EXEMPLO 3 : PRODUÇÃO DE ceDNA ATRAVÉS DE CONSTRUTO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

[00674] Outro método exemplificativo de produção de um vetor de ceDNA com o uso de um método sintético que envolve a montagem de vários oligonucleotídeos é fornecido. Nesse exemplo, o vetor de ceDNA é produzido sintetizando-se um oligonucleotídeo 5' e um oligonucleotídeo de ITR 3' e ligando-se os oligonucleotídeos de ITR a um polinucleotídeo de filamento duplo que compreende um cassete de expressão. A Figura 11B mostra um método exemplificativo de ligação de um oligonucleotídeo de ITR 5' e um oligonucleotídeo de ITR 3' a um polinucleotídeo de filamento duplo que compreende um cassete de expressão.

[00675] Para fins ilustrativos, o Exemplo 3 descreve a geração de vetores de ceDNA como vetores de DNA de extremidade fechada exemplificativos gerados com o uso desse método. No entanto, embora os vetores de ceDNA sejam exemplificados nesse Exemplo para ilustrar métodos de produção sintética *in vitro* para gerar um vetor de

DNA de extremidade fechada ligando-se oligonucleotídeos de ITR a um polinucleotídeo de filamento duplo que compreende o cassete de expressão (por exemplo, sequência de ácidos nucleicos heteróloga) conforme descrito no presente documento, um versado na técnica sabe que é possível, conforme ilustrado acima, modificar os parâmetros do método de modo que qualquer vetor de DNA de extremidade fechada desejado seja gerado, incluindo, mas sem limitação, DNA em formato de osso de cachorro, DNA em formato de haltere e similares. Exemplos de vetores de DNA que podem ser produzidos pelo método de produção sintética descrito no Exemplo 3 são discutidos nas seções intituladas "II D. DNA vectors produced using the synthetic production method", "III. ceDNA vectors in general" e "IV. Exemplary ceDNA vectors".

[00676] Os oligonucleotídeos de ITR podem ser fornecidos por qualquer método de síntese de DNA (por exemplo, metodologias de síntese de DNA *in vitro*) e são fornecidos como moléculas lineares com uma extremidade 5' livre e uma extremidade 3' livre. Os oligonucleotídeos de ITR podem formar estruturas secundárias de emparelhamento de bases (por exemplo, alças de haste ou gancho), mas a estrutura primária é uma molécula linear de filamento simples. **A Tabela 7** mostra oligonucleotídeos de ITR exemplificativos, que podem ser ligados aos 5' e 3' de um construto de DNA de filamento duplo, conforme ilustrado na **Figura 11)**

TABELA 7

Oligonucleotideo de ITR sintética	Oligonulceotideo de ITR sintética	SEQ ID NO:	
WT-L-oligo-1	ctAGGCCGCCCGGGCAAAGCC CGGGCGTCGGGCGACCTTTG GTCGCCCGGC	134	reconhecimento de AvrII colocado na haste, para recuperar sítios de ligação à rep, se necessário

WT-L-oligo-2	ctaggACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTc	135	Sítio de reconhecimento de AvrII colocado na extremidade da haste
WT-R-oligo-3	ggACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTcctgca	136	Sítio de reconhecimento de Sbf1 colocado na extremidade da haste
MU-R-oligo-1	GtgCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGcaCTCA	137	Reconhecimento de DraIII colocado na haste, para recuperar sítios de ligação à rep, se necessário
MU-R-oligo-2	ggACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTcctgca	138	Sítio de reconhecimento de Sbf1 colocado na extremidade da haste
MU-L-oligo-3	ctaggACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTc	139	Sítio de reconhecimento de AvrII colocado na extremidade da haste
MU-L-oligo-4	ggACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGGCCTCAGTcctgca	140	Sítio de reconhecimento de Sbf1 colocado na extremidade da haste [dITR R]
MU-L-oligo-5	ctaggACTGAGGCCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTc	141	Sítio de reconhecimento de AvrII colocado na extremidade da haste [dITR L]
MU-R-oligo-6	ggACTGAGGCCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGCCTCAGTcctgca	142	Sítio de reconhecimento de Sbf1 colocado na extremidade da haste [FL R ITR]
FBGR-senso-1	atacctaggcacgcgtgttactagttattaatagtaatcaattacgg	143	3NT cadeia secundária-AvrII-5'senso (38bp, Tm 60C)-iniciador
FBGR-senso-2	atacctaggggccgcacgcgtgttactag	144	3NT cadeia secundária-AvrII-5'senso (20bp, Tm 62C)-iniciador
FBGR-as-1	AtaCactcagtgcctgcaggcacgtggtccggagatccagac	145	3NT cadeia secundária-DraIII-SbfI-3'-antissenso (22bp, Tm 62C)

[00677] Como divulgado no presente documento, os oligonucleotídeos de ITR podem compreender WT-ITRs (por exemplo, consultar **Figura 6A**, **Figura 6B**) ou ITRs modificadas (por exemplo, consultar **Figura 7A** e **Figura 7B**). As ITRs modificadas podem incluir deleção, inserção ou substituição de um ou mais nucleotídeos da ITR do tipo selvagem nas sequências que formam o braço B e B' e/ou o braço C e C'. Os oligonucleotídeos de ITR que compreendem WT-ITRs ou mod-ITRs, conforme descrito no presente documento, para serem utilizados na síntese livre de células, podem ser gerados por modificação genética ou síntese biológica e/ou química. Conforme discutido no presente documento, os oligonucleotídeos de ITR nos Exemplos 2 e 3 podem

compreender WT-ITRs ou ITRs modificadas (mod-ITRs) em configurações simétricas ou assimétricas, conforme discutido no presente documento.

[00678] Como parte do processo de síntese, um ou mais sítios de endonucleases de restrição podem ser introduzidos na porção de haste da ITR. **As Figuras 6A a 7E** fornecem sequências e estruturas de oligonucleotídeos de ITR exemplificativas, incluindo modalidades em que sítios de endonuclease de restrição são incorporados.

[00679] O polinucleotídeo de filamento duplo que compreende o cassete de expressão é fornecido como uma molécula linear com extremidades 5' e 3' livres em cada filamento. O polinucleotídeo de filamento duplo pode ser fornecido por síntese de DNA, por montagem em cadeia de PCR ou por excisão dessa molécula de um plasmídeo ou outro vetor. Consultar, por exemplo, a **Figura 11B.**

[00680] O polinucleotídeo de filamento duplo é, então, posto em contato com os oligonucleotídeos de ITR 5' e 3', sequencialmente ou simultaneamente e os oligonucleotídeos de ITR são ligados ao polinucleotídeo de filamento duplo para formar um vetor de ceDNA. Uma reação de ligação padrão é realizada, por exemplo, com o uso de DNA T4 ligase.

[00681] Em algumas modalidades, como as ilustradas na **Figura 11B**, os oligonucleotídeos de ITR e o polinucleotídeo de filamento duplo podem ser fornecidos com cadeias secundárias complementares e suas extremidades e/ou clivados com a mesma endonuclease de restrição, a fim de fornecer cadeias secundárias complementares. Ligações de extremidade cega também podem ser realizadas.

[00682] As moléculas podem ser montadas passo a passo. Por exemplo, os oligos são anelados seguidos por ligação de oligos de filamento duplo anelados um ao outro. Para emparelhar dois filamentos de oligo, os oligos são misturados em quantidades molares iguais em

um tampão adequado: por exemplo, acetato de potássio 100 mM; 30 mM de HEPES, pH 7,5, e aquecido a 94 °C durante 2 minutos e resfriado gradualmente. Para oligos sem estrutura secundária significativa, a etapa de resfriamento pode ser tão simples quanto transferir amostras do bloco de calor ou do banho-maria para a temperatura ambiente. Para os oligos os quais prevê-se ter grande parte de estrutura secundária, uma etapa de resfriamento/anelamento mais gradual é benéfica. Isso é feito colocando-se a solução de oligo em banho-maria ou bloco térmico e desconectando/desligando a máquina. Os oligonucleotídeos anelados podem ser diluídos em um tampão livre de nuclease e armazenados em sua forma anelada de filamento duplo a 4 °C.

EXEMPLO 4: PRODUÇÃO DE ceDNA ATRAVÉS DE UMA MOLÉCULA DE DNA DE FILAMENTO SIMPLES

[00683] Outro método exemplificativo de produção de um vetor de ceDNA com o uso de um método sintético usa um DNA linear de filamento simples que compreende duas ITRs sensoriais que flanqueiam uma sequência cassete de expressão sensoriais e são anexadas covalentemente a duas ITRs antissenso que flanqueiam um cassete de expressão antissenso, cujas extremidades de DNA linear de filamento único são, então, ligadas para formar uma molécula de filamento único de extremidade fechada. Um exemplo não limitante compreende sintetizar e/ou produzir uma molécula de DNA de filamento simples, emparelhar porções da molécula para formar uma única molécula de DNA linear que tem uma ou mais regiões emparelhadas em bases de estrutura secundária e, em seguida, ligar as extremidades 5' e 3' livres entre si para formar uma molécula de filamento simples fechada.

[00684] Para fins ilustrativos, o Exemplo 4 descreve a produção de vetores de ceDNA como vetores de DNA exemplificativos gerados com o uso desse método. No entanto, embora os vetores de ceDNA sejam exemplificados nesse exemplo para ilustrar métodos de produção sin-

tética *in vitro* para gerar um vetor de DNA de extremidade fechada, conforme descrito no presente documento, um indivíduo de habilidade na técnica sabe que é possível, como ilustrado acima, modificar os parâmetros do método, de modo que seja gerado qualquer vetor de DNA de extremidade fechada desejado, incluindo, mas sem limitação, DNA em formato de ossos de cachorro, DNA em formato de halteres e similares. Exemplos de vetores de DNA que podem ser produzidos pelo método de produção sintética descrito no Exemplo 3 são discutidos nas seções intituladas "II D. DNA vectors produced using the synthetic production method", "III. ceDNA vectors in general" e "IV. Exemplary ceDNA vectors".

[00685] Uma molécula de DNA de filamento simples exemplificativa para produção de um vetor de ceDNA compreende, 5' a 3':

[00686] uma primeira ITR senso;

[00687] uma sequência cassete de expressão senso;

[00688] uma segunda ITR senso;

[00689] uma segunda ITR antissenso;

[00690] uma sequência cassete de expressão antissenso; e

[00691] uma primeira ITR antissenso.

[00692] Uma molécula de DNA de filamento simples para uso no método exemplificativo do Exemplo 4 pode ser formada por qualquer metodologia de síntese de DNA descrita no presente documento, por exemplo, síntese de DNA *in vitro*, ou fornecida pela clivagem de um construto de DNA (por exemplo, um plasmídeo) com nucleases e fusão dos fragmentos de dsDNA resultantes para fornecer fragmentos de ssDNA.

[00693] O anelamento pode ser realizado abaixando-se a temperatura abaixo das temperaturas de fusão calculadas dos pares de sequência senso e antissenso. A temperatura de fusão depende do teor de base de nucleotídeos específico e das características da solução

utilizada, por exemplo, a concentração de sal. As temperaturas de fusão para qualquer sequência e combinação de soluções são prontamente calculadas por um indivíduo de habilidade comum na técnica.

[00694] As extremidades 5' e 3' livres da molécula anelada podem ser ligadas uma à outra ou ligadas a uma molécula em forma de gancho para formar o vetor de ceDNA. Metodologias de ligação exemplificativas adequadas e moléculas em forma de gancho são descritas nos Exemplos 2 e 3.

EXEMPLO 5: PURIFICAÇÃO E/OU CONFIRMAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ceDNA

[00695] Qualquer um dos produtos de vetor de DNA produzidos pelos métodos descritos no presente documento, por exemplo, incluindo os métodos descritos nos Exemplos 1 a 4, pode ser purificado, por exemplo, para remover impurezas, componentes não utilizados ou subprodutos com o uso de métodos comumente conhecidos por um especialista; e/ou pode ser analisado para confirmar que o vetor de DNA produzido (nesse caso, um vetor de ceDNA) é a molécula desejada. Um método exemplificativo para purificação do vetor de DNA, por exemplo, ceDNA, é usar o protocolo de purificação Qiagen Midi Plus (Qiagen) e/ou por purificação em gel.

[00696] A seguir, é apresentado um método exemplificativo para confirmar a identidade de vetores de ceDNA.

[00697] Os vetores de ceDNA podem ser avaliados e identificados por eletroforese em gel de agarose sob condições nativas ou de desnaturação, conforme ilustrado na **Figura 4C**, em que (a) presença de bandas características migrando com o dobro do tamanho em géis de desnaturação *versus* géis nativos após a clivagem de endonuclease e análise eletroforética em gel, e (b) presença de bandas de monômero e dímero (2x) em géis de desnaturação para material não clivado, são características da presença do vetor de ceDNA.

[00698] As estruturas dos vetores de ceDNA isolados foram posteriormente analisadas pela digestão do DNA purificado com endonucleases de restrição selecionadas para a) presença de apenas um único sítio de corte nos vetores de ceDNA e b) fragmentos resultantes que eram grandes o suficiente para serem vistos claramente quando fracionados em um gel de agarose de desnaturação a 0,8% (> 800 pb). Conforme ilustrado nas **Figuras 4C** e **4D**, vetores de DNA lineares com uma estrutura não contínua e o vetor de ceDNA com a estrutura linear e contínua podem ser distinguidos por tamanhos de seus produtos de reação - por exemplo, espera-se que um vetor de DNA com uma estrutura não contínua produza 1 kb e fragmentos de 2 kb, enquanto se espera que um vetor de ceDNA com a estrutura contínua produza fragmentos de 2 kb e 4 kb.

[00699] Portanto, para demonstrar de maneira qualitativa que os vetores de ceDNA isolados são covalentemente de extremidade fechada, como é exigido por definição, as amostras foram digeridas com uma endonuclease de restrição identificada no contexto da sequência específica do vetor de DNA como tendo um único sítio de restrição, de preferência, resultando em dois produtos de clivagem de tamanho desigual (por exemplo, de 1.000 pb e 2.000 pb). Após a digestão e eletroforese em um gel de desnaturação (que separa os dois filamentos de DNA complementares), um DNA linear fechado de maneira não covalente será resolvido nos tamanhos de 1.000 bp e 2.000 bp, enquanto um DNA covalentemente fechado (isto é, um vetor de ceDNA) será resolvido em tamanhos 2x (de 2.000 pb e 4.000 pb), à medida que os dois filamentos de DNA são ligados e agora se desdobram e têm o dobro do comprimento (embora de filamento simples). Além disso, a digestão das formas monoméricas, diméricas e *n*-méricas dos vetores de DNA será resolvida como fragmentos do mesmo tamanho devido à ligação de ponta a ponta dos vetores de DNA multiméricos (consultar

Figura 4C).

[00700] Conforme utilizada no presente documento, a frase "ensaio para a Identificação de vetores de DNA por eletroforese em gel de agarose sob condições de desnaturação e gel nativo" se refere a um ensaio para avaliar a proximidade do ceDNA realizando-se digestão com endonucleases de restrição seguida de avaliação eletroforética dos produtos digeridos. Um desses ensaios exemplificativos segue, embora um indivíduo de habilidade comum na técnica compreenda que muitas variações conhecidas na técnica nesse exemplo são possíveis. A endonuclease de restrição é selecionada para ser uma enzima de corte único para o vetor de ceDNA de interesse que gerará produtos com aproximadamente 1/3x e 2/3x do comprimento de vetor de DNA. Isso resolve as bandas em géis nativos e de desnaturação. Antes da desnaturação, é importante remover o tampão da amostra. O kit de limpeza Qiagen PCR ou a dessalinização de "colunas de rotação", por exemplo, colunas GE HEALTHCARE ™ILUSTRA, MICROSPIN ™ G-25, são algumas opções conhecidas pela técnica para a digestão de endonucleases. O ensaio inclui, por exemplo, i) digerir DNA com endonuclease (ou endonucleases) de restrição apropriada, 2) aplicar a, por exemplo, um kit de limpeza Qiagen PCR, eluir com água destilada, iii) adicionar 10x de solução de desnaturação (10x = NaOH a 0,5 M, EDTA a 10mM), adicionar 10X de corante, sem tamponamento e análise, juntamente com as escadas de DNA preparadas adicionando-se solução de desnaturação de 10X a 4x, em um gel de 0,8 a 1,0% previamente incubado com EDTA a 1 mM e NaOH a 200 mM para garantir que a concentração de NaOH seja uniforme na caixa de gel e no gel, e correr o gel na presença de solução de desnaturação 1x (NaOH a 50 mM, EDTA a 1 mM). Um indivíduo de habilidade comum na técnica observará qual voltagem usar para executar a eletroforese com base no tamanho e no tempo desejado dos resultados. Após a eletroforese,

os géis são drenados e neutralizados em 1x TBE ou TAE e transferidos para água destilada ou 1x TBE/TAE com 1x SYBR Gold. As bandas podem então ser visualizadas com, por exemplo, Thermo Fisher, mancha de gel de ácido nucleico SYBR® Gold (Concentrado a 10.000 X em DMSO) e luz epifluorescente (azul) ou UV (a 312 nm). O método anterior baseado em gel pode ser adaptado para fins de purificação, isolando-se o vetor de ceDNA da banda de gel e permitindo-se que ele renature.

[00701] A pureza do vetor de ceDNA gerado pode ser avaliada com o uso de qualquer método conhecido na técnica. Como um método exemplificativo e não limitante, a contribuição de ceDNA-plasmídeo para a absorbância total de UV de uma amostra pode ser estimada comparando-se a intensidade fluorescente de vetor de ceDNA com um padrão. Por exemplo, se com base na absorbância de UV, 4 µg do vetor de ceDNA foram carregados no gel, e a intensidade fluorescente do vetor de ceDNA for equivalente a uma banda de 2 kb que é conhecida por 1 µg, então, há 1 µg de vetor de ceDNA e o vetor de ceDNA é 25% do total de material absorvente de UV. A intensidade de banda no gel é, então, plotada contra a entrada calculada que a banda representa - por exemplo, se o vetor de ceDNA total for de 8 kb e a banda comparativa excisada for de 2 kb, a intensidade da banda será plotada como 25% da entrada total, que nesse caso seria 0,25 µg para 1,0 µg de entrada. Utilizando a titulação do plasmídeo de vetor de ceDNA para plotar uma curva padrão, uma equação de linha de regressão é, então, usada para calcular a quantidade da banda de vetor de ceDNA, que pode ser usada para determinar a porcentagem de entrada total representada pelo vetor de ceDNA, ou porcentagem de pureza.

EXEMPLO 6: CONSTRUÇÃO DE VETORES DE ceDNA COM O USO DE UMA ABORDAGEM SINTÉTICA

[00702] Como um exemplo do construto sintético de vetores de ce-

DNA descritos no presente documento, foi utilizado o seguinte procedimento. Uma representação esquemática de um vetor de ceDNA é mostrada na **Figura 11A** , mostrando as ITRs em forma de gancho que flanqueiam o cassete com o gene de interesse e, opcionalmente, um promotor/intensificador, elemento regulador pós-transcricional e/ou sequência de poliadenilação. De forma resumida, o método de construção envolveu a construção de vários segmentos do vetor de ceDNA com extremidades de DNA de cadeia secundária complementares para facilitar a ligação correta para formar adequadamente o vetor de ceDNA (consultar **Figura 11A** e **Figura 11B),** seguido de purificação para remover os produtos de ligação indesejados.

[00703] Em mais detalhes, os oligodesoxinucleotídeos de filamento simples foram projetados para cada ITR que compreende (a) a estrutura de ITR desejada (por exemplo, do tipo selvagem ou mutante) e (b) uma região de cadeia secundária na haste A da sequência de ITR entre as sequências B e C de gancho e o elemento RPE que é complementar à cadeia secundária criada pela clivagem de endonuclease em um sítio de restrição modificado no oligodesoxinucleotídeo de cassete ("oligo"), em que a ligação entre as duas regiões de cadeia secundária é desejada. As cadeias secundárias em cada um dos dois oligos de ITR são marcadas como R1 e R2, respectivamente, na Figura A(B). Cada oligo de ITR foi sintetizado com o uso de métodos tradicionais, incluindo purificação de gel ou coluna e com uma concentração final entre 10 e 100 μM em água, seguido de anelamento a 95 °C por 2 minutos e resfriamento rápido em banho de gelo. Para construir o vetor de ceDNA com ITRs de AAV2 do tipo selvagem, os oligodesoxinucleotídeos sintetizados foram:

[00704] ITR esquerda ("oligo-1 esquerda") (que contém cadeia secundária R1 complementar à cadeia secundária de clivagem no sítio de restrição de AvrII):

5'CTAGGACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGA CCTTTGGTCGCCCGGC CTCAGTC3' (**SEQ ID NO: 135**) e ITR direita (oligo-2 direito) (que contém cadeia secundária de R2 complementar à cadeia secundária de clivagem de sítio de restrição SbfI): 5'GGACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCT TTGGTCGCCCGGCCTC AGTCCTGCA3' (**SEQ ID NO: 136**).

[00705] A região de cassete (marcada como "unidade de expressão gênica" na Figura A (B)) pode ser feita por qualquer método tradicional de construto de nucleotídeos, mas nesse exemplo foi convenientemente produzido com o uso de um sistema de produção de plasmídeo. O promotor de CAG, o quadro de leitura aberta de proteína verde fluorescente (GFP), a sequência de poliadenilação de hormônio de crescimento bovino e as regiões de ITR D e RPE (coletivamente, **SEQ ID NO: 146**) foram inseridas em um plasmídeo parental (**SEQ ID NO: 147**).

[00706] Os sítios de restrição na unidade de expressão gênica e as cadeias secundárias em cada um dos oligos de ITR foram selecionados para facilitar a ligação específica dos oligos de ITR à unidade de expressão gênica na orientação correta, devido a cadeias secundárias complementares. Nesse exemplo específico, uma região de cadeia secundária foi projetada na ITR esquerda para complementar a cadeia secundária resultante da clivagem de AvrII da unidade de expressão gênica 5'. No entanto, os resíduos terminais do oligo de ITR esquerda não constituem por si só um sítio de restrição de AvrII, portanto, a enzima não cliva a cadeia secundária. Essa mesma região do oligo forma um sítio de restrição de ApaLI no caso de homodimerização e, portanto, o ApaLI pode ser usado para garantir que os homodímeros indesejados de oligo de ITR esquerda sejam clivados e retornem ao seu estado monomérico. Uma abordagem similar foi adotada na ITR direita, em que a região de cadeia secundária foi projetada para complemen-

tar a sobrecarga gerada pela clivagem no sítio de Sbf1 geneticamente modificado na extremidade 3' da unidade de expressão gênica. A região terminal do oligo de ITR direita é projetada para não ser reconhecida por SbfI, mas para formar um sítio de Nhe1 no caso de homodimerização do oligo, para que a homodimerização possa ser controlada por clivagem com essa enzima. Por fim, os sítios de restrição DraIII e BsaI existiram como sítios únicos na estrutura principal de plasmídeo parental e foram explorados para facilitar a remoção do fragmento de estrutura principal indesejado. Esses vários sítios de restrição foram selecionados por conveniência e um indivíduo de habilidade comum na técnica pode facilmente projetar qualquer combinação de sítios de restrição para alcançar os mesmos resultados que são compatíveis com os reagentes disponíveis e os construtos de nucleotídeos subjacentes.

[00707] Plasmídeos que contêm a unidade de expressão gênica para transformar *E. coli*, e a pressão seletiva para manter o plasmídeo foi mantida através da inclusão de Ampicilina no meio, utilizando técnicas padrão. O DNA de plasmídeo foi coletado com o uso do kit de extração de DNA (Qiagen) e os métodos recomendados pelo fabricante para purificação. A excisão da unidade de expressão gênica do plasmídeo (etapa 1B conforme apresentado na **Figura 12**) foi realizada por uma etapa de clivagem de endonuclease de restrição. Em um volume de reação de 100 µl, 20 pmol de plasmídeo parental foram combinados com 3% de cada uma das três enzimas de restrição AvrII, SbfI e ApaLI. A reação foi incubada a 37 °C por 4 horas.

[00708] Em seguida, os oligos de ITR e o segmento de DNA da unidade de expressão gênica foram ligados (Etapa 2 da **Figura 12**). Para um volume total de 400 µl, 20 pmol da reação de plasmídeo parental digerida (100 µl) foram combinados com 160 pmol de cada um dos oligos ITR anelados à esquerda e à direita, com 10% de um tam-

pão de ligação que contém ATP, DNA T4 ligase a 2% e 2% de cada uma dessas endonucleases de restrição: AvrII, SbfI, ApaLI, NheI. A ligase efetuou a ligação, enquanto as enzimas AvrII e SbfI garantiram que a unidade de expressão gênica não homodimerizasse, e as enzimas ApaL1 e NheI garantiram que os oligos de ITR não homodimerizassem. A reação foi incubada de 4 a 16 horas a 22 °C, após o que a DNA ligase de T4 foi inativada por aquecimento da reação a 65 °C por 20 minutos.

[00709] Para remover o plasmídeo parental restante da reação, a mistura foi tratada com enzimas de endonuclease de restrição conhecidas por cortar apenas na estrutura principal de plasmídeo parental, mas não no oligo de ITR ou na unidade de expressão gênica (consultar a etapa 3 da **Figura 12**). Consequentemente, 400 µl da mistura de reação imediatamente anterior são combinados com 10% do tampão de enzima de restrição recomendado pelo fabricante, 3% da enzima de endonuclease de restrição DraIII e 5% da enzima de endonuclease de restrição BsaI para um volume total de reação de 1 ml em água. A reação foi incubada a 37 °C por 1 a 2 horas.

[00710] Os oligos não ligados indesejados e as partes restantes da estrutura principal de plasmídeo parental foram, então, removidos por digestão com exonuclease (etapa 4 da **Figura 12**). À reação anterior de 1 ml foram adicionados 10% do tampão de reação de exonuclease recomendado pelo fabricante, 10% de ATP (10 mM) e 8% de exonuclease de T5 e água suficiente para levar o volume de reação total a 5 ml. A reação foi incubada a 37 °C por 1 a 4 horas. A exonuclease T5 cliva o DNA de filamento simples, portanto, qualquer um dos oligos ou partes da estrutura principal com uma cadeia secundária não ligada é digerido pela enzima.

[00711] A reação foi submetida à precipitação com etanol (etapa 5 da **Figura 12**) para concentrar o DNA na preparação para a purifica-

ção. Todo o volume de reação de 5 ml da clivagem de exonuclease T5 foi combinado em um volume total de reação > 12,5 ml com 10% de acetato de sódio a 3 M e 2,5 vezes o volume de etanol. A mistura foi incubada por pelo menos 20 minutos a -80 °C e depois o DNA foi peletizado por centrifugação a 4 °C. O pélete foi lavado com etanol a 70% e repeletizado por centrifugação. O pélete de DNA lavado resultante foi ressuspenso em 1 ml de água. O vetor de ceDNA foi purificado com o uso de uma coluna de sílica de purificação de DNA padrão (Zymo Research), eliminando proteínas e pequenos fragmentos de DNA residuais (etapa 6 da **Figura 12**).

[00712] Uma amostra do vetor de ceDNA de ITR WT/WT purificado resultante foi escalonada com uma escala padrão e foi analisada com o uso de um Bioanalisador (Agilent Technologies) utilizando as condições e o kit recomendados pelo fabricante (Agilent Technologies, DNA-12000 Kit). O cromatógrafo resultante é mostrado na **Figura 13B**. Os dois picos maiores correspondem aos tamanhos esperados para o vetor de ceDNA monomérico e dimérico, e foram observados picos muito menores nos tamanhos esperados para os oligodímeros, ilustrando que a amostra geral após a etapa final de purificação era um vetor de ceDNA substancialmente puro. Os dados de pico tabular do cromatógrafo são apresentados na **Tabela 8.**

TABELA 8: PARÂMETROS DE PICO QUE CORRESPONDEM AO CROMATÓGRAFO NA FIGURA 13B.

Tamanho [bp]	Conc. [ng/µl]	Molaridade [nmol/l]	Notas	Área	Tempo de Migração Alinhado [s]	Altura de Pico	Largura de Pico	% do Total	Área corrigida no tempo
50	8,3	251,5	Marcador Inferior	17,6	**31,65**	29,2	1,4	**0**	54,9
84	0,04	0,7		0,1	**33,15**	0,2	0,8	**0,3**	0,4
131	0,4	4,6		1,3	**35,25**	1,5	1,5	**2,9**	3,7
165	0,35	3,2		1,2	**36,8**	1,7	1,2	**2,6**	3,2
468	0,03	0,1		0,2	**49,55**	0,3	0,8	**0,4**	0,3
543	0,02	0,1		0,1	**52**	0,2	0,6	**0,2**	0,2
576	0,02	0,1		0,1	**52,9**	0,2	0,7	**0,2**	0,2
606	0,01	0		0	**53,75**	0,1	0,6	**0,1**	0,1
646	0,05	0,1		0,2	**54,85**	0,5	0,8	**0,5**	0,4
673	0,01	0		0,1	**55,6**	0,2	0,5	**0,1**	0,1
1.352	0,11	0,1		0,7	**63,05**	0,8	1,4	**1,5**	1,1
1.660	0,09	0,1		0,5	**64,4**	0,7	1,2	**1,2**	0,8
2.732	0,04	0		0,2	**66,75**	0,3	1,1	**0,5**	0,3
4.545	4,45	1,5		29	**69**	40,5	2,2	**64**	41,8
8.543	1,74	0,3		11,4	**72,1**	15	2,3	**25,2**	15,7
11.568	0,02	0		0,1	**73,7**	0,2	0,5	**0,3**	0,1
17.000	4,2	0,4	Marcador Superior	26,3	**75,3**	27,7	2,6	**0**	34,7
46.535	0	0		0	**84**	0,1	0,5	**0**	0,1
55.701	0	0		0,3	**86,7**	0,4	1,2	**0**	0,3

[00713] Essa metodologia foi repetida várias vezes com diferentes oligos de ITR para resultar na produção sintética de diferentes vetores de ceDNA, incluindo um vetor WT/mutante de ceDNA, conforme mostrado na **Figura 14A** e um vetor de ceDNA mutante/mutante assimétrico, como mostrado na **Figura 15A**, bem como variantes alternativas de vetor de ceDNA que compreendem luciferase no cassete de unidade de expressão de genes em vez de proteína verde fluorescente no contexto de cada um desses pares de ITR. Seus resultados de bioanalisadores para os construtos de ceDNA de GFP são mostrados na **Figura 14B** e **Figura 15B**, respectivamente, e foram muito semelhantes aos obtidos para a amostra de vetor de ceDNA WT/WT (**Figura 13B**)). As tabelas de dados de pico para cada um são apresentadas abaixo na **Tabela 9** e na **Tabela 10**, respectivamente.

TABELA 9: PARÂMETROS DE PICO CORRESPONDENTES AO

CROMATÓGRAFO NA FIGURA 14B.

Tamanho [bp]	Conc. [ng/µl]	Molaridade [nmol/l]	Notas	Área	Tempo de Migração Alinhado [s]	Altura de Pico	Largura de Pico	% do Total	Área corrigida no tempo
50	8,3	251,5	Marcador Inferior	15,8	**31,65**	25,9	1,4	**0**	48,6
89	0,04	0,7		0,1	**33,35**	0,2	1,1	**0,2**	0,3
143	0,17	1,8		0,5	**35,79**	0,7	1	**0,7**	1,3
166	0,35	3,2		1	**36,84**	1,4	1,2	**1,5**	2,7
281	0,02	0,1		0,1	**42,08**	0,1	0,6	**0,1**	0,1
446	0,01	0		0,1	**48,66**	0,1	0,6	**0,1**	0,1
561	0,01	0		0,1	**52,5**	0,2	0,6	**0,1**	0,1
662	0,02	0		0,1	**55,3**	0,2	0,6	**0,1**	0,1
4.377	10,41	3,6		57,2	**68,81**	91	2	**83,2**	82,1
5.725	0,01	0		0	**70,06**	0,1	0,5	**0,1**	0,1
8.407	1,74	0,3		9,6	**72,01**	13,1	2,4	**13,9**	13,2
17.000	4,2	0,4	Marcador Superior	22,2	**75,3**	24,3	2,6	**0**	29,2
29.702	0	0		0,1	**79,04**	0,2	0,6	**0**	0,1

TABELA 10: PARÂMETROS DE PICO CORRESPONDENTES AO CROMATÓGRAFO NA FIGURA 15B.

Tamanho [bp]	Conc. [ng/µl]	Molaridade [nmol/l]	Notas	Área	Tempo de Migração Alinhado [s]	Altura de Pico	Largura de Pico	% do Total	Área corrigida no tempo
50	8,3	251,5	Marcador Inferior	15,4	**31,65**	25,4	1,5	**0**	47,4
81	0,13	2,5		0,4	**33**	0,5	1,1	**0,6**	1,1
115	0,91	11,9		2,4	**34,55**	3,8	1,4	**3,6**	6,9
146	0,3	3,1		0,8	**35,95**	1,1	1,5	**1,2**	2,3
4.091	10,19	3,8		55,3	**68,5**	89,6	1,8	**80,8**	79,7
7.661	1,66	0,3		9	**71,5**	10	2,1	**13,2**	12,5
11.738	0,08	0		0,4	**73,75**	0,6	0,8	**0,6**	0,6
17.000	4,2	0,4	Marcador Superior	22,1	**75,3**	25	2,4	**0**	29

[00714] O vetor de ceDNA (WT/mutante) produzido por um método tradicional de células de inseto Sf9 (**Figura 16A** também foi submetido a análises de bioanalisadores). O cromatógrafo é mostrado na **FIG. 16B**, e inclui notavelmente várias espécies adicionais de ceDNA, incluindo picos multiméricos e submonoméricos, mais do que aqueles observados nas análises vetoriais de ceDNA produzidas sinteticamente. Como pode ser visto comparando-se os dados de parâmetros de pico

nas **Tabelas 8 a 11**, as amostras produzidas sinteticamente são > 65% de vetor de ceDNA monomérico e em alguns casos > 85% de vetor de ceDNA monomérico, enquanto a amostra de vetor de ceDNA produzida por Sf9 foi < 35% de vetor de ceDNA monomérico e tinha inúmeras espécies adicionais de vetores de ceDNA presentes na amostra.

TABELA 11: DADOS DE PARÂMETROS DE PICO CORRESPONDENTES AO CROMATÓGRAFO MOSTRADO NA FIGURA 16B.

Tamanho [bp]	Conc. [ng/µl]	Molaridade [nmol/l]	Notas	Área	Tempo de Migração Alinhado [s]	Altura de Pico	Largura de Pico	% do Total	Área corrigida no tempo
11	0	0		0,2	**27,27**	0,3	0,7	**0**	0,7
19	0	0		0,1	**28,18**	0,3	0,7	**0**	0,5
31	0	0		0,1	**29,46**	0,3	0,6	**0**	0,5
50	8,3	251,5	Marcador Inferior	7,2	**31,65**	11,8	1,9	**0**	22,5
137	0,15	1,7		0,2	**35,55**	0,4	1	**0,6**	0,6
252	0,02	0,1		0	**40,79**	0,1	0,5	**0,1**	0,1
427	0,06	0,2		0,1	**47,95**	0,2	0,9	**0,3**	0,2
464	0,05	0,2		0,1	**49,39**	0,2	0,6	**0,3**	0,2
580	0,06	0,2		0,1	**53,02**	0,3	0,9	**0,4**	0,2
962	0,08	0,1		0,2	**60,23**	0,4	0,7	**0,5**	0,3
1.789	2,39	2		5,9	**64,72**	4,2	3,4	**17,6**	9,3
2.889	2,66	1,4		6,8	**67,07**	5,8	1,7	**20,4**	10,5
4.007	4,25	1,6		11,1	**68,41**	10,3	1,9	**33,4**	16,8
6.348	1,06	0,3		2,8	**70,54**	2,9	1,1	**8,4**	4,1
7.985	2,01	0,4		5,3	**71,72**	3,2	2,4	**15,9**	7,7
11.377	0,27	0		0,7	**73,64**	1,3	0,7	**2,1**	1
17.000	4,2	0,4	Marcador Superior	10,7	**75,3**	12,4	2,2	**0**	14,7
36.952	0	0		0,2	**81,18**	0,3	0,8	**0**	0,2
59.080	0	0		0,1	**87,7**	0,2	0,5	**0**	0,1
65.791	0	0		0,1	**89,67**	0,3	0,6	**0**	0,1
71.232	0	0		0,1	**91,27**	0,3	0,7	**0**	0,1
110.772	0	0		0	**102,92**	0,1	0,6	**0**	0

[00715] Para garantir que os vetores de ceDNA obtidos tivessem a estrutura apropriada do vetor de ceDNA de extremidade covalentemente fechada, as amostras de cada um foram digeridas com uma endonuclease de restrição com um único sítio de restrição no vetor de ceDNA, resultando, de preferência, em dois produtos de clivagem de tamanho desigual. Após digestão e eletroforese em um gel de desna-

turação, um DNA linear não covalentemente fechado exibirá bandas migrando no gel em tamanhos correspondentes aos dois fragmentos esperados. Um DNA linear fechado covalentemente (tal como o vetor de ceDNA) deve ter bandas migrando com o dobro do tamanho esperado dos produtos de clivagem, pois os dois filamentos de DNA estão ligados e após a clivagem se desdobram e adotam duas vezes o comprimento. Além disso, a digestão de formas monoméricas, diméricas e multiméricas do vetor de ceDNA será resolvida como um fragmento de mesmo tamanho devido à ligação de ponta a ponta desses vetores de DNA multiméricos. Quando cada um dos vetores de ceDNA sintético e produzido por Sf9 foi avaliado por esse método eletroforético em gel, cada uma das amostras tinha padrões de bandas semelhantes, indicando que todos os vetores de ceDNA tinham a estrutura de extremidade covalentemente fechada apropriada.

[00716] Será observado por um versado na técnica que as quantidades de todos os reagentes podem ser adaptadas para efetuar a produção da quantidade desejada de vetor de ceDNA.

EXEMPLO 7: TRANSGENE EXPRESSO POR VETORES DE ceDNA EM CÉLULAS

[00717] Para avaliar se os vetores de ceDNA produzidos sinteticamente foram capazes de expressar transgene de maneira similar aos vetores de ceDNA produzidos tradicionalmente com Sf9, a expressão de vetores de ceDNA em células cultivadas foi medida pelo grau de produção de proteína fluorescente (GFP) e emissão de fluorescência. Células hepáticas humanas (linhagem celular HepaRG, Lonza) foram preparadas a uma concentração de 7,5 x 10^4 células/ml. O vetor de ceDNA desejado foi introduzido nas células cultivadas com o uso de um dispositivo comercialmente disponível (Nucleofector™, Lonza) de acordo com os protocolos do fabricante. Uma tira de 16 poços que contém 150 ng/poço de cada construto foi nucleofectada em um volu-

me de 20 µl. Foram adicionadas amostras de núcleos infectados com 80 µl de meio em cada poço de uma placa de 96 poços para um volume final em cada poço de 100 µl. Os meios foram modificados 24 horas após a nucleofecção e subsequentemente substituídos duas vezes por semana. O plasmídeo que compreende o vetor de ceDNA mostrado na **Figura 14A** foi usado como controle. A fluorescência de cada cultura foi medida 6 dias após a nucleofecção com o uso do microscópio de imagem de células vivas Essen Bioscience IncuCyte®. Esse sistema é posicionado dentro de uma incubadora e automaticamente tira fotos da fase de lapso de tempo e de fluorescência de células no período desejado.

[00718] Os resultados são mostrados na **Figura 17**. A expressão de GFP aparece como manchas brancas brilhantes. As células tratadas com o vetor de ceDNA produzido por Sf9 com ITRs WT/mutantes apresentaram expressão semelhante de GFP como visto nas células tratadas com plasmídeo. Todos os três vetores de ceDNA produzidos sinteticamente (WT/WT, WT/Mut e mutante assimétrico) demonstraram maior fluorescência e número de manchas no ensaio do que o controle de plasmídeo ou o vetor de ceDNA tradicionalmente produzido por Sf9. Esse aumento relativo na fluorescência pode ser pelo menos parcialmente devido à maior pureza do material produzido sinteticamente àquela do material produzido tradicionalmente. Os resultados ilustram que o vetor ceDNA produzido sinteticamente expressa o transgene codificado pelo menos tão bem e possivelmente melhor do que o vetor de ceDNA produzido tradicionalmente por Sf9 e, portanto, que o material produzido sinteticamente funciona como esperado.

EXEMPLO 8: EXPRESSÃO PROTEICA DE VETORES DE ceDNA EM CAMUNDONGOS

[00719] A expressão proteica *in vivo* de um transgene de luciferase de vaga-lume a partir dos vetores de ceDNA produzidos sinteticamen-

te descritos acima foi avaliada *in vivo* em camundongos em comparação com vetores de ceDNA equivalentes produzidos tradicionalmente. Trinta camundongos CDS-1 IGS machos com aproximadamente quatro semanas de idade (Envigo) receberam uma única administração intravenosa de 0,5 mg/kg em um volume de 5 ml/kg de (a) ceDNA WT/Mut produzido por LNP-Sf9, (b) ceDNA Mut/Mut produzido por LNP-Sf9 (assimétrico), (c) vetores de ceDNA WT/WT produzidos por LNP-Sf9, (d) vetores de ceDNA WT/WT sintéticos de LNP, (e) ceDNA WT/Mut sintético de LNP, ou (f) controle de LNP-Poly C. Os camundongos são avaliados por 28 dias após a injeção, com coleta de sangue total nos dias 0, 1 e 28. A imaginologia *in vivo* (IVIS) de cada camundongo inteiro foi realizada nos dias 3, 7, 14, 21 e 28, aplicando-se a cada camundongo luciferina a 150 mg/kg (60 mg/ml) por injeção intraperitoneal a 2,5 ml/kg, com raspagem do pelo de camundongo, conforme necessário. Quinze minutos após cada injeção de luciferina, cada camundongo é anestesiado e imageado. Os animais são concluídos no dia 28 e o fígado e o baço são coletados e imageados *ex vivo* por IVIS. A expressão de luciferase é adicionalmente avaliada nesses tecidos por um ensaio ELISA de luciferase (MAXDISCOVERY®, BIOO Scientific/PerkinElmer) e qPCR para luciferase de amostras de fígado.

[00720] Os resultados das análises IVIS do dia 3 e 7 são mostrados nas **Figuras 18A e 18B** (dados do dia 7). Observou-se fluorescência significativa acima dos níveis de fundo em cada um dos grupos de camundongos tratados com ceDNA. A fluorescência detectada nos camundongos tratados com vetores de ceDNA produzidos sinteticamente foi pelo menos tão grande e, em alguns casos, maior que a fluorescência detectada nos camundongos tratados com o ceDNA produzido tradicionalmente. Conforme visto na **Figura 18B** em relação aos dados do dia 7, a maior parte da fluorescência foi localizada no fígado como esperado para cada grupo de tratamento. Esse resultado mostra

novamente que o ceDNA produzido por métodos sintéticos funciona *in vivo* de modo similar aos vetores de ceDNA produzidos por Sf9.

REFERÊNCIAS

[00721] Todas as publicações e referências, incluindo, mas sem limitação, patentes e pedidos de patentes, citadas neste relatório descritivo e Exemplos do presente documento são incorporadas a título de referência em sua totalidade, como se cada publicação ou referência individual fosse específica e individualmente indicada para ser incorporada ao presente documento a título de referência como sendo totalmente estabelecida. Qualquer pedido de patente ao qual este pedido reivindica prioridade também é incorporado ao presente documento a título de referência, na maneira descrita acima para publicações e referências.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar um vetor de DNA de extremidade fechada, caracterizado pelo fato de que compreende:

fornecer uma primeira molécula de ITR de filamento simples que compreende uma primeira ITR;

fornecer uma segunda molécula de ITR de filamento simples que compreende uma segunda ITR;

fornecer um polinucleotídeo de filamento duplo que compreende uma sequência de cassetes de expressão; e

ligar as extremidades 5' e 3' da primeira molécula de ITR a uma primeira extremidade da molécula de filamento duplo e ligar as extremidades 5' e 3' da segunda molécula de ITR à segunda extremidade da molécula de filamento duplo para formar o vetor de DNA.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR e a segunda ITR é sintetizada.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de cassetes de expressão de filamento duplo foi obtida por meio de excisão de um construto de DNA de filamento duplo que compreende a sequência de cassetes de expressão.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que dentro do construto de DNA de filamento duplo, a sequência de cassetes de expressão é flanqueada na extremidade 5' por um primeiro sítio de clivagem de endonuclease de restrição e na extremidade 3' por um segundo local de clivagem de endonuclease de restrição.

5. Método, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que o construto de DNA de filamento duplo é uma molécula de DNA de bacmídeo, plasmídeo, minicírculo ou uma molécula de DNA linear de filamento duplo.

6. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a primeira endonuclease de restrição e a segunda endonuclease de restrição são a mesma endonuclease de restrição.

7. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a primeira endonuclease de restrição e a segunda endonuclease de restrição são endonucleases de restrição diferentes.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR e a segunda ITR são aneladas antes da ligação à sequência de cassetes de expressão.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR e a segunda ITR compreende uma região protuberante complementar à primeira extremidade da sequência de cassetes de expressão ou à segunda extremidade da sequência de cassetes de expressão, respectivamente.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a ligação é selecionada a partir de uma ligação química e uma ligação assistida por proteína.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a ligação é efetuada por T4 ligase ou uma proteína Rep AAV.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a primeira ITR é selecionada a partir de uma ITR do tipo selvagem e uma ITR modificada.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a segunda ITR é selecionada a partir de uma ITR do tipo selvagem e uma ITR modificada.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções precedentes, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR e a segunda ITR compreende pelo menos um sítio de RBE.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR e a segunda ITR é uma ITR de AAV ou uma ITR derivada de AAV.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a sequência da primeira ITR é selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ITR esquerda apresentadas na Tabela 4B ou na Tabela 5 ou SEQ ID NO: 2, 5 a 9, 32 a 48.

17. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a sequência da segunda ITR é selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ITR direita apresentadas na Tabela 4A ou na Tabela 5 ou SEQ ID NO: 1, 3, 10 a 14, 15 a 31.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a sequência de cassetes de expressão compreende pelo menos um elemento cis-regulador.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o elemento cis-regulador é selecionado a partir do grupo que consiste em um promotor, um intensificador, um elemento regulador pós-transcricional e um sinal de poliadenilação.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o elemento regulador pós-transcricional compreende um elemento regulador pós-transcricional de WHP (WPRE).

21. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o promotor é selecionado a partir do grupo que consiste em um promotor de CAG, um promotor de AAT, um promotor de LP1 e um promotor de EF1a.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções precedentes, caracterizado pelo fato de que a sequência de cassetes de expressão compreende uma sequência de transgenes.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes tem pelo menos 2.000 nucleotídeos de comprimento.

24. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes codifica uma proteína.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes codifica uma proteína repórter, uma proteína terapêutica, um antígeno, uma proteína de edição de genes ou uma proteína citotóxica.

26. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes é uma sequência de nucleotídeos funcional.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o vetor de DNA de extremidade fechada é um vetor de ceDNA.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o vetor de ceDNA é purificado.

29. Vetor de DNA de extremidade fechada, caracterizado pelo fato de que é gerado pelo método, como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes.

30. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de DNA de extremidade fechada, como definido na reivindicação 29 e, opcionalmente, um excipiente.

31. Método para preparar um vetor de DNA de extremidade fechada, caracterizado pelo fato de que compreende:

colocar em contato um construto de DNA de filamento duplo que compreende:

um cassete de expressão;

uma primeira ITR a montante (extremidade 5') do cassete de expressão;

uma segunda ITR a jusante (extremidade 3') do cassete de expressão;

e pelo menos dois sítios de clivagem de endonuclease de restrição que flanqueiam as ITRs, de modo que as endonucleases de restrição estejam distais ao cassete de expressão

com uma ou mais endonucleases de restrição que podem clivar o construto de DNA de filamento duplo nos sítios de clivagem de endonuclease de restrição para excisar as sequências entre os sítios de clivagem de endonuclease de restrição a partir do construto de DNA de filamento duplo; e ligar as extremidades 5' e 3' da sequência excisada para formar um vetor de DNA de extremidade fechada.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o construto de DNA de filamento duplo é um bacmídeo, plasmídeo, minicírculo ou uma molécula de DNA de filamento duplo linear.

33. Método, de acordo com a reivindicação 31 ou 32, caracterizado pelo fato de que uma única endonuclease de restrição é usada para efetuar a excisão.

34. Método, de acordo com a reivindicação 31 ou 32, caracterizado pelo fato de que duas endonucleases de restrição diferentes são usadas para efetuar a excisão.

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a ligação é selecionada a partir de uma ligação química e uma ligação assistida por proteína.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que a ligação é efetuada por T4 ligase ou uma proteína Rep AAV.

37. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 36, caracterizado pelo fato de que a primeira ITR é selecionada a partir de uma ITR do tipo selvagem e uma ITR modificada.

38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 37, caracterizado pelo fato de que a segunda ITR é selecionada a partir de uma ITR do tipo selvagem e uma ITR modificada.

39. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 38, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR e a segunda ITR compreende pelo menos um sítio de RBE.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 39, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR e a segunda ITR é uma ITR de AAV ou uma ITR derivada de AAV.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 40, caracterizado pelo fato de que a sequência da primeira ITR é selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ITR esquerda apresentadas na Tabela 4B ou Tabela 5 ou SEQ ID NO: 2, 5 a 9, 32 a 48.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 41, caracterizado pelo fato de que a sequência da segunda ITR é selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ITR direita apresentadas na Tabela 4A ou na Tabela 5 ou nas SEQ ID NO: 1, 3, 10 a 14, 15 a 31.

43. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 42, caracterizado pelo fato de que a sequência de cassetes de expressão compreende pelo menos um elemento cis-regulador.

44. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 43, caracterizado pelo fato de que o elemento cis-regulador é selecionado a partir do grupo que consiste em um promotor, um in-

tensificador, um elemento regulador pós-transcricional e um sinal de poliadenilação.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o elemento regulador pós-transcricional compreende um elemento regulador pós-transcricional de WHP (WPRE).

46. Método, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o promotor é selecionado a partir do grupo que consiste em um promotor de CAG, um promotor de AAT, um promotor de LP1 e um promotor de EF1a.

47. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 46, caracterizado pelo fato de que a sequência de cassetes de expressão compreende uma sequência de transgenes.

48. Método, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes tem pelo menos 2.000 nucleotídeos de comprimento.

49. Método, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes codifica uma proteína.

50. Método, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes codifica uma proteína repórter, uma proteína terapêutica, um antígeno, uma proteína de edição de genes ou uma proteína citotóxica.

51. Método, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes é uma sequência de nucleotídeos funcional.

52. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 51, caracterizado pelo fato de que o vetor de DNA de extremidade fechada é um vetor de ceDNA.

53. Método, de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que o vetor de ceDNA é purificado.

54. Vetor de DNA de extremidade fechada, caracterizado

pelo fato de que é gerado pelo método, como definido em qualquer uma das reivindicações 31 a 54.

55. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de DNA de extremidade fechada, como definido na reivindicação 54, e, opcionalmente, um excipiente.

56. Método para preparar um vetor de DNA, caracterizado pelo fato de que compreende:

sintetizar uma molécula de DNA de filamento simples que compreende na ordem na direção 5' a 3':

uma primeira ITR senso;

uma sequência de cassetes de expressão senso;

uma segunda ITR senso;

uma segunda ITR antissenso;

uma sequência de cassetes de expressão antissenso; e

uma primeira ITR antissenso;

formar um polinucleotídeo que compreende uma estrutura em gancho a partir da molécula de filamento simples; e ligar as extremidades 5' e 3' para formar o vetor de DNA de extremidade fechada.

57. Método, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR senso, a sequência de cassetes de expressão senso, a segunda ITR senso, a segunda ITR antissenso, a sequência de cassetes de expressão antissenso e a primeira ITR antissenso é sintetizada.

58. Método, de acordo com a reivindicação 56 ou 57, caracterizado pelo fato de que a molécula de DNA de filamento simples é construída sintetizando-se uma ou mais dentre a primeira ITR senso, a sequência de cassetes de expressão senso, a segunda ITR senso, a segunda ITR antissenso, a sequência de cassetes de expressão antissenso, e a primeira ITR antissenso como oligonucleotídeos e ligando-se esses oligonucleotídeos para formar a molécula de DNA de filamen-

to simples.

59. Método, de acordo com a reivindicação 56 ou 57, caracterizado pelo fato de que a molécula de DNA de filamento simples é fornecida por excisão da molécula de um polinucleotídeo de DNA de filamento duplo, seguida por desnaturação do fragmento de filamento duplo excisado para produzir a molécula de DNA de filamento simples.

60. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 59, caracterizado pelo fato de que a etapa de formação de um polinucleotídeo que compreende estrutura em gancho a partir da molécula de filamento simples é realizada pelo anelamento da molécula de filamento simples sob condições pelas quais uma ou mais das ITRs formam um laço de estrutura em gancho.

61. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 60, caracterizado pelo fato de que a ligação é selecionada a partir de uma ligação química e uma ligação assistida por proteína.

62. Método, de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que a ligação é efetuada por T4 ligase ou uma proteína Rep AAV.

63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 62, caracterizado pelo fato de que a primeira ITR senso é selecionada a partir de uma ITR do tipo selvagem e uma ITR modificada.

64. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 63, caracterizado pelo fato de que a segunda ITR senso é selecionada a partir de uma ITR do tipo selvagem e uma ITR modificada.

65. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 64, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR senso, a primeira ITR antissenso, a primeira ITR senso e a segunda ITR senso compreende pelo menos um sítio de RBE.

66. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 65, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR senso e a segunda ITR senso é uma ITR de AAV ou uma ITR derivada de AAV.

67. Método, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que a sequência da primeira ITR senso é selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ITR esquerda apresentadas na Tabela 4B ou na Tabela 5 ou SEQ ID NO: 2, 5 a 9, 32 a 48.

68. Método, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que a sequência da segunda ITR é selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ITR direita apresentadas na Tabela 4A ou na Tabela 5 ou SEQ ID NO: 1, 3, 10 a 14, 15 a 31.

69. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 68, caracterizado pelo fato de que a sequência de cassetes de expressão senso compreende pelo menos um elemento cis-regulador.

70. Método, de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que o elemento cis-regulador é selecionado a partir do grupo que consiste em um promotor, um intensificador, um elemento regulador pós-transcricional e um sinal de poliadenilação.

71. Método, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o elemento regulador pós-transcricional compreende um elemento regulador pós-transcricional de WHP (WPRE).

72. Método, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o promotor é selecionado a partir do grupo que consiste em um promotor de CAG, um promotor de AAT, um promotor de LP1 e um promotor de EF1a.

73. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 72, caracterizado pelo fato de que a sequência de cassetes de expressão senso compreende uma sequência de transgenes.

74. Método, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes tem pelo menos 2.000 nucleotídeos de comprimento.

75. Método, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes codifica uma proteína.

76. Método, de acordo com a reivindicação 75, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes codifica uma proteína repórter, uma proteína terapêutica, um antígeno, uma proteína de edição de genes ou uma proteína citotóxica.

77. Método, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes é uma sequência de nucleotídeos funcional.

78. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 77, caracterizado pelo fato de que o vetor de DNA de extremidade fechada é um vetor de ceDNA.

79. Método, de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que o vetor de ceDNA é purificado.

80. Vetor de DNA de extremidade fechada, caracterizado pelo fato de que é gerado pelo método, como definido em qualquer uma das reivindicações 56 a 79.

81. Composição farmacêutica caracterizada, pelo fato de que compreende o vetor de DNA de extremidade fechada, como definido na reivindicação 80, e, opcionalmente, um excipiente.

82. Método para preparar um vetor de DNA de extremidade fechada, caracterizado pelo fato de que compreende:

sintetizar uma molécula de DNA de filamento simples que compreende na ordem na direção 5' a 3':

uma primeira ITR senso;

uma sequência de cassetes de expressão senso;

uma segunda ITR senso; e

uma sequência de cassetes de expressão antissenso;

e anelar a molécula.

83. Método, de acordo com a reivindicação 82, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR senso, a sequência de cassetes de expressão senso, a segunda ITR senso e a sequência de cassetes de expressão antissenso é sintetizada.

84. Método, de acordo com a reivindicação 82 ou 83, caracterizado pelo fato de que a molécula de DNA de filamento simples é construída sintetizando-se uma ou mais dentre a primeira ITR senso, a sequência de cassetes de expressão senso, a segunda ITR senso e a sequência de cassetes de expressão antissenso e ligando-se esses oligonucleotídeos para formar a molécula de DNA de filamento simples.

85. Método, de acordo com a reivindicação 82 ou 83, caracterizado pelo fato de que a molécula de DNA de filamento simples é fornecida por excisão da molécula de um polinucleotídeo de DNA de filamento duplo, seguida por desnaturação do fragmento de filamento duplo excisado para produzir a molécula de DNA de filamento simples.

86. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 85, caracterizado pelo fato de que a etapa de anelamento resulta na formação de um laço de estrutura em gancho por uma ou ambas dentre a primeira ITR senso e a segunda ITR senso.

87. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 86, caracterizado pelo fato de que a primeira ITR senso é selecionada a partir de uma ITR do tipo selvagem e uma ITR modificada.

88. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 87, caracterizado pelo fato de que a segunda ITR senso é selecionada a partir de uma ITR do tipo selvagem e uma ITR modificada.

89. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 88, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR senso e a segunda ITR senso compreende pelo menos um sítio de RBE.

90. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 89, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR senso e a segunda ITR senso é uma ITR de AAV ou uma ITR derivada de AAV.

91. Método, de acordo com a reivindicação 90, caracterizado pelo fato de que a sequência da primeira ITR senso é selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ITR esquerda apresentadas na Tabela 4B ou na Tabela 5 ou SEQ ID NO: 2, 5 a 9, 32 a 48.

92. Método, de acordo com a reivindicação 90, caracterizado pelo fato de que a sequência da segunda ITR é selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ITR direita apresentadas na Tabela 4A ou na Tabela 5 ou SEQ ID NO: 1, 3, 10 a 14, 15 a 31.

93. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 92, caracterizado pelo fato de que a sequência de cassetes de expressão senso compreende pelo menos um elemento cis-regulador.

94. Método, de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que o elemento cis-regulador é selecionado a partir do grupo que consiste em um promotor, um intensificador, um elemento regulador pós-transcricional e um sinal de poliadenilação.

95. Método, de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que o elemento regulador pós-transcricional compreende um elemento regulador pós-transcricional de WHP (WPRE).

96. Método, de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que o promotor é selecionado a partir do grupo que consiste em um promotor de CAG, um promotor de AAT, um promotor

de LP1 e um promotor de EF1a.

97. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 96, caracterizado pelo fato de que a sequência de cassetes de expressão senso compreende uma sequência de transgenes.

98. Método, de acordo com a reivindicação 97, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes tem pelo menos 2.000 nucleotídeos de comprimento.

99. Método, de acordo com a reivindicação 97, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes codifica uma proteína.

100. Método, de acordo com a reivindicação 99, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes codifica uma proteína repórter, uma proteína terapêutica, um antígeno, uma proteína de edição de genes ou uma proteína citotóxica.

101. Método, de acordo com a reivindicação 97, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes é uma sequência de nucleotídeos funcional.

102. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 101, caracterizado pelo fato de que o vetor de DNA de extremidade fechada é um vetor de ceDNA.

103. Método, de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que o vetor de ceDNA é purificado.

104. Vetor de DNA de extremidade fechada, caracterizado pelo fato de que é gerado pelo método, como definido em qualquer uma das reivindicações 82 a 103.

105. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de DNA de extremidade fechada, como definido na reivindicação 104, e, opcionalmente, um excipiente.

106. Método para preparar um vetor de DNA de extremidade fechada, caracterizado pelo fato de que compreende:

fornecer um construto de DNA de filamento duplo que com-

preende na ordem na direção 5' a 3':

um primeiro sítio de clivagem de endonuclease de restrição;

uma primeira ITR senso;

uma sequência de cassetes de expressão senso;

uma segunda ITR senso;

uma sequência de cassetes de expressão antissenso; e

um segundo sítio de clivagem de endonuclease de restrição;

colocar o construto de DNA de filamento duplo em contato com uma ou mais endonucleases de restrição que podem clivar o construto de DNA de filamento duplo no primeiro sítio de clivagem de endonuclease de restrição e no segundo sítio de clivagem de endonuclease de restrição para excisar a sequência de filamento duplo entre os sítios de clivagem de endonuclease de restrição a partir do polinucleotídeo de filamento duplo;

separar a sequência de filamento duplo excisada em um filamento senso e um filamento antissenso; e

realizar uma etapa de anelamento em que cada um dentre o filamento senso e o filamento antissenso forma um vetor de DNA de extremidade fechada.

107. Método, de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que o construto de DNA de filamento duplo é um bacmídeo, plasmídeo, minicírculo ou uma molécula de DNA de filamento duplo linear.

108. Método, de acordo com a reivindicação 106 ou 107, caracterizado pelo fato de que uma única endonuclease de restrição é usada para efetuar a excisão.

109. Método, de acordo com a reivindicação 106 ou 107, caracterizado pelo fato de que duas endonucleases de restrição diferentes são usadas para efetuar a excisão.

110. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 109, caracterizado pelo fato de que a etapa de anelamento resulta na formação de um laço de estrutura em gancho por uma ou ambas dentre a primeira ITR senso e a segunda ITR senso.

111. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 110, caracterizado pelo fato de que a primeira ITR senso é selecionada a partir de uma ITR do tipo selvagem e uma ITR modificada.

112. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 111, caracterizado pelo fato de que a segunda ITR senso é selecionada a partir de uma ITR do tipo selvagem e uma ITR modificada.

113. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 112, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR senso e a segunda ITR senso compreende pelo menos um sítio de RBE.

114. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 113, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dentre a primeira ITR senso e a segunda ITR senso é uma ITR de AAV ou uma ITR derivada de AAV.

115. Método, de acordo com a reivindicação 114, caracterizado pelo fato de que a sequência da primeira ITR senso é selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ITR esquerda apresentadas na Tabela 4B ou na Tabela 5 ou SEQ ID NO: 2, 5 a 9, 32 a 48.

116. Método, de acordo com a reivindicação 114, caracterizado pelo fato de que a sequência da segunda ITR é selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ITR direita apresentadas na Tabela 4A ou na Tabela 5 ou SEQ ID NO: 1, 3, 10 a 14, 15 a 31.

117. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 116, caracterizado pelo fato de que a sequência de casse-

tes de expressão senso compreende pelo menos um elemento cis-regulador.

118. Método, de acordo com a reivindicação 117, caracterizado pelo fato de que o elemento cis-regulador é selecionado a partir do grupo que consiste em um promotor, um intensificador, um elemento regulador pós-transcricional e um sinal de poliadenilação.

119. Método, de acordo com a reivindicação 118, caracterizado pelo fato de que o elemento regulador pós-transcricional compreende um elemento regulador pós-transcricional de WHP (WPRE).

120. Método, de acordo com a reivindicação 118, caracterizado pelo fato de que o promotor é selecionado a partir do grupo que consiste em um promotor de CAG, um promotor de AAT, um promotor de LP1 e um promotor de EF1a.

121. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 120, caracterizado pelo fato de que a sequência de cassetes de expressão senso compreende uma sequência de transgenes.

122. Método, de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes tem pelo menos 2.000 nucleotídeos de comprimento.

123. Método, de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes codifica uma proteína.

124. Método, de acordo com a reivindicação 123, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes codifica uma proteína repórter, uma proteína terapêutica, um antígeno, uma proteína de edição de genes ou uma proteína citotóxica.

125. Método, de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que a sequência de transgenes é uma sequência de nucleotídeos funcional.

126. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 106 a 125, caracterizado pelo fato de que o vetor de DNA de extremidade fechada é um vetor de ceDNA.

127. Método, de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que o vetor de ceDNA é purificado.

128. Vetor de DNA de extremidade fechada, caracterizado pelo fato de que é gerado pelo método, como definido em qualquer uma das reivindicações 106 a 127.

129. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de DNA de extremidade fechada, como definido na reivindicação 128, e, opcionalmente, um excipiente.

130. Vetor de DNA de extremidade fechada isolado, caracterizado pelo fato de que é obtido por ou obtenível por um processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, 31 a 53, 56 a 79, 82 a 103 e 106 a 127.

131. Medicina genética, caracterizada pelo fato de que compreende um vetor de DNA de extremidade fechada isolado obtido pelo processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, 31 a 53, 56 a 79, 82 a 103 e 106 a 127.

132. Célula, caracterizada pelo fato de que compreende um vetor de DNA de extremidade fechada, como definido na reivindicação 130.

133. Animal transgênico, caracterizado pelo fato de que compreende o vetor de DNA de extremidade fechada, como definido na reivindicação 130.

134. Método, caracterizado pelo fato de que é para tratar um sujeito administrando-se um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, 31 a 53, 56 a 79, 82 a 103 e 106 a 127.

135. Método para entregar uma proteína terapêutica a um sujeito, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

administrar a um sujeito uma composição que compreende um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, 31 a 53, 56 a 79, 82 a 103 e 106 a 127, em que pelo menos uma sequência de nucleotídeos heteróloga codifica uma proteína terapêutica.

136. Método, de acordo com a reivindicação 135, caracterizado pelo fato de que a proteína terapêutica é um anticorpo terapêutico.

137. Kit caracterizado pelo fato de que compreende um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, 31 a 53, 56 a 79, 82 a 103 e 106 a 127, e um nanocarreador, empacotado em um recipiente com um inserto de pacote.

138. Kit caracterizado pelo fato de que é para produzir um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, 31 a 53, 56 a 79, 82 a 103 e 106 a 127.

139. Kit para produzir um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de que compreende uma primeira molécula de ITR de filamento simples que compreende uma primeira ITR, uma segunda molécula de ITR de filamento simples que compreende uma segunda ITR e pelo menos um reagente para ligação da primeira molécula de ITR de filamento simples e da segunda molécula de ITR de filamento simples a uma molécula de polinucleotídeo de filamento duplo.

140. Kit para produzir um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 31 a 53, caracterizado pelo fato de que compreende:

um construto de DNA de filamento duplo que compreende um cassete de expressão; uma primeira ITR a montante (extremidade 5') do cassete de expressão; uma segunda ITR a jusante (extremidade 3') do cassete de expressão; e pelo menos dois sítios de clivagem de endonuclease de restrição que flanqueiam as ITRs, de modo que as endonucleases de restrição estejam distais ao cassete de expressão, em que o cassete de expressão tem um sítio de endonuclease de restrição para inserção de um transgene, e

pelo menos um reagente de ligação para ligação

141. Kit para produzir um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 56 a 79, caracterizado pelo fato de que compreende:

molécula de DNA de filamento simples que compreende na ordem na direção 5' até 3':

uma primeira ITR senso;

uma sequência de cassetes de expressão senso;

uma segunda ITR senso;

uma segunda ITR antissenso;

uma sequência de cassetes de expressão antissenso; e

uma primeira ITR antissenso;

em que a sequência de cassetes de expressão senso e a sequência de cassetes de expressão antissenso têm um sítio de endonuclease de restrição para inserção de um transgene, e

pelo menos um reagente de ligação para ligação

142. Kit para produzir um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 82 a 103, caracterizado pelo fato de que compreende:

uma molécula de DNA de filamento simples que compreen-

de na ordem de direção 5' até 3':

uma primeira ITR senso;

uma sequência de cassetes de expressão senso;

uma segunda ITR senso; e

uma sequência de cassetes de expressão antissenso;

em que a sequência de cassetes de expressão senso e a sequência de cassetes de expressão antissenso têm um sítio de endonuclease de restrição para inserção de um transgene, e

pelo menos um reagente de ligação para ligação.

143. Kit para produzir um vetor de DNA de extremidade fechada obtido por ou obtenível por um processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 106 a 127, caracterizado pelo fato de que compreende:

um construto de DNA de filamento duplo que compreende na ordem na direção 5' até 3':

um primeiro sítio de clivagem de endonuclease de restrição;

uma primeira ITR senso;

uma sequência de cassetes de expressão senso;

uma segunda ITR senso;

uma sequência de cassetes de expressão antissenso; e

um segundo sítio de clivagem de endonuclease de restrição;

em que a sequência de cassetes de expressão senso e a sequência de cassetes de expressão antissenso têm um sítio de endonuclease de restrição para inserção de um transgene, e

pelo menos um reagente de ligação para ligação.

144. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 138 a 143, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um reagente para ligação é um reagente para ligação química.

145. Kit, de acordo com a reivindicação 144, caracterizado

pelo fato de que o pelo menos um reagente para ligação é um reagente para ligação assistida por proteína.

146. Kit, de acordo com a reivindicação 146, caracterizado pelo fato de que a ligação é efetuada pela ligação a T4 ou uma proteína Rep AAV.

147. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 138 a 146, caracterizado pelo fato de que a primeira molécula de ITR de filamento simples e a segunda molécula de ITR de filamento simples compreendem um sítio de clivagem de endonuclease de restrição em suas extremidades.

148. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 138 a 147, caracterizado pelo fato de que o kit compreende adicionalmente pelo menos uma enzima de endonuclease de restrição.

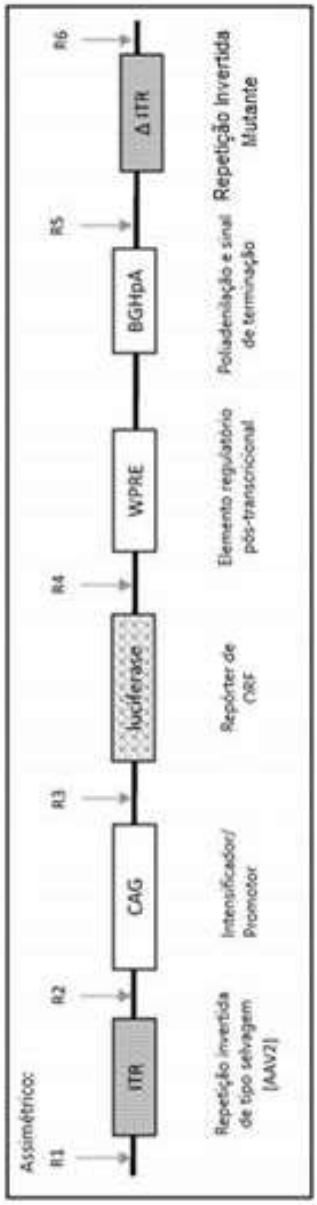


Fig. 1A

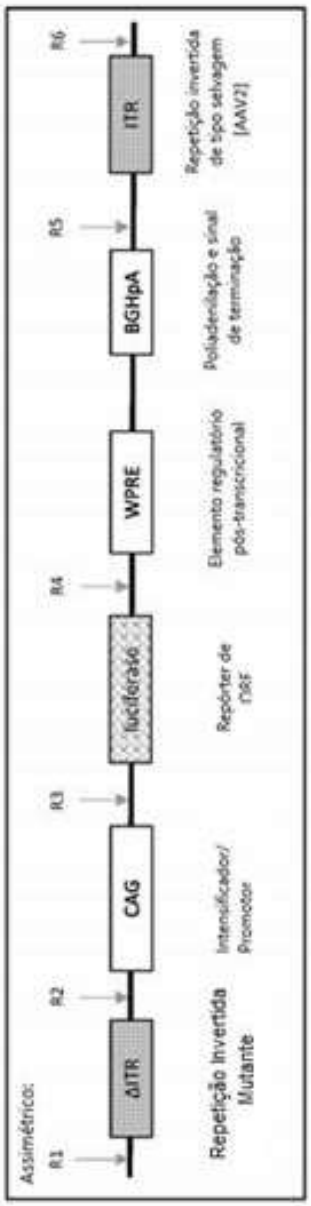


Fig. 1B

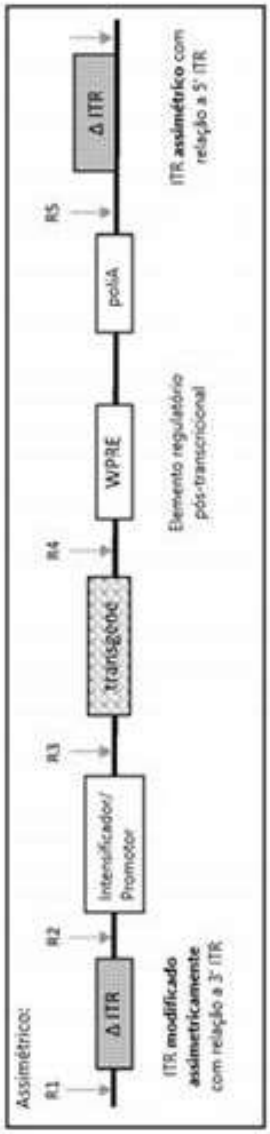


Fig 1C

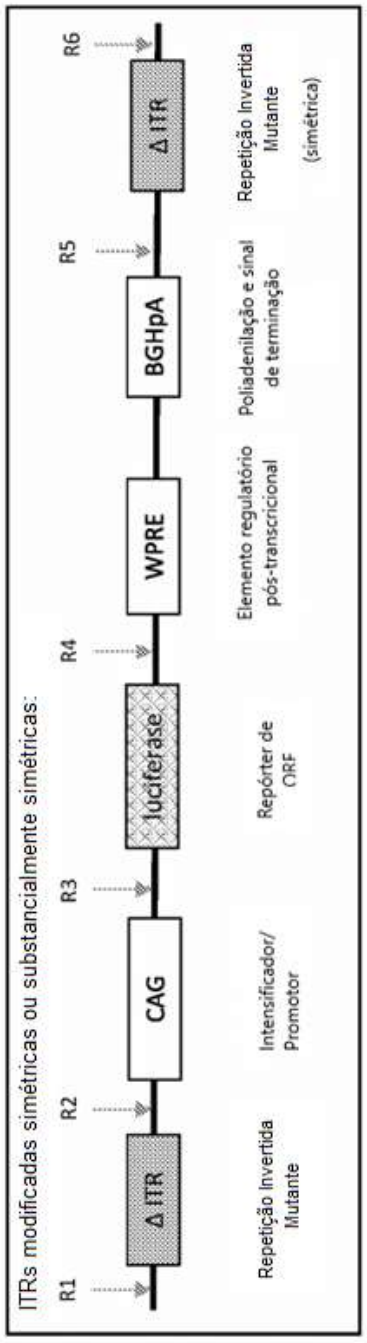

ITRs modificadas simétricas ou substancialmente simétricas:
R1
R2
R3
R4
R5
R6
Δ ITR
CAG
luciferase
WPRE
BGHpA
Δ ITR
Repetição Invertida Mutante
Intensificador/ Promotor
Repórter de ORF
Elemento regulatório pós-transcricional
Poliadenilação e sinal de terminação
Repetição Invertida Mutante (simétrica)

FIG. 1D

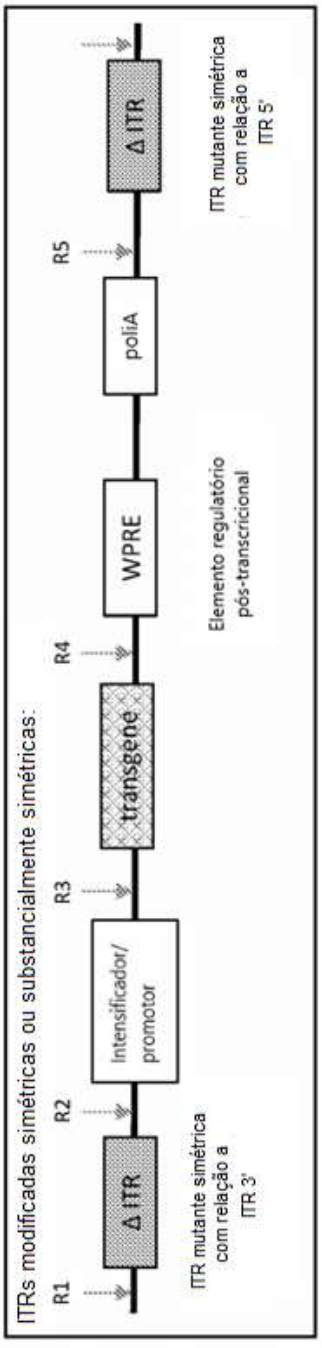

ITRs modificadas simétricas ou substancialmente simétricas:
R1
R2
R3
R4
R5
Δ ITR
Intensificador/ promotor
transgene
WPRE
poliA
Δ ITR
ITR mutante simétrica com relação a ITR 3'
Elemento regulatório pós-transcricional
ITR mutante simétrica com relação a ITR 5'

FIG. 1E

FIG. 1F

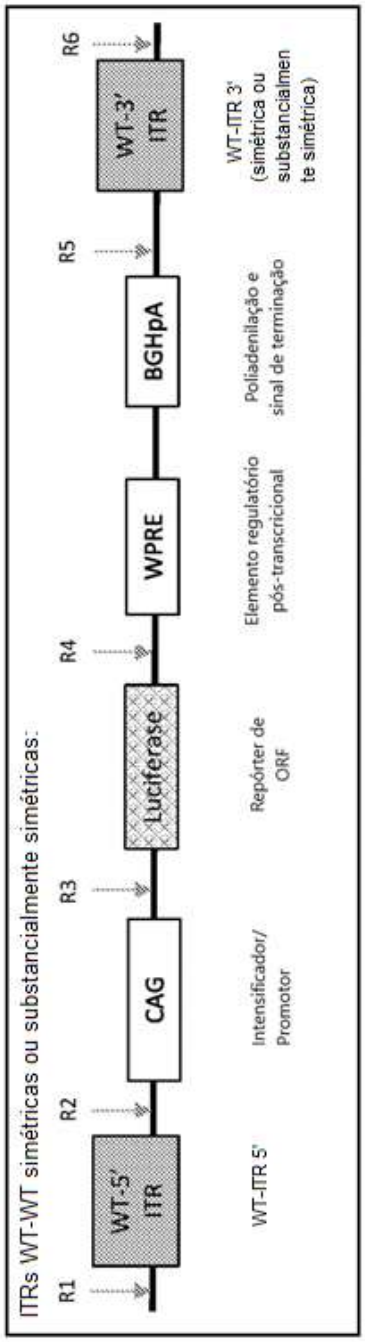
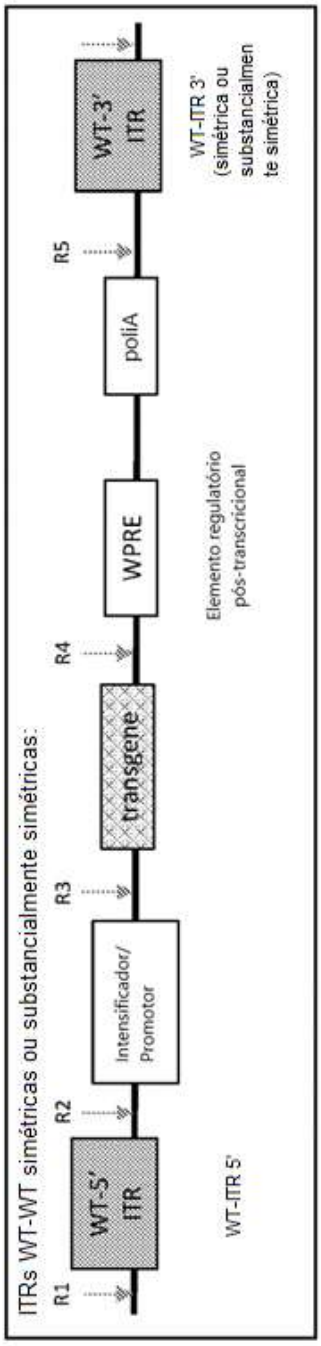

ITRs WT-WT simétricas ou substancialmente simétricas:
R1
R2
R3
R4
R5
R6
WT-5' ITR
CAG
Luciferase
WPRE
BGHpA
WT-3' ITR
WT-ITR 5'
Intensificador/ Promotor
Repórter de ORF
Elemento regulatório pós-transcricional
Poliadenilação e sinal de terminação
WT-ITR 3' (simétrica ou substancialmente simétrica)

FIG. 1G


ITRs WT-WT simétricas ou substancialmente simétricas:
R1
R2
R3
R4
R5
WT-5' ITR
Intensificador/ Promotor
transgene
WPRE
políA
WT-3' ITR
WT-ITR 5'
Elemento regulatório pós-transcricional
WT-ITR 3' (simétrica ou substancialmente simétrica)

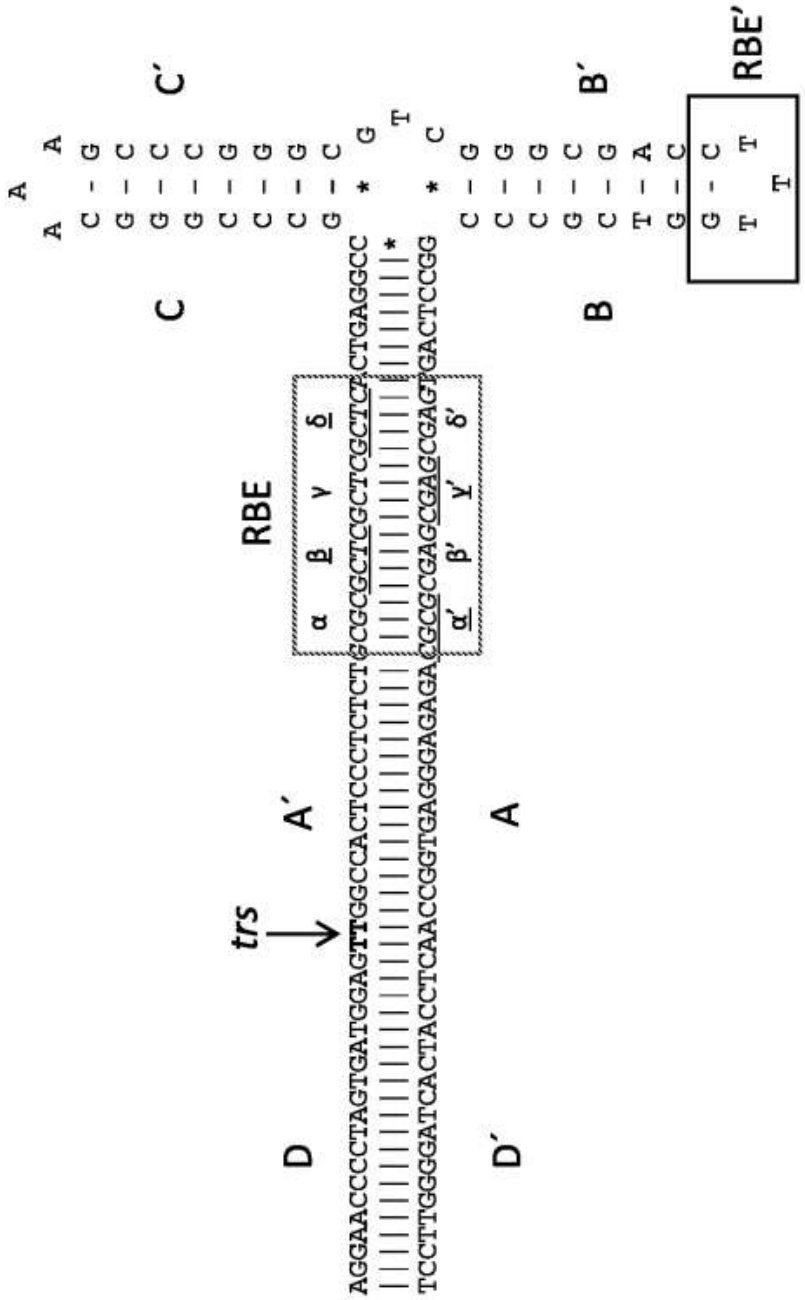


FIG. 2A

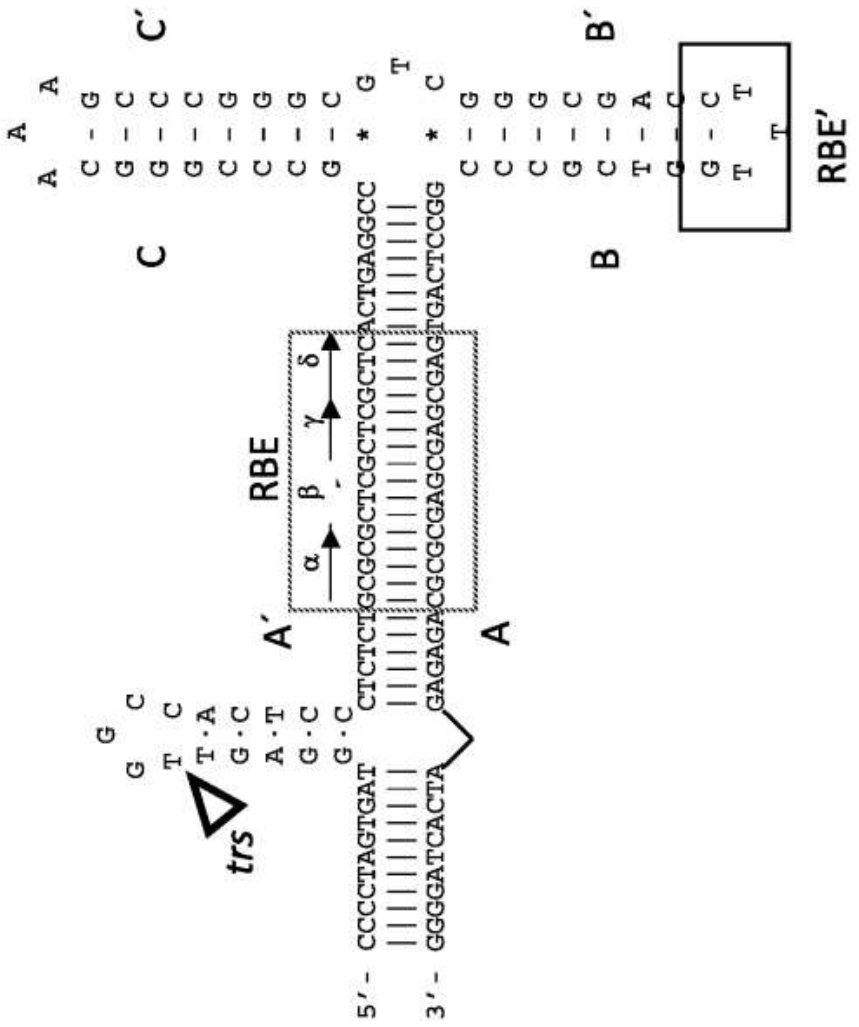

trs
A´
RBE
α
β
γ
δ
A
C
C´
B
B´
RBE´
5´- CCCCTAGTGAT CTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC
3´- GGGGATCACTA GAGAGACGCGCGAGCGAGCGAGTGACTCCGG

FIG. 2B

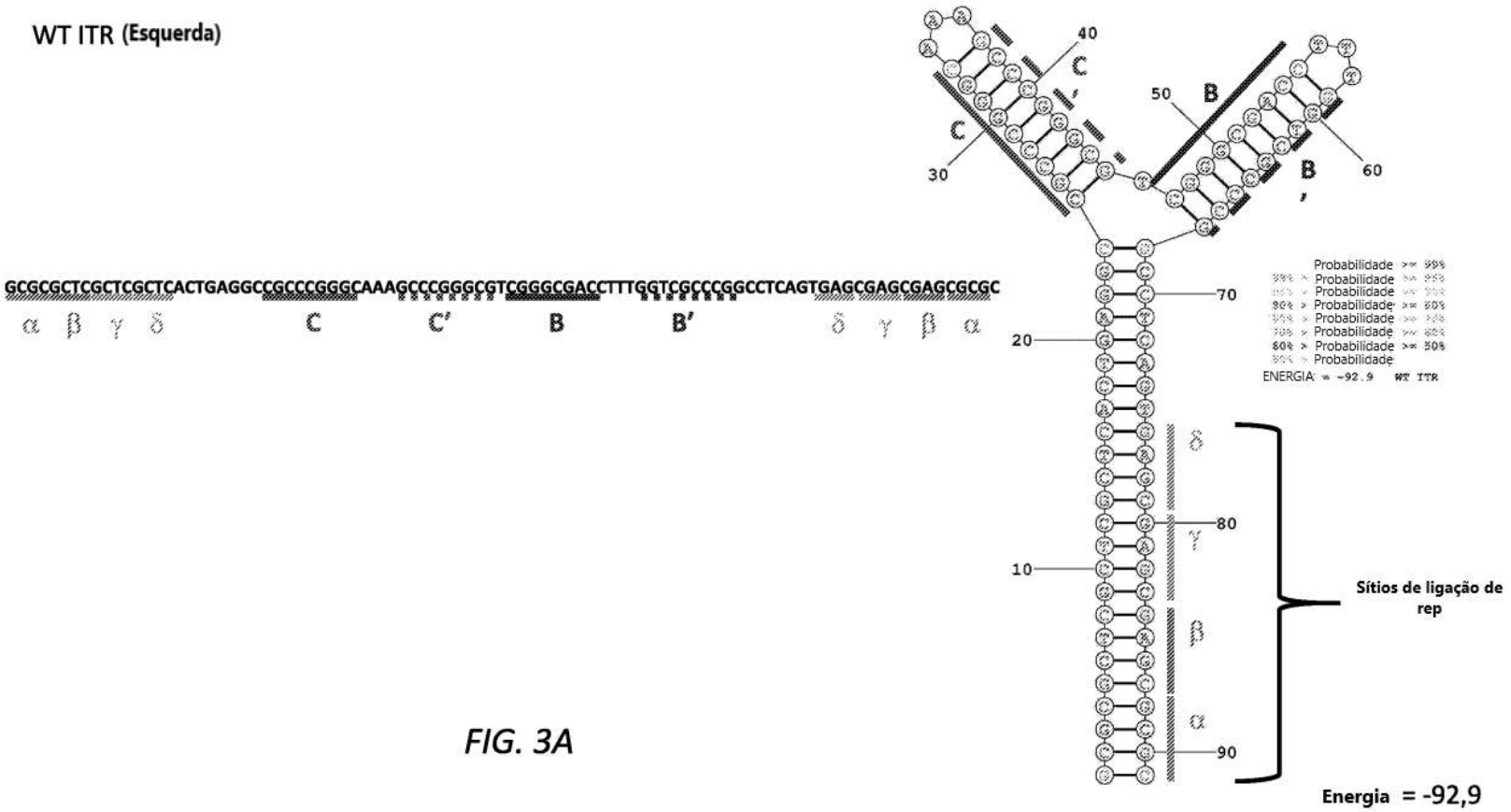
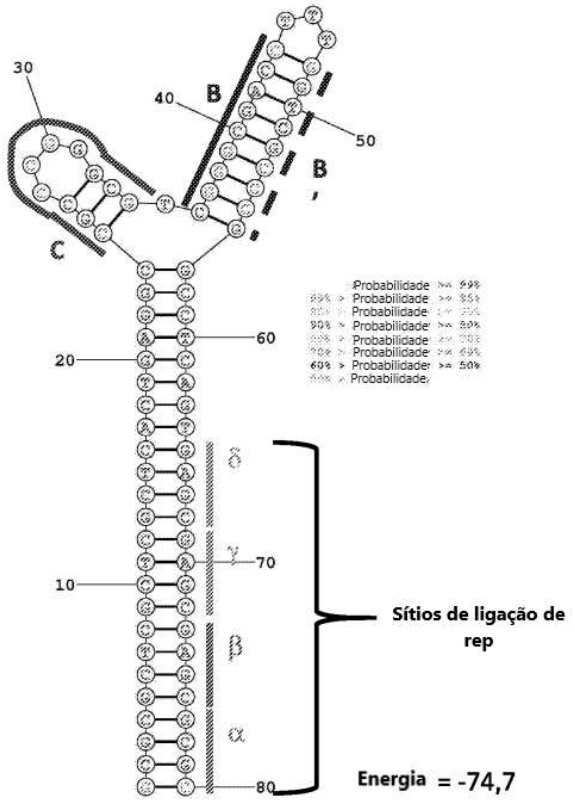

WT ITR (Esquerda)
GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
α β γ δ C C′ B B′ δ γ β α
40
C
′
50
B
C
30
B
′
60
70
20
80
10
90
δ
γ
β
α
Probabilidade >= 99%
Probabilidade >= 95%
Probabilidade >= 90%
Probabilidade >= 80%
Probabilidade >= 70%
Probabilidade >= 60%
80% > Probabilidade >= 50%
Probabilidade
ENERGIA = -92.9 WT ITR
Sítios de ligação de rep
Energia = -92,9

FIG. 3A

ITR-1, Esquerda



FIG. 3B



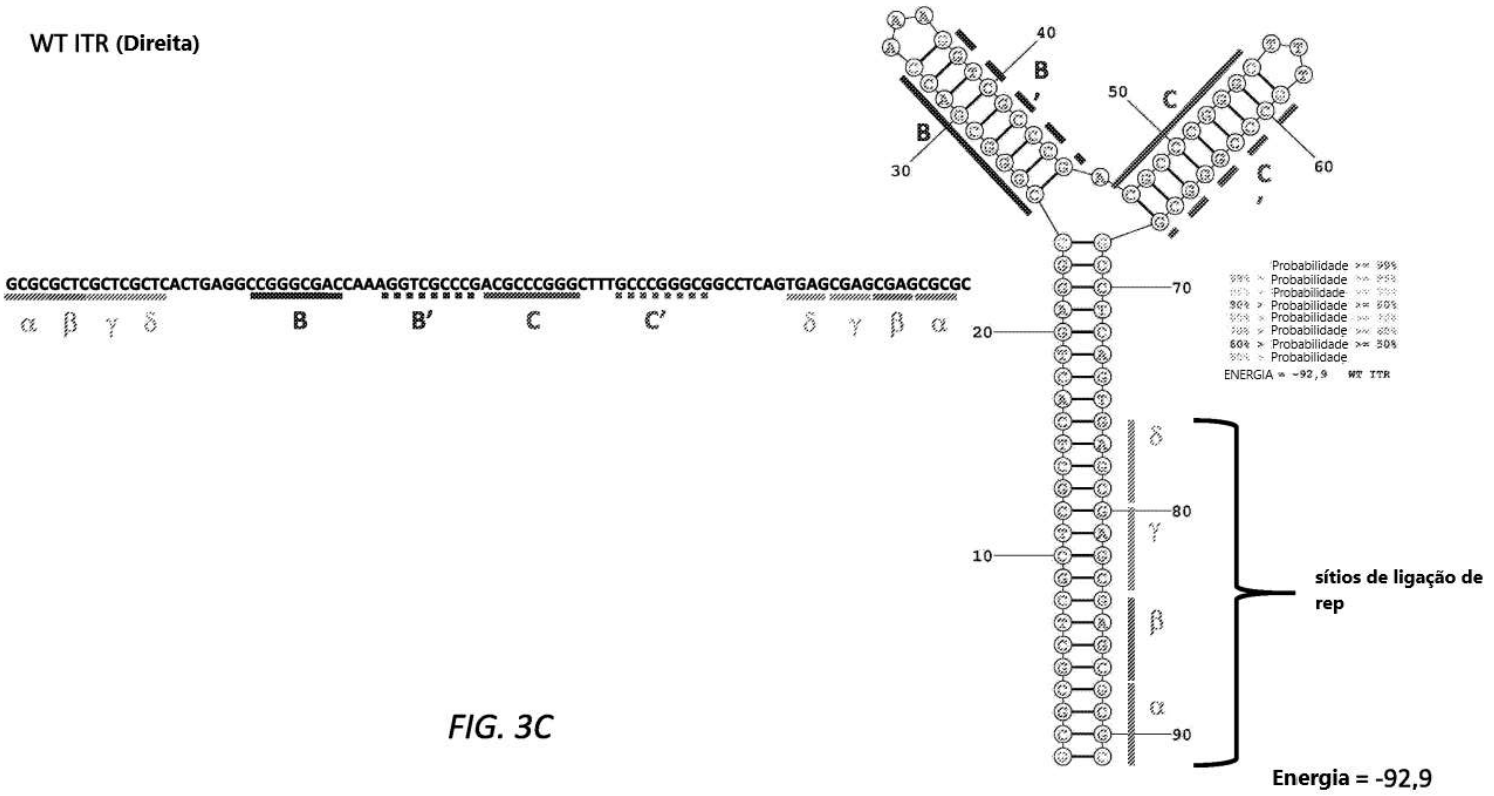
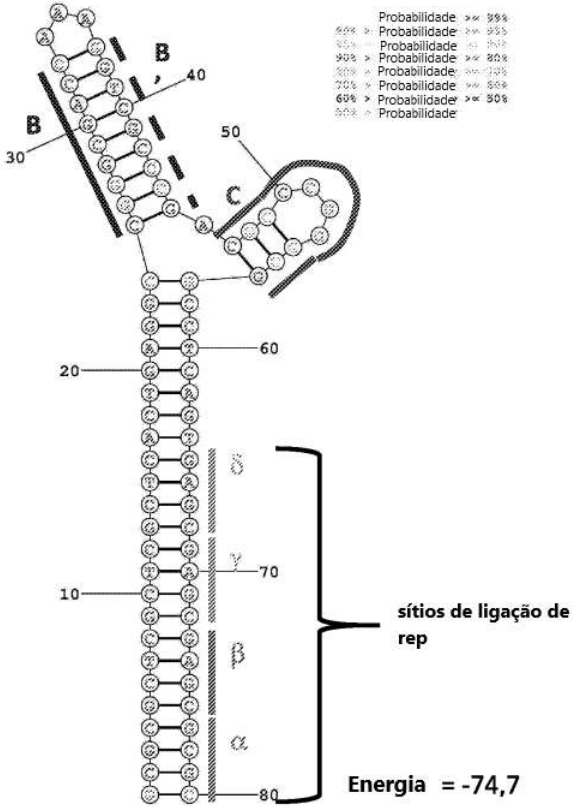

WT ITR (Direita)
GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
α β γ δ
B
B'
C
C'
δ γ β α
40
B
B'
50
C
B
30
C'
60
70
20
80
10
90
δ
γ
β
α
Probabilidade >= 99%
99% > Probabilidade >= 95%
95% > Probabilidade >= 90%
90% > Probabilidade >= 80%
80% > Probabilidade >= 70%
70% > Probabilidade >= 60%
60% > Probabilidade >= 50%
50% > Probabilidade
ENERGIA = -92,9 WT ITR
sítios de ligação de rep
Energia = -92,9

FIG. 3C

ITR-1, Direita



FIG. 3D



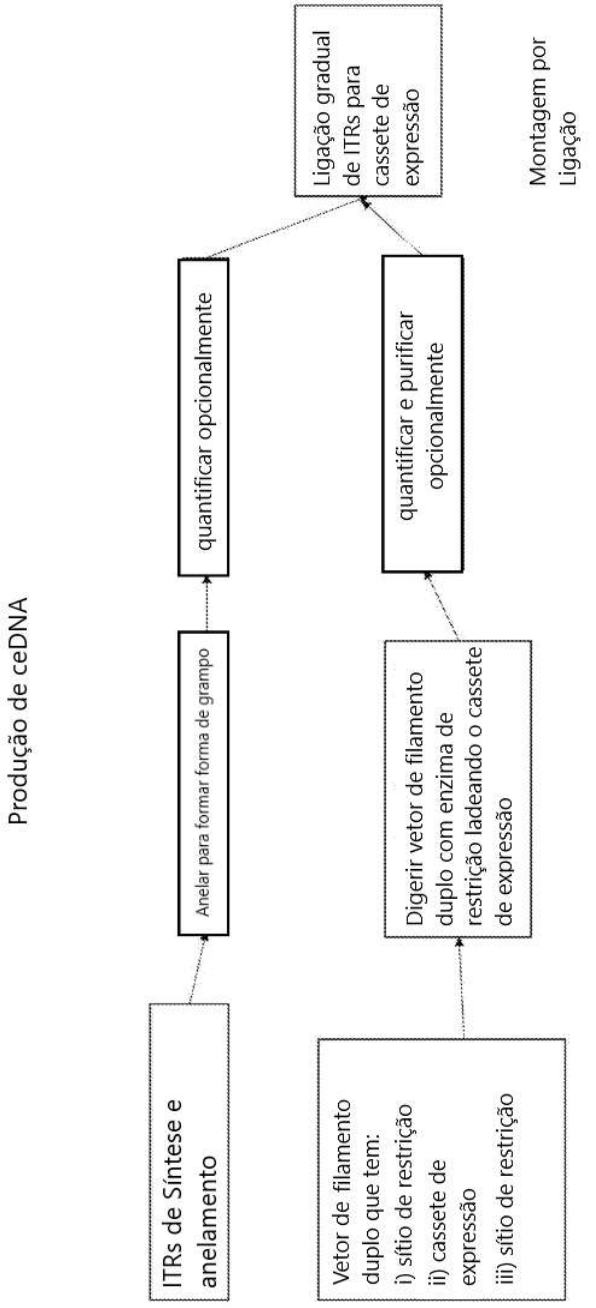

Produção de ceDNA
ITRs de Síntese e anelamento
Anelar para formar forma de grampo
quantificar opcionalmente
Vetor de filamento duplo que tem:
i) sítio de restrição
ii) cassete de expressão
iii) sítio de restrição
Digerir vetor de filamento duplo com enzima de restrição ladeando o cassete de expressão
quantificar e purificar opcionalmente
Ligação gradual de ITRs para cassete de expressão
Montagem por Ligação

FIG. 4A

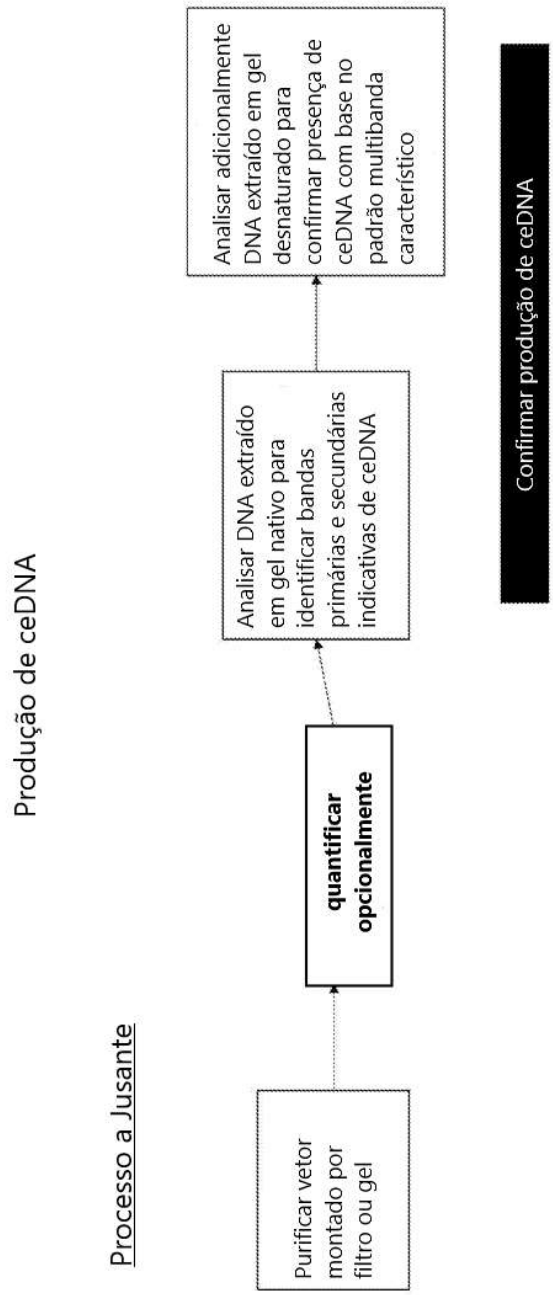

Produção de ceDNA
Processo a Jusante
Purificar vetor montado por filtro ou gel
quantificar opcionalmente
Analisar DNA extraído em gel nativo para identificar bandas primárias e secundárias indicativas de ceDNA
Analisar adicionalmente DNA extraído em gel desnaturado para confirmar presença de ceDNA com base no padrão multibanda característico
Confirmar produção de ceDNA

FIG. 4B

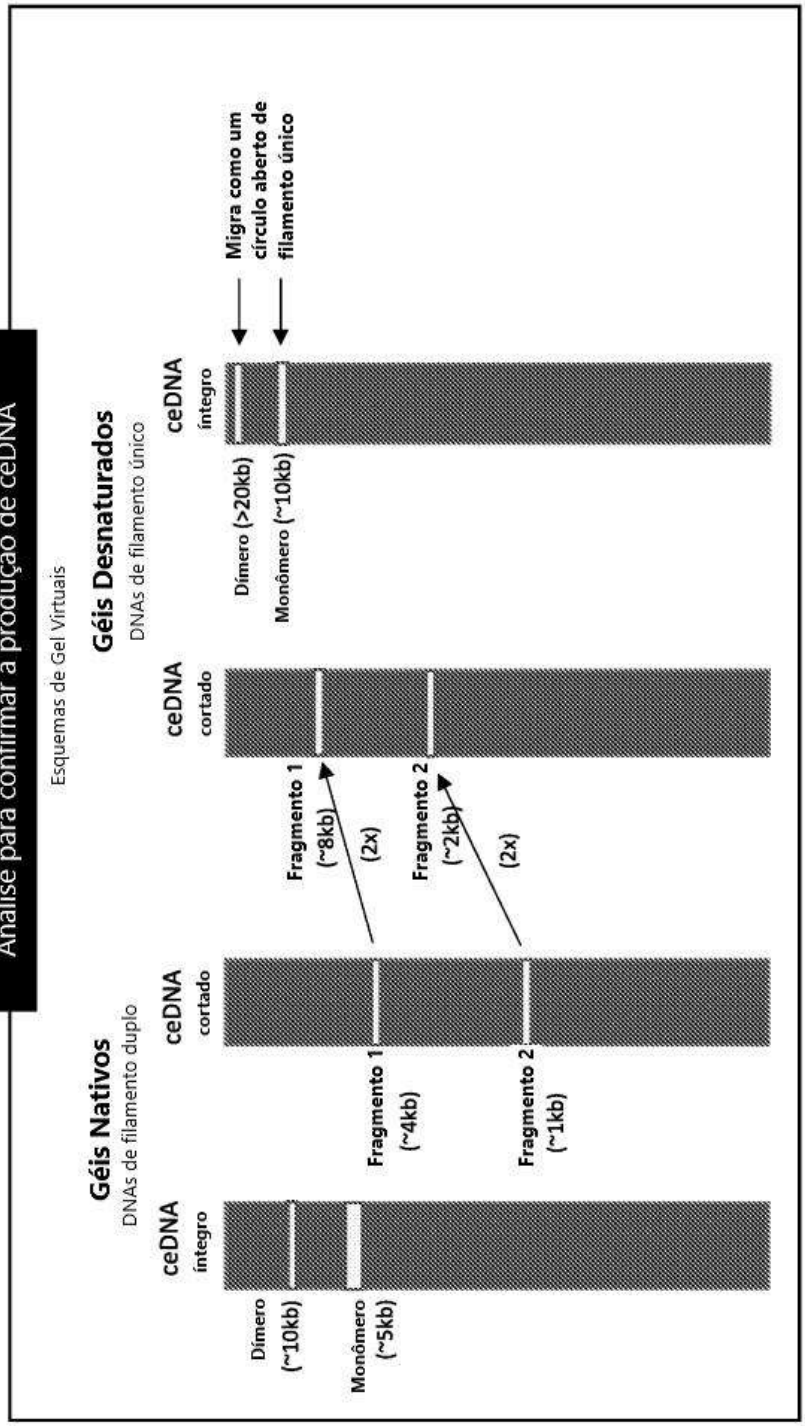

Análise para confirmar a produção de ceDNA
Esquemas de Gel Virtuais
Géis Nativos
DNAs de filamento duplo
ceDNA íntegro
ceDNA cortado
Dímero (~10kb)
Monômero (~5kb)
Fragmento 1 (~4kb)
Fragmento 2 (~1kb)
Fragmento 1 (~8kb)
(2x)
Fragmento 2 (~2kb)
(2x)
Géis Desnaturados
DNAs de filamento único
ceDNA íntegro
ceDNA cortado
Dímero (>20kb)
Monômero (~10kb)
Migra como um círculo aberto de filamento único

FIG. 4C

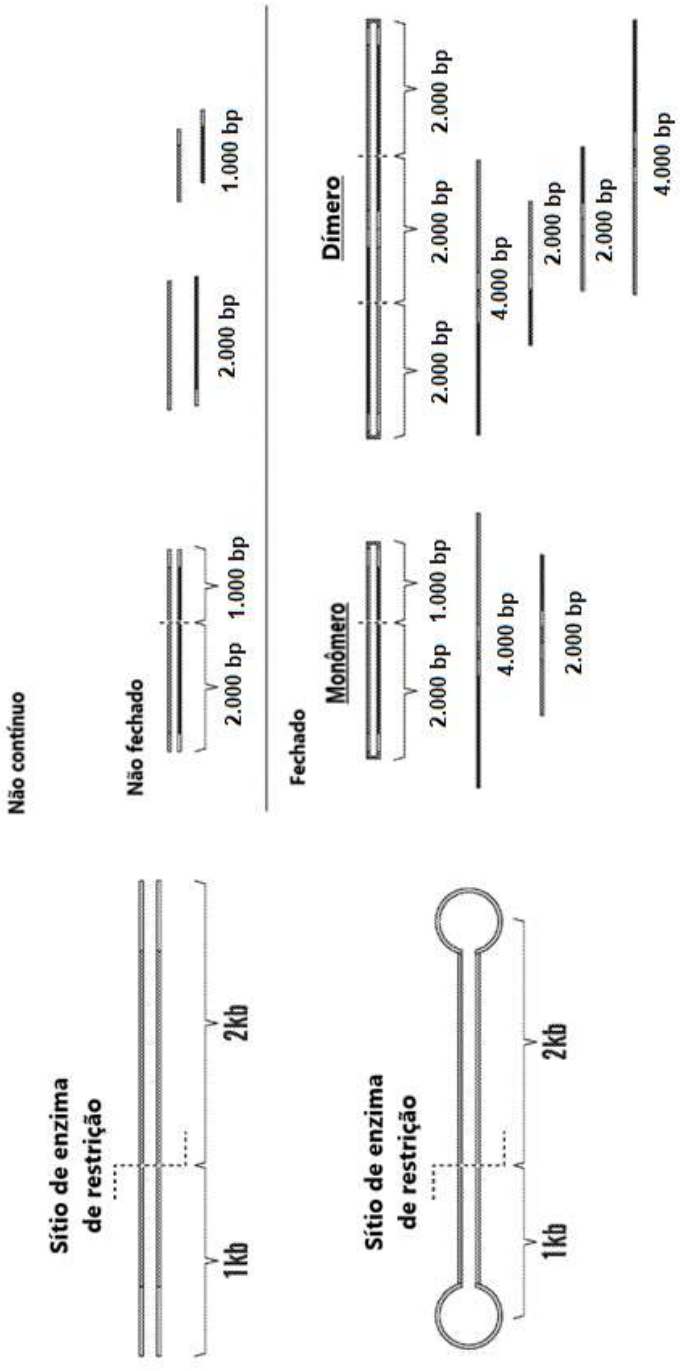
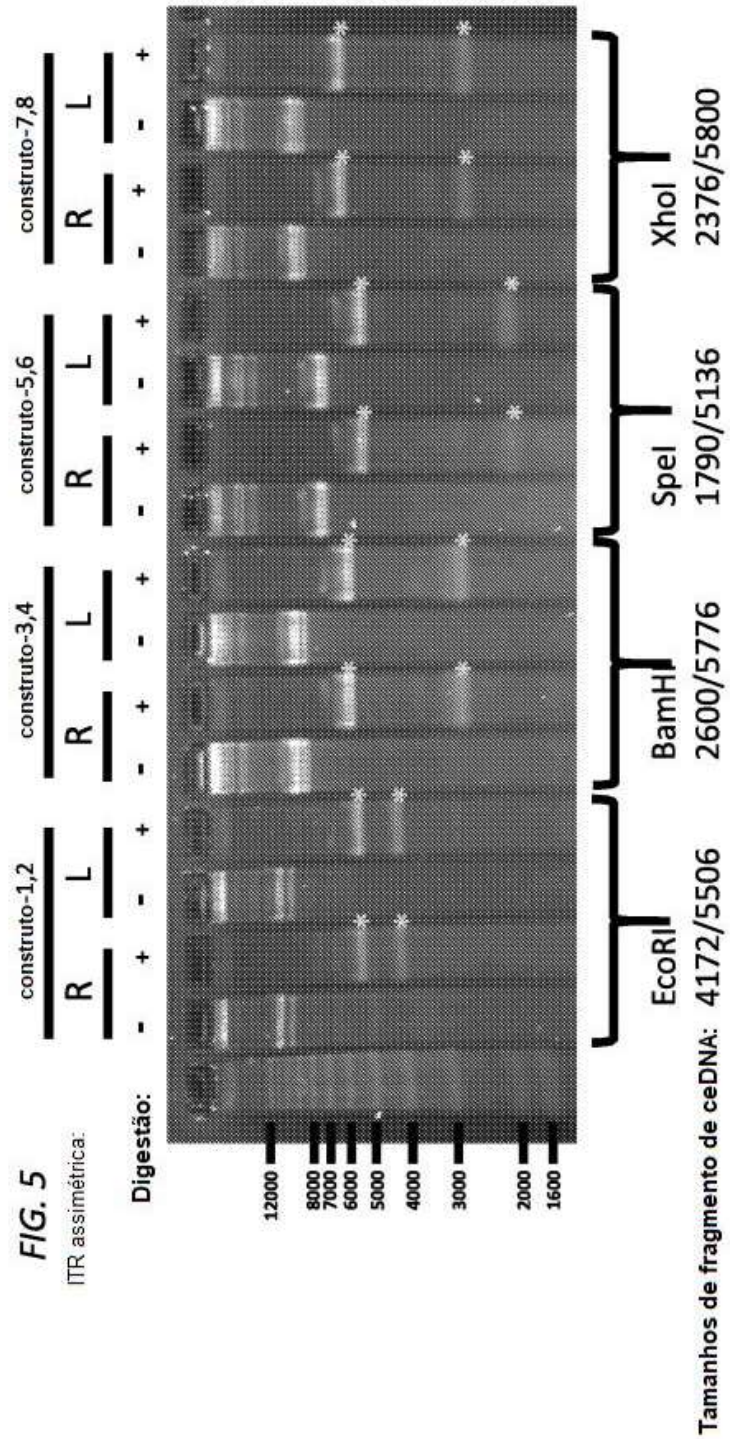

Não contínuo
Não fechado
2.000 bp
1.000 bp
Fechado
Monômero
2.000 bp
1.000 bp
4.000 bp
2.000 bp
Dímero
2.000 bp
2.000 bp
2.000 bp
4.000 bp
2.000 bp
2.000 bp
4.000 bp
Sítio de enzima de restrição
1kb
2kb
Sítio de enzima de restrição
1kb
2kb
Linear e contínuo

FIG. 4D


FIG. 5
ITR assimétrica:
Digestão:
construto-1,2
construto-3,4
construto-5,6
construto-7,8
R
L
12000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1600
EcoRI
BamHI
SpeI
XhoI
Tamanhos de fragmento de ceDNA:
4172/5506
2600/5776
1790/5136
2376/5800

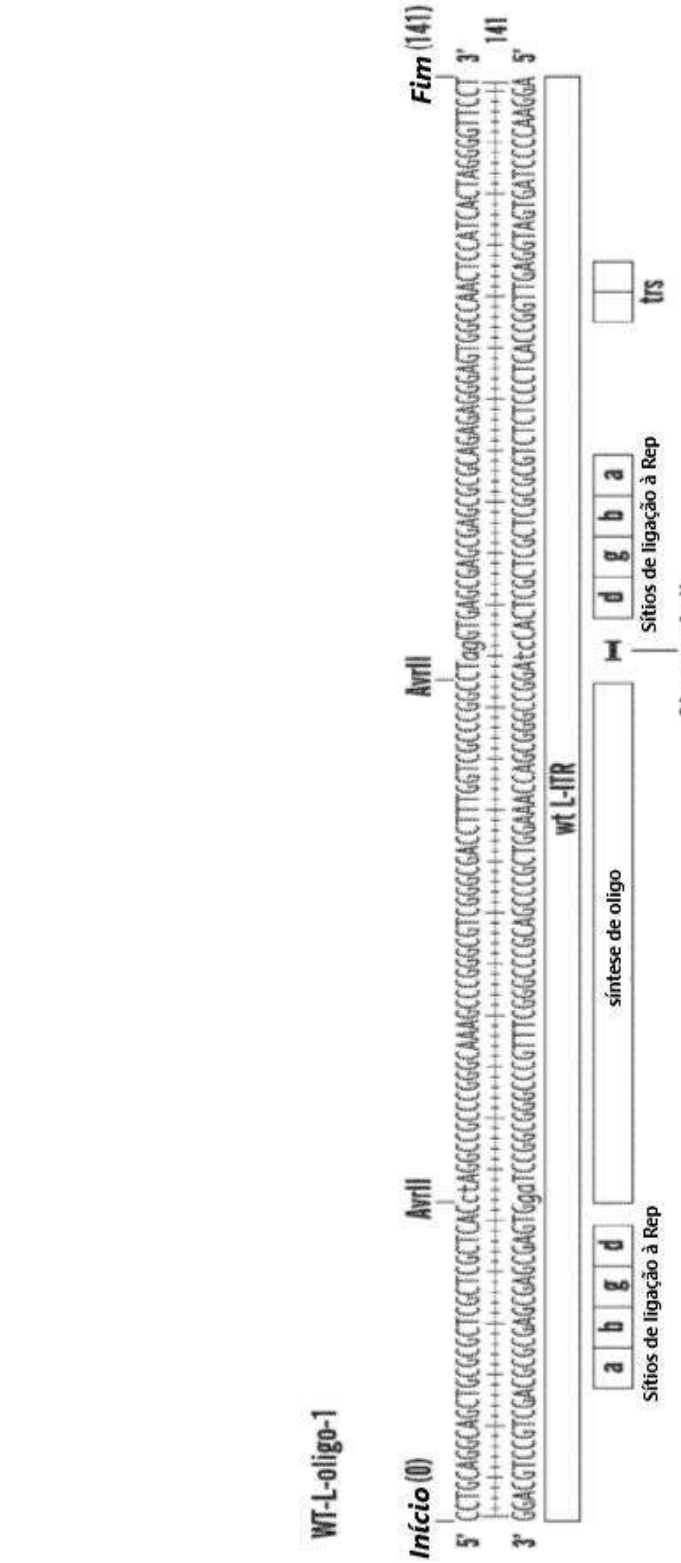

WT-L-oligo-1
Início (0)
AvrII
AvrII
Fim (141)
5'
3'
3'
5'
141
wt L-ITR
a b g d
síntese de oligo
d g b a
trs
Sítios de ligação à Rep
Sítios de ligação à Rep
CA -> ag AvrII
tronco
C tronco
C' tronco
B tronco
B' tronco
tronco

FIG. 6A

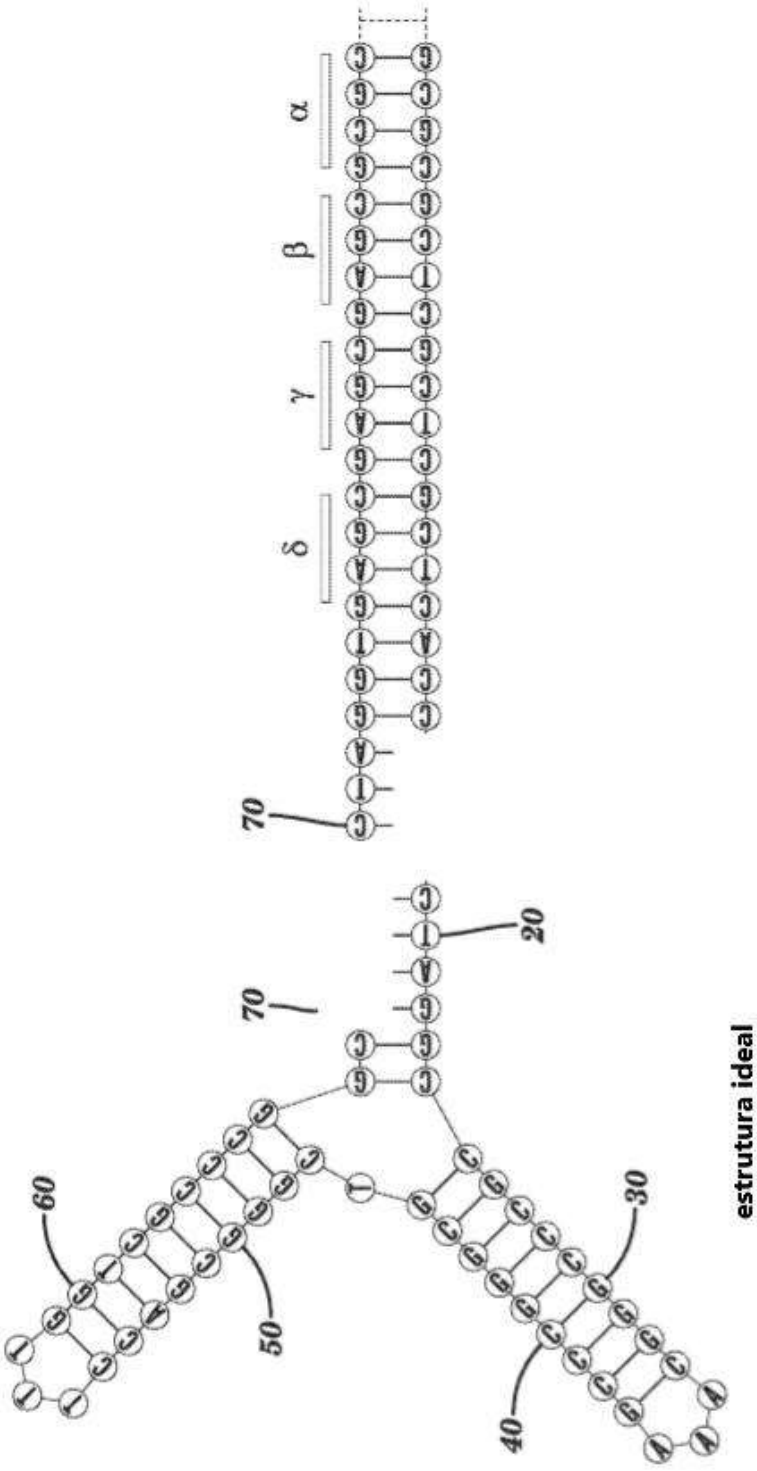


FIG. 6A (cont.)

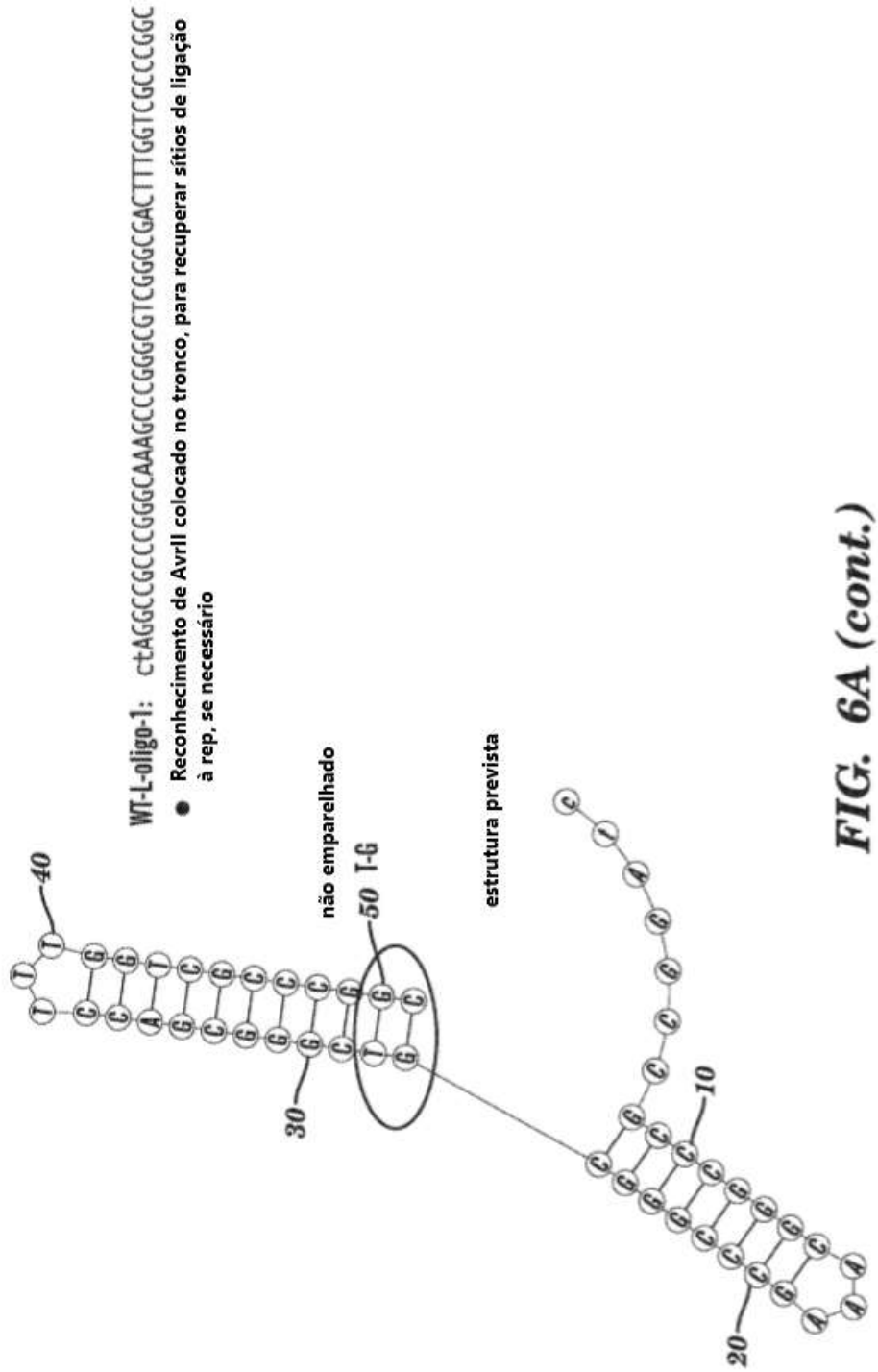

WT-L-oligo-1: ctAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACTTTGGTCGCCCGGC
Reconhecimento de AvrII colocado no tronco, para recuperar sítios de ligação à rep, se necessário
não emparelhado
estrutura prevista
40
50
30
10
20

FIG. 6A (cont.)

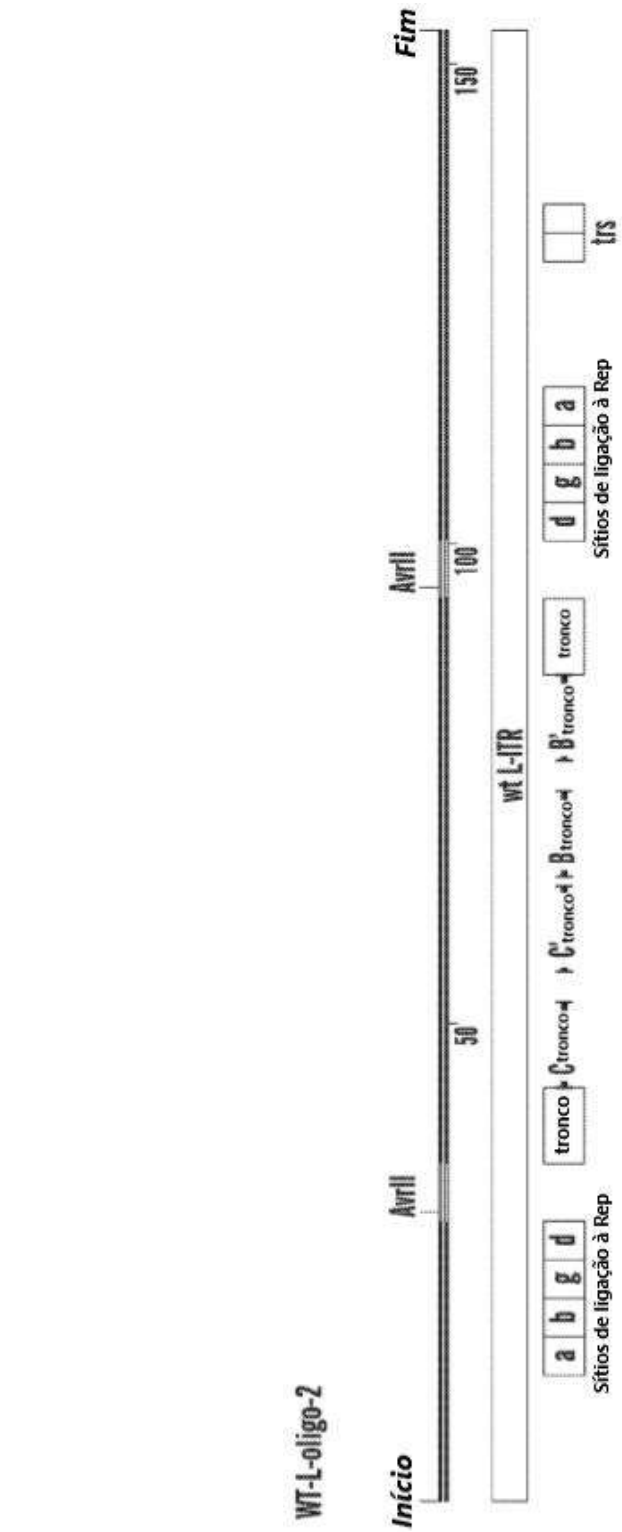

WT-L-oligo-2
Início
AvrII
AvrII
Fim
50
100
150
wt L-ITR
a b g d
Sítios de ligação à Rep
tronco
C tronco
C' tronco
B tronco
B' tronco
tronco
d g b a
Sítios de ligação à Rep
trs
wt L-ITR avrII
153 bp

FIG. 6B

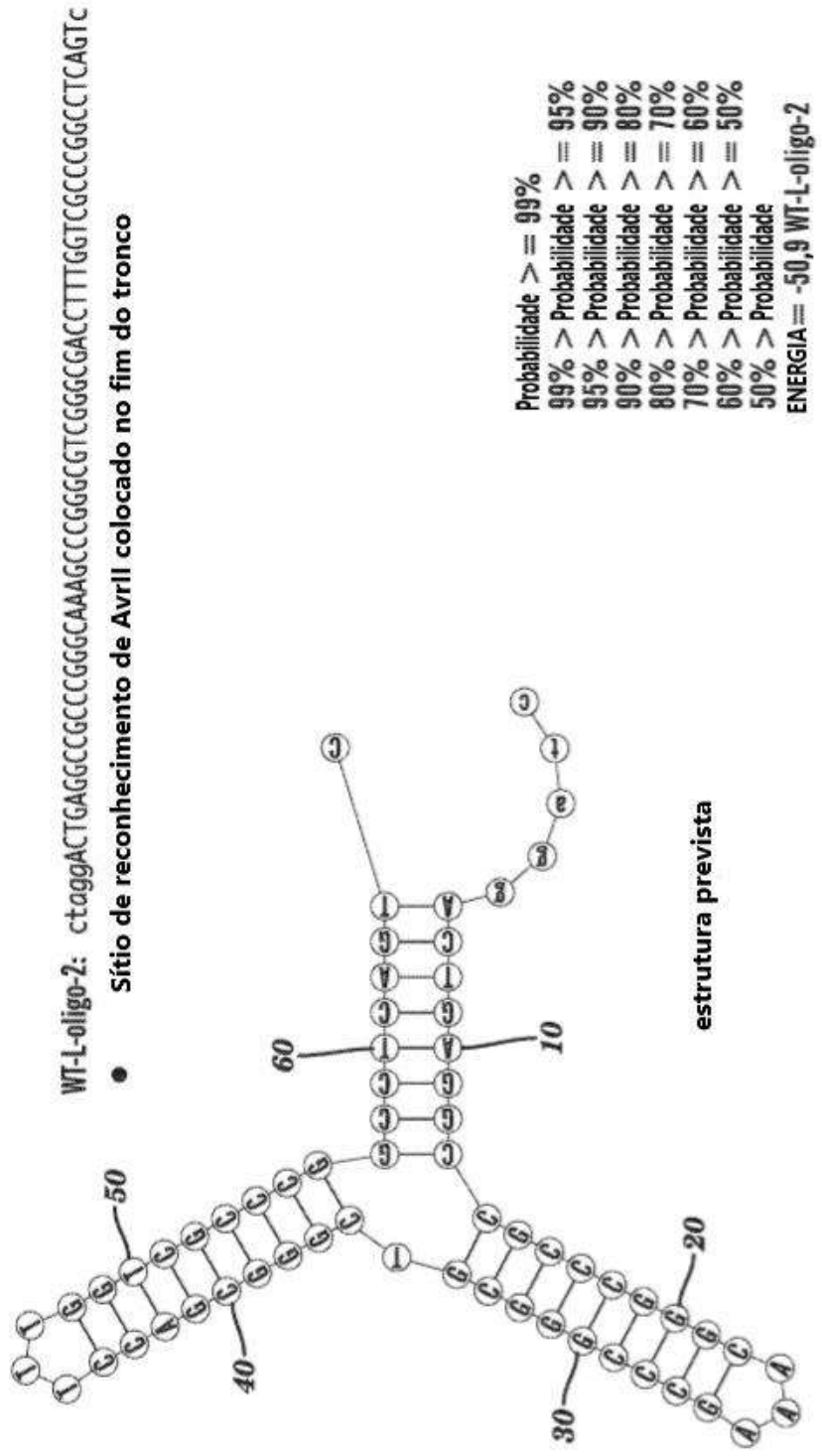

WT-L-oligo-2: ctaggACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTc
• Sítio de reconhecimento de AvrII colocado no fim do tronco
estrutura prevista
Probabilidade > = 99%
99% > Probabilidade > = 95%
95% > Probabilidade > = 90%
90% > Probabilidade > = 80%
80% > Probabilidade > = 70%
70% > Probabilidade > = 60%
60% > Probabilidade > = 50%
50% > Probabilidade
ENERGIA = -50,9 WT-L-oligo-2

FIG. 6B (cont.)

WT-R-oligo-3

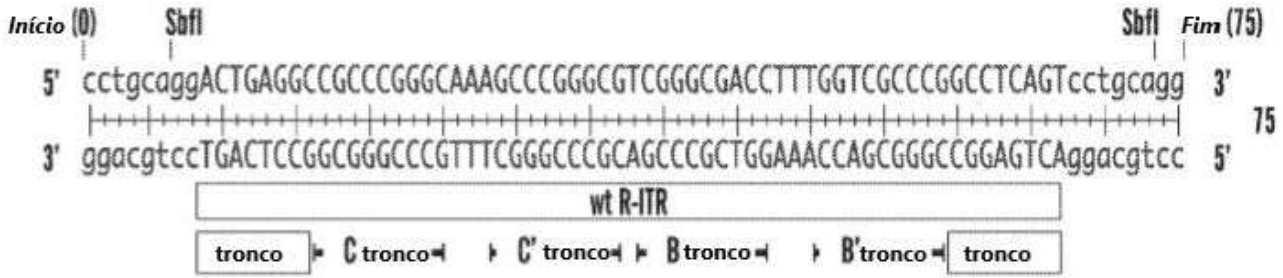


FIG. 6C

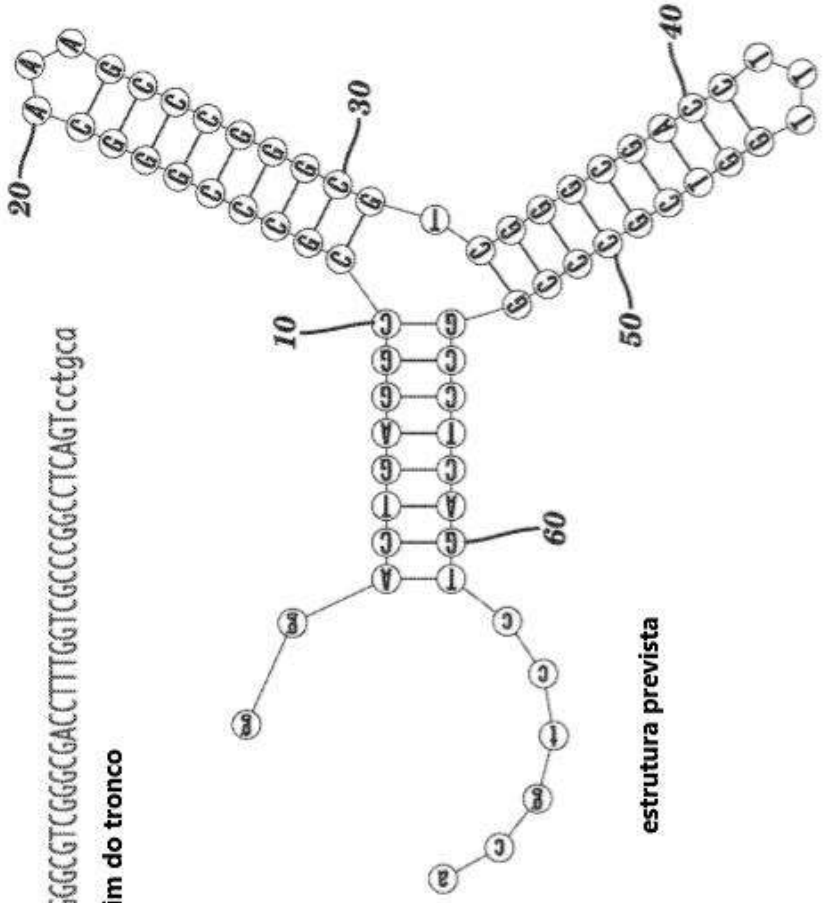

WT-R-oligo-3: ggACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTcctgca
Sítio de reconhecimento de Sbf1 no fim do tronco
Probabilidade >= 99%
99% > Probabilidade >= 95%
95% > Probabilidade >= 90%
90% > Probabilidade >= 80%
80% > Probabilidade >= 70%
70% > Probabilidade >= 60%
60% > Probabilidade >= 50%
50% > Probabilidade
ENERGIA = -50,9 WT-R-oligo-3
estrutura prevista
10
20
30
40
50
60

FIG. 6C (cont.)

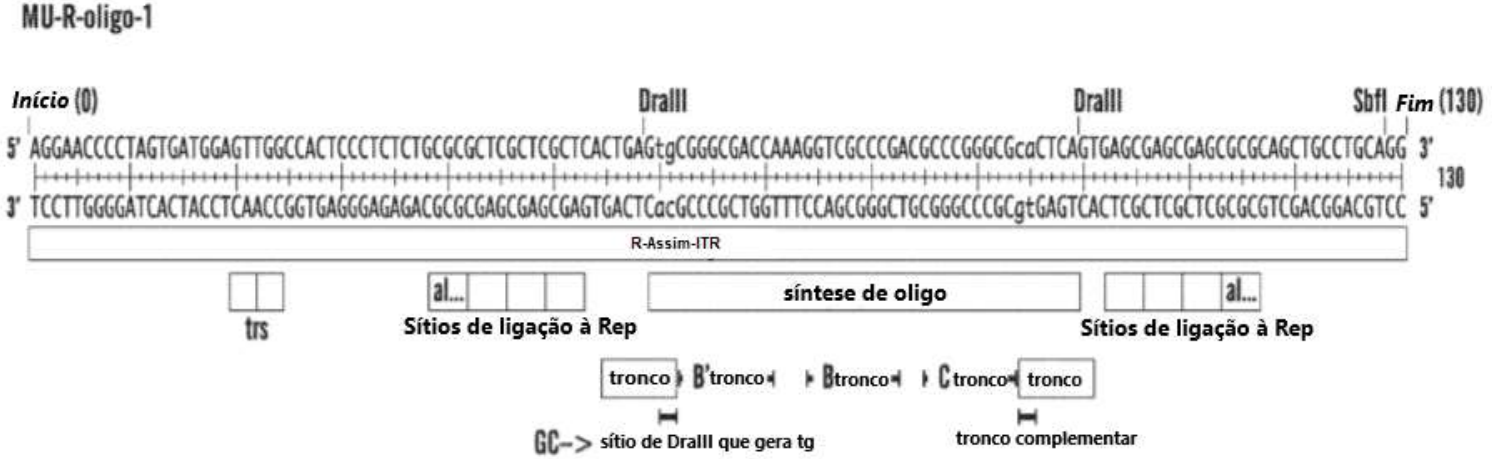
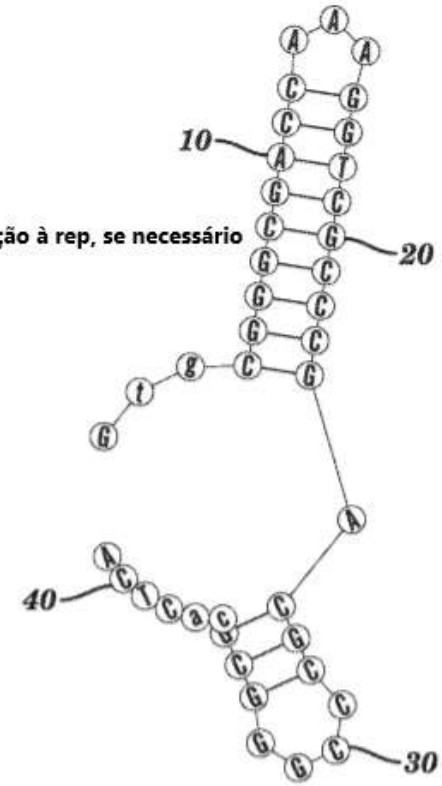

MU-R-oligo-1
Início (0)
DraIII
DraIII
SbfI
Fim (130)
5' AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGtgCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGcaCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG 3'
130
3' TCCTTGGGGATCACTACCTCAACCGGTGAGGGAGAGACGCGCGAGCGAGCGAGTGACTCacGCCCGCTGGTTTCCAGCGGGCTGCGGGCCCGCgtGAGTCACTCGCTCGCTCGCGCGTCGACGGACGTCC 5'
R-Assim-ITR
trs
al...
Sítios de ligação à Rep
síntese de oligo
al...
Sítios de ligação à Rep
tronco
B'tronco
Btronco
Ctronco
tronco
GC-> sítio de DraIII que gera tg
tronco complementar

FIG. 6D

MU-R-oligo-1: GtgCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGcaCTCA

- Reconhecimento de DraIII colocado no tronco, para recuperar sítios de ligação à rep, se necessário



estrutura prevista

Probabilidade >= 99%
99% > Probabilidade >= 95%
95% > Probabilidade >= 90%
90% > Probabilidade >= 80%
80% > Probabilidade >= 70%
70% > Probabilidade >= 60%
60% > Probabilidade >= 50%
50% > Probabilidade
ENERGIA= -22,0 MÚ-R-oligo-1

FIG. 6D (cont.)

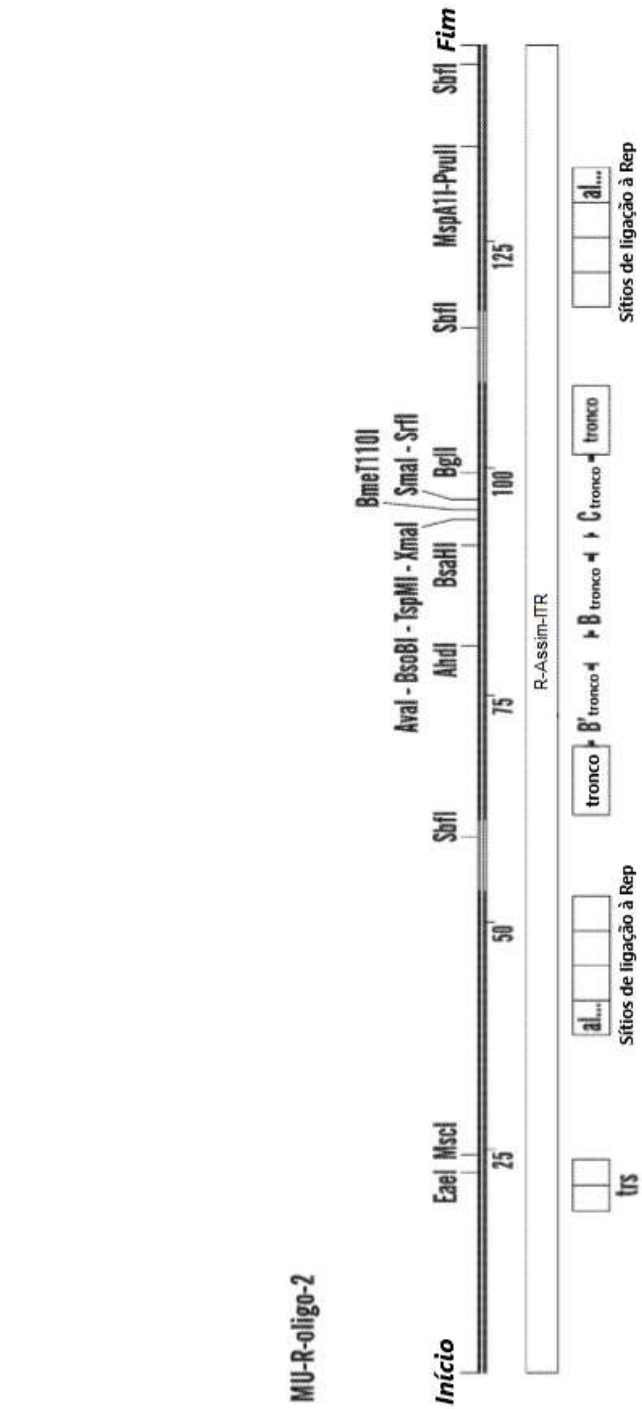
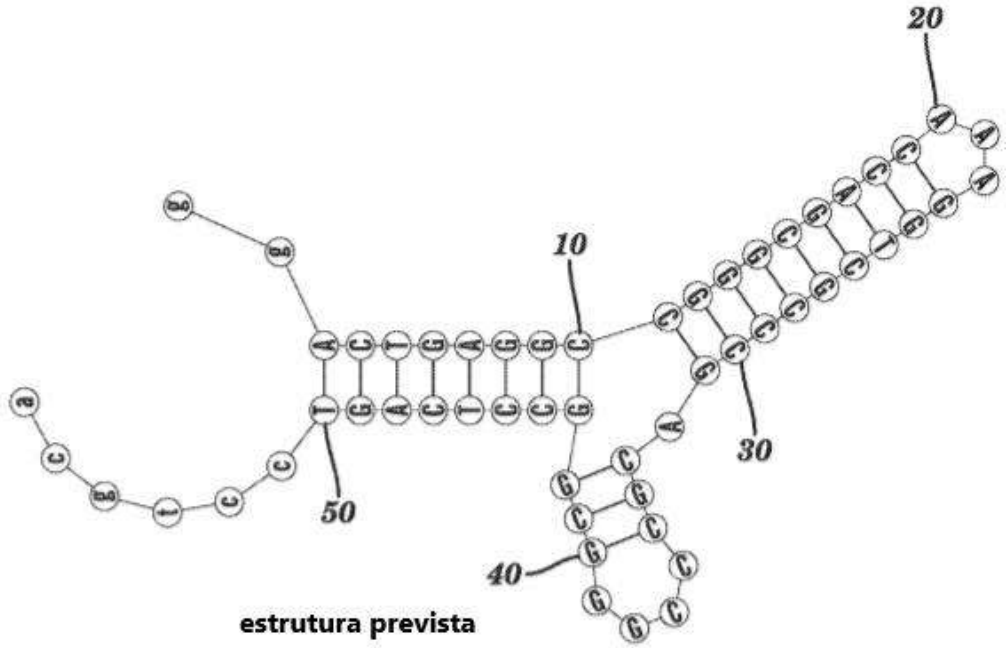

MU-R-oligo-2
Início
EaeI MscI
SbfI
AvaI - BsoBI - TspMI - XmaI
BmeT110I
SmaI - SrfI
AhdI
BsaHI
BglI
SbfI
MspA1I-PvuII
SbfI Fim
25'
50'
75'
100'
125'
R-Assim-ITR
trs
al....
Sítios de ligação à Rep
tronco
B'tronco
Btronco
Ctronco
tronco
al....
Sítios de ligação à Rep
R-Assim-ITR SbfI
146 bp

FIG. 7A

MU-R-oligo-2: ggACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTcctgca

- **Sítio de reconhecimento de Sbf1 no fim do tronco**



estrutura prevista

Probabilidade >= 99%
99% > Probabilidade >= 95%
95% > Probabilidade >= 90%
90% > Probabilidade >= 80%
80% > Probabilidade >= 70%
70% > Probabilidade >= 60%
60% > Probabilidade >= 50%
50% > Probabilidade
ENERGIA= -33,2 MÚ-R-oligo-2

FIG. 7A (cont.)

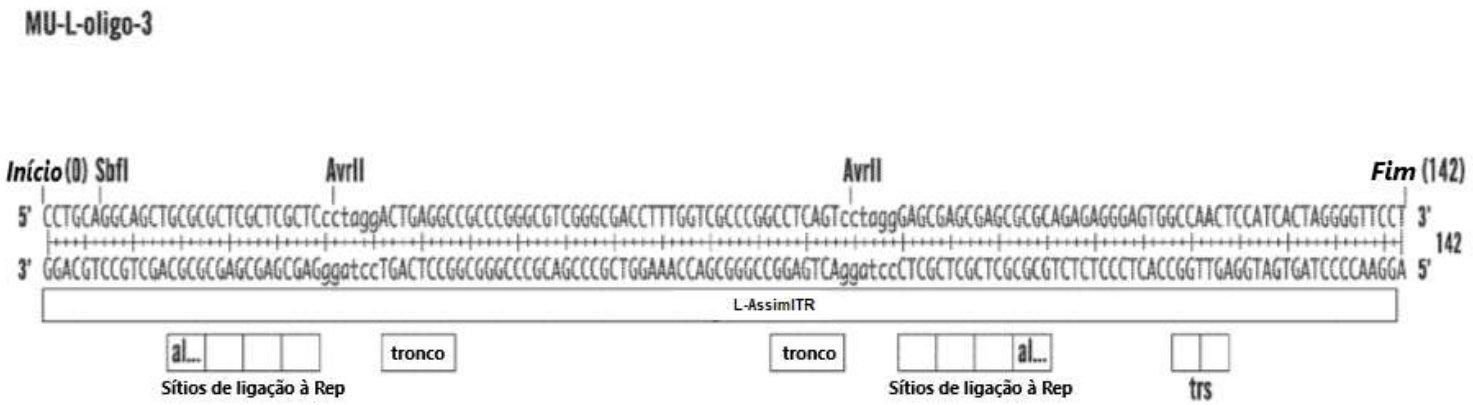

MU-L-oligo-3
Início (0) SbfI
AvrII
AvrII
Fim (142)
5' CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCcctaggACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTcctaggGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT 3'
142
3' GGACGTCCGTCGACGCGCGAGCGAGCGAGggatccTGACTCCGGCGGGCCCGCAGCCCGCTGGAAACCAGCGGGCCGGAGTCAggatccCTCGCTCGCTCGCGCGTCTCTCCCTCACCGGTTGAGGTAGTGATCCCCAAGGA 5'
L-AssimITR
al...
tronco
tronco
al...
Sítios de ligação à Rep
Sítios de ligação à Rep
trs

FIG. 7B

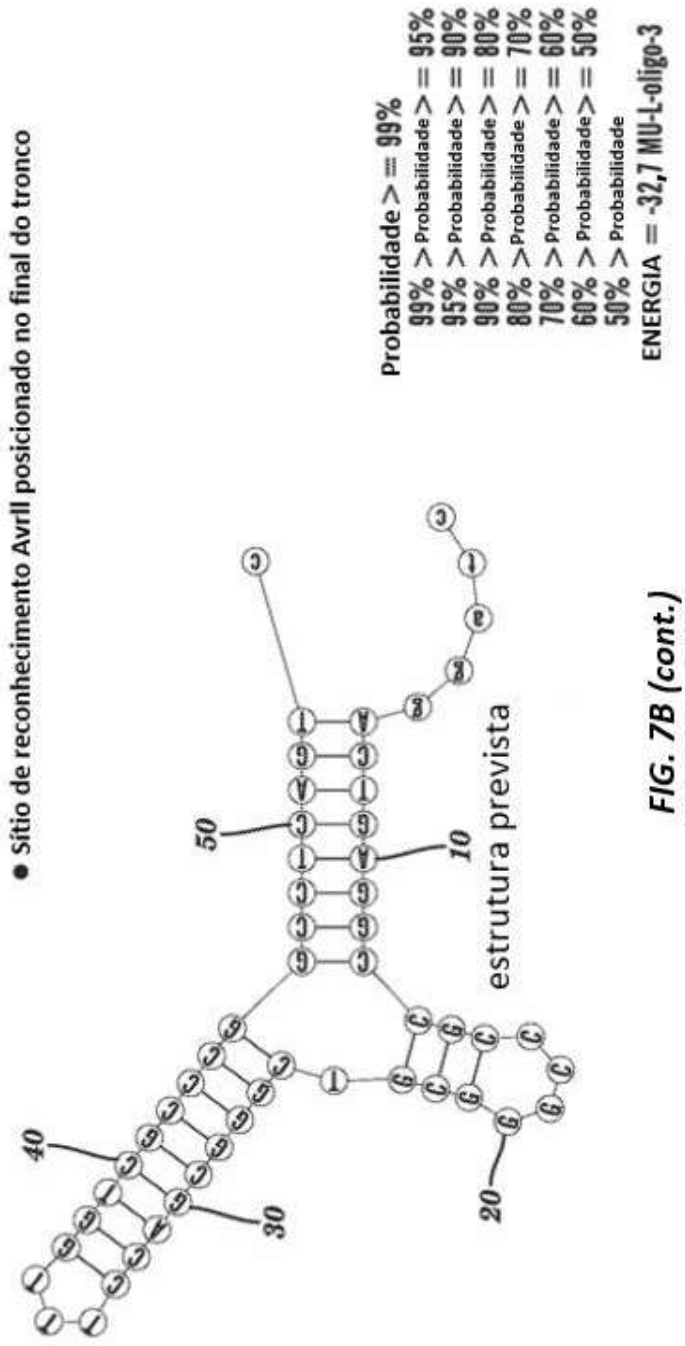

MU-L-oligo-3: ctaggACTGAGGCCCCCCGGGGGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGGCCTCAGTc
● Sítio de reconhecimento AvrII posicionado no final do tronco
Probabilidade >= 99%
99% > Probabilidade >= 95%
95% > Probabilidade >= 90%
90% > Probabilidade >= 80%
80% > Probabilidade >= 70%
70% > Probabilidade >= 60%
60% > Probabilidade >= 50%
50% > Probabilidade
ENERGIA = -32,7 MU-L-oligo-3
50
10
40
30
20
estrutura prevista

FIG. 7B (cont.)

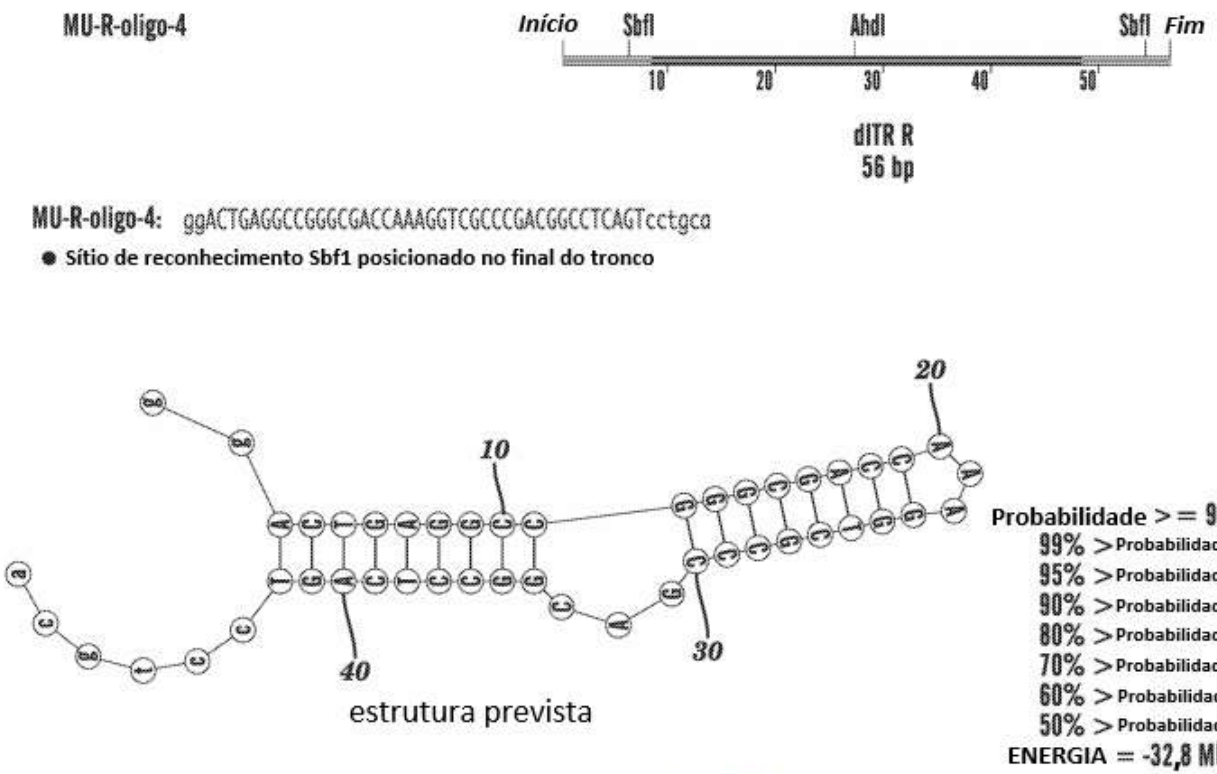

MU-R-oligo-4
Início
SbfI
AhdI
SbfI
Fim
10
20
30
40
50
dITR R
56 bp
MU-R-oligo-4: ggACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGGCCTCAGTcctgca
● Sítio de reconhecimento Sbf1 posicionado no final do tronco
10
20
30
40
estrutura prevista
Probabilidade >= 99%
99% >Probabilidade>= 95%
95% >Probabilidade>= 90%
90% >Probabilidade>= 80%
80% >Probabilidade>= 70%
70% >Probabilidade>= 60%
60% >Probabilidade>= 50%
50% >Probabilidade
ENERGIA = -32,8 MU-L-oligo-4

FIG. 7C

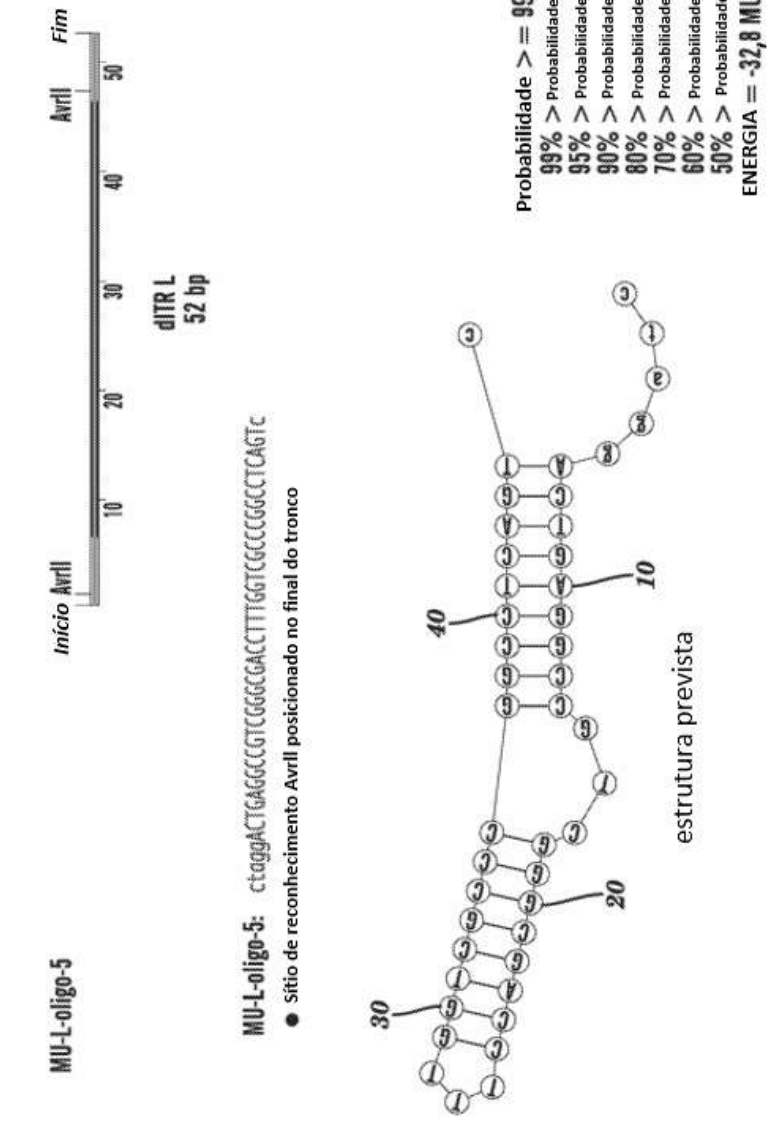

MU-L-oligo-5
Início AvrII
AvrII Fim
10 20 30 40 50
dITR L
52 bp
MU-L-oligo-5: ctcggACTGAGGCCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTc
● Sítio de reconhecimento AvrII posicionado no final do tronco
Probabilidade >= 99%
99% > Probabilidade >= 95%
95% > Probabilidade >= 90%
90% > Probabilidade >= 80%
80% > Probabilidade >= 70%
70% > Probabilidade >= 60%
60% > Probabilidade >= 50%
50% > Probabilidade
ENERGIA = -32,8 MU-L-oligo-5
10
20
30
40
estrutura prevista

FIG. 7D

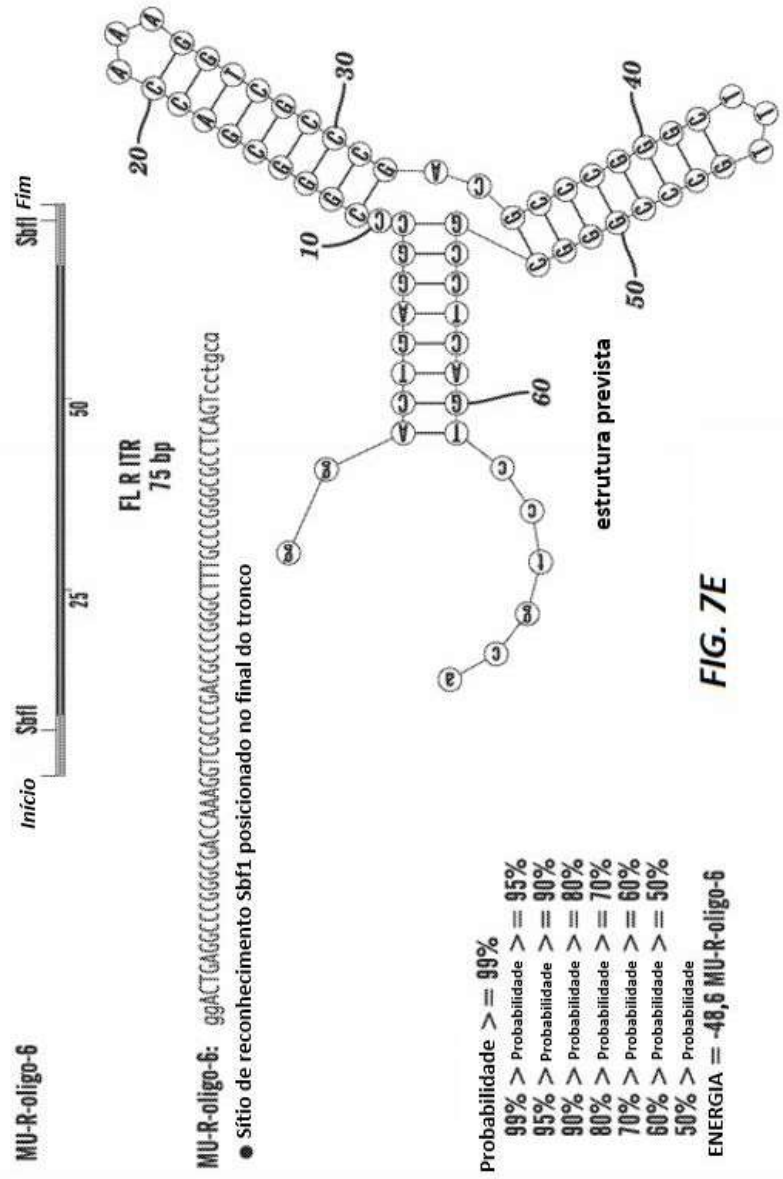

MU-R-oligo-6
Início
SbfI
SbfI
Fim
25
50
FL R ITR
75 bp
MU-R-oligo-6: ggACTGAGGCCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGCCTCAGTcctgca
● Sítio de reconhecimento Sbf1 posicionado no final do tronco
20
30
10
60
50
40
estrutura prevista
Probabilidade >= 99%
99% > Probabilidade >= 95%
95% > Probabilidade >= 90%
90% > Probabilidade >= 80%
80% > Probabilidade >= 70%
70% > Probabilidade >= 60%
60% > Probabilidade >= 50%
50% > Probabilidade
ENERGIA = -48,6 MU-R-oligo-6

FIG. 7E

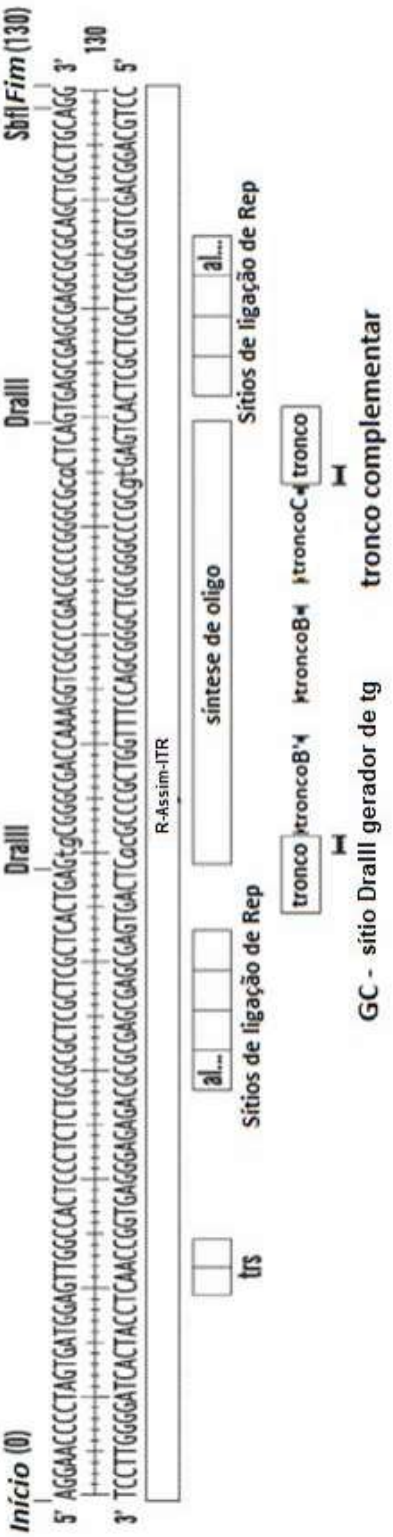
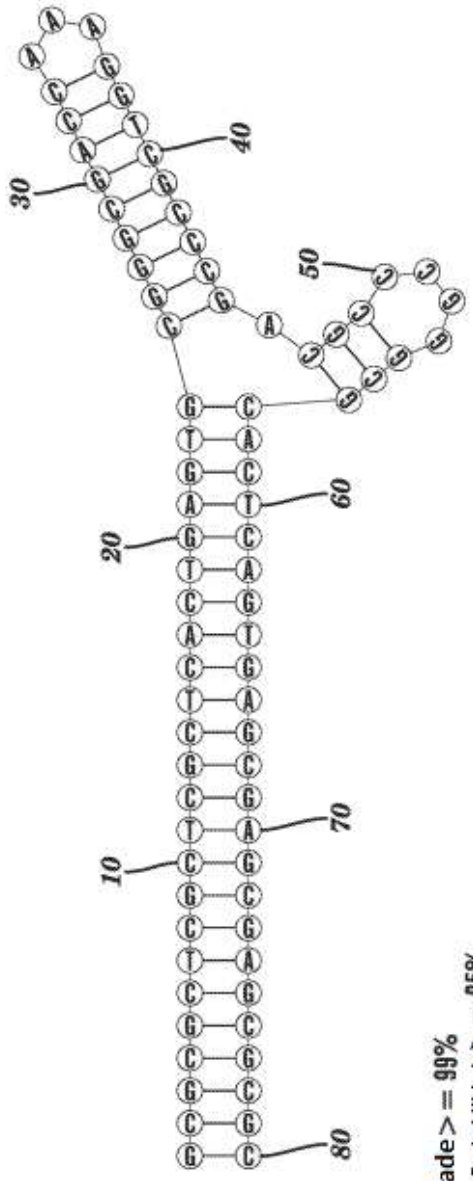

Início (0)
DraIII
DraIII
SbfI Fim (130)
5' AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCACTGAGtgCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGCaaCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG 3'
3' TCCTTGGGGATCACTACCTCAACCGGTGAGGGAGAGACGCGCGAGCGAGCGAGTGACTCaCGCCCGCTGGTTTCCAGCGGGCTGCGGGGCCCGCgtGAGTCACTCGCTCGCTCGCGCGTCGACGGAACGTCC 5'
130
R-Assim-ITR
trs
al...
Sítios de ligação de Rep
Síntese de oligo
al...
Sítios de ligação de Rep
tronco
troncoB'
troncoB
troncoC
tronco
GC - sítio DraIII gerador de tg
tronco complementar

FIG. 8



Probabilidade >= 99%
99% >Probabilidade >= 95%
95% >Probabilidade >= 90%
90% >Probabilidade >= 80%
80% >Probabilidade >= 70%
70% >Probabilidade >= 60%
60% >Probabilidade >= 50%
50% >Probabilidade
ENERGIA = -72,9 WT oligo

FIG. 8 (cont.)

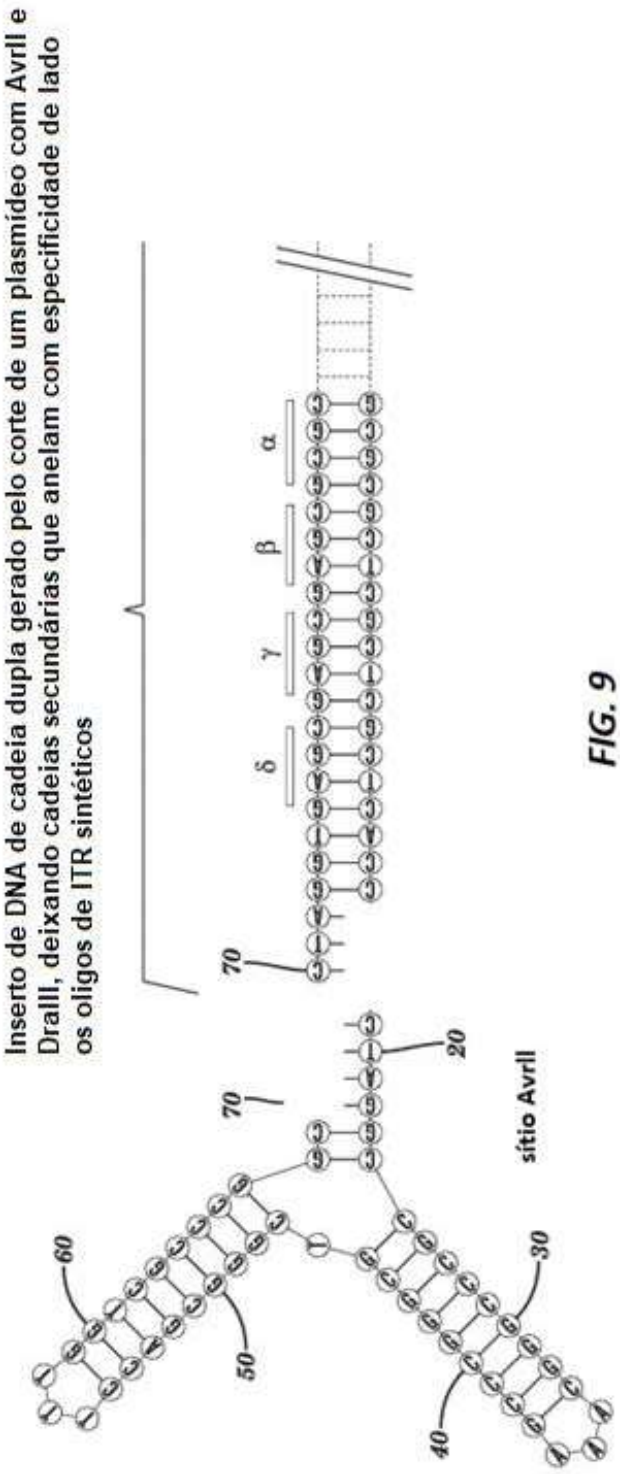

Inserto de DNA de cadeia dupla gerado pelo corte de um plasmídeo com AvrII e DraIII, deixando cadeias secundárias que anelam com especificidade de lado os oligos de ITR sintéticos
δ
γ
β
α
70
70
20
60
50
40
30
sítio AvrII

FIG. 9

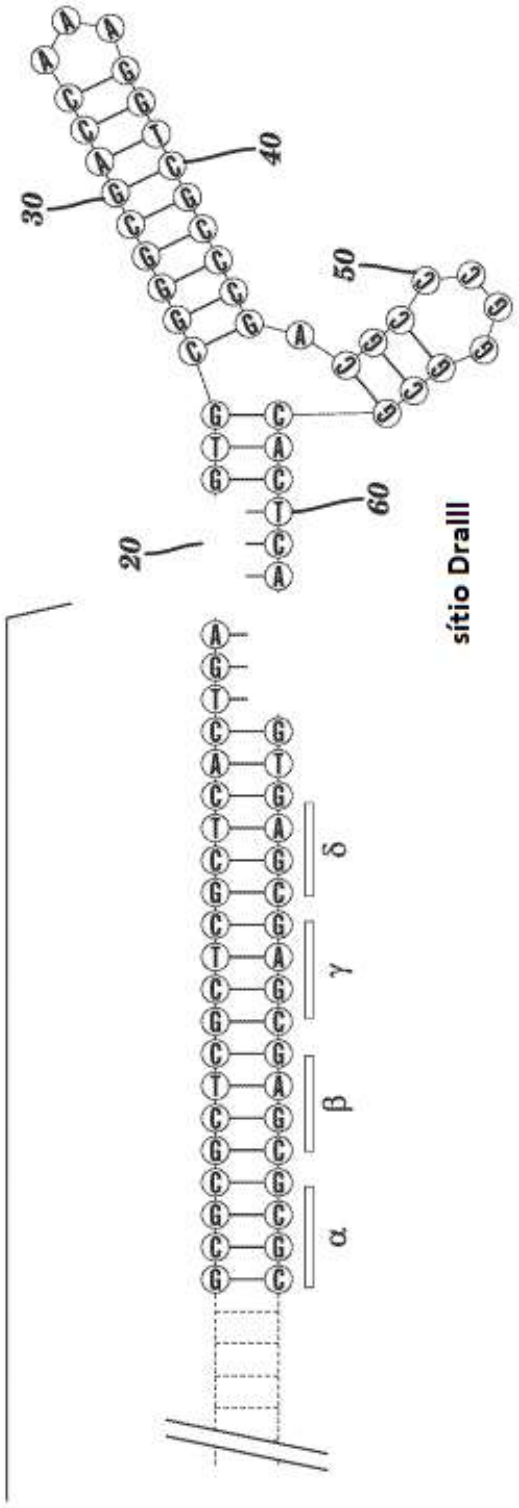
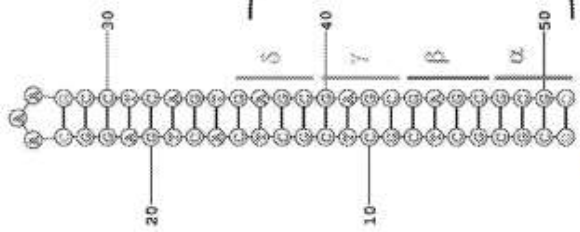


FIG. 9 (cont.)

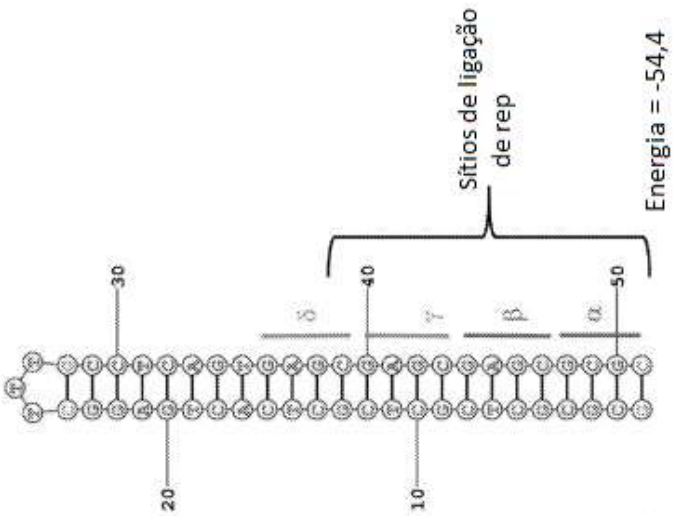
FIG. 10A



ITR-6, Esquerda

Energia = -54,4

FIG. 10B



ITR-6,Direita

Energia = -54,4

FIG. 11A

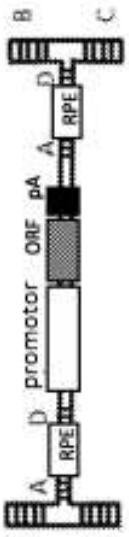


FIG. 11B

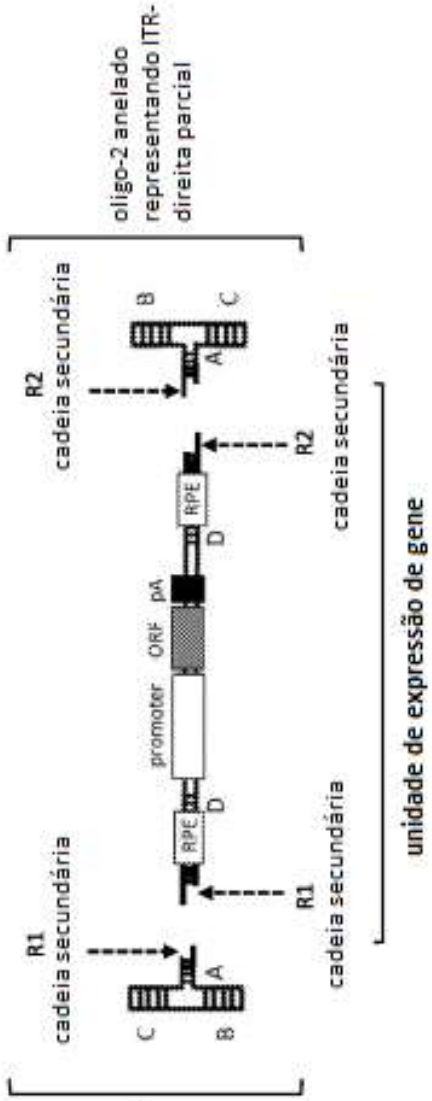
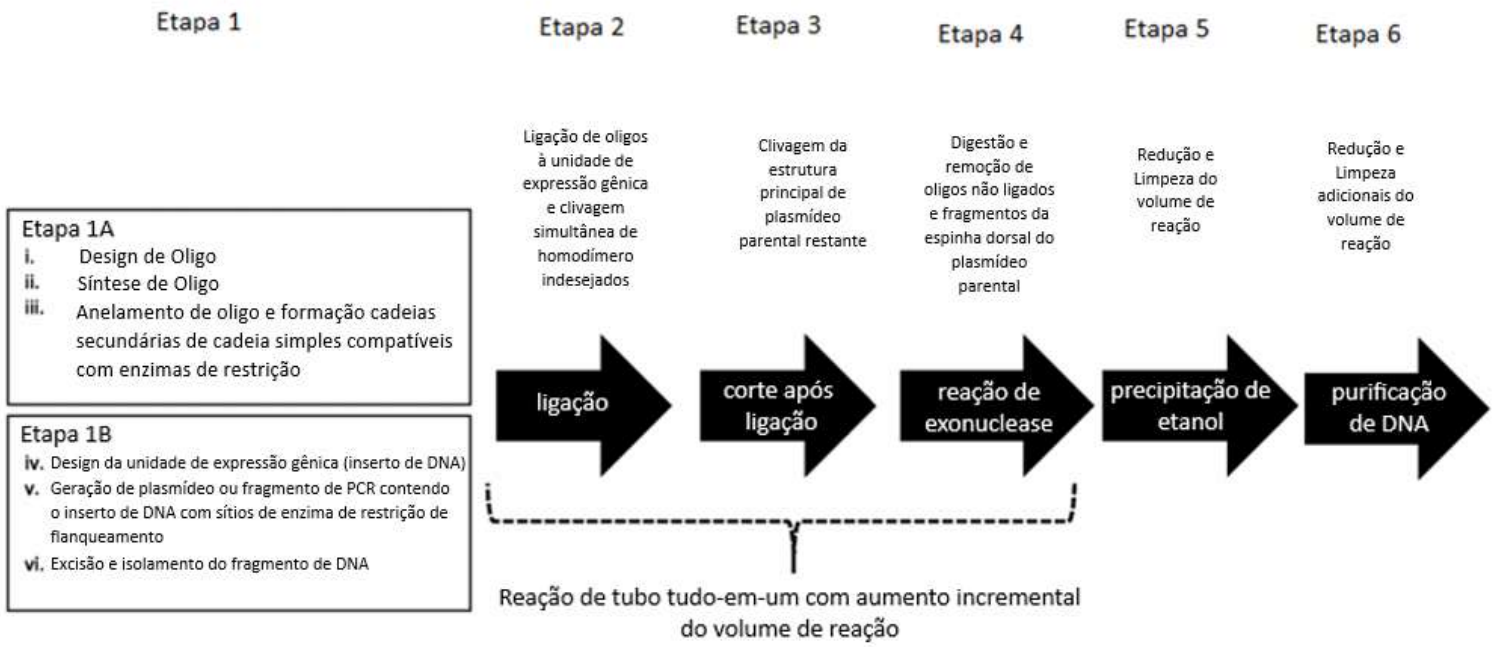


FIG. 12


Etapa 1
Etapa 2
Etapa 3
Etapa 4
Etapa 5
Etapa 6
Ligação de oligos à unidade de expressão gênica e clivagem simultânea de homodímero indesejados
Clivagem da estrutura principal de plasmídeo parental restante
Digestão e remoção de oligos não ligados e fragmentos da espinha dorsal do plasmídeo parental
Redução e Limpeza do volume de reação
Redução e Limpeza adicionais do volume de reação
Etapa 1A
i. Design de Oligo
ii. Síntese de Oligo
iii. Anelamento de oligo e formação cadeias secundárias de cadeia simples compatíveis com enzimas de restrição
Etapa 1B
iv. Design da unidade de expressão gênica (inserto de DNA)
v. Geração de plasmídeo ou fragmento de PCR contendo o inserto de DNA com sítios de enzima de restrição de flanqueamento
vi. Excisão e isolamento do fragmento de DNA
ligação
corte após ligação
reação de exonuclease
precipitação de etanol
purificação de DNA
Reação de tubo tudo-em-um com aumento incremental do volume de reação

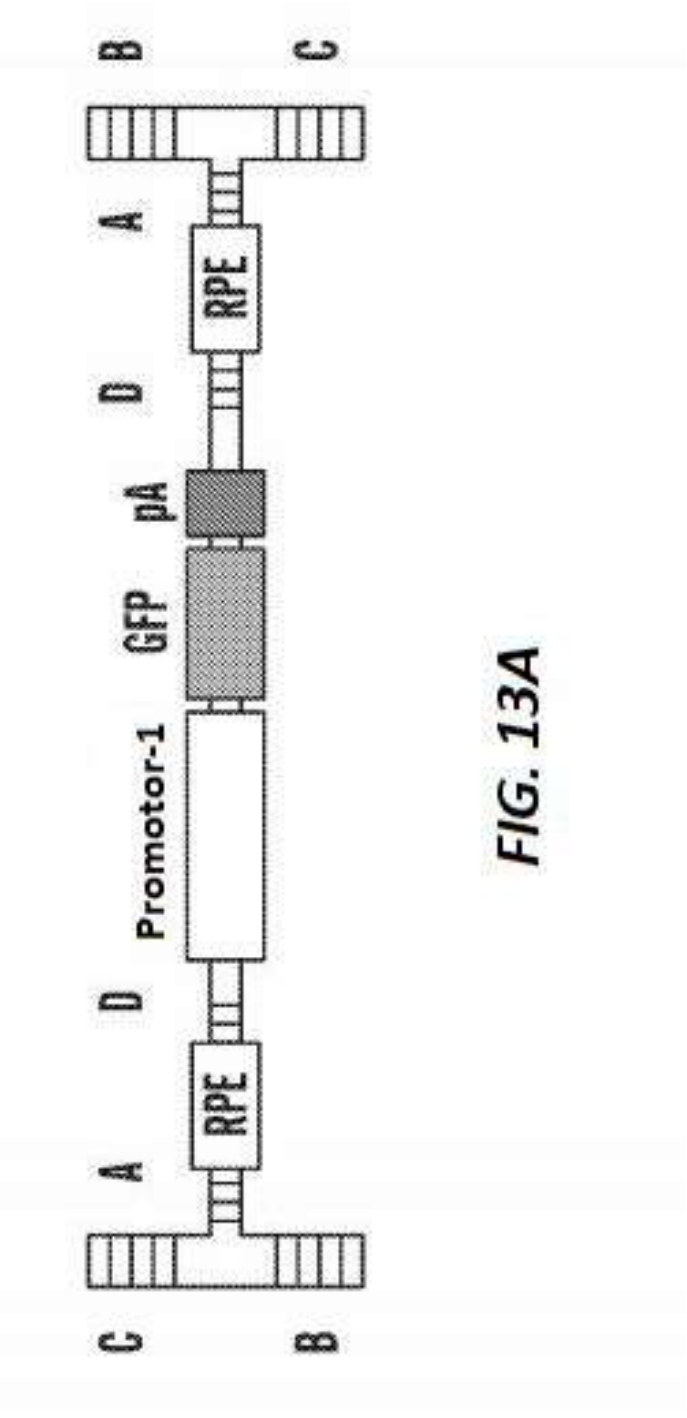


FIG. 13A

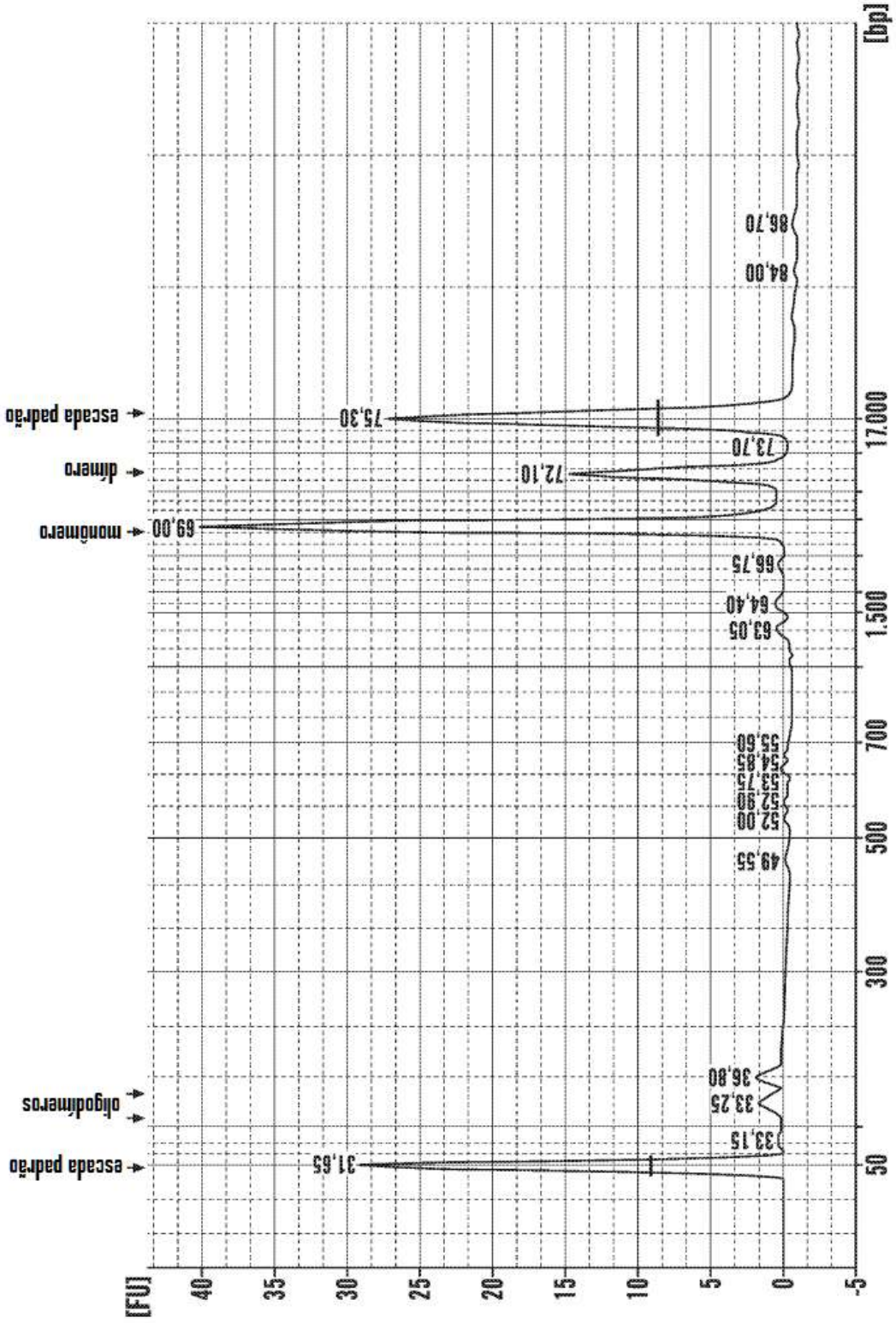

[FU]
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
50
300
500
700
1.500
17.000
[bp]
escada padrão
oligodímeros
dímero
monômero
escada padrão
31,65
33,15
33,25
36,80
49,55
52,00
52,80
53,75
54,85
55,60
63,05
64,40
66,75
69,00
72,10
73,70
75,30
84,00
86,70

FIG. 13B

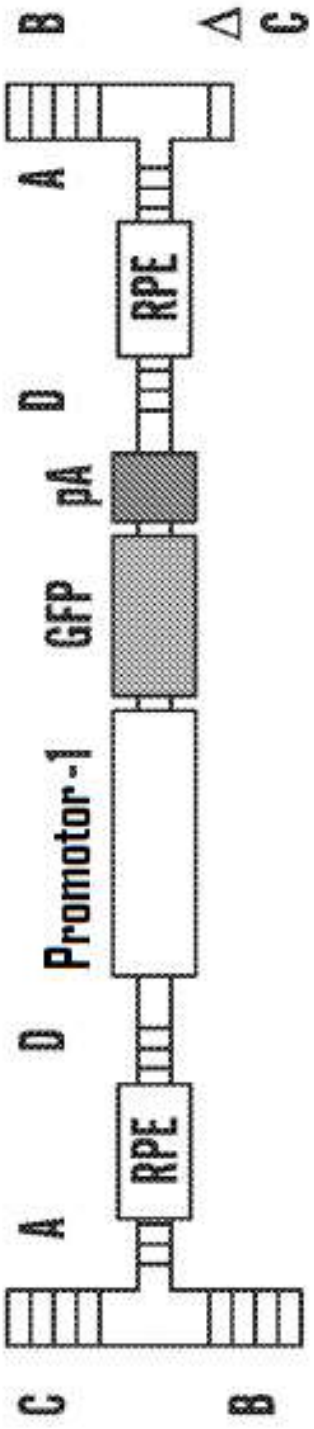


FIG. 14A

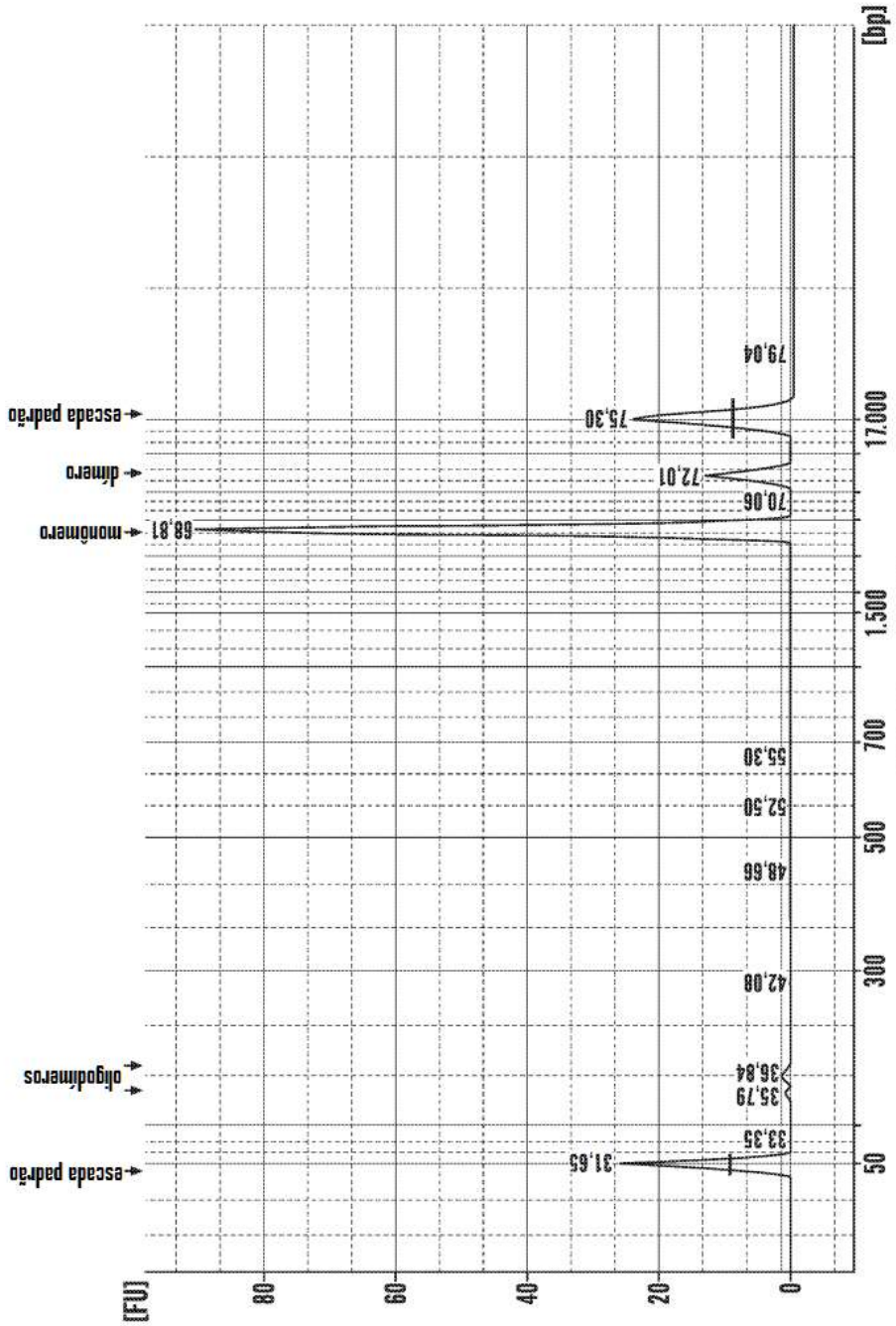

[FU]
80
60
40
20
0
50
300
500
700
1.500
17.000
[bp]
escada padrão
oligodímeros
monômero
dímero
escada padrão
31,65
33,35
35,79
36,84
42,08
48,66
52,50
55,30
68,81
70,06
72,01
75,30
79,04

FIG. 14B

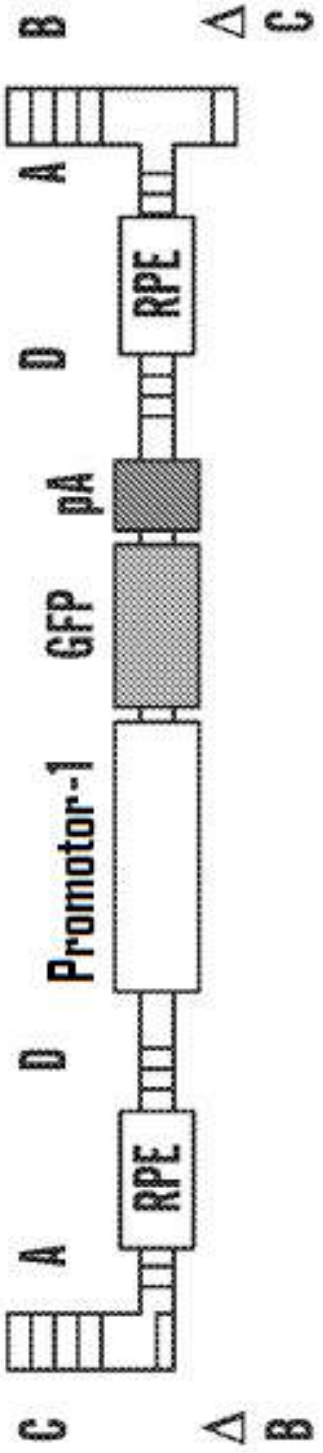


FIG. 15A

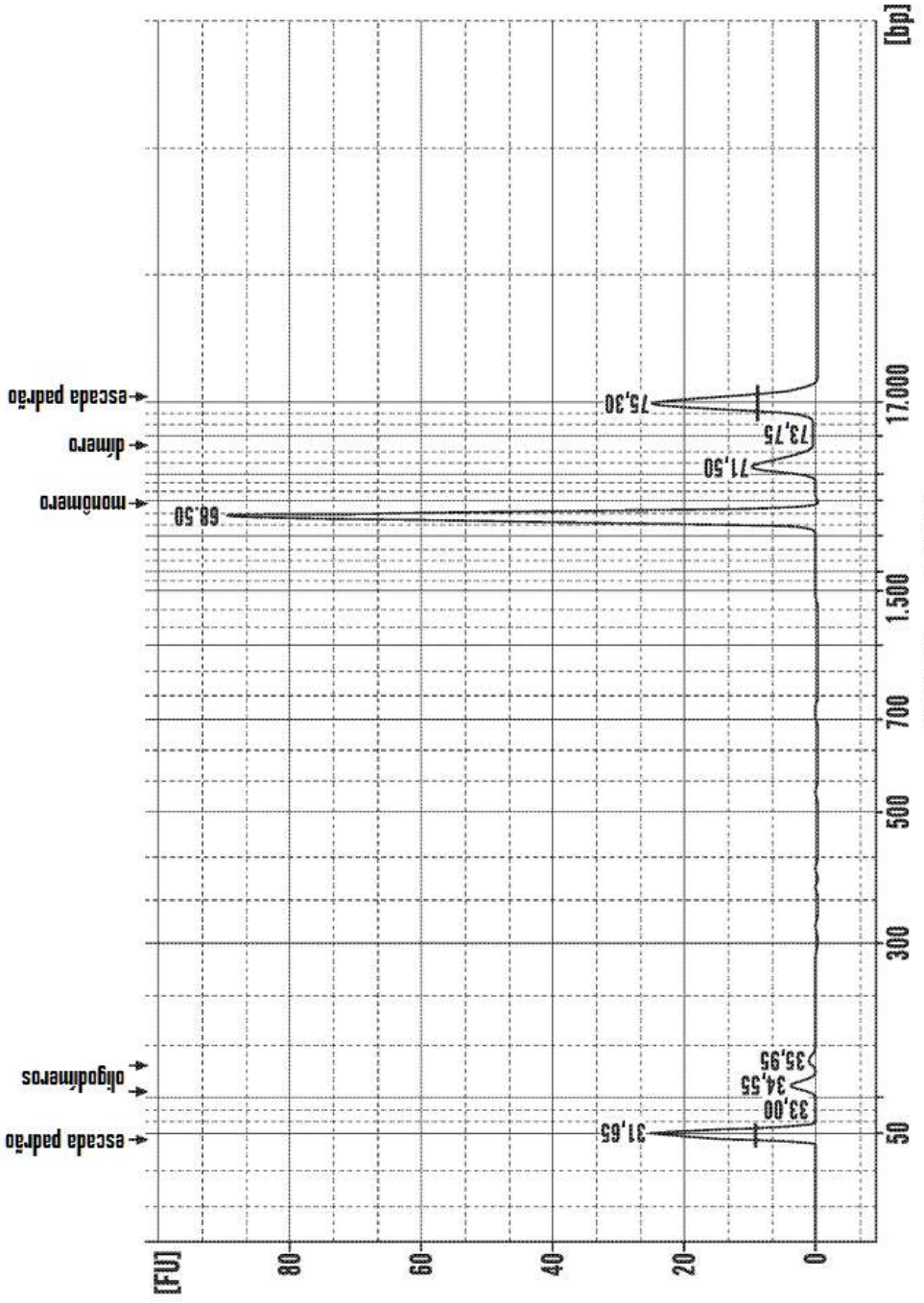

[FU]
80
60
40
20
0
50
300
500
700
1.500
17.000
[bp]
31,65
33,00
34,55
35,95
68,50
71,50
73,75
75,30
escada padrão
oligodímeros
escada padrão
dímero
monômero

FIG. 15B

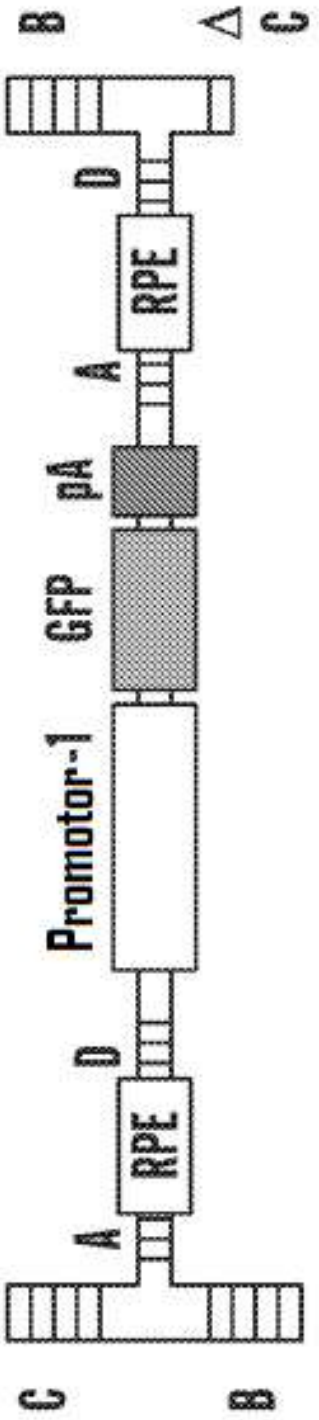


FIG. 16A

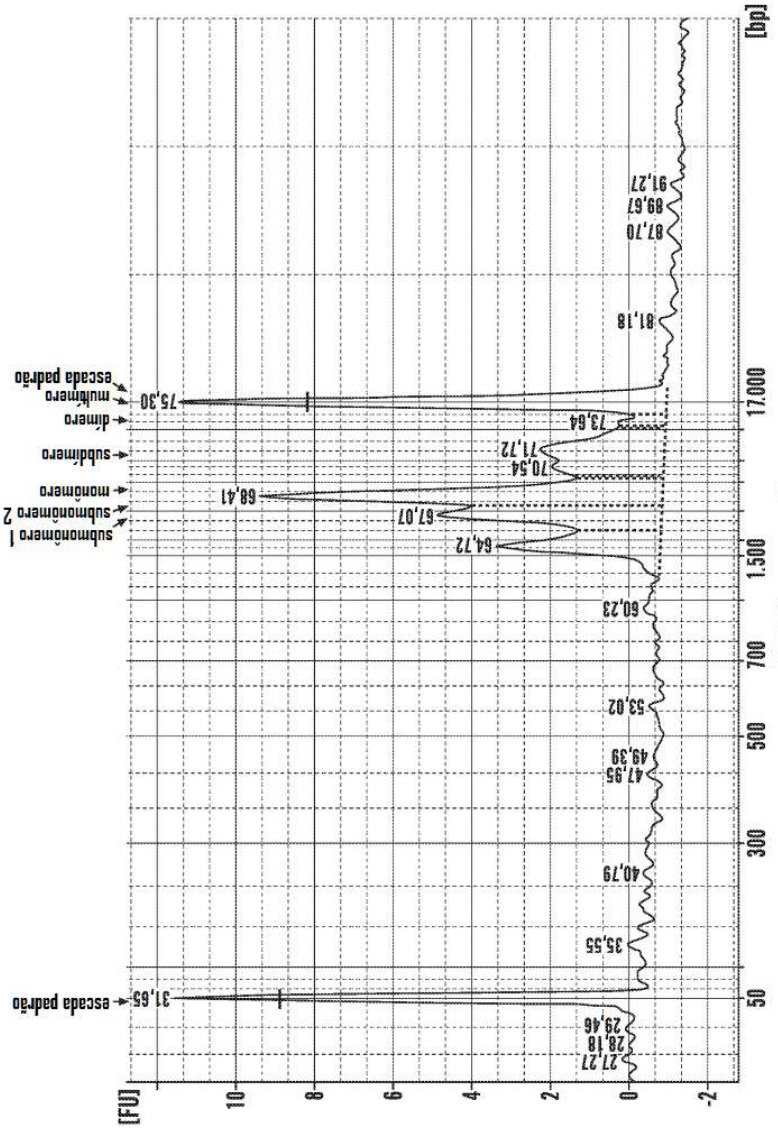

[FU]
10
8
6
4
2
0
-2
[bp]
50
300
500
700
1.500
17.000
escada padrão
31,65
27,27
28,18
29,46
35,55
40,79
47,95
49,39
53,02
60,23
64,72
67,07
68,41
70,54
71,72
73,64
75,30
81,18
87,70
89,67
91,27
monômero
dímero
multímero
escada padrão

FIG. 16B

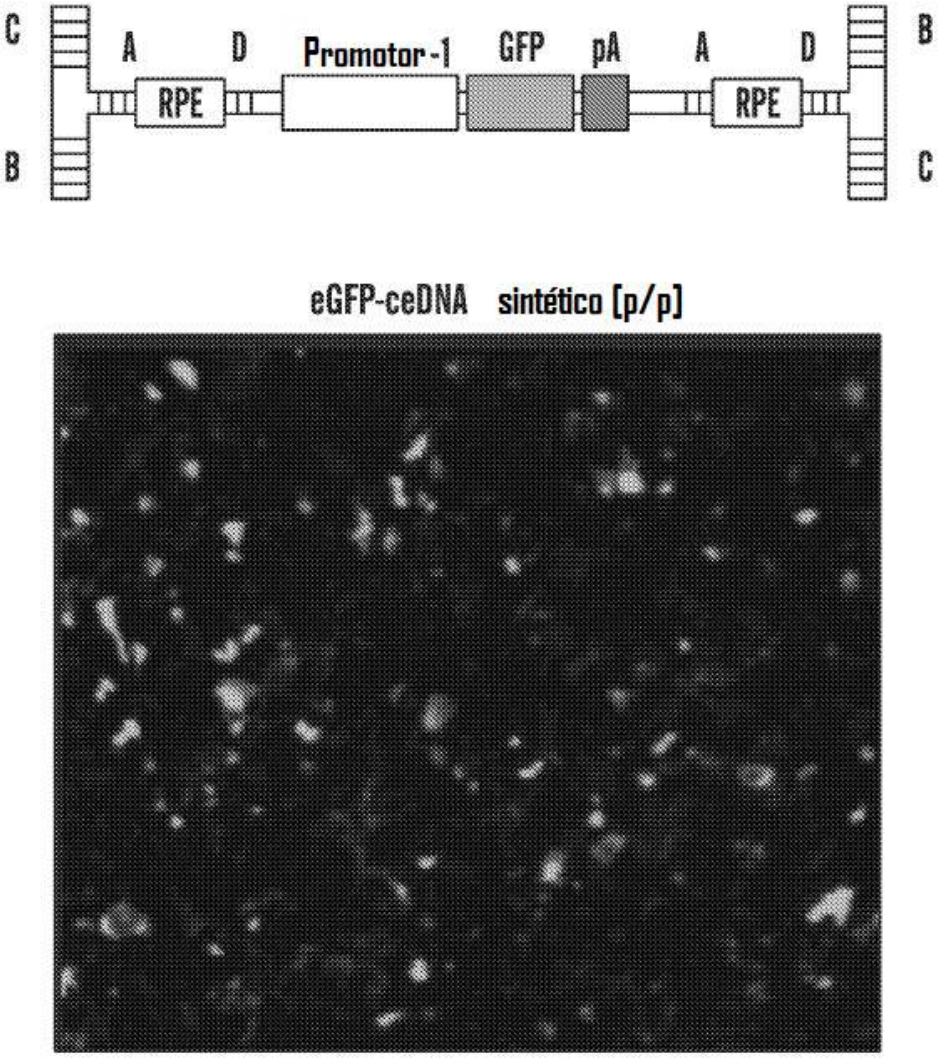


FIG. 17



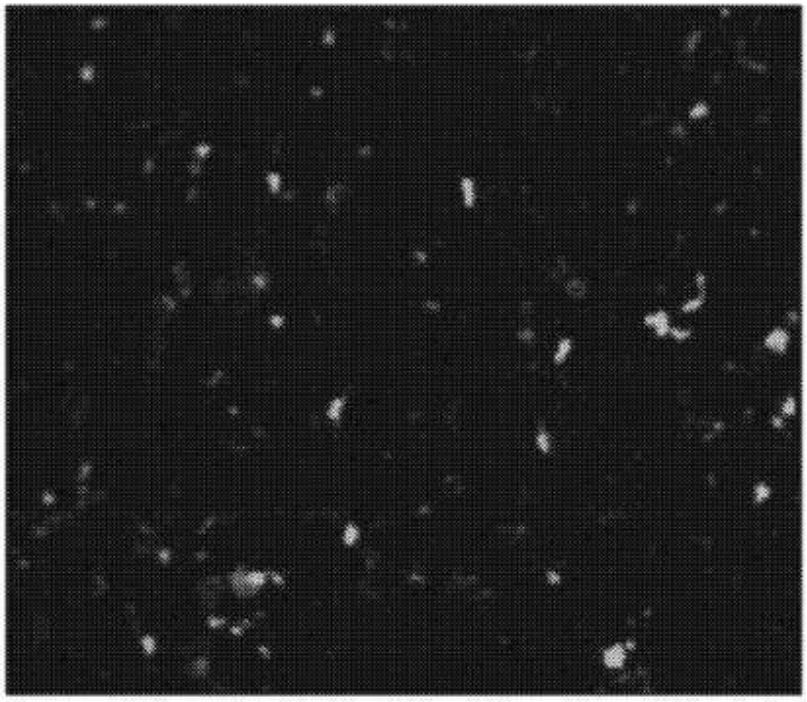


FIG. 17 (cont.)

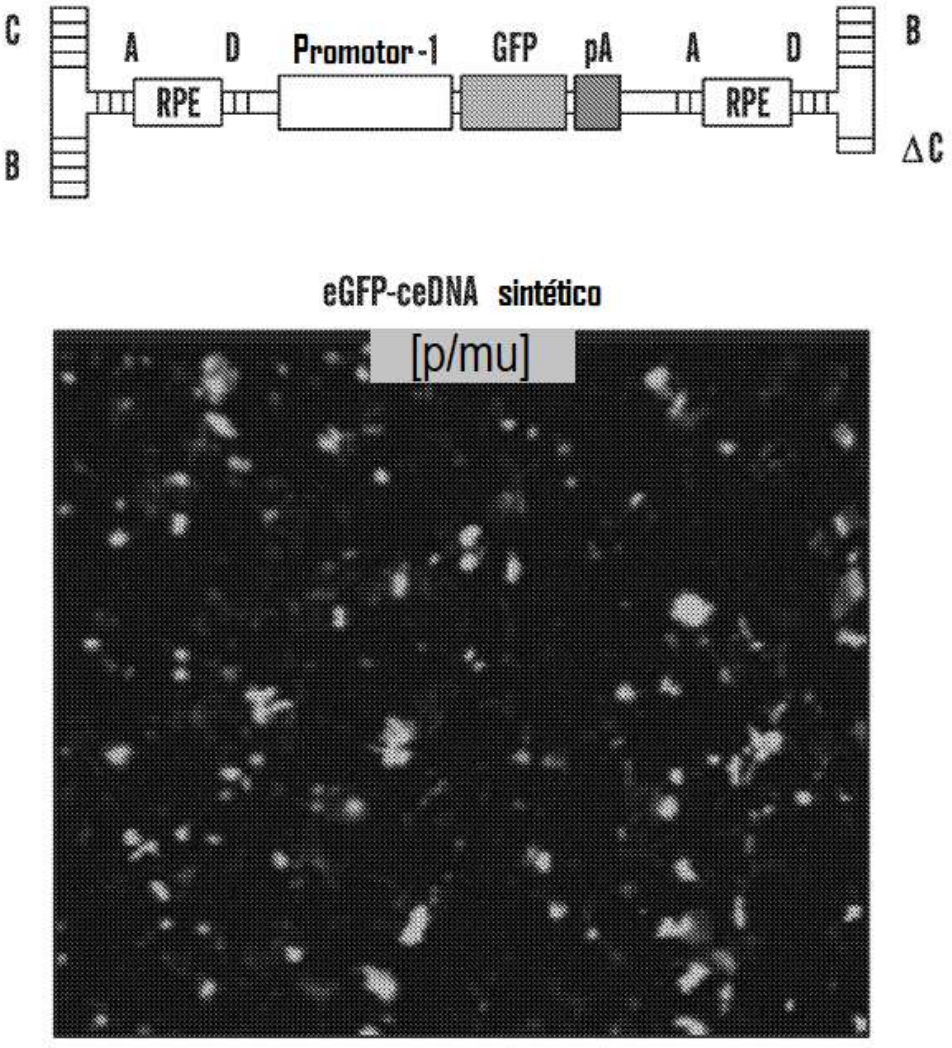
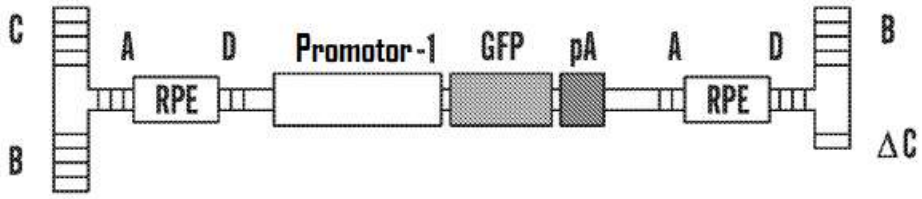

C
B
A
D
RPE
Promotor-1
GFP
pA
A
D
RPE
B
ΔC
eGFP-ceDNA sintético
[p/mu]

FIG. 17 (cont.)



eGFP-ceDNA derivado
de SF9 de controle [p/mu]

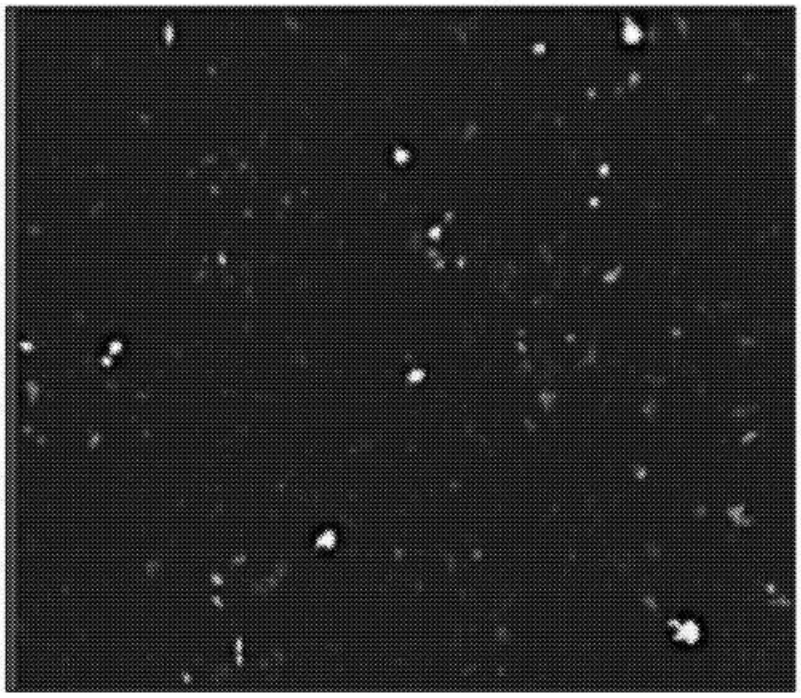
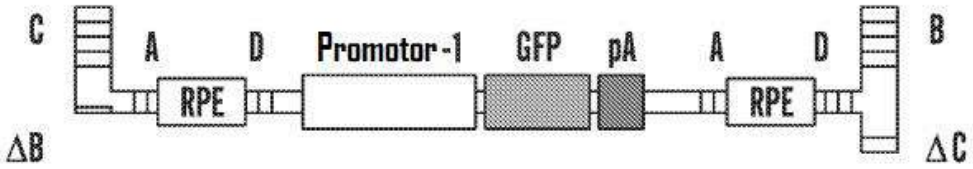


FIG. 17 (cont.)


C
A
D
Promotor-1
GFP
pA
A
D
B
RPE
RPE
ΔB
ΔC

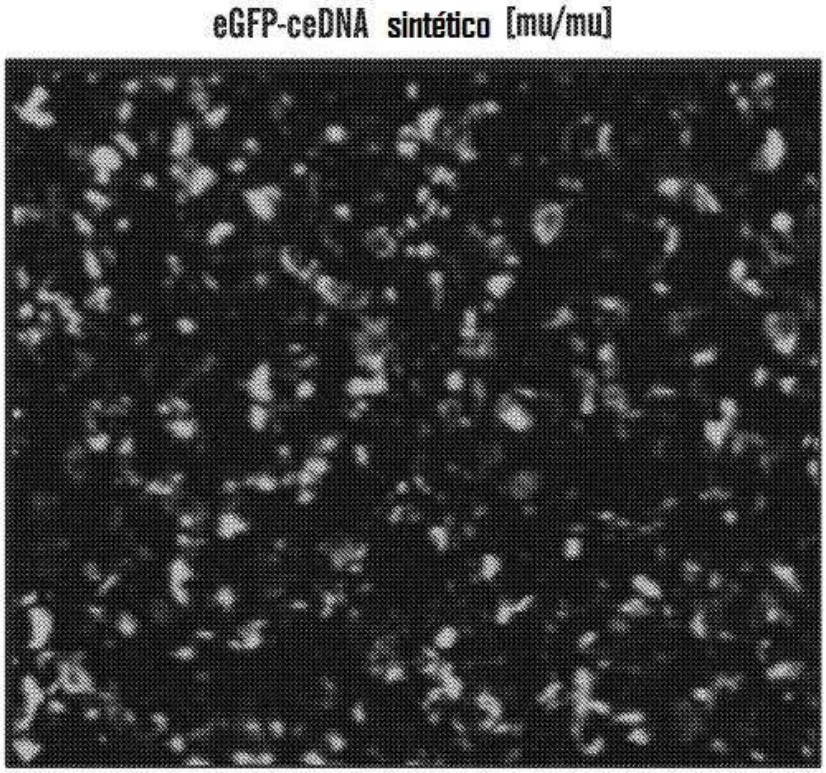

eGFP-ceDNA sintético [mu/mu]

FIG. 17 (cont.)

FIG. 18A

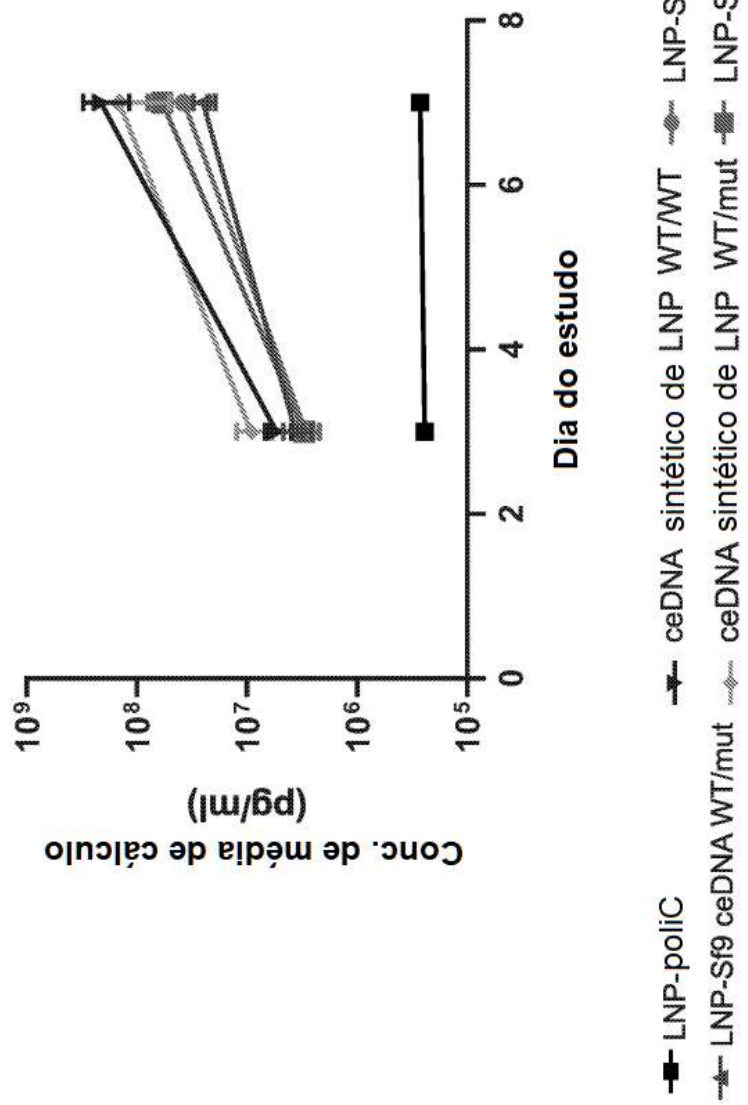
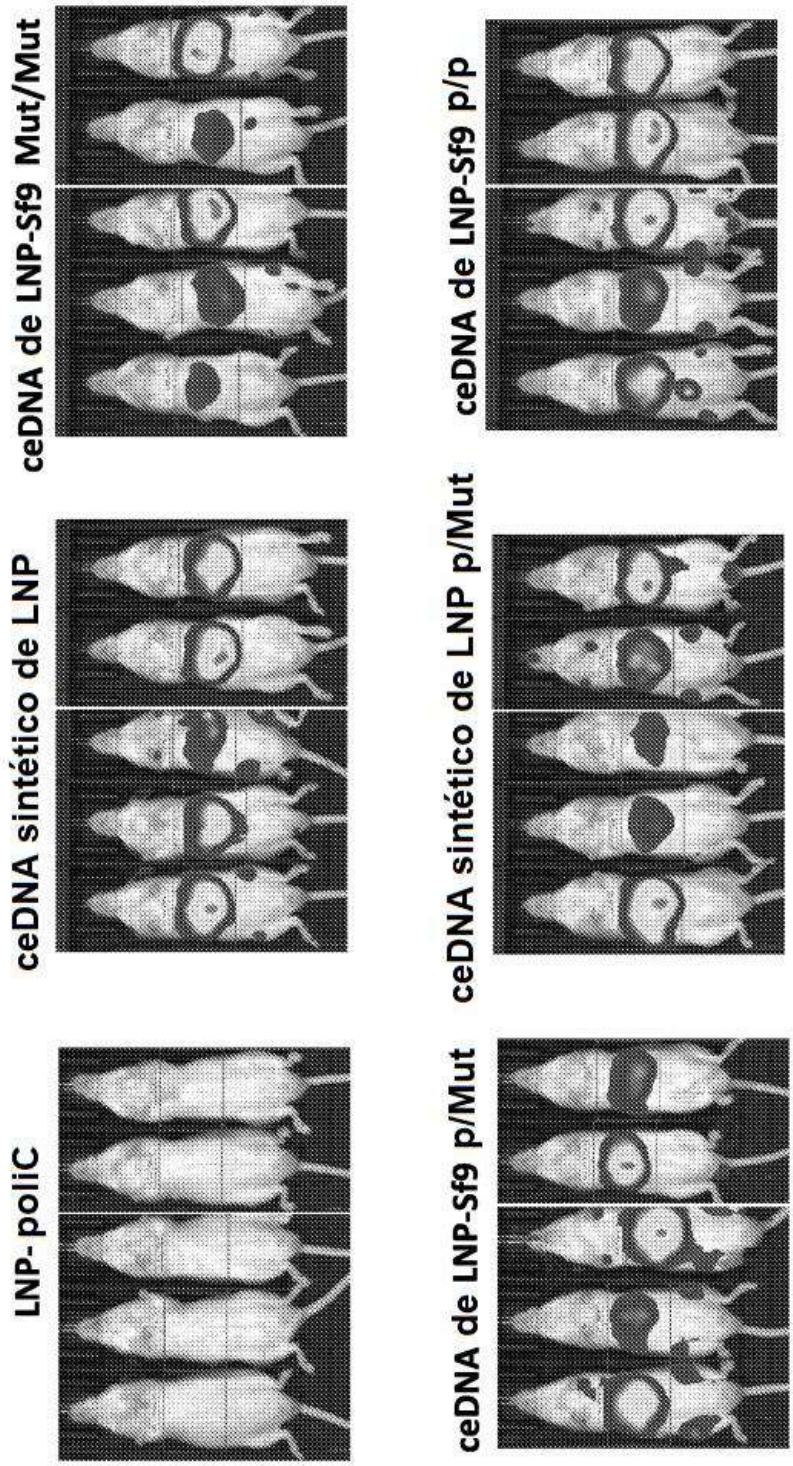

Conc. de média de cálculo (pg/ml)
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
0
2
4
6
8
Dia do estudo
LNP-poliC
ceDNA sintético de LNP WT/WT
LNP-Sf9 ceDNA mut/mut
LNP-Sf9 ceDNA WT/mut
ceDNA sintético de LNP WT/mut
LNP-Sf9 ceDNA WT/WT

FIG. 18B


LNP- poliC
ceDNA sintético de LNP
ceDNA de LNP-Sf9 Mut/Mut
ceDNA de LNP-Sf9 p/Mut
ceDNA sintético de LNP p/Mut
ceDNA de LNP-Sf9 p/p

RESUMO

Patente de Invenção: **"VETORES DE DNA DE EXTREMIDADE FECHADA OBTENÍVEIS A PARTIR DE SÍNTESE LIVRE DE CÉLULAS E PROCESSO PARA OBTER VETORES DE ceDNA".**

A presente invenção refere-se a métodos para síntese sintética e síntese livre de células de vetores de DNA, particularmente vetores de DNA de extremidade fechada (por exemplo, vetores de ceDNA) que têm estrutura linear e contínua para entrega e expressão de um transgene. A presente invenção se refere a um processo *in vitro* para a produção de vetores de DNA de extremidade fechada, produtos de vetor de DNA correspondentes produzidos pelos métodos e usos dos mesmos, e oligonucleotídeos e kits úteis no processo da invenção. Os vetores de DNA produzidos utilizando os métodos descritos no presente documento estão livres de efeitos colaterais indesejados devido a contaminantes introduzidos durante a produção em linhagens de células, por exemplo, linhas de células bacterianas ou de insetos. São ainda fornecidos no presente documento métodos e linhagens de células para expressão gênica confiável *in vitro, ex vivo* e *in vivo* com o uso dos vetores de ceDNA sintetizados utilizando os métodos descritos no presente documento.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P247357 ListSeq (JUNTADA TRADUÇÃO).txt
- Data de Geração do Código: 24/08/2020
- Hora de Geração do Código: 09:11:13
- Código de Controle:
  - Campo 1: F1383F839D2FD185
  - Campo 2: 0106AD3CDF91C733