



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

(21) BR 112021000763-6 A2



(22) Data do Depósito: 16/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 13/04/2021

(54) Título: MÉTODOS E COMPOSIÇÕES DE CONSTRUTOS E VETORES DE OTC

(51) Int. Cl.: C07K 14/47; A61K 48/00; C12N 9/10; C12N 9/88; C12N 15/861.

(30) Prioridade Unionista: 16/07/2018 US 62/698,503; 28/04/2019 US 62/839,766.

(71) Depositante(es): SELECTA BIOSCIENCES, INC..

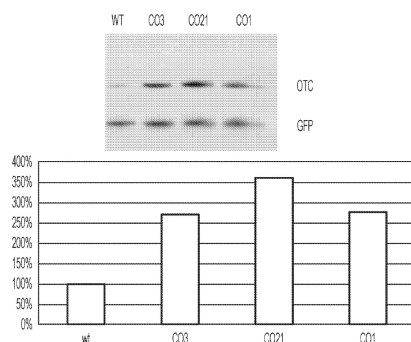
(72) Inventor(es): PETER KELLER; TAKASHI KEI KISHIMOTO; ANDRES MURO; GIULIA DE SABBATA.

(86) Pedido PCT: PCT US2019042069 de 16/07/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/018583 de 23/01/2020

(85) Data da Fase Nacional: 15/01/2021

(57) Resumo: MÉTODOS E COMPOSIÇÕES DE CONSTRU-TOS E VETORES DE OTC. A presente invenção refere-se a métodos e composições relacionadas a ácidos nucleicos que codificam ornitina transcarbamilase (OTC), tais como ácidos nucleicos que compreendem uma sequência otimizada por códon de OTC, assim como vetores relacionados, tais como vetores de AAV. Além disso, são fornecidos métodos para administrar vetores de AAV que compreendem uma sequência que codifica uma enzima associada a um distúrbio de ciclo de ureia e uma sequência de controle de expressão, em combinação com nanocarreadores sintéticos acoplados a um imunossupressor.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **“MÉTODOS E COMPOSIÇÕES DE CONSTRUTOS E VETORES DE OTC”**.

PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício disposto no Título 35 do USC § 119(e) do Pedido Provisório de nº de série U.S. 62/698.503, depositado em 16 de julho de 2018 e Pedido Provisório de nº de série U.S. 62/839.766, depositado em 28 de abril de 2019, sendo que o conteúdo de cada um é incorporado ao presente documento a título de referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção refere-se a métodos e composições relacionadas a ácidos nucleicos que codificam ornitina transcarbamilase (OTC), tais como ácidos nucleicos que compreendem uma sequência otimizada por códon de OTC, assim como vetores relacionados, tais como vetores de AAV. Além disso, são fornecidos métodos para administrar vetores de AAV que compreendem uma sequência que codifica uma enzima associada a um distúrbio de ciclo de ureia e uma sequência de controle de expressão, em combinação com nanocarreadores sintéticos acoplados a um imunossupressor.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0003] São fornecidos no presente documento métodos e composições relacionadas a ácidos nucleicos que codificam OTC, tais como ácidos nucleicos que compreendem uma sequência otimizada por códon de OTC, assim como vetores relacionados, tais como vetores de AAV. Além disso, são fornecidos no presente documento métodos e composições para administrar vetores de AAV que compreendem a sequência de ácidos nucleicos que codifica uma enzima associada a um distúrbio de ciclo de ureia e uma sequência de controle de expressão, em combinação com nanocarreadores sintéticos acoplados a um imunossupressor. A administração pode ter um benefício terapêutico para qualquer um dos propósitos fornecidos no presente documento em qualquer

um dos métodos ou composições fornecidas no presente documento.

[0004] Em outro aspecto, um método ou composição conforme descrito em qualquer um dos Exemplos é fornecido. Em uma modalidade, uma composição que compreende qualquer um dos vetores ou sequências de ácidos nucleicos fornecidas no presente documento é fornecida.

[0005] Em outro aspecto, qualquer uma dentre as composições é fornecida para uso em qualquer um dos métodos fornecidos.

[0006] Em outro aspecto, qualquer um dos métodos ou composições é para uso em tratar qualquer uma das doenças ou distúrbios descritos no presente documento. Em outro aspecto, qualquer um dos métodos ou composições é para uso em reduzir uma resposta imunológica (isto é, humoral e/ou celular) a um antígeno de AAV e/ou o produto expresso do vetor de AAV, aumentar a expressão da sequência que codifica a enzima, ou para administração repetida de um vetor de AAV.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0007] A Figura 1 mostra eficiência de transfecção de três construtos diferentes. Um plasmídeo de GFP foi usado para normalizar para eficiência de transfecção (wt).

[0008] A Figura 2 mostra os resultados quando cada construto foi transfectado em duplicata. O Western blot (topo) é quantificado por intensidade de banda no gráfico (fundo) em quantificação de WB.

[0009] A Figura 3 mostra a intensidade de banda de cada construto a partir de todos os experimentos (n=4).

[0010] A Figura 4 mostra recursos da sequência CO3.

[0011] A Figura 5 mostra recursos da sequência CO21.

[0012] A Figura 6 mostra uma variedade de diferentes algoritmos usados para análise de otimização de códon, incluindo uso de códon, sítios de splicing crípticos, ORFs na fita antissenso (ARF >50 bp), estrutura secundária, teor de GC e ilhas de CpG.

[0013] A Figura 7 mostra níveis de expressão de mRNA de OTC em

células de Huh7 transfectadas com construtos pSMD2_hOTC com uso de PCR em tempo real, n=2.

[0014] As Figuras 8A e 8B mostram expressão de OTC em HUH7 transfectado com construtos pSMD2_hOTC; uma análise de Western blot (Figura 8A) e quantificação de banda (a Figura 8B) são mostrados.

[0015] A Figura 9 mostra localização subcelular de hOTC por coloração.

[0016] A Figura 10 mostra os resultados de lote de AAV 5,0E12 vg/kg em C57Bl/6N. Três construtos diferentes foram testados: AAV8-CO1, AAV8-CO3 e AAV8-CO6. AAV8-OTC de tipo selvagem foi usado como controle.

[0017] A Figura 11 mostra os resultados de experimentos com camundongos com OTC^{spf-ash} (5×10^{11} Vg/Kg).

[0018] A Figura 12 mostra uma comparação de OTC humano e de camundongo por Western blot.

[0019] A Figura 13 mostra o ácido orótico urinário de camundongos com OTC^{spf-ash} que têm a mesma concentração de (5×10^{11} Vg/Kg) de vírus no fígado (n=2).

[0020] A Figura 14 mostra os níveis de expressão de um primeiro grupo de variantes de AAV8-hOTC-CO em linhagens de carcinoma hepatocelular de HUH7. Seis construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO2, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6, AAV8-hOTC-CO7, AAV8-hOTC-CO9. AAV8-hOTC de tipo selvagem e vetor de AAV8 vazio foram usados como controles (n=2, * = $P < 0,05$).

[0021] A Figura 15 mostra os níveis de expressão de um segundo grupo de variantes de AAV8-hOTC-CO em linhagens de carcinoma hepatocelular de HUH7. Cinco construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6-1, AAV8-hOTC-CO9-1, AAV8-hOTC-CO9-2. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle (n=2, * = $P < 0,05$).

[0022] A Figura 16 mostra uma representação de logo do alinhamento de 566 sequências de OTC em humanos. A numeração corresponde à sequência humana para remover inserções relativas à sequência humana. O tamanho das letras indica o grau de conservação de sequência.

[0023] A Figura 17 mostra uma representação esquemática dos construtos de cDNA de hOTC embaralhados para gerar um terceiro grupo de variantes de hOTC-CO. Os construtos de hOTC-CO21 e hOTC-CO18 foram designados embaralhando-se as regiões conservadas dos construtos de hOTC-CO1, hOTC-CO3 e hOTC-CO6. A numeração corresponde à sequência de aminoácidos da proteína de OTC humana de tipo selvagem.

[0024] A Figura 18 mostra os níveis de expressão de construtos de AAV8-hOTC-CO em linhagens de carcinoma hepatocelular de HUH7. Cinco construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6, AAV8-hOTC-CO18 e AAV8-hOTC-CO21. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle (n=4, * = $P < 0,05$).

[0025] A Figura 19 mostra níveis de expressão DE OTC, atividade catalítica de OTC, e cópias de genoma viral/célula em camundongos C57Bl/6N machos transduzidos com alta dose AAV ($5,0 \times 10^{12}$ genomas virais/quilograma (vg/kg)). Seis construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO2, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6, AAV8-hOTC-CO7 e AAV8-hOTC-CO9. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle (n=3, * = $P < 0,05$).

[0026] A Figura 20 mostra os resultados de camundongos C57Bl/6N machos transduzidos com AAV ($5,0 \times 10^{12}$ vg/kg). Três construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3 e AAV8-hOTC-CO6. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle (n=3, * = $P < 0,05$).

[0027] A Figura 21 mostra níveis de expressão de OTC, atividade catalítica de OTC, e cópias de genoma viral/célula em camundongos C57Bl/6N machos transduzidos com AAV (1,25E12 vg/kg). Seis construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO2, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6, AAV8-hOTC-CO7 e AAV8-hOTC-CO9. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle (n=3, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$). Níveis de expressão, atividade catalítica de OTC, e cópias de genoma viral/célula são mostrados.

[0028] A Figura 22 mostra níveis de expressão de OTC, atividade catalítica de OTC, e cópias de genoma viral/célula em camundongos C57Bl/6N fêmeas transduzidos com AAV (5,0E12 vg/kg). Seis construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO2, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6, AAV8-hOTC-CO7 e AAV8-hOTC-CO9. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle.

[0029] A Figura 23 mostra níveis de mRNA de construtos de AAV8-hOTC-CO in male e camundongos C57Bl/6N fêmeas tratados com construtos 1,25E12 vg/kg ou 5,0E12 vg/kg. Seis construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO2, AAV8-hOTC-CO3, AAV8-hOTC-CO6, AAV8-hOTC-CO7 e AAV8-hOTC-CO9. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle.

[0030] A Figura 24 mostra níveis de expressão de OTC, atividade catalítica de OTC, e cópias de genoma viral/célula em camundongos C57Bl/6N machos transduzidos com AAV (1,25E12 vg/kg). Três construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3 e AAV8-hOTC-CO6. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle (n=2, * = $P < 0,05$).

[0031] A Figura 25 mostra níveis de expressão de OTC, atividade catalítica de OTC, e cópias de genoma viral/célula em camundongos C57Bl/6N transduzidos com AAV (1,25E12 vg/kg). Três construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3 e AAV8-

hOTC-CO21. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle (n=4, * = $P < 0,05$).

[0032] A Figura 26 mostra ácido orótico urinário de camundongos com OTC^{spf-ash} tratados com 5,0E11 vg/kg. Três construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3 e AAV8-hOTC-CO21. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle (n=4).

[0033] A Figura 27 mostra níveis de amônia de plasma (NH₄) de camundongos com OTC^{spf-ash} tratados com 5,0E11 vg/kg. Três construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3 e AAV8-hOTC-CO21. AAV8-hOTC de tipo selvagem e camundongos C57Bl/6N de tipo selvagem foram usados como controles (n=4).

[0034] A Figura 28 mostra níveis de expressão de OTC, atividade catalítica de OTC, e cópias de genoma viral/célula em camundongos com OTC^{spf-ash} transduzidos com AAV (5,0E11 vg/kg). Três construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1, AAV8-hOTC-CO3 e AAV8-hOTC-CO06. AAV8-hOTC de tipo selvagem e camundongos C57Bl/6N de tipo selvagem foram usados como controles (n=4, * = $P < 0,05$, **= $P < 0,01$, ***= $P < 0,001$).

[0035] A Figura 29 mostra níveis de expressão de OTC, atividade catalítica de OTC, e cópias de genoma viral/célula em camundongos com OTC^{spf-ash} transduzidos com AAV (5,0E11 vg/kg). Dois construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1 e AAV8-hOTC-CO3. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle (n=4).

[0036] A Figura 30 mostra ácido orótico urinário e atividade catalítica de camundongos com OTC^{spf-ash} tratados com 5,0E11 vg/kg. Dois construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1 e AAV8-hOTC-CO3. AAV8-hOTC de tipo selvagem e camundongos C57Bl/6N de tipo selvagem foram usados como controles (n=5).

[0037] A Figura 31 mostra níveis de expressão de OTC, atividade catalítica de OTC, e cópias de genoma viral/célula em camundongos

com OTC^{spf-ash} transduzidos com AAV (1,0E12 vgp/kg). Dois construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1 e AAV8-hOTC-CO3. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle (n=5).

[0038] A Figura 32 mostra níveis de expressão de OTC, atividade catalítica de OTC, e cópias de genoma viral/célula em camundongos fêmeas com OTC^{spf-ash} transduzidos com AAV (5,0E11 vgp/kg). Dois construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1 e AAV8-hOTC-CO3. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle (n=5).

[0039] A Figura 33 mostra níveis de expressão de OTC, atividade catalítica de OTC, e cópias de genoma viral/célula em camundongos fêmeas com OTC^{spf-ash} transduzidos com AAV (1,0E12 vgp/kg). Dois construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO1 e AAV8-hOTC-CO3. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle (n=5).

[0040] A Figura 34 mostra níveis de expressão de OTC, atividade catalítica de OTC, e cópias de genoma viral/célula em camundongos machos com OTC^{spf-ash} transduzidos com AAV (1,0E12 vgp/kg). Dois construtos diferentes foram testados: AAV8-hOTC-CO3 e AAV8-hOTC-CO21. AAV8-hOTC de tipo selvagem foi usado como controle (n=5, * =P<0,05, ** =P<0,01)

[0041] A Figura 35 mostra o ácido orótico urinário de camundongos machos com OTC^{spf-ash} que têm a mesma concentração (1,0E12 vgp/kg) do vírus no fígado (n=5).

[0042] A Figura 36 mostra o ácido orótico urinário, atividade enzimática de OTC, e níveis de proteína de OTC em camundongos com OTC^{spf-ash} injetados com uma de três doses (2,5E11 vgp/kg, 5,0E11 vgp/kg, 1,0E12 vgp/kg) de AAV8-hOTC de tipo selvagem ou AAV8-hOTC-CO21.

[0043] A Figura 37 mostra os níveis de ácido orótico urinário em camundongos machos com OTC^{spf-ash} tratados com 5,0E11 vg/kg AAV8-hOTC-wt ou AAV8-hOTC-CO21 (n=5).

[0044] A Figura 38 mostra expressão de proteína, e atividade catalítica de camundongos machos com OTC^{spf-ash} tratados com 2,5E11 vg/kg de AAV8-hOTC-wt ou AAV8-hOTC-CO21 (n=5, *=P<0,05).

[0045] A Figura 39 mostra expressão de proteína, e atividade catalítica de camundongos machos com OTC^{spf-ash} tratados com 2,5E11 vg/kg de AAV8-hOTC-wt ou AAV8-hOTC-CO21 (n=5, *=P<0,05).

[0046] A Figura 40 mostra o ácido orótico urinário em camundongos machos com OTC^{spf-ash} tratados com 2,5E11 vg/kg de AAV8-OTC-wt ou AAV8-hOTC-CO21.

[0047] A Figura 41 mostra o ácido orótico urinário e atividade enzimática de OTC em camundongos machos com OTC^{spf-ash} tratados com uma de três doses (2,5E11, 5,0E11, ou 1,0E12 vg/kg) de AAV8-hOTC-wt ou AAV8-hOTC-CO21.

[0048] A Figura 42 mostra resultados de teste comportamental, níveis de amônia de plasma (NH₄), e níveis de ácido orótico urinário em camundongos com OTC^{spf-ash} injetados com 5E11 vgp/kg AAV8-hOTC de tipo selvagem ou vírus AAV8-hOTC-CO21. Camundongos B6EiC3Sn-WT (WT-CH3) foram usados como controle (n=4, * =P<0,05, ** =P<0,01, *** =P<0,001).

[0049] A Figura 43 mostra o ácido orótico urinário de camundongos com OTC^{spf-ash} injetados com 5E11 vgp/kg ou 1E12 vgp/kg de AAV8-hOTC-CO21.

[0050] A Figura 44 mostra os resultados de teste comportamental, níveis de amônia de plasma (NH₄), níveis de ácido orótico urinário, níveis de expressão de proteína, e atividade enzimática de OTC em camundongos OTC^{spf-ash} injetados com 5E11 vgp/kg AAV8-hOTC de tipo selvagem ou vírus AAV8-hOTC-CO21. Bi6EiC3Sn-WT (WT-CH3) ou camundongos C57Bl/6N de tipo selvagem (C57-WT) foram usados como controle (n=4, * =P<0,05, ** =P<0,01, *** =P<0,001).

[0051] A Figura 45 mostra expressão de OTC e atividade enzimática em hepatócitos humanos que expressam AAV8-hOTC-CO21 e AAV8-hOTC- Δ intensificador-CO21 (AAV8-hOTC- Δ -CO21). Camundongos com OTC^{spf-ash} não tratados foram usados como controle.

[0052] A Figura 46 mostra o ácido orótico urinário e expressão de OTC de camundongos com OTC^{spf-ash} injetados com AAV8-hOTC-CO21 e AAV8-hOTC- Δ -CO21. Camundongos com OTC^{spf-ash} não tratados foram usados como controle.

[0053] A Figura 47 mostra o ácido orótico urinário e anticorpo anti-AAV8 (Nab) de camundongos jovens (P30) com OTC^{spf-ash} injetados com vírus 5,0E11 vg/kg AAV8-hOTC-CO21. Camundongos com OTC^{spf-ash} não tratados foram usados como controle.

[0054] A Figura 48 mostra os níveis de anticorpo IgG anti-AAV8 e a expressão de hFIX em camundongos C57BL/6 injetados com 4,0E12 vg/kg de AAV8-luciferase (AAV8-luc) e 8 mg/kg de SVP [Rapa] ou SVP [vazio], seguido por 4,0E12 vg/kg AAV8-hFIX e 8 vg/kg SVP [Rapa] ou SVP [vazio] (n=5/grupo).

[0055] A Figura 49 mostra os níveis de anticorpo IgG anti-AAV8 e expressão de hFIX em primatas não humanos *Macaca fascicularis* injetados com 2,0E12 vg/kg AAV8-Gaa e 3 mg/kg SVP [Rapa] ou SVP [vazio], seguido por 2,0E12 vg/kg AAV8-hFIX e 3 mg/kg SVP [Rapa] ou SVP [vazio] (n=2 SVP[Rapa] + AAV, n=1 SVP[Vazio] + AAV).

[0056] A Figura 50 mostra o nível de anticorpo IgG anti-AAV8 em camundongos com OTC^{spf-ash} duas semanas após injeção com AAV8-OTC CO21 por si só ("AAV", círculos fechados), AAV8-OTC CO21 + controle de nanopartícula vazia ("AAV + NPc", quadrados fechados), AAV8-OTC CO21 + 4 mg/kg SVP-Rapamicina ("AAV + SVP4", triângulos fechados), AAV8-OTC CO21 + 8 mg/kg SVP-Rapamicina ("AAV + SVP8", triângulos fechados invertidos), ou AAV8-OTC CO21 + 12 mg/kg SVP-Rapamicina ("AAV + SVP12", diamantes fechados).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0057] Antes de descrever a presente invenção em detalhes, deve-se entender que esta invenção não é limitada a materiais particularmente exemplificados ou parâmetros de processo tais como podem, evidentemente, variar. Deve ser entendido que a terminologia usada no presente documento é para o propósito de descrever modalidades particulares da invenção apenas, e não é destinada a ser limitante do uso de terminologia alternativa para descrever a presente invenção.

[0058] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente citados no presente documento, seja supra ou infra, são incorporados por meio deste a título de referência em sua totalidade para todos os fins. Tal incorporação a título de referência não se destina a ser uma admissão de quaisquer das publicações, patentes e pedidos de patente incorporados citados no presente documento constituem técnica anterior.

[0059] Conforme usado neste relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um”, “uma”, “a” e “o” incluem vários referentes a menos que o conteúdo indique claramente o contrário. Por exemplo, referência a “um polímero” inclui uma mistura de duas ou mais moléculas ou uma mistura de pesos moleculares diferentes de espécies de polímero únicas, referência a “um nanocarreador sintético” inclui uma mistura de dois ou mais nanocarreadores sintéticos ou uma pluralidade de tais nanocarreadores sintéticos, referência a “uma molécula de DNA” inclui uma mistura de duas ou mais moléculas de DNA ou uma pluralidade de tais moléculas de DNA, referência a “um imunossupressor” inclui uma mistura de dois ou mais moléculas imunossupressoras ou uma pluralidade de tais moléculas imunossupressoras, e similares.

[0060] Conforme usado no presente documento, o termo “compreender” ou variações dos mesmos tais como “compreende” ou “compreendendo” devem ser lidos para indicar a inclusão de qualquer número

inteiro citado (por exemplo, um recurso, elemento, característica, propriedade, método/etapa de processo ou limitação) ou grupo de números inteiros (por exemplo, recursos, elementos, características, propriedades, método/etapas de processo ou limitações), mas não a exclusão de nenhum outro número inteiro ou grupo de números inteiros. Desse modo, conforme usado no presente documento, o termo “compreendendo” é inclusivo e não exclui números inteiros ou método/etapas de processo adicionais não citados.

[0061] Em modalidades de qualquer uma das composições e métodos fornecidos no presente documento, “compreendendo” pode ser substituído por “consistindo essencialmente em” ou “consistindo em”. A frase “consistindo essencialmente em” é usado no presente documento para solicitar o número (ou números) inteiro ou etapas especificadas assim como aquelas que não afetam de forma material o caractere ou função da invenção reivindicada. Conforme usado no presente documento, o termo “consistindo” é usado para indicar a presença do número inteiro citado (por exemplo, um recurso, elemento, característica, propriedade, método/etapa de processo ou limitação) ou grupo de números inteiros (por exemplo, recursos, elementos, características, propriedades, método/etapas de processo ou limitações) por si só.

A. INTRODUÇÃO

[0062] Defeitos de ciclo de ureia (UCDs) são geralmente causados por distúrbios genéticos que resultam em uma deficiência de uma das seis enzimas no ciclo de ureia, causando um acúmulo de amônia no sangue. Apesar da restrição de proteína dietética e fármacos de sequestro de amônia, crianças com UCDs desenvolvem incapacidades relacionadas à hiperamonemia, e muitas morrem nas primeiras duas décadas de vida. Não há tratamento definitivo para o UCD mais comum, deficiência de ornitina transcarbamilase (OTCd), além de transplante de fígado, um procedimento invasivo limitado por disponibilidade de órgão e

tratamento de imunossupressão de vida longa. Deficiência de ornitina TransCarbamilase (OTCd) é a doença de ciclo de ureia ligada por X monogênica com uma prevalência estimada de 15.000 a 60.000 nascidos vivos. Os pacientes com deficiência de OTC mais severa manifestam sintomas imediatamente após o nascimento, com crise de amônia severa que pode causar coma e morte prematura. Um segundo grupo de pacientes é caracterizado por manifestação de início tardio, incluindo desenvolvimento atrasado e incapacidade intelectual, devido a uma atividade residual parcial da enzima (Campbell et al., 1973; Wraith, 2001; Gordon, 2003).

[0063] Como exemplos, uma série de construtos de vetor ssAAV que expressam transgene de OTC humano sob o controle transcripcional de um promotor específico de fígado foi desenvolvida. O wt-hOTC foi Otimizado com Códon (CO) com diferentes algoritmos. Esses vetores candidatos foram acondicionados em AAV8 e usados para transduzir camundongos com OTCspf-ash (5×10^{11} e 1×10^{12} vgp/kg). Medindo-se o número de cópias de genoma viral por célula, níveis de proteína, atividade catalítica, níveis de ácido orótico urinário e níveis de amônia de plasma, construtos de CO-hOTC que foram particularmente eficientes em corrigir o fenótipo de camundongos com OTCspf-ash foram identificados. Composições que compreendem tais construtos são fornecidos no presente documento em alguns aspectos. Tais construtos podem ser usados em qualquer um dos métodos e composições fornecidas no presente documento.

[0064] Adicionalmente, é observado que, embora vetores virais são agentes terapêuticos promissores para a variedade de aplicações tais como expressão de transgene, respostas imunes celulares e humorais contra o vetor viral pode diminuir eficácia e/ou reduzir a capacidade de usar tais agentes terapêuticos em um contexto de administração repetida. Essas respostas imunes incluem respostas de anticorpo, célula B

e célula T e podem ser específicas a antígenos virais do vetor viral, tais como viral cápside ou proteínas de revestimento ou peptídeos dos mesmos.

[0065] Foi constatado que vetores de vírus adenoassociado (AAV) que codificam o gene de OTC para administração em combinação com nanocarreadores sintéticos biodegradáveis que contém um imunossupressor, tais como rapamicina, podem ser produzidos e usados para prevenir respostas imunes, tais como respostas de anticorpo, por exemplo, a uma enzima terapêutica imunogênica. Em estudos, os nanocarreadores sintéticos que compreendem respostas imunes humorais e celulares bloqueadas por imunossupressor a AAV, que, para OTCd, poderia ter dois benefícios: 1) capacidade de tratar pacientes em uma idade precoce, enquanto mantém a possibilidade de nova dose posterior em vida para manter níveis de expressão terapêuticos, e 2) minimizar o uso de esteroides, que pode disparar crise metabólica. Desse modo, são fornecidos no presente documento métodos e composições para tratar um indivíduo com a vetor de AAV recombinante que compreende qualquer um dos construtos fornecidos no presente documento em combinação com nanocarreadores sintéticos que compreendem um imunossupressor.

[0066] Desse modo, os inventores constataram de modo surpreendente e inesperado que os problemas e limitações observados acima podem ser superados praticando-se a invenção revelada no presente documento. São fornecidos métodos e composições que oferecem soluções aos obstáculos supracitados para uso eficaz dos vetores virais para tratamento.

[0067] A invenção será agora descrita em mais detalhes abaixo.

B. DEFINIÇÕES

[0068] “Agente terapêutico adicional” se refere a qualquer agente

terapêutico que é adicional ao vetor viral e/ou nanocarreadores sintéticos que compreendem um imunossupressor. Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional é um esteroide, tal como um corticosteroide.

[0069] “Administrando” ou “administração” ou “administrar” significa dar ou dispensar um material a um indivíduo de maneira que seja farmacologicamente útil. O termo se destina a incluir “fazer com que seja administrado”. “Fazer com que seja administrado” significa causar, impedir, encorajar, auxiliar, induzir ou direcionar, direta ou indiretamente, outra entidade para administrar o material. Qualquer um dos métodos fornecidos no presente documento pode compreender ou compreender ainda uma etapa de administrar de modo concomitante um vetor de AAV e nanocarreadores sintéticos que compreendem um imunossupressor. Em algumas modalidades, a administração concomitante é realizada repetidamente. Em ainda outras modalidades, a administração concomitante é administração simultânea. “Simultâneo” significa administração ao mesmo tempo ou substancialmente ao mesmo tempo em que um médico consideraria qualquer tempo entre administrações virtualmente nulas ou negligenciáveis como ao impacto no resultado terapêutico desejado. Em algumas modalidades, simultâneo significa que as administrações ocorrem com 5, 4, 3, 2, 1 ou menos minutos.

[0070] “Quantidade eficaz” no contexto de uma composição ou forma de dosagem para administração a um indivíduo conforme determinado no presente documento se refere a uma quantidade da composição ou forma de dosagem que produz um ou mais resultados desejados no indivíduo, por exemplo, a redução ou eliminação de uma resposta imunológica contra um vetor viral ou um produto de expressão do mesmo e/ou expressão de transgene eficaz. A quantidade eficaz pode ser para propósitos *in vitro* ou *in vivo*. Para propósitos *in vivo*, a quantidade pode ser uma que um médico acreditaria poder ter um benefício

clínico para um indivíduo. Em qualquer um dos métodos fornecidos no presente documento, a composição (ou composições) administrada pode estar em qualquer uma das quantidades eficazes conforme determinado no presente documento.

[0071] Quantidades eficazes podem envolver a redução do nível de uma resposta imunológica indesejada, embora em algumas modalidades, envolvam prevenir uma resposta imunológica indesejada totalmente. Quantidades eficazes também podem envolver atrasar a ocorrência de uma resposta imunológica indesejada. Uma quantidade eficaz também pode ser uma quantidade que resulta em um ponto final de teste terapêutico desejado ou um resultado terapêutico desejado. Quantidades eficazes, em algumas modalidades, resultam em uma resposta imunológica tolerogênica em um indivíduo a um antígeno, tais como um antígeno viral do vetor viral e/ou produto expresso. Quantidades eficazes também podem resultar em expressão de transgene aumentada (o transgene que é entregue pelo vetor viral). Isso pode ser determinado medindo-se concentrações de proteína de transgene em vários tecidos ou sistemas de interesse no indivíduo. Essa expressão aumentada pode ser medida de modo localizado ou sistemático. A realização de qualquer um do supracitado pode ser monitorada por métodos de rotina.

[0072] Em algumas modalidades de qualquer uma das composições e métodos fornecidos, a quantidade eficaz é uma na qual a resposta imunológica desejada, tais como a redução ou eliminação de uma resposta imunológica, persiste no indivíduo por pelo menos 1 semana, pelo menos 2 semanas ou pelo menos 1 mês. Em outras modalidades de qualquer uma das composições e métodos fornecidos, a quantidade eficaz é uma que produz uma resposta imunológica desejada mensurável, tais como a redução ou eliminação de uma resposta imunológica. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz é uma que produz uma resposta imunológica desejada mensurável, por pelo menos 1 semana,

pelo menos 2 semanas ou pelo menos 1 mês.

[0073] Quantidades eficazes dependerão, evidentemente, do indivíduo particular que é tratado; a severidade de uma afecção, doença ou distúrbio; os parâmetros de paciente individuais incluindo idade, condição física, tamanho e peso; a duração do tratamento; a natureza de terapia concorrente (se houver); a rota específica de administração e fatores similares dentro do conhecimento e especialidade do profissional de saúde. Esses fatores são conhecidos pelos elementos de habilidade comum na técnica e podem ser abordados com não mais do que experimentação de rotina.

[0074] “Fixar” ou “fixado” ou “Acoplar” ou “Acoplado” (e similares) significa associar quimicamente uma entidade (por exemplo, uma porção química) a outra. Em algumas modalidades, a fixação é covalente, significando que fixação ocorre no contexto da presença de uma ligação covalente entre as duas entidades. Em modalidades não covalentes, a fixação não covalente é mediada por interações não covalentes, incluindo, porém, sem limitação, interações de carga, interações de afinidade, coordenação de metal, adsorção física, interações de hospedeiro e convidado, interações hidrofóbicas, interações de empilhamento TT, interações de ligação de hidrogênio, interações van der Waals, interações magnéticas, interações eletroestáticas, interações dipolo-dipolo, e/ou combinações dos mesmos. Em modalidades, encapsulação é uma forma de fixação.

[0075] “Média”, conforme usado no presente documento, se refere ao meio aritmético a menos que observado de outro modo.

[0076] “Otimizado por códon” se refere à otimização de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma proteína mudando-se códons geralmente sem resultar em uma mudança na sequência de aminoácidos, mas resultando em expressão aumentada ou mais eficiente. Otimização por códon é uma técnica usada para aprimorar a expressão

de proteína de um gene de codificação de proteína, por exemplo, OTC, em um organismo aumentando-se a eficiência transcripcional e translacional do gene. A expressão de proteína diminuída de um gene alvo em um organismo vivo pode ser devido a inúmeros fatores, incluindo, porém, sem limitação: a presença de códons raros, teor de GC, estrutura de mRNA, sequências repetidas, e a presença de sítios de clivagem de enzima de restrição. Diferentes algoritmos de otimização por códon consideram e ponderam esses fatores a níveis variados. Tipicamente, múltiplos algoritmos de otimização por códon diferentes serão usados para uma sequência particular e comparados lado a lado.

[0077] Em algumas modalidades, otimização por códon é realizada para alterar a sequência de códons em uma sequência de ácidos nucleicos, por exemplo, uma sequência de mRNA. Em algumas modalidades, a uma sequência de ácidos nucleicos é alterada sem alterar a sequência de aminoácidos codificada. Códons são 3 blocos pares de base de uma sequência de nucleotídeos em um mRNA que são ligadas por um RNA de transferência complementar (tRNA) durante tradução de RNA em proteína. Em alguns casos, uma sequência de mRNA é alterada para remover um códon raro. Códons raros são complementares a um tRNA que tanto não está presente como está presente em baixos níveis em um organismo no qual o gene alvo é expresso. A presença de códons raros em um gene alvo pode diminuir ou ainda bloquear tradução de proteína. Em algumas modalidades, mudar a sequência de ácidos nucleicos para remover códons raros para um dado organismo sem mudar a sequência de aminoácidos pode aprimorar a expressão de proteína.

[0078] Em alguns casos, uma sequência de ácidos nucleicos, por exemplo, uma sequência de mRNA é alterada para aumentar ou diminuir o teor de GC da sequência de ácidos nucleicos. O teor de guano-

sina/citosina (GC) de uma sequência de ácidos nucleicos é a porcentagem de nucleotídeos na sequência de ácidos nucleicos que são G ou C. Guanosina e citosina são complementares e formam 3 ligações de hidrogênio em nucleotídeos de fita dupla, enquanto adenina e timina ou adenina e uracila somente formam 2 ligações de hidrogênio. Esse aumento do número de ligações de hidrogênio aumenta a estabilidade da molécula de ácido nucleico. Em algumas modalidades, mudar a sequência de ácidos nucleicos para aumentar o teor de GC sem mudar a sequência de aminoácidos pode aprimorar a expressão de proteína. Em algumas modalidades, mudar a sequência de ácidos nucleicos para diminuir o teor de GC sem mudar a sequência de aminoácidos pode aprimorar a expressão de proteína.

[0079] A estrutura de mRNA desempenha uma função crucial em regular a tradução de mRNA em proteína em um organismo. Quando mRNA forma uma estrutura secundária, terciária, ou quaternária, essas estruturas podem tornar os códons inacessíveis à ligação por tRNAs ou ribossomos, inibindo a tradução. Estruturas secundárias e terciárias de mRNAs incluem ciclos de tronco e pseudonós, com estruturas terciárias sendo formas de mRNA tridimensionais mais complexas do que estruturas secundárias. Estruturas quaternárias de mRNAs incluem homodímeros de mRNA-mRNA e heterodímeros de mRNA-mRNA. Em algumas modalidades, mudar a sequência de ácidos nucleicos, por exemplo, uma sequência de mRNA, para diminuir ou evitar a formação de estruturas de mRNA secundárias, terciárias ou quaternárias sem mudar a sequência de aminoácidos pode aprimorar a expressão de proteína.

[0080] Em algumas modalidades, a presença de sequências repetidas em uma sequência de ácidos nucleicos, por exemplo, uma sequência de mRNA, diminui a expressão de proteína inibindo-se a transcrição e tradução do gene alvo. Sequências repetidas diminuem transcrição e

tradução esgotando agrupamentos de nucleotídeo e tRNA disponíveis. Ainda, sequências repetidas também podem diminuir tradução permitindo-se a formação de estruturas secundárias e terciárias de mRNA. Em algumas modalidades, mudar a sequência de ácidos nucleicos para remover ou reduzir sequências repetidas sem mudar a sequência de aminoácidos pode aprimorar a expressão de proteína.

[0081] Em algumas modalidades, a presença de sítios de clivagem de enzima de restrição em uma sequência de ácidos nucleicos, por exemplo, uma sequência de mRNA, diminui a expressão de proteína inibindo-se a transcrição e tradução do ácido nucleico, por exemplo, o mRNA. Enzimas de restrição são proteínas que clivam ácidos nucleicos depois de se ligarem em sequências específicas. Esses ácidos nucleicos clivados podem não ser substratos adequados para transcrição ou tradução. Em algumas modalidades, mudar a sequência de ácidos nucleicos para remover sítios de clivagem de enzima de restrição sem mudar a sequência de aminoácidos aprimora expressão de proteína.

[0082] “De modo concomitante” significa administrar dois ou mais materiais/agentes a um indivíduo em uma maneira que é correlacionada em tempo, preferencialmente correlacionada o suficiente em tempo de modo a fornecer uma modulação em uma resposta imunológica, e com ainda mais preferência os dois ou mais materiais/agentes são administrados em combinação. Em modalidades, administração concomitante pode abranger administração de dois ou mais materiais/agentes dentro de um período de tempo especificado, preferencialmente dentro de 1 mês, com mais preferência dentro de 1 semana, com ainda mais preferência, dentro de 1 dia, e com ainda mais preferência, dentro de 1 hora. Em modalidades, os materiais/agentes podem ser administrados repetidamente de modo concomitante; isto é, a administração concomitante em mais de uma ocasião.

[0083] “Dose” se refere a uma quantidade específica de um material

farmacologicamente e/ou imunologicamente ativo para administração a um indivíduo por um dado tempo. Em geral, doses dos nanocarreadores sintéticos que compreendem um imunossupressor e/ou vetores virais nos métodos e composições da invenção se referem à quantidade dos nanocarreadores sintéticos que compreendem um imunossupressor e/ou vetores virais. Alternativamente, a dose pode ser administrada com base no número de nanocarreadores sintéticos que fornecem a quantidade desejada de um imunossupressor, em casos ao se referir a uma dose de nanocarreadores sintéticos que compreendem um imunossupressor. Quando a dose é usada no contexto de uma dosagem repetida, a dose se refere à quantidade de cada das doses repetidas, que podem ser iguais ou diferentes.

[0084] “Início de doença precoce” se refere ao início da doença em um indivíduo em uma idade que é mais cedo do que a idade média de início de doença ou mais cedo do que a idade esperada do início de doença. Em algumas modalidades, início de doença precoce ocorre na infância. O Início de doença precoce pode ser determinada por um médico.

[0085] “Encapsular” significa encerrar pelo menos uma porção de uma substância dentro de um nanocarreador sintético. Em algumas modalidades, uma substância é encerrada completamente dentro de um nanocarreador sintético. Em outras modalidades, a maior parte ou toda uma substância que é encapsulada não é exposta ao ambiente externo local ao nanocarreador sintético. Em outras modalidades, não mais do que 50%, 40%, 30%, 20%, 10% ou 5% (peso/peso) é exposto ao ambiente local. Encapsulação é distinta de absorção, que coloca a maior parte ou toda uma substância em uma superfície de um nanocarreador sintético, e deixa a substância exposta ao ambiente externo local ao nanocarreador sintético.

[0086] “Sequências de controle de expressão” são quaisquer sequências que pode afetar a expressão e podem incluir promotores, intensificadores e operadores. Em uma modalidade de qualquer um dos métodos ou composições fornecidas, a sequência de controle de expressão é um promotor. Em uma modalidade de qualquer um dos métodos ou composições fornecidas, a sequência de controle de expressão é um promotor específico de fígado. “Promotores específicos de fígado” são aqueles que resultam exclusiva ou preferencialmente em expressão em células do fígado.

[0087] “Identidade” significa a porcentagem de aminoácido ou resíduos ou bases de ácido nucleico que são posicionados de modo idêntico em um alinhamento de sequência unidimensional. Identidade é uma medida de quão próximo as sequências que são comparadas são relacionadas. Em uma modalidade, a identidade entre duas sequências pode ser determinada com uso do programa BESTFIT. Ainda, a porcentagem de identidade também pode ser calculada com uso de várias, ferramentas de software publicamente disponíveis desenvolvidas por NCBI (Bethesda, Maryland) que podem ser obtidas através da internet (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/>). Ferramentas exemplificadoras incluem o sistema BLAST disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Alinhamentos Pairwise e ClustalW (configuração de matriz BLOSUM30) assim como análise hidropática Kyte-Doolittle podem ser obtidos com uso do software de análise de sequência MacVector (Oxford Molecular Group). Complementos de Watson-Crick (incluindo complementos de comprimento total) dos ácidos nucleicos precedentes também são abrangidos pela invenção. “Imunossupressor” significa um composto que pode causar um efeito tolerogênico, preferencialmente através de seus efeitos em APCs. Um efeito tolerogênico geralmente se refere à modulação pelo APC ou outras células imunes de modo sistemático e/ou localizado, que reduz, inibe ou previne uma resposta imunológica indesejada a um

antígeno de modo durável. Em uma modalidade, o imunossupressor faz com que uma APC promova um fenótipo regulador em uma ou mais células efetoras imunológicas. Por exemplo, o fenótipo regulador pode ser caracterizado pela inibição da produção, indução, estímulo ou recrutamento de CD4+ células T ou células B específicas de antígeno, a inibição da produção de anticorpos específicos de antígeno, a produção, indução, estímulo ou recrutamento de células Treg (por exemplo, CD4+CD25^{high}FoxP3+ células Treg), etc. Esse pode ser o resultado da conversão de CD4+ células T ou células B em um fenótipo regulador. Esse também pode ser o resultado de indução de FoxP3 em outras células imunes, tais como CD8+ células T, macrófagos e células iNKT. Em uma modalidade, o imunossupressor é um que afeta a resposta da APC após processar um antígeno. Em outra modalidade, o imunossupressor não é um que interfere com o processamento do antígeno. Em uma modalidade adicional, o imunossupressor não é uma molécula sinalizadora apoptótica. Em outra modalidade, o imunossupressor não é um fosfolípido.

[0088] Os imunossupressores incluem, mas sem limitação, estatinas; inibidores de mTOR, como rapamicina ou um análogo de rapamicina (isto é, rapalogos); agentes sinalizadores de TGF- β ; agonistas de receptor de TGF- β ; inibidores de acetilase de histona, como Tricostatina A; corticosteroides; inibidores de função mitocondrial, como rotenona; inibidores de P38; inibidores de NF- κ B, como 6Bio, Dexametasona, TCPA-1, IKK VII; agonistas de receptor de adenosina; agonistas de prostaglandina E2 (PGE2), como Misoprostol; inibidores de fosfodiesterase, como inibidor de fosfodiesterase 4 (PDE4), como Rolipram; inibidores de proteassoma; inibidores de cinase; agonistas de receptor acoplados à proteína G; antagonistas de receptor acoplados à proteína G; glicocorticoides; retinoides; inibidores de citocina; inibidores de receptor de citocina; ativadores de receptor de citocina; antagonistas de

receptor ativados por proliferador de peroxissoma; agonistas de receptor ativados por proliferador de peroxissomo; inibidores de acetilase de histona; inibidores de calcineurina; inibidores de fosfatase; inibidores de PI3KB, como TGX-221; inibidores de autofagia, como 3-metiladenina; inibidores de receptor de hidrocarboneto de arila; inibidor de proteossoma I (PSI); e ATPs oxidadas, como bloqueadores de receptor de P2X. Os imunossupressores também incluem IDO, vitamina D3, ácido retinóico, ciclosporinas, como ciclosporina A, inibidores de receptor de hidrocarboneto de arila, resveratrol, azatiopurina (Aza), 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), FK506, sangliferina A, salmeterol, micofenolato mofetil (MMF), aspirina e outros inibidores de COX, ácido niflúmico, estriol e triptolida. Outros imunossupressores exemplificadores incluem, porém, sem limitação, fármacos de molécula pequena, produtos naturais, anticorpos (por exemplo, anticorpos contra CD20, CD3, CD4), fármacos de base biológica, fármacos de base biológica, RNAi, ácidos nucleicos antissenso, aptâmeros, metotrexato, NSAIDs; fingolimod; natalizumab; alemtuzumab; anti-CD3; tacrolimo (FK506), abatacept, belatacept, etc. “Rapalogo”, conforme usado no presente documento, se refere a uma molécula que é estruturalmente relacionada a (um análogo) de rapamicina (sirolimo). Exemplos de rapalogos incluem, sem limitação, temsirolimo (CCI-779), everolimo (RAD001), ridaforolimo (AP-23573), e zotarolimo (ABT-578). Exemplos adicionais de rapalogos podem ser encontrados, por exemplo, na Publicação WO 1998/002441 e Patente nº U.S. 8.455.510, cujos rapalogos são incorporados no presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0089] O imunossupressor pode ser um composto que fornece diretamente o efeito tolerogênico em APCs ou pode ser um composto que fornece o efeito tolerogênico indiretamente (isto é, após ser processado em algum modo após administração). Imunossupressores adicionais, são conhecidos pelos elementos versados na técnica, e a invenção não

é limitada em relação a isso. Em modalidades, o imunossupressor pode compreender qualquer um dos agentes fornecidos no presente documento.

[0090] “Carga”, quando acoplada a um nanocarreador sintético, é a quantidade do imunossupressor acoplado ao nanocarreador sintético com base no peso de receita seco total de materiais em um nanocarreador sintético inteiro (peso/peso). Em geral, tal carga é calculada como uma média através de uma população de nanocarreadores sintéticos. Em uma modalidade, a carga em média através dos nanocarreadores sintéticos é entre 0,1% e 99%. Em outra modalidade, a carga é entre 0,1% e 50%. Em outra modalidade, a carga é entre 0,1% e 20%. Em uma modalidade adicional, a carga é entre 0,1% e 10%. Em ainda mais uma modalidade, a carga é entre 1% e 10%. Em ainda mais uma modalidade, a carga é entre 7% e 20%. Em ainda outra modalidade, a carga é pelo menos 0,1%, pelo menos 0,2%, pelo menos 0,3%, pelo menos 0,4%, pelo menos 0,5%, pelo menos 0,6%, pelo menos 0,7%, pelo menos 0,8%, pelo menos 0,9%, pelo menos 1%, pelo menos 2%, pelo menos 3%, pelo menos 4%, pelo menos 5%, pelo menos 6%, pelo menos pelo menos 7%, pelo menos 8%, pelo menos 9%, pelo menos 10%, pelo menos 11%, pelo menos 12%, pelo menos 13%, pelo menos 14%, pelo menos 15%, pelo menos 16%, pelo menos 17%, pelo menos 18%, pelo menos 19%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% em média através da população de nanocarreadores sintéticos. Em ainda mais uma modalidade, a carga é 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% em média através da população de nanocarreadores sintéticos. Em algumas modalidades

das modalidades acima, a carga é não mais do que 25% em média através de uma população de nanocarreadores sintéticos. Em modalidades, a carga é calculada conforme pode ser descrito nos Exemplos ou conforme conhecido de outro modo na técnica.

[0091] “Dimensão máxima de um nanocarreador sintético” significa a maior dimensão de um nanocarreador medida ao longo de qualquer eixo geométrico do nanocarreador sintético. “Dimensão mínima de um nanocarreador sintético” significa a menor dimensão de um nanocarreador sintético medida ao longo de qualquer eixo geométrico do nanocarreador sintético. Por exemplo, para um nanocarreador sintético esférico, a dimensão máxima e mínima de um nanocarreador sintético seriam substancialmente idênticas, e seriam o tamanho de seu diâmetro. De modo similar, para um nanocarreador sintético cuboidal, a dimensão mínima de um nanocarreador sintético seria a menor dentre sua altura, largura ou comprimento, enquanto a dimensão máxima de um nanocarreador sintético seria a maior dentre sua altura, largura ou comprimento. Em uma modalidade, uma dimensão mínima de pelo menos 75%, preferencialmente, pelo menos 80%, com mais preferência, pelo menos 90%, dos nanocarreadores sintéticos em uma amostra, com base no número total de nanocarreadores sintéticos na amostra, é igual ou maior do que 100 nm. Em uma modalidade, uma dimensão máxima de pelo menos 75%, preferencialmente, pelo menos 80%, com mais preferência, pelo menos 90%, dos nanocarreadores sintéticos em uma amostra, com base no número total de nanocarreadores sintéticos na amostra, é igual ou menor do que 5 μ m. Preferencialmente, uma dimensão mínima de pelo menos 75%, preferencialmente, pelo menos 80%, com mais preferência, pelo menos 90%, dos nanocarreadores sintéticos em uma amostra, com base no número total de nanocarreadores sintéticos na amostra, é maior do que 110 nm, com mais preferência maior do que

120 nm, com mais preferência, maior do que 130 nm, e com mais preferência, ainda maior do que 150 nm. Razões de aspecto das dimensões máxima e mínima de nanocarreadores sintéticos podem variar dependendo da modalidade. Por exemplo, razões de aspecto das dimensões máxima a mínima dos nanocarreadores sintéticos podem variar de 1:1 a 1.000.000:1, preferencialmente, de 1:1 a 100.000:1, com mais preferência, de 1:1 a 10.000:1, com mais preferência, de 1:1 a 1.000:1, com ainda mais preferência, de 1:1 a 100:1, e com ainda mais preferência, de 1:1 a 10:1.

[0092] Preferencialmente, uma dimensão máxima de pelo menos 75%, preferencialmente, pelo menos 80%, com mais preferência, pelo menos 90%, dos nanocarreadores sintéticos em uma amostra, com base no número total de nanocarreadores sintéticos na amostra é igual ou menor do que 3 μm , com mais preferência, igual ou menor do que 2 μm , com mais preferência igual ou menor do que 1 μm , com mais preferência, igual ou menor do que 800 nm, com mais preferência, igual ou menor do que 600 nm, e com mais preferência, ainda igual ou menor do que 500 nm. Em modalidades preferenciais, uma dimensão mínima de pelo menos 75%, preferencialmente, pelo menos 80%, com mais preferência, pelo menos 90%, dos nanocarreadores sintéticos em uma amostra, com base no número total de nanocarreadores sintéticos na amostra, é igual ou maior do que 100 nm, com mais preferência igual ou maior do que 120 nm, com mais preferência igual ou maior do que 130 nm, com mais preferência igual ou maior do que 140 nm, e com mais preferência ainda igual ou maior do que 150 nm. A medição de dimensões de nanocarreador sintético (por exemplo, diâmetro eficaz) pode ser obtida, em algumas modalidades, suspendendo-se os nanocarreadores sintéticos em um meio líquido (geralmente aquoso) e com uso de difusão de luz dinâmica (DLS) (por exemplo, com uso de um instrumento

Brookhaven ZetaPALS). Por exemplo, uma suspensão de nanocarreadores sintéticos pode ser diluída a partir de um tampão aquoso em água purificada para alcançar uma concentração de suspensão de nanocarreador sintético final de aproximadamente 0,01 a 0,1 mg/ml. A suspensão diluída pode ser preparada diretamente no interior, ou transferida para uma cuveta adequada para análise de DLS. A cuveta pode ser então colocada na DLS, permitida a equilibrar à temperatura controlada, e então lida por tempo suficiente para adquirir uma distribuição estável e reproduzível com base em entradas apropriadas para viscosidade dos índices médios e refrativos da amostra. O diâmetro eficaz, ou média da distribuição, é então relatado. Determinar os tamanhos eficazes de alta razão de aspecto, ou Nanocarreadores sintéticos não esféricos podem exigir técnicas aumentativas, tais como microscopia de elétron, para obter medições mais precisas. “Dimensão” ou “tamanho” ou “diâmetro” de nanocarreadores sintéticos significa a média de uma distribuição de tamanho de partícula, por exemplo, obtida com uso de difusão de luz dinâmica.

[0093] “Excipiente farmacologicamente aceitável” ou “carreador farmacologicamente aceitável” significa um material farmacologicamente inativo usada em conjunto com um material farmacologicamente ativo para formular as composições. Excipientes farmacologicamente aceitáveis compreendem uma variedade de materiais conhecidas na técnica, incluindo, porém, sem limitação, sacarídeos (tais como glucose, lactose e similares), conservantes, tais como agentes antimicrobianos, auxiliares de reconstituição, colorantes, salino (tal como salino tamponado com fosfato), e tampões.

[0094] “Polinucleotídeo (ou polinucleotídeos)” ou “sequência de ácidos nucleicos (ou sequências de ácidos nucleicos)” ou “ácido nucleico (ou ácidos nucleicos)” são usados de modo intercambiável no presente

documento e pode ser, por exemplo, DNA, RNA (tais como, por exemplo, mRNA) ou cDNA. Os vetores de AAV e transgenes descritos no presente documento compreendem polinucleotídeos. Em algumas modalidades, os polinucleotídeos codificam o transgene, por exemplo, OTC.

[0095] Em modalidades, as composições inventivas compreendem um complemento, tal como um complemento de comprimento total, ou um degenerado (devido à degeneracidade do código genético) que codifica qualquer um dos polipeptídeos da presente invenção.

[0096] São também fornecidos no presente documento polinucleotídeos que hibridizam para qualquer um dos polinucleotídeos da presente invenção. Procedimentos de hibridização de ácido nucleico padrão podem ser usados para identificar sequências de ácidos nucleicos relacionadas de porcentagem de identidade selecionada. O termo “condições rigorosas” conforme usado no presente documento se refere a parâmetros com os quais a técnica é familiar. Tais parâmetros incluem sal, temperatura, comprimento da sonda, etc. A quantidade de incompatibilidade de base resultante mediante hibridização pode variar de quase 0% (“alta rigorosidade”) a cerca de 30% (“baixa rigorosidade”). Um exemplo de condições de alta rigorosidade é hibridização a 65 °C em tampão de hibridização (3,5X SSC, Ficoll a 0,02%, polivinil pirrolidona a 0,02%, Albumina de Soro Bovino a 0,02%, 2,5 mM de NaH₂PO₄(pH7), SDS a 0,5%, 2 mM de EDTA). SSC é 0,15M de cloreto de sódio/0,015M de citrato de sódio, pH7; SDS é sulfato de dodecila de sódio; e EDTA é ácido etilenodiaminetetracético. Após hibridização, uma membrana mediante a qual o ácido nucleico é transferido é lavada, por exemplo, em 2X SSC em temperatura ambiente e então em 0,1 a 0,5X SSC/0,1X SDS em temperaturas de até 68 °C.

[0097] “Dose repetida” ou “dosagem repetida” ou similares significa pelo menos uma dose ou dosagem adicional que é administrada a um

indivíduo subsequente a uma dose ou dosagem precoce do mesmo material. Por exemplo, uma dose repetida de um vetor viral é pelo menos uma dose adicional do vetor viral após uma dose anterior do mesmo material. Embora o material possa ser o mesmo, a quantidade do material na dose repetida pode ser diferente da dose precoce. Por exemplo, em uma modalidade de qualquer um dos métodos ou composições fornecidas no presente documento, a quantidade do vetor viral na dose repetida pode ser menor do que a quantidade do vetor viral da dose precoce. Alternativamente, em uma modalidade de qualquer um dos métodos ou composições fornecidas no presente documento, a dose repetida pode estar em uma quantidade que é pelo menos igual à quantidade do vetor viral na dose precoce. A dose repetida pode ser administrada em semanas, meses ou anos após a dose anterior. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos no presente documento, a dose ou dosagem repetida é administrada pelo menos 1 semana após a dose ou dosagem que ocorreu logo antes da dose ou dosagem repetida. Dosagem repetida é considerada como eficaz se a mesma resultar em um efeito benéfico para o indivíduo. Preferencialmente, dosagem repetida eficaz resulta em um efeito benéfico em conjunto com resposta imunológica reduzida, tal como ao vetor viral.

[0098] Uma “quantidade reduzida” se refere a um dose de um agente terapêutico que é menor do que a quantidade de do agente terapêutico que foi administrado, tais como em uma administração anterior, a um indivíduo ou que seria selecionado para administração ao indivíduo sem a administração concomitante de um vetor de AAV e nanocarreadores sintéticos que compreendem um imunossupressor conforme determinado no presente documento. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos no presente documento, o método pode compreender ou compreender ainda uma etapa de selecionar uma quantidade reduzida de um agente terapêutico conforme descrito

no presente documento. “Selecionar” se destina a incluir “causar a seleção”. “Causar a seleção” significa causar, impulsionar, encorajar, auxiliar, induzir ou direcionar ou atuar na coordenação com uma entidade para que a entidade selecione a quantidade reduzida supracitada.

[0099] “Indivíduo” significa animais, incluindo mamíferos de sangue quente, tais como humanos e primatas; aves; animais domésticos ou de fazenda, tais como gatos, cães, ovelhas, cabras, bezerros, cavalos e porcos; animais de laboratório, tais como camundongos, ratos e porquinhos-da-Índia; peixes; répteis; animais de zoológico ou selvagens; e similares. Conforme usado no presente documento, um indivíduo pode ser estar em necessidade de qualquer um dos métodos ou composições fornecidas no presente documento. Em algumas modalidades, um indivíduo tem ou tem suspeitas de ter um UCD, por exemplo, OTCd. Em algumas modalidades, um indivíduo está em risco de desenvolver um UCD, por exemplo, OTCd. Em algumas modalidades, o indivíduo é um indivíduo pediátrico ou jovem, por exemplo, é menor do que 18, menor do que 16, menor do que 15, menor do que 14, menor do que 13, menor do que 12, menor do que 11, menor do que 10, menor do que 9, menor do que 8, menor do que 7, menor do que 6, menor do que 5, menor do que 4, menor do que 3 anos de idade, ou menor do que 2 anos de idade. Em algumas modalidades, o indivíduo tem 1 a 10 anos de idade. Em algumas modalidades, o indivíduo é um indivíduo adulto.

[00100] “Nanocarreador sintético (ou nanocarreadores sintéticos)” significa um objeto distinto que não é encontrado na natureza, e que tem pelo menos uma dimensão que é menor ou igual a 5 microns de tamanho. Nanopartículas de albumina são geralmente incluídos como nanocarreadores sintéticos; no entanto, em determinadas modalidades os nanocarreadores sintéticos não compreendem nanopartículas de albumina. Em modalidades, nanocarreadores sintéticos não compreendem quitosana. Em outras modalidades, nanocarreadores sintéticos não são

nanopartículas à base de lipídio. Em modalidades adicionais, nanocarreadores sintéticos não compreendem um fosfolipídio.

[00101] Um nanocarreador sintético pode ser, porém, sem limitação, uma ou uma pluralidade de nanopartículas à base de lipídio (também denominadas no presente documento como nanopartículas de lipídio, isto é, nanopartículas em que a maior parte do material que compõe sua estrutura são lipídios), nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, emulsões à base de tensoativo, dendrímero, buckyballs, nanofios, partículas similares a vírus (isto é, partículas que são principalmente feitas de proteínas estruturais virais, mas que não são infecciosas ou têm baixa capacidade de infecção), partículas parciais à base de peptídeo ou proteína (também denominadas no presente documento como partículas de proteína, isto é, partículas em que a maior parte do material que compõe sua estrutura são peptídeos ou proteínas) (tais como nanopartículas de albumina) e/ou nanopartículas que são desenvolvidas com uso de uma combinação de nanomateriais tais como nanopartículas de polímero lipídico. Nanocarreadores sintéticos podem ser uma variedade de diferentes formatos, incluindo, porém, sem limitação, esferoidal, cuboidal, piramidal, oblongo, cilíndrico, toroidal e similares. Nanocarreadores sintéticos de acordo com a invenção compreendem uma ou mais superfícies. Nanocarreadores sintéticos exemplificadores que podem ser adaptados para uso na prática da presente invenção compreendem: (1) as nanopartículas biodegradáveis reveladas na Patente nº U.S. 5.543.158 por Gref et al., (2) as nanopartículas poliméricas do Pedido de Patente Publicado nº U.S. 20060002852 por Saltzman et al., (3) as nanopartículas construídas de modo litográfico do Pedido de Patente Publicado nº U.S. 20090028910 por DeSimone et al., (4) a descrição de WO 2009/051837 por von Andrian et al., (5) as nanopartículas reveladas por Pedido de Patente Publicado nº U.S.

2008/0145441 por Penades et al., (6) as nanopartículas de proteína reveladas no Pedido de Patente Publicado nº U.S. 20090226525 por de los Rios et al., (7) as partículas similares a vírus reveladas no Pedido de Patente publicado nº U.S. 20060222652 por Sebbel et al., (8) o partículas similares a vírus fixadas a ácido nucleico reveladas no Pedido de Patente publicado nº U.S. 20060251677 por Bachmann et al., (9) as partículas similares a vírus reveladas no documento nº WO2010047839A1 ou nº WO2009106999A2, (10) as nanopartículas nanoprecipitadas reveladas em P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" *Nanomedicine*. 5(6):843-853 (2010), (11) células apoptóticas, corpos apoptóticos ou a simulação sintética ou semissintética revelada na Publicação nº U.S. 2002/0086049, ou (12) aquelas de Look et al., "Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice" *J. Clinical Investigation* 123(4):1741-1749(2013).

[00102] Nanocarreadores sintéticos de acordo com a invenção que têm uma dimensão mínima de igual ou menor do que cerca de 100 nm, preferencialmente igual ou menor do que 100 nm, não compreendem uma superfície com grupos hidroxila que ativam complemento ou compreendem alternativamente uma superfície que consiste essencialmente em porções químicas que não são grupos hidroxila que ativam complemento. Em uma modalidade preferencial, nanocarreadores sintéticos de acordo com a invenção que têm uma dimensão mínima de igual ou menor do que cerca de 100 nm, preferencialmente igual ou menor do que 100 nm, não compreendem uma superfície que ativa substancialmente complemento ou compreendem alternativamente uma superfície que consiste essencialmente em porções químicas que não ativam substancialmente o complemento. Em uma modalidade mais preferencial, nanocarreadores sintéticos de acordo com a invenção que têm

uma dimensão mínima de igual ou menor do que cerca de 100 nm, preferencialmente igual ou menor do que 100 nm, não compreendem uma superfície que ativa complemento ou alternativamente compreendem uma superfície que consiste essencialmente em porções químicas que não ativa complemento. Em modalidades, nanocarreadores sintéticos excluem partículas similares a vírus. Em modalidades, nanocarreadores sintéticos podem ter uma razão de aspecto maior do que 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, ou maior do que 1:10.

[00103] “Distúrbio de ciclo de Ureia” se refere a qualquer distúrbio ou defeito pelo qual há uma deficiência de uma enzima do ciclo de ureia. Em geral, isso é causado por uma mutação que resulta em tal deficiência em um indivíduo. Desse modo, uma “enzima associada ao distúrbio de ciclo de ureia” é uma enzima na qual há uma deficiência que resulta no distúrbio no indivíduo.

[00104] “Vetor viral” significa um construto de vetor com componentes virais, tais como cápside e/ou proteínas de revestimento, que foi adaptado para compreender e entregar um transgene ou material de ácido nucleico que codifica agente, tal como uma proteína terapêutica, que transgene ou material de ácido nucleico pode ser expresso conforme determinado no presente documento. “Expresso” ou “expressão” ou similares se refere à síntese de um produto funcional (isto é, fisiologicamente ativo para o propósito desejado) depois que o transgene ou material de ácido nucleico é transduzido em uma célula e processada pela célula transduzida. Tal produto é também denominado no presente documento como um “produto de expressão”. Vetores virais podem ser baseados em, sem limitação, vírus adenoassociados, tal como AAV8. Desse modo, um vetor de AAV fornecido no presente documento é um vetor viral com base em um AAV, tal como AAV8, e tem componentes virais, tais como um cápside e/ou proteína de revestimento, dos mesmos que podem acondicionar para entrega o transgene ou material de

ácido nucleico.

C. COMPOSIÇÕES PARA USO NOS MÉTODOS INVENTIVOS

[00105] Conforme mencionado acima, não há tratamento definitivo para o UCD mais comum, deficiência de ornitina transcarbamilase (OTCd), além de transplante de fígado, um procedimento invasivo limitado por disponibilidade de órgão e tratamento de imunossupressão de vida longa. Adicionalmente, também conforme mencionado acima, respostas imunes, tais como respostas imunes humorais e celulares, contra um vetor viral pode afetar de modo adverso sua eficácia e também pode interferir com sua readministração. De modo importante, os métodos e composições fornecidas no presente documento foram constatados para superar os obstáculos supracitados alcançando-se forte expressão de OTC e/ou reduzir respostas imunes a vetores virais que codificam OTC, tais como codificados por uma sequência otimizada por códon.

TRANSGENES

[00106] O transgene ou material de ácido nucleico, tal como dos vetores virais, fornecidos no presente documento pode codificar qualquer proteína ou porção da mesma benéfica a um indivíduo, tal como uma com uma doença ou distúrbio. De modo geral, o indivíduo tem ou tem suspeitas de ter uma doença ou distúrbio pelo qual a versão endógena do indivíduo da proteína é defeituosa ou produzida em quantidades limitadas ou de forma alguma. O indivíduo pode ser uma com qualquer uma das doenças ou distúrbios conforme determinado no presente documento, e o transgene ou material de ácido nucleico é um que codifica qualquer uma das proteínas terapêuticas ou porção das mesmas conforme determinado no presente documento. Em algumas modalidades, o transgene pode ser otimizado por códon. O transgene ou material de ácido nucleico fornecido no presente documento pode codificar uma versão funcional de qualquer proteína que, através de algum defeito na

versão endógena da qual em um indivíduo (que inclui um defeito na expressão da versão endógena) resulta em uma doença ou distúrbio no indivíduo. Exemplos de tais doenças ou distúrbios incluem, porém, sem limitação, defeitos de ciclo de ureia enzima, tais como deficiência de ornitina transcarbamilase sintetase (OTCd). Por conseguinte, proteínas terapêuticas codificadas pelo transgene ou material de ácido nucleico inclui ornitina transcarbamilase sintetase (OTC).

[00107] A sequência de um transgene ou material de ácido nucleico também pode incluir uma sequência de controle de expressão. Sequências de controle de expressão incluem promotores, intensificadores, e operadores, e são geralmente selecionados com base nos sistemas de expressão nos quais o construto de expressão deve ser utilizado. Em algumas modalidades, sequências de promotor de intensificador são selecionadas para a capacidade de aumentar expressão de gene, enquanto sequências de operadores podem ser selecionadas para a capacidade de regular expressão de gene. O transgene também pode incluir sequências que facilitam, e preferencialmente promovem, recombinação homóloga em uma célula hospedeira. O transgene também pode incluir sequências que são necessárias para replicação em uma célula hospedeira.

[00108] Sequências de controle de expressão exemplificadoras incluem sequências de promotores específicas de fígado, tais como qualquer uma que pode ser fornecida no presente documento. De modo geral, promotores são ligadas de modo operativo a montante (isto é, 5') da codificação de sequência para um produto de expressão desejado. O transgene também pode incluir uma sequência de poliadenilação adequada ligada de modo operativo a jusante (isto é, 3') da sequência de codificação.

[00109] Sequências de transgene exemplificadoras contempladas por esta descrição são apresentadas na Tabela 1, seguindo a seção de

Exemplos. Em algumas modalidades, a sequência de transgenes pode ser idêntica a uma ou mais das sequências nucleicas na Tabela 1. A sequência de transgenes em algumas modalidades de CO3 ou CO21 conforme determinado no presente documento.

[00110] Em algumas modalidades, a sequência de transgenes é uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade a qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:1 a 13 (Tabela 1). Polinucleotídeos que codificam esses polipeptídeos são também contemplados como parte de modalidades da presente invenção. Em algumas modalidades, a sequência de transgenes é 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntica a uma ou mais das sequências de transgenes fornecidas no presente documento, tais como as de CO3 ou CO21.

[00111] Em algumas modalidades, a sequência de transgenes codifica um polipeptídeo que é idêntico a uma ou mais das sequências de aminoácidos na Tabela 1, por exemplo, SEQ ID NOS. 14 a 25. Em algumas modalidades, a sequência de transgenes codifica uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, ou pelo menos 99% de identidade a qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 a 25 (Tabela 1).

[00112] Ácidos nucleicos que compreendem qualquer uma das sequências fornecidas no presente documento, ou uma porção da mesma que codifica um OTC, é fornecida em um aspecto. Composições de tais ácidos nucleicos são também fornecidas.

VETORES VIRAIS

[00113] Vírus desenvolveram mecanismos especializados para

transportar seus genomas dentro das células que os mesmos infectam; vetores virais com base em tais vírus podem ser adaptados para transduzir células às aplicações específicas. Exemplos de vetores virais que podem ser usados conforme determinado no presente documento são conhecidos na técnica ou descritos no presente documento. Vetores virais adequados incluem, por exemplo, vetores à base de vírus adeno-associado (AAV).

[00114] Os vetores virais fornecidos no presente documento podem ser baseados em vírus adenoassociado (AAVs). Vetores de AAV foram de interesse particular para uso em aplicações terapêuticas tais como aquelas descritas no presente documento. AAV é um vírus de DNA, que não conhecido por causar doença humana. De modo geral, AAV exige coinfeção com um vírus auxiliar (por exemplo, um adenovírus ou um vírus de herpes), ou expressão de genes auxiliares, para replicação eficaz. Para uma descrição de vetores à base de AAV, consultar, por exemplo, os documentos de Patente nº U.S. 8.679.837, nº U.S. 8.637.255, nº U.S. 8.409.842, 7.803.622, e 7.790.449, e Publicações nº U.S. 20150065562, nº U.S. 20140155469, nº U.S. 20140037585, nº U.S. 20130096182, nº U.S. 20120100606, e nº U.S. 20070036757. Os vetores de AAV podem ser vetores de AAV recombinantes. Os vetores de AAV também podem ser vetores autocomplementares (sc) de AAV, que são descritos, por exemplo, em Publicações de Patente nº U.S. 2007/01110724 e 2004/0029106, e documentos de Patente nº U.S. 7.465.583 e nº U.S. 7.186.699.

[00115] O vírus adenoassociado no qual um vetor viral é baseado pode ser de um serotipo específico, tal como AAV8. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos ou composições fornecidas no presente documento, portanto, o vetor de AAV é um vetor de AAV8.

NANOCARREADORES SINTÉTICOS QUE COMPREENDEM UM IMUNOSSUPRESSOR

[00116] Os vetores virais fornecidos no presente documento podem ser administrados em combinação com nanocarreadores sintéticos que compreendem um imunossupressor. Em geral, o imunossupressor é um elemento que está em adição ao material que compõe a estrutura do nanocarreador sintético. Por exemplo, em uma modalidade, em que o nanocarreador sintético é feito de um ou mais polímeros, o imunossupressor é um composto que está em adição e, em algumas modalidades, é fixado ao um ou mais polímeros. Em modalidades, como em que o material do nanocarreador sintético também resulta em um efeito tolerogênico, o imunossupressor é um elemento presente na adição ao material do nanocarreador sintético que resulta em um efeito tolerogênico.

[00117] Uma ampla variedade de outros nanocarreadores sintéticos pode ser usada de acordo com a invenção e, em algumas modalidades, acoplada a um imunossupressor. Em algumas modalidades, nanocarreadores sintéticos são esferas ou esferoides. Em algumas modalidades, nanocarreadores sintéticos são planos ou tem formato de placa. Em algumas modalidades, nanocarreadores sintéticos são cubos ou cúbicos. Em algumas modalidades, nanocarreadores sintéticos são ovais ou elipses. Em algumas modalidades, nanocarreadores sintéticos são cilindros, cones ou pirâmides.

[00118] Em algumas modalidades, é desejável usar uma população de nanocarreadores sintéticos que é relativamente uniforme em termos de tamanho ou formato de modo que cada nanocarreador sintético tenha propriedades similares. Por exemplo, pelo menos 80%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% dos nanocarreadores sintéticos de qualquer uma das composições ou métodos fornecidos, com base no número total de nanocarreadores sintéticos, pode ter uma dimensão mínima ou dimensão máxima que está dentro de 5%, 10%, ou 20% do diâmetro médio ou dimensão média dos nanocarreadores sintéticos.

[00119] Nanocarreadores sintéticos podem ser sólidos ou ocos e podem compreender uma ou mais camadas. Em algumas modalidades, cada camada tem uma composição exclusiva e propriedades exclusivas relativas à outra camada (ou camadas). Para gerar mais um exemplo, nanocarreadores sintéticos podem ter uma estrutura de núcleo/carcaça, em que o núcleo é uma camada (por exemplo, um núcleo polimérico) e a carcaça é uma segunda camada (por exemplo, uma bicamada ou monocamada de lipídio). Nanocarreadores sintéticos podem compreender uma pluralidade de diferentes camadas.

[00120] Em algumas modalidades, nanocarreadores sintéticos podem compreender opcionalmente um ou mais lipídios. Em algumas modalidades, um nanocarreador sintético pode compreender um lipossoma. Em algumas modalidades, um nanocarreador sintético pode compreender uma bicamada lipídica. Em algumas modalidades, um nanocarreador sintético pode compreender uma monocamada lipídica. Em algumas modalidades, um nanocarreador sintético pode compreender uma micela. Em algumas modalidades, um nanocarreador sintético pode compreender um núcleo que compreende uma matriz polimérica circundada por uma camada lipídica (por exemplo, bicamada lipídica, monocamada lipídica, etc.). Em algumas modalidades, um nanocarreador sintético pode compreender um núcleo não polimérico (por exemplo, partícula de metal, ponto quântico, partícula de cerâmica, partícula óssea, partícula viral, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos, etc.) circundado por uma camada lipídica (por exemplo, bicamada lipídica, monocamada lipídica, etc.).

[00121] Em outras modalidades, nanocarreadores sintéticos podem compreender partículas de metal, pontos quânticos, partículas de cerâmica, etc. Em algumas modalidades, um nanocarreador sintético não polimérico é um agregado de componentes não poliméricos, tais como um agregado de átomos de metal (por exemplo, átomos de ouro).

[00122] Em algumas modalidades, nanocarreadores sintéticos podem compreender opcionalmente uma ou mais entidades anfifílicas. Em algumas modalidades, uma entidade anfifílica pode promover a produção de nanocarreadores sintéticos com estabilidade aumentada, uniformidade aprimorada ou viscosidade aumentada. Em algumas modalidades, entidades anfifílicas podem ser associadas à superfície interior de uma membrana lipídica (por exemplo, bicamada lipídica, monocamada lipídica, etc.). Muitas entidades anfifílicas conhecidas na técnica são adequadas para uso em produzir nanocarreadores sintéticos de acordo com a presente invenção. Tais entidades anfifílicas incluem, porém, sem limitação, fosfoglicerídeos; fosfatidilcolinas; fosfatidilcolina de dipalmitoila (DPPC); etanolamina de dioleilfosfatidila (DOPE); dioleiloxipropiltrimetilamônio (DOTMA); dioleoilfosfatidilcolina; colesterol; éster de colesterol; diacilglicerol; diacilglicerolsuccinato; difosfatidila glicerol (DPPG); hexanedecanol; álcoois graxos tais como polietileno glicol (PEG); polioxietileno-9-lauril éter; um ácido graxo ativo por superfície, tal como ácido palmítico ou ácido oleico; ácidos graxos; monoglicerídeos de ácido graxo; diglicerídeos de ácido graxo; amidas de ácido graxo; trioleato sorbitano (Span®85) glicolato; monolaurato sorbitano (Span®20); polissorbato 20 (Tween®20); polissorbato 60 (Tween®60); polissorbato 65 (Tween®65); polissorbato 80 (Tween®80); polissorbato 85 (Tween®85); monostearato de polioxietileno; surfactina; um poloxômero; um éster de ácido graxo sorbitano, tal como trioleato sorbitano; lecitina; lisolecitina; fosfatidilserina; fosfatidilinositol; esfingomielina; fosfatidiletanolamina (cefalina); cardiolipina; ácido fosfatídico; cerebrosídeos; dicetilfosfato; dipalmitoilfosfatidilglicerol; estearilamina; dodecilamina; hexadecil-amina; palmitato de acetila; ricinoleato de glicerol; estearato de hexadecila; miristato de isopropila; tiloxapol; poli(etileno glicol)5000-fosfatidiletanolamina; poli(etileno glicol)400-monostearato;

fosfolipídios; detergentes sintéticos e/ou naturais que tem altas propriedades de tensoativo; deoxicolatos; ciclodextrinas; sais caotrópicos; agentes de pareamento de íon; e combinações dos mesmos. Um componente de entidade anfifílica pode ser uma mistura de diferentes entidades anfifílicas. As pessoas versadas na técnica reconhecerão que essa é uma lista exemplificadora não compreensiva de substâncias com atividade de tensoativo. Qualquer entidade anfifílica pode ser usada na produção de nanocarreadores sintéticos a serem usados de acordo com a presente invenção.

[00123] Em algumas modalidades, nanocarreadores sintéticos podem compreender opcionalmente um ou mais carboidratos. Carboidratos podem ser naturais ou sintéticos. Um carboidrato pode ser um carboidrato natural derivado. Em determinadas modalidades, um carboidrato compreende monossacarídeo ou dissacarídeo, incluindo, porém, sem limitação, glicose, frutose, galactose, ribose, lactose, sacarose, maltose, trealose, celbiose, manose, xilose, arabinose, ácido glucurônico, ácido galactorônico, ácido manurônico, glucosamina, galatosamina e ácido neurâmico. Em determinadas modalidades, um carboidrato é um polissacarídeo, incluindo, porém, sem limitação, pullulan, celulose, celulose microcristalina, metilcelulose de hidroxipropila (HPMC), hidroxixelulose (HC), metilcelulose (MC), dextrano, ciclodextrano, glicogênio, hidroxietilamido, carragenina, glycon, amilose, quitosana, N,O-carboxilmetilquitosana, algina e ácido algínico, amido, quitina, inulina, konjac, glucommannan, pustulan, heparina, ácido hialurônico, curdlana, e xantana. Em modalidades, os nanocarreadores sintéticos não compreendem (ou excluem especificamente) carboidratos, tais como um polissacarídeo. Em determinadas modalidades, o carboidrato pode compreender um derivado de carboidrato, tal como um álcool de açúcar, incluindo, porém, sem limitação, manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, maltitol e lactitol.

[00124] Em algumas modalidades, nanocarreadores sintéticos podem compreender um ou mais polímeros. Em algumas modalidades, os nanocarreadores sintéticos compreendem um ou mais polímeros que é um polímero plurônico não terminado com metóxi. Em algumas modalidades, pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% ou 99% (peso/peso) dos polímeros que compõem os nanocarreadores sintéticos são polímeros plurônicos não terminados com metóxi. Em algumas modalidades, todos os polímeros que compõem os nanocarreadores sintéticos são polímeros plurônicos não terminados com metóxi. Em algumas modalidades, os nanocarreadores sintéticos compreendem um ou mais polímeros que é um polímero não terminado com metóxi. Em algumas modalidades, pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% ou 99% (peso/peso) dos polímeros que compõem os nanocarreadores sintéticos são polímeros não terminados com metóxi. Em algumas modalidades, todos os polímeros que compõem os nanocarreadores sintéticos são polímeros não terminados com metóxi. Em algumas modalidades, os nanocarreadores sintéticos compreendem um ou mais polímeros que não compreendem polímero plurônico. Em algumas modalidades, pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, ou 99% (peso/peso) dos polímeros que compõem os nanocarreadores sintéticos não compreendem polímero plurônico. Em algumas modalidades, todos os polímeros que compõem os nanocarreadores sintéticos não compreendem polímero plurônico. Em algumas modalidades, tal polímero pode ser circundado por uma camada de revestimento (por exemplo, lipossoma, monocamada lipídica, micela, etc.). Em algumas modalidades, elementos dos nanocarreadores sintéticos podem ser fixados ao polímero.

[00125] Imunossupressores podem ser acoplados aos nanocarreadores sintéticos por qualquer dentre um número de métodos. De modo geral, a fixação pode ser um resultado de ligação entre os imunossupressores e os nanocarreadores sintéticos. Essa ligação pode resultar em os imunossupressores que são fixados à superfície dos nanocarreadores sintéticos e/ou contidos (encapsulados) dentro dos nanocarreadores sintéticos. Em algumas modalidades, no entanto, os imunossupressores são encapsulados pelos nanocarreadores sintéticos como resultado da estrutura dos nanocarreadores sintéticos em vez da ligação aos nanocarreadores sintéticos. Em modalidades preferenciais, o nanocarreador sintético compreende um polímero conforme determinado no presente documento, e os imunossupressores são fixados ao polímero.

[00126] Quando a fixação ocorre como resultado de ligação entre os imunossupressores e nanocarreadores sintéticos, a fixação pode ocorrer por meio de uma porção química de acoplamento. Uma porção química de acoplamento pode ser qualquer porção química através da qual um imunossupressor é ligado a um nanocarreador sintético. Tais porções químicas incluem ligações covalentes, tais como uma ligação de amida ou ligação de éster, assim como moléculas separadas que ligam (de modo covalente ou não covalente) o imunossupressor ao nanocarreador sintético. Tais moléculas incluem ligantes ou polímeros ou uma unidade dos mesmos. Por exemplo, a porção química de acoplamento pode compreender um polímero carregado ao qual um imunossupressor se liga de modo eletroestático. Em outro exemplo, a porção química de acoplamento pode compreender um polímero ou unidade do mesmo a qual o mesmo é ligado de modo covalente.

[00127] Em modalidades preferenciais, os nanocarreadores sintéticos compreendem um polímero conforme determinado no presente documento. Esses nanocarreadores sintéticos podem ser completamente

poliméricos ou os mesmos podem ser uma mistura de polímeros e outros materiais.

[00128] Em algumas modalidades, os polímeros de um nanocarreador sintético se associam para formar uma matriz polimérica. Em algumas dessas modalidades, um componente, tal como um imunossupressor, pode ser associado de modo covalente a um ou mais polímeros da matriz polimérica. Em algumas modalidades, associação covalente é mediada por um ligante. Em algumas modalidades, um componente pode ser associado de modo não covalente a um ou mais polímeros da matriz polimérica. Por exemplo, em algumas modalidades, um componente pode ser encapsulado dentro de, circundado por, e/ou dispersado por toda uma matriz polimérica. Alternativa ou adicionalmente, um componente pode ser associado a um ou mais polímeros de uma matriz polimérica por interações hidrofóbicas, interações de carga, forças de van der Waals, etc. Uma ampla variedade de polímeros e métodos para formar matrizes poliméricas dos mesmos é conhecida convencionalmente.

[00129] Polímeros podem ser polímeros naturais ou não naturais (sintéticos). Polímeros podem ser homopolímeros ou copolímeros que compreendem dois ou mais monômeros. Em termos de sequência, copolímeros podem ser aleatórios, bloco, ou compreendem uma combinação de sequências aleatórias e de bloco. Tipicamente, polímeros de acordo com a presente invenção são polímeros orgânicos.

[00130] Em algumas modalidades, o polímero compreende um poliéster, policarbonato, poliamida, ou poliéter, ou unidade dos mesmos. Em outras modalidades, o polímero compreende poli(etileno glicol) (PEG), polipropileno glicol, ácido (poli)lático, ácido (poli)glicólico, ácido (poli)lático-co-glicólico, ou uma policaprolactona, ou unidade dos mesmos. Em algumas modalidades, é preferencial que o polímero seja biodegradável. Portanto, nessas modalidades, é preferencial que, se o po-

límero compreender um poliéter, tal como poli(etileno glicol) ou polipropileno glicol ou unidade dos mesmos, o polímero compreenda um blococopolímero de um poliéter e um polímero biodegradável de modo que o polímero seja biodegradável. Em outras modalidades, o polímero não compreende somente um poliéter ou unidade do mesmo, tal como poli(etileno glicol) ou polipropileno glicol ou unidade dos mesmos.

[00131] Outros exemplos de polímeros adequados para uso na presente invenção incluem, porém, sem limitação a polietilenos, policarbonatos (por exemplo, poli(1,3-dioxan-2ona)), polianidridos (por exemplo, anidrido (poli) sebácico), polipropilfumeratos, poliamidas (por exemplo, policaprolactama), poliacetais, poliéteres, poliésteres (por exemplo, polilactida, poliglicolida, polilactida-co-glicolida, policaprolactona, polihidroxiácido (por exemplo, poli(β -hidroxialcanoato))), poli(ortoésteres), policianoacrilatos, álcoois polivinílicos, poliuretanos, polifosfazenos, poliacrilatos, polimetacrilatos, poliureias, poliestirenos, e poliaminas, polilisina, copolímeros de polilisina-PEG e poli(etilenoimina), copolímeros de poli(etileno imina)-PEG.

[00132] Em algumas modalidades, polímeros de acordo com a presente invenção incluem polímeros que foram aprovadas para uso em humanos pela Administração de Alimento e Fármaco dos EUA (FDA) disposto no título 21 C.F.R. § 177.2600, incluindo, porém, sem limitação, poliésteres (por exemplo, ácido poliláctico, ácido (poli)láctico-co-glicólico, policaprolactona, polivalerolactona, poli(1,3-dioxan-2ona)); polianidridos (por exemplo, anidrido (poli) sebácico); poliéteres (por exemplo, polietileno glicol); poliuretanos; polimetacrilatos; poliacrilatos; e policianoacrilatos.

[00133] Em algumas modalidades, polímeros podem ser hidrofílicos. Por exemplo, polímeros podem compreender grupos aniônicos (por exemplo, grupo fosfato, grupo sulfato, grupo carboxilato); grupos catiônicos (por exemplo, grupo amina quaternária); ou grupos polares (por

exemplo, grupo hidroxila, grupo tiol, grupo amina). Em algumas modalidades, um nanocarreador sintético que compreende uma matriz polimérica hidrofílica gera um ambiente hidrofílico dentro do nanocarreador sintético. Em algumas modalidades, polímeros podem ser hidrofóbicos. Em algumas modalidades, um nanocarreador sintético que compreende uma matriz polimérica hidrofóbica gera um ambiente hidrofóbico dentro do nanocarreador sintético. A seleção da hidrofilicidade ou hidrofobicidade do polímero pode ter um impacto na natureza de materiais que são incorporados dentro do nanocarreador sintético.

[00134] Em algumas modalidades, polímeros podem ser modificados com uma ou mais porções químicas e/ou grupos funcionais. A variedade de porções químicas ou grupos funcionais pode ser usada de acordo com a presente invenção. Em algumas modalidades, polímeros podem ser modificados com polietileno glicol (PEG), com um carboidrato, e/ou com poliacetais acrílicos derivados de polissacarídeos (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). Determinadas modalidades podem ser criadas com uso dos ensinamentos gerais da Patente nº U.S. No. 5543158 por Gref et al., ou Publicação nº WO2009/051837 por von Andrian et al.

[00135] Em algumas modalidades, polímeros podem ser modificados com um grupo lipídico ou ácido graxo. Em algumas modalidades, um grupo ácido graxo pode ser um ou mais dentre ácido butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, beênico ou lignocérico. Em algumas modalidades, um grupo ácido graxo pode ser um ou mais dentre ácido palmitoleico, oleico, vaccênico, linoleico, alfa-linoleico, gama-linoleico, araquidônico, gadoleico, araquidônico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico ou erúico.

[00136] Em algumas modalidades, polímeros pode ser poliésteres, incluindo copolímeros que compreendem unidades de ácido láctico e ácido glicólico, tais como ácido (poli)láctico-co-glicólico e poli(lactida-co-

glicolida), coletivamente denominada no presente documento como “PLGA”; e homopolímeros que compreendem unidades de ácido glicólico, denominado no presente documento como “PGA,” e unidades ácido láctico, tais como ácido poli-L-láctico, ácido poli-D-láctico, ácido poli-D,L-láctico, poli-L-lactida, poli-D-lactida, e poli-D,L-lactida, coletivamente denominada no presente documento como “PLA.” Em algumas modalidades, poliésteres exemplificadores incluem, por exemplo, polihidroxiácidos; copolímeros de PEG e copolímeros de lactida e glicolida (por exemplo, copolímeros de PLA-PEG, copolímeros de PGA-PEG, copolímeros de PLGA-PEG, e derivados dos mesmos. Em algumas modalidades, poliésteres incluem, por exemplo, poli(caprolactona), copolímeros de poli(caprolactona)-PEG, poli(L-lactida-co-L-lisina), éster de (poli)serina, éster de (poli)4-hidroxi-L-prolina, ácido[poli] α -(4-aminobutil)-L-glicólico e derivados dos mesmos.

[00137] Em algumas modalidades, um polímero pode ser PLGA. PLGA é um copolímero biocompatível e biodegradável de ácido láctico e ácido glicólico, e várias formas de PLGA são caracterizadas pela razão de ácido láctico:ácido glicólico. Ácido láctico pode ser ácido L-láctico, ácido D-láctico ou ácido D,L-láctico. A taxa de degradação de PLGA pode ser ajustada alterando-se a razão de ácido láctico:ácido glicólico. Em algumas modalidades, PLGA a ser usado de acordo com a presente invenção é caracterizado por uma razão de ácido láctico:ácido glicólico de aproximadamente 85:15, aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, aproximadamente 25:75, ou aproximadamente 15:85.

[00138] Em algumas modalidades, polímeros podem ser um ou mais polímeros acrílicos. Em determinadas modalidades, polímeros acrílicos incluem, por exemplo, copolímeros de ácido acrílico e ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metila, metacrilatos de etoxietila, metacrilato de cianoetila, copolímero de metacrilato de aminoalquila, ácido

(poli)acrílico, ácido (poli)metacrílico, ácido metacrílico copolímero de alquilamida, metacrilato de (poli)metila, anidrido de ácido (poli)metacrílico, metacrilato de metila, polimetacrilato, copolímero de metacrilato de (poli)metila, poliacrilamida, copolímero de metacrilato de aminoalquila, copolímeros de metacrilato de glicidila, policianoacrilatos e combinações que compreendem um ou mais dos polímeros precedentes. O polímero acrílico pode compreender copolímeros totalmente polimerizados de ésteres de ácido acrílico e metacrílico com baixo teor de grupos amônio quaternário.

[00139] Em algumas modalidades, polímeros podem ser polímeros catiônicos. Em geral, polímeros catiônicos têm capacidade de condensar e/ou proteger fitas negativamente carregadas de ácidos nucleicos. Polímeros contendo amina, tais como poli(lisina) (Zauner et al., 1998, *Adv. Drug Del. Rev.*, 30:97; e Kabanov et al., 1995, *Bioconjugate Chem.*, 6:7), imina de (poli)etileno (PEI; Boussif et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci., E.U.A.*, 1995, 92:7297), e dendrímeros de poli(amidoamina) (Kukowska-Latallo et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci., E.U.A.*, 93:4897; Tang et al., 1996, *Bioconjugate Chem.*, 7:703; e Haensler et al., 1993, *Bioconjugate Chem.*, 4:372) são positivamente carregados em pH fisiológico, formam pares de íon com ácidos nucleicos. Em modalidades, os nanocarreadores sintéticos podem não compreender (ou podem excluir) polímeros catiônicos.

[00140] Em algumas modalidades, polímeros podem ser poliésteres degradáveis que portam cadeias laterais catiônicas (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010; Kwon et al., 1989, *Macromolecules*, 22:3250; Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633; e Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399). Exemplos desses poliésteres incluem poli(L-lactida-co-L-lisina) (Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010), éster de (poli)serina (Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399), éster de

(poli)4-hidroxi-L-prolina (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; e Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633), e éster de (poli)4-hidroxi-L-prolina (Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; e Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633).

[00141] Essas propriedades desses e de outros polímeros e métodos para preparar os mesmos são conhecidos na técnica (consultar, por exemplo, documentos de Patente nº U.S.6.123.727; nº U.S.5.804.178; nº U.S.5.770.417; nº U.S.5.736.372; nº U.S.5.716.404; nº U.S.6.095.148; nº U.S.5.837.752; nº U.S.5.902.599; nº U.S.5.696.175; nº U.S.5.514.378; nº U.S.5.512.600; nº U.S.5.399.665; nº U.S.5.019.379; nº U.S.5.010.167; nº U.S.4.806.621; nº U.S.4.638.045; e nº U.S.4.946.929; Wang et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:9480; Lim et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:2460; Langer, 2000, *Acc. Chem. Res.*, 33:94; Langer, 1999, *J. Control. Liberação*, 62:7; e Uhrich et al., 1999, *Chem. Rev.*, 99:3181). De modo mais geral, uma variedade de métodos para sintetizar determinados polímeros adequados são descritos em *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts*, Ed. por Goethals, Pergamon Press, 1980; *Principles of Polymerization* por Odian, John Wiley & Sons, Quarta Edição, 2004; *Contemporary Polymer Chemistry* por Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, *Nature*, 390:386; e nos documentos de Patente nº U.S.6.506.577, nº U.S.6.632.922, nº U.S.6.686.446 e nº U.S.6.818.732.

[00142] Em algumas modalidades, polímeros podem ser polímeros lineares ou ramificados. Em algumas modalidades, polímeros podem ser dendrímeros. Em algumas modalidades, polímeros podem ser substancialmente reticulados entre si. Em algumas modalidades, polímeros podem ser substancialmente livres de reticulações. Em algumas modalidades, polímeros podem ser usados de acordo com a presente inven-

ção sem sofrer uma etapa de reticulação. Entende-se ainda que os nanocarreadores sintéticos podem compreender copolímeros de bloco, copolímeros de enxerto, mesclas, misturas, e/ou adutos de qualquer dos polímeros antecedentes e outros polímeros. As pessoas versadas na técnica reconhecerão que os polímeros listados no presente documento representam uma lista exemplificadora não compreensiva de polímeros que podem ser de uso de acordo com a presente invenção.

[00143] Em algumas modalidades, nanocarreadores sintéticos não compreendem um componente polimérico. Em algumas modalidades, nanocarreadores sintéticos podem compreender partículas de metal, pontos quânticos, partículas de cerâmica, etc. Em algumas modalidades, um nanocarreador sintético não polimérico é um agregado de componentes não poliméricos, tais como um agregado de átomos de metal (por exemplo, átomos de ouro).

[00144] Qualquer imunossupressor conforme determinado no presente documento pode ser, em algumas modalidades, acoplado a nanocarreadores sintéticos. Imunossupressores incluem, porém, sem limitação to, estatinas; inibidores de mTOR, tais como rapamicina ou um análogo de rapamicina (rapalogo); agentes de sinalização de TGF- β ; agonistas receptor de TGF- β ; inibidores de histona deacetilase (HDAC); corticosteroides; inibidores de função mitocondrial, tais como rotenona; inibidores de P38; inibidores de NF- $\kappa\beta$; agonistas de receptor de adenosina; agonistas de prostaglandina E2; inibidores de fosfodiesterase, tais como inibidor de fosfodiesterase 4; inibidores de proteasoma; inibidores de quinase; agonistas de receptor acoplado a G-proteína; antagonistas acoplados a G-proteína; glucocorticoides; retinoides; inibidores de citocina; inibidores de receptor de citocina; ativadores de receptor de citocina; antagonistas receptores ativados por proliferador de peroxisoma; agonistas de receptor ativado por proliferador de peroxissoma; inibido-

res de histona deacetilase; inibidores de calcineurina; inibidores de fosfatase e ATPs oxidizados. Imunossupressores também incluem IDO, vitamina D3, ciclosporina A, inibidores de receptor de hidrocarboneto de arila, resveratrol, azatiopurina, 6-mercaptopurina, aspirina, ácido niflúmico, estriol, tripolida, interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-10), ciclosporina A, citocinas de alvejamento de siRNAs ou receptores de citocina e similares.

[00145] Exemplos de inibidores de mTOR incluem rapamicina e análogos dos mesmos (por exemplo, CCL-779, RAD001, AP23573, C20-metalilrapamicina (C20-Marap), C16-(S)-butilsulfonamidrapamicina (C16-BSrap), C16-(S)-3-metilindolerapamicina (C16-iRap) (Bayle et al. Chemistry & Biology 2006, 13:99-107)), AZD8055, BEZ235 (NVP-BEZ235), ácido crisofânico (crisofanol), deforolimus (MK-8669), everolimo (RAD0001), KU-0063794, PI-103, PP242, temsirolimo e WYE-354 (disponível da Selleck, Houston, TX, E.U.A).

[00146] Composições de acordo com a invenção podem compreender excipientes farmacêuticamente aceitáveis, tais como conservantes, tampões, salino, ou salino tamponado com fosfato. As composições podem ser produzidas com uso de técnicas de fabricação e composição de produto farmacêutico convencional para atingir formas de dosagem úteis. Em uma modalidade, composições são suspensas em solução de salino estéril para injeção em conjunto com um conservante.

D. MÉTODOS DE USO E PRODUÇÃO DAS COMPOSIÇÕES E MÉTODOS RELACIONADOS

[00147] Vetores virais podem ser produzidos com métodos conhecidos pelos elementos de habilidade comum na técnica ou conforme descrito de outro modo no presente documento. Por exemplo, vetores virais podem ser construídos e/ou purificados com uso dos métodos definidos, por exemplo, no documento de Patente. Nº U.S. 4.797.368 e Laughlin et al., Gene, 23, 65-73 (1983).

[00148] Vetores de AAV podem ser produzidos com uso de métodos recombinantes. Tipicamente, os métodos envolvem cultivar uma célula hospedeira que contém uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma proteína de cápside de AAV ou fragmento dos mesmos; um gene rep funcional; um vetor de AAV recombinante composto de repetições de terminal invertido de AAV (ITRs) e um transgene; e funções auxiliares suficientes para permitir o acondicionamento do vetor de AAV recombinante nas proteínas de cápside de AAV. Em algumas modalidades, o vetor viral pode compreender repetições de terminal invertido (ITR) de serótipos de AAV, tais como AAV8.

[00149] Os componentes a serem cultivados na célula hospedeira para acondicionar um vetor de rAAV em um cápside de AAV podem ser fornecidos à célula hospedeira em trans. Alternativamente, qualquer um ou mais dos componentes necessários (por exemplo, vetor de AAV recombinante, sequências de rep, sequências de cap, e/ou funções auxiliares) pode ser fornecido por uma célula hospedeira estável que foi manipulada para conter um ou mais dos componentes necessários com uso de métodos conhecidos pelos elementos versados na técnica. Do modo mais adequado, tal célula hospedeira estável pode conter o componente (ou componentes) necessário sob o controle de um promotor induzível. No entanto, o componente (ou componentes) necessário pode estar sob o controle de um promotor constitutivo. O vetor de AAV recombinante, sequências de rep, sequências de cap, e funções auxiliares necessárias para produzir o rAAV da invenção podem ser entregues à célula hospedeira de acondicionamento com uso de qualquer elemento genético apropriado. O elemento genético apropriado pode ser entregue por qualquer método adequado, incluindo aqueles descritos no presente documento. Os métodos usados para construir qualquer modalidade desta invenção são conhecidos pelos elementos versados

em manipulação de ácido nucleico e incluem engenharia genética, engenharia recombinante e técnicas sintéticas. consultar, por exemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. De modo similar, métodos de geração de viriões de rAAV são conhecidos e a seleção de um método adequado não é uma limitação na presente invenção. Consultar, por exemplo, K. Fisher et al, J. Virol., 70:520-532 (1993) e o documento de Patente nº U.S. 5.478.745.

[00150] Em algumas modalidades, vetores de AAV recombinantes podem ser produzidos com uso do método de transfecção tripla (por exemplo, conforme descrito em detalhes no documento de Patente Nº U.S. 6.001.650, cujo conteúdo relacionado ao método de transfecção tripla são incorporados no presente documento a título de referência). Tipicamente, os AAVs recombinantes são produzidos transfectando-se uma célula hospedeira com um vetor de AAV recombinante (que compreende um transgene) a ser acondicionado em partículas de AAV, um vetor de função auxiliar de AAV, e um vetor de função de acessório. De modo geral, um vetor de função auxiliar de AAV codifica sequências de função auxiliar de AAV (rep e cap), que funcionam em trans para replicação e encapsidação de AAV produtivo. Preferencialmente, o vetor de função auxiliar de AAV suporta produção de vetor de AAV eficiente sem gerar nenhum virião de AAV de tipo selvagem detectável (isto é, viriões de AAV que contém genes de rep e cap funcionais). O vetor de função de acessório pode codificar sequências de nucleotídeo para funções virais e/ou celulares não derivadas de AAV mediante os quais AAV é dependente para replicação. As funções de acessório incluem aquelas funções necessárias para replicação de AAV, incluindo, sem limitação, aquelas porções químicas envolvidas na ativação de transcrição de gene de AAV, splicing de mRNA de AAV específico de estágio, replica-

ção de DNA de AAV, síntese de produtos de expressão de cap e conjunto de cápside de AAV. Funções de acessório de base viral podem ser derivadas de qualquer um dos vírus auxiliares conhecidos, tais como adenovírus, vírus de herpes (diferentes de vírus de simplex de herpes tipo-1) e vírus tipo vaccinia.

[00151] Outros métodos para produzir vetores virais são conhecidos na técnica. Além disso, vetores virais são disponíveis comercialmente.

[00152] Em relação a nanocarreadores sintéticos acoplados a imunossuppressores, métodos para fixar componentes a nanocarreadores sintéticos podem ser úteis.

[00153] Em determinadas modalidades, a fixação pode se dar por meio de um ligante covalente. Em modalidades, imunossuppressores de acordo com a invenção podem ser fixados de modo covalente à superfície externa por meio de um ligante de 1,2,3-triazol formado pela reação de cicloadição de 1,3-dipolar de grupos azido com imunossupressor que contém um grupo alcino ou pela reação de cicloadição de 1,3-dipolar de alcinos com imunossuppressores que contém um azido grupo. Tais reações de cicloadição são preferencialmente realizadas na presença de um catalisador de Cu(I) ao longo de com um Cu(I)-ligante adequado e um agente redutor para reduzir o composto de Cu(II) para catalisar composto de Cu(I) ativo. Essa cicloadição de azida-alcino catalisada com Cu(I) (CuAAC) também pode ser denominada como a reação de clique.

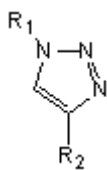
[00154] Adicionalmente, acoplamento covalente pode compreender um ligante covalente que compreende um ligante de amida, um ligante de dissulfeto, um ligante de tioéter, um ligante de hidrazona, um ligante de hidrazida, um ligante de imina ou oxima, um ligante de ureia ou tioureia, um ligante de amidina, um ligante de amina, ou um ligante de sulfonamida.

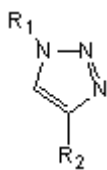
[00155] Um ligante de amida é formado por meio de uma ligação de

amida entre uma amina em um componente tal como um imunossupressor com o grupo ácido carboxílico de um segundo componente, tal como o nanocarreador. A ligação de amida no ligante pode ser realizada com uso de quaisquer das reações de formação de ligação de amida convencional com aminoácidos adequadamente protegidos e ácido carboxílico ativado, tal como éster ativado com N-hidroxisuccinimida.

[00156] Um ligante de dissulfeto é produzido por meio da formação de uma ligação de dissulfeto (S-S) entre dois átomos de enxofre da forma, por exemplo, de R1-S-S-R2. Uma ligação de dissulfeto pode ser formada por troca de tiol de um componente que contém grupo tiol/mercaptano (-SH) com outro grupo tiol ativado ou um componente que contém grupos tiol/mercaptano com um componente que contém grupo tiol ativado.

[00157] Um ligante de triazol, especificamente um 1,2,3-triazol da



forma R_1  R_2 , em que R1 e R2 pode ser quaisquer entidades químicas, é produzido pela reação de cicloadição de 1,3-dipolar de uma azida fixada a um primeiro componente com um terminal de alcino fixado a um segundo componente tal como o imunossupressor. A reação de cicloadição de 1,3-dipolar é realizada com ou sem um catalisador, preferencialmente com catalisador de Cu(I), que liga os dois componentes através de uma função de 1,2,3-triazol. Essa química é descrita em detalhes por Sharpless et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41(14), 2596, (2002) e Meldal, et al, *Chem. Rev.*, 2008, 108(8), 2952 a 3015 e é frequentemente denominada como uma reação de “clique” ou CuAAC.

[00158] Um ligante de tioéter é produzido pela formação de uma ligação de enxofre-carbono (tioéter) na forma, por exemplo, de R1-S-R2. Tioéter pode ser produzido tanto por alquilação de um grupo tiol/mercaptano (-SH) em um componente com um grupo alquilante, tal como

haletos como por epóxido em um segundo componente. Ligantes de tioéter também podem ser formados por adição de Michael de um grupo tiol/mercaptano em um componente a um grupo alceno deficiente de elétron em um segundo componente que contém um grupo maleimida ou grupo de sulfona de vinila como o aceitador de Michael. De outro modo, ligantes de tioéter podem ser preparados pela reação de radical tiol-eno de um grupo tiol/mercaptano em um componente com um grupo alceno em um segundo componente.

[00159] Um ligante de hidrazona é produzido pela reação de um grupo hidrazida em um componente com um grupo aldeído/cetona no segundo componente.

[00160] Um ligante de hidrazida é formado pela reação de um grupo hidrazina em um componente com um grupo ácido carboxílico no segundo componente. Tal reação é geralmente realizada com uso de química similar à formação de ligação de amida em que o ácido carboxílico é ativado com um reagente de ativação.

[00161] Um ligante de imina ou oxima é formado pela reação de um grupo amina ou N-alcoxiamina (ou aminoxi) em um componente com um grupo aldeído ou cetona no segundo componente.

[00162] Um ligante de ureia ou tioureia é preparado pela reação de um grupo amina em um componente com um grupo isocianato ou tioisocianato no segundo componente.

[00163] Um ligante de amidina é preparado pela reação de um grupo amina em um componente com um grupo imidoéster no segundo componente.

[00164] Um ligante de amina é produzido pela reação de alquilação de um grupo amina em um componente com um grupo alquilante, tal como grupo haleto, epóxido, ou éster de sulfonato no segundo componente. Alternativamente, um ligante de amina também pode ser produzido pela aminação redutiva de um grupo amina em um componente

com um grupo aldeído ou cetona no segundo componente com um reagente redutor adequado tal como cianoboroidreto de sódio ou triacetoxiboroidreto de sódio.

[00165] Um ligante de sulfonamida é produzido pela reação de um grupo amina em um componente com um grupo haleto de sulfonila (tal como cloreto de sulfonila) no segundo componente.

[00166] Um ligante de sulfona é produzido pela adição de Michael de um nucleófilo a uma sulfona de vinila. Tanto a sulfona de vinila como o nucleófilo pode estar na superfície do nanocarreador ou fixada a um componente.

[00167] O componente também pode ser conjugado por meio de métodos de conjugação não covalentes. Por exemplo, um imunossupressor carregado negativo pode ser conjugado a um componente carregado positivo através de adsorção eletroestática. Um componente que contém um ligante de metal também pode ser conjugado a um complexo de metal por meio de um complexo de ligante de metal.

[00168] Em modalidades, o componente pode ser fixado a um polímero, por exemplo, ácido polilático-bloco-polietileno glicol, antes do conjunto de um nanocarreador sintético ou o nanocarreador sintético pode ser formada com grupos reativos ou ativáveis em sua superfície. Nesse último caso, o componente pode ser preparado com um grupo que é compatível com a química de fixação que é apresentada pela superfície dos nanocarreadores sintéticos. Em outras modalidades, um componente de peptídeo pode ser fixado a VLPs ou lipossomas com uso de um ligante adequado. Um ligante é um composto ou reagente que tem capacidade de acoplar duas moléculas em conjunto. Em uma modalidade, o ligante pode ser um reagente homobifuncional ou heterobifuncional conforme descrito em Hermanson 2008. Por exemplo, um nanocarreador sintético de VLP ou lipossoma que contém um grupo carboxílico na superfície pode ser tratado com um ligante homobifuncional,

dihidrazida adípica (ADH), na presença de EDC para formar o nanocarreador sintético correspondente com o ligante de ADH. O nanocarreador sintético ligado a ADH resultante é então conjugado com um componente de peptídeo que contém um grupo ácido por meio da outra extremidade do ligante de ADH no nanocarreador para produzir o VLP correspondente ou conjugado de peptídeo de lipossoma.

[00169] Em modalidades, um polímero que contém um grupo azida ou alcino, terminal à cadeia polimérica é preparado. Esse polímero é então usado para preparar um nanocarreador sintético de tal maneira que uma pluralidade dos grupos alcino ou azida são posicionados na superfície desse nanocarreador. Alternativamente, o nanocarreador sintético pode ser preparado por outra rota e subsequentemente funcionalizado com grupos alcino ou azida. O componente é preparado com a presença tanto de um grupo alcino (se o polímero conter uma azida) como de um grupo azida (se o polímero conter um alcino). Permite-se que o componente reaja com o nanocarreador por meio da reação de cicloadição 1,3-dipolar com ou sem um catalisador que fixa de maneira covalente o componente à partícula através do ligante 1,2,3-triazol de 1,4-dissubstituído.

[00170] Caso o componente seja uma molécula pequena, pode vantajoso fixar o componente a um polímero antes da montagem de nanocarreadores sintéticos. Em modalidades, também pode ser vantajoso preparar os nanocarreadores sintéticos com grupo de superfície que são usados para ficar o componente ao nanocarreador sintético com o uso desse grupo de superfície em vez ficar o componente a um polímero e, em seguida, usar esse conjugado de polímero na construção de nanocarreadores sintéticos.

[00171] Para descrições detalhadas de métodos de conjugação adequados, consultar Hermanson G T “Bioconjugate Techniques”, 2ª Edi-

ção publicada pela Academic Press, Inc., 2008. Além da ligação covalente, o componente pode ser fixado por adsorção a um nanocarreador sintético ou pré-formado ou pode ser fixado por encapsulação durante a formação do nanocarreador sintético.

[00172] Nanocarreadores sintéticos podem ser preparados com o uso de uma ampla variedade de métodos. Por exemplo, nanocarreadores sintéticos podem ser formados por métodos, tais como nanoprecipitação, focagem com uso de canais fluídicos, secagem por aspersão, evaporação de solvente de emulsão único e duplo, extração de solvente, separação de fase, moagem, procedimentos de microemulsão, microfabricação, nanofabricação, camadas sacrificiais, coacervação simples e complexa e outros métodos serão conhecidos pelas pessoas de habilidade comum na técnica. Alternativa ou ainda, síntese de solvente aquosa e orgânica para materiais semicondutores monodispersos, condutores, magnéticos, orgânicos e outros nanomateriais tenham sido descritos (Pellegrino et al., 2005, *Small*, 1:48; Murray et al., 2000, *Ann. Rev. Mat. Sci.*, 30:545; e Trindade et al., 2001, *Chem. Mat.*, 13:3843). Métodos adicionais foram descritos na literatura (consultar, por exemplo, Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, *J. Control. Release*, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, *Reactive Polymers*, 6:275; e Mathiowitz et al., 1988, *J. Appl. Polymer Sci.*, 35:755; Patentes nº U.S. 5578325 e 6007845; P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" *Nanomedicine*. 5(6):843 a 853 (2010)).

[00173] Os materiais podem ser encapsulados em nanocarreadores sintéticos, conforme desejável com uso de uma variedade de métodos, incluindo, porém sem limitação C. Astete et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" *J. Biomater. Sci. Polymer*, Volume. 17,

No. 3, páginas 247 a 289 (2006); K. Avgoustakis “Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery” *Current Drug Delivery* 1:321 a 333 (2004); C. Reis et al., “Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles” *Nanomedicine* 2:8 a 21 (2006); P. Paolicelli et al., “Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles” *Nanomedicine*. 5(6):843 a 853 (2010). Outros métodos adequados para encapsular materiais em nanocarreadores sintéticos podem ser usados, incluindo sem limitação, métodos revelados na Patente nº U.S. 6.632.671 de Unger expedido em 14 de outubro de 2003.

[00174] Em determinadas modalidades, são nanocarreadores sintéticos são preparadas por um processo de nanoprecipitação ou secagem por aspersão. As condições usadas na preparação de nanocarreadores sintéticos pode ser alterada para render partículas de um tamanho ou propriedade desejados (por exemplo, hidrofobicidade, hidrofiliidade, morfologia externa, “pegajosidade”, formato etc.). O método para preparar os nanocarreadores sintéticos e as condições (por exemplo, solvente, temperatura, concentração, taxa de fluxo de ar etc.) usadas podem depender dos materiais a serem fixados aos nanocarreadores sintéticos e/ou a composição da matriz de polímero.

[00175] Caso nanocarreadores sintéticos preparados por qualquer um dos métodos acima têm uma faixa de tamanho fora da faixa desejada, os nanocarreadores sintéticos podem ser dimensionados, por exemplo, com uso de uma peneira.

[00176] Os elementos dos nanocarreadores sintéticos podem ser fixados ao nanocarreador sintético geral, por exemplo, por uma ou mais ligações covalentes ou podem ser fixadas por meio de um ou mais ligantes . Os métodos adicionais para funcionalizar os nanocarreadores sintéticos podem ser adaptados do documento do Pedido de Patente

Publicado nº U.S. 2006/0002852 de Saltzman et al., Pedido de Patente nº U.S. Publicado 2009/0028910 de DeSimone et al., ou Pedido de Patente Internacional Publicado WO/2008/127532 A1 de Murthy et al.

[00177] Alternativa ou adicionalmente, nanocarreadores sintéticos podem ser fixados aos componentes direta ou indiretamente por meio de interações não covalentes. Em modalidades não covalentes, a fixação não covalente é mediada por interações não covalentes, incluindo, porém, sem limitação, interações de carga, interações de afinidade, coordenação de metal, adsorção física, interações de hospedeiro e convidado, interações hidrofóbicas, interações de empilhamento TT, interações de ligação de hidrogênio, interações van der Waals, interações magnéticas, interações eletroestáticas, interações dipolo-dipolo, e/ou combinações dos mesmos. Tais fixações podem ser dispostas como uma superfície externa ou uma superfície interna de um nanocarreador sintético. Em modalidades, a encapsulação e/ou absorção é uma forma de fixação.

[00178] As composições fornecidas no presente documento podem ser compreender tampões inorgânicos ou orgânicos (por exemplo, sais de sódio ou de potássio de fosfato, carbonato, acetato ou citrato) e agentes de ajuste de pH (por exemplo, ácido clorídrico, hidróxido de sódio ou potássio, sais de citrato ou acetato, aminoácidos e sais dos mesmos) antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico, alfa-tocoferol), tensoativos (por exemplo, polisorbato 20, polisorbato 80, polioxietileno9-10 nonil fenol, desoxicolato de sódio), solução e/ou estabilizadores de crio/lio (por exemplo, sacarose, lactose, manitol, trealose), agentes de ajuste osmótico (por exemplo, sais ou açúcares), atentes antibacterianos (por exemplo, ácido benzoico, fenol, gentamicina), agentes antiespumantes (por exemplo, polidimetilsilozona), conservantes (por exemplo, timerosal, 2-fenoxietanol, EDTA), estabilizadores poliméricos e

agentes de ajuste de viscosidade (por exemplo, polivinilpirrolidona, poloxâmico 488, carboximetilcelulose) e co-solventes (por exemplo, glicérol, polietileno glicol, etanol).

[00179] As composições de acordo com a invenção podem compreender excipientes farmacologicamente aceitáveis. As composições podem ser produzidas com uso de técnicas de fabricação e composição de produto farmacêutico convencional para atingir formas de dosagem úteis. As técnicas adequadas para uso na prática da presente invenção podem ser encontradas em Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, Editado por Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng, and Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; and Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2ª Edição Editado por M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone. Em uma modalidade, as composições são suspensas em uma solução salina estéril para injeção com um conservante.

[00180] Deve-se ser entendido que as composições da invenção podem ser produzidas de qualquer maneira adequada, e a invenção não se limita de modo algum às composições que possam ser produzidas com o uso dos métodos descritos no presente documento. A seleção de um método apropriado de fabricação pode exigir uma fabricação pode exigir atenção às propriedades das porções químicas particulares que são associadas.

[00181] Em algumas modalidades, as composições são fabricadas sob condições estéreis ou são esterilizados terminalmente. Isso garantir que composições resultantes são estéreis e não infecciosas, desse modo, aprimorando a segurança quando em comparação a composições não estéreis. Isso fornece uma medida de segurança valiosa, especialmente quando indivíduos que recebem as composições têm defeitos imunológicos sofrem com infecção e/ou estão suscetíveis à infecção.

[00182] A administração de acordo com a presente invenção pode ocorrer por várias rotas, incluindo, porém sem limitação rotas subcutâneas, intravenosas e intraperitoneais. As composições denominadas to no presente documento podem ser fabricadas e preparadas para administração, em algumas modalidades, a administração concomitante, com uso de métodos convencionais.

[00183] As composições da invenção podem ser administradas em quantidades eficazes, tais como as quantidades eficazes descritas ao longo do presente documento. Em algumas modalidades, os nanocarreadores sintéticos que compreendem um imunossupressor e/ou vetores virais estão presentes em formas de dosagem em uma quantidade eficaz para reduzir uma resposta imunológica e/ou permitir para a readministração de um vetor viral a um indivíduo. Em algumas modalidades, os nanocarreadores sintéticos que compreende um imunossupressor e/ou vetores virais estão presentes em formas de dosagem em uma quantidade eficaz para escalar ou obter a expressão de transgene eficaz em um indivíduo. As formas de dosagem podem ser administradas em uma variedade de frequências. Em algumas modalidades, a administração repetida de nanocarreadores sintéticos compreende um imunossupressor com um vetor viral é realizada.

[00184] Os aspectos da invenção se referem à determinação de um protocolo para aos métodos de administração, conforme fornecido no presente documento. Um protocolo pode ser determinado variando-se pelo menos a frequência, quantidade de dosagem do vetor viral e nanocarreadores sintéticos que compreendem um imunossupressor e avaliando-se subsequentemente uma resposta imunológica desejada ou indesejada. Um protocolo preferencial para praticar a invenção reduz uma resposta imunológica contra o vetor viral e/ou o produto expresso e/ou promove expressão de transgene. O protocolo compreende pelo menos a frequência da administração e doses do vetor viral e nanocarreadores

sintéticos que compreendem um imunossupressor.

[00185] Outro aspecto da descrição se refere aos kits. Em algumas modalidades, o kit compreende qualquer uma ou mais dentre as composições fornecidas no presente documento. De preferência, a composição (ou composições) está em uma quantidade para fornecer qualquer uma ou mais doses, conforme fornecido no presente documento. A composição (ou composições) pode estar em um recipiente ou mais de um m recipiente no kit. Em algumas modalidades de qualquer um dos kits fornecidos, o recipiente é um frasco ou uma ampola. Em algumas modalidades de qualquer um dos kits fornecidos, a composição (ou composições) está em forma liofilizada, cada um em um recipiente separado ou no mesmo recipiente, de modo que possam ser reconstituídos em um tempo subsequente. Em algumas modalidades de qualquer um dos kits fornecido, o kit compreende ainda instruções para reconstituição, mistura, administração etc. Em algumas modalidades de qualquer um dos kits fornecidos, as instruções incluem uma descrição de qualquer um dos métodos descritos no presente documento. As instruções podem estar em qualquer forma adequada, por exemplo, como um inserto ou identificação impressa. Em algumas modalidades de qualquer um dos kits fornecidos no presente documento, o kit compreende ainda uma ou mais seringas ou outro dispositivo (ou dispositivos) que possam entregar a composição (ou composições) *in vivo* a um indivíduo.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: EXPERIMENTOS DE CONSTRUTO DE VETOR SSAAV *IN VITRO*

[00186] Uma série de construtos de vetor ssAAV que expressam o transgene de OTC humano sob o controle transcripcional de um promotor específico de fígado foi desenvolvida. O vetor rAAV-hOTC (AAV2/8, isto é, um vírus AAV2 submetidos a engenharia para ter proteínas cap-

sidiais AAV8) contém um cassete de expressão de OTC (hOTC) humana flanqueado por repetições terminais invertidas do tipo selvagem AAV2 (ITRs). A cadeia principal, promotor e elementos reguladores se baseiam no vetor pSMD2 (Ronzitti, et al., 2016). A transcrição do transgene de hOTC é adicionada por um promotor híbrido que contém intensificador de apolipoproteína E (ApoE) e promotor de alfa-1-antitripsina (hAAT) humana e terminados pelo sinal de poliadenilação de hemoglobina beta (HBB). A região de codificação e o promotor são separados por um íntron sintético beta-derivado por hemoglobina humana (HBB2) que foi modificado por remoção de quadros abertos de leitura alternativa maior que 50 pares de bases e sítios de splicing críptica (Ronzitti, et al., 2016).

[00187] A wt-hOTC foi otimizada por códon (CO) com diferentes algoritmos. O processo de otimização tem como objetivo aprimorar a tradução e estabilidade do OTC mRNA mudando-se a sequência de nucleotídeos enquanto a sequência primária de aminoácidos não variou. A sequência de OTC cDNA tipo selvagem, e a sequência de LW4 otimizada por códon (CO) do a Patente nº WO 2015/138357 A2 (Wang L., Wilson J.M.) foram também sintetizados, para serem usados como controle de comparação (CO1). A sequência de nucleotídeos dos CO cDNAs diferentes de uma faixa de 30 a 20% da sequência WT cDNA. Os vetores foram, então, acondicionados no serótipo AAV8 e usados para transduzir células de Huh7. As células de Huh7, cotransfectadas com os construtos OTC e os plasmídeos pGG2-eGFP (para normalizar para eficiência de transfecção), foram usados para gerar RNA total e proteínas. mRNA, proteína e níveis de atividade foram analisados com uso de qRT-PCR e Western blotting.

[00188] A transfecção foi demonstrada com uso de um plasmídeo de GFP para normalizar para eficiência. O DNA resultante foi amplificado

(topo, Figura 1) e os construtos CO3 e CO21 mostraram a maior eficiência de transfecção (fundo, Figura 1). Os recursos dos construtos CO3 e CO21 são mostrados nas Figuras 4 e 5, respectivamente. Quando os construtos foram executados em duplicata e, então, quantificados, diferenças significativas foram observadas entre o tipo selvagem (plasmídeo de GFP) e o vetores CO18 e CO21 (Figura 2). Os resultados de todos os experimentos (n=4) foram calculados em média e são apresentados na Figura 3. CO3 foi examinado da mesma maneira; os resultados são mostrados nas Figuras 7 a 8B.

[00189] As células ratadas também foram manchadas para examinar a localização do OTC (Figura 9).

[00190] Todas as preparações de DNA foram feitas em paralelo no mesmo dia com o mesmo com o mesmo kit de preparação de DNA a fim de evitar maiores diferenças na qualidade e quantificação do DNA.

EXEMPLO 2: EXPERIMENTOS DE CONSTRUTO DE VETOR SSAAV EM CAMUNDONGOS

[00191] Uma série de construtos de vetor ssAAV que expressam o transgene de OTC humano sob o controle transcripcional de um promotor específico de fígado foi desenvolvida. O wt-hOTC foi otimizado por códon (CO) com diferentes algoritmos (Figura 6, Tabela 1). Os diferentes algoritmos, incluindo uso de códon, sítios de splicing críptica, ORFs NA fita antissenso (ARF > 50 bp), estrutura secundária, teor de GC e ilhas de CpG, foram examinadas e, então, análise manual foi conduzida para determinar construtos candidatos. Os vetores foram, então, acondicionados no serótipo AAV8 e foram usados para transduzir camundongos machos e fêmeas WT C57Bl/6 e OTC^{spf-ash}.

[00192] Adicionalmente, os níveis de proteína, atividade catalítica (Figuras 10 a 11), e níveis de ácido orótico urinário (Figura 13) foram medidos, o que leva à identificação de um construto CO-hOTC que foi particularmente eficiente na correção do fenótipo dos camundongos

OTC^{spf-ash} (CO3). Proteína, atividade e quantificação de mRNA foram normalizados por genomas virais.

TABELA 1 SEQUÊNCIAS TRANSGÊNICAS EXEMPLIFICAS

[00193] Caixa alta em negrito indicam o códon de Parada e de Par-tida, letras minúsculas indicam a sequência Kozak.

Nome	Sequência	SEQ ID NO:
hOCT-001_cds_(WT)	GTCGACgcccgcaccATGCTGTTTAACTCTGAGGATCCTGTTAAACAATGCAGCTTT-TAGAAA- TGGTCACAACTTCATGGTTCGAAATTTTCGGTGTGGACAACCACTACAAAATAAAGT GCAGCTGAAGGGCCGTGACCTTCTCACTCTAAAAAATTTACCGGAGAAGAAAT-TAAATATA- TGCTATGGCTATCAGCAGATCTGAAATTTAGGATAAAACAGAAAGGAGAGTATTTGC CTTTATTGCAAGGGAAGTCCTTAGGCATGATTTTTGAGAAAAGAAGTACTCGAACAA-GATTG- TCTACAGAAACAGGCTTTGCACTTCTGGGAGGACATCCTTGTCTTCTACCAACACAA GATATTCAATTTGGGTGTGAATGAAAGTCTCACGGACACGGCCCGTGTATTGTCTAG-CATGG- CAGATGCAGTATTGGCTCGAGTGTATAAACAATCAGATTTGGACACCTGGCTAAAG AAGCATCCATCCCAATTATCAATGGGCTGTCAGATTTGTACCATCCTATCCAGA-TCCTGG- CTGATTACCTCACGCTCCAGGAACACTATAGCTCTCTGAAAGGTCTTACCCTCAGCT GGATCGGGGATGGGAACAATATCCTGCACTCCATCATGATGAGCGCAGCGAAATT-CGGAATG- CACCTTCAGGCAGCTACTCCAAAGGGTTATGAGCCGGATGCTAGTGTAACCAAGTT GGCAGAGCAGTATGCCAAAGAGAATGGTACCAAGCTGTTGCTGACAAA-TGATCCATTGGAAG- CAGCGCATGGAGGCAATGTATTAATTACAGACACTTGGATAAGCATGGGACAAGAAG AGGAGAAGAAAAAGCGGCTCCAGGCTTTCCAAGTTACCAGTTACAATGAAGAC-TGC- TAAAGTTGCTGCCTCTGACTGGACATTTTTACTGCTTGGCCAGAAAGCCAGAAGA AGTGGATGATGAAGTCTTTTATTCTCCTCGATCACTAGTGTCCAGAGGCAGAAAA-CA- GAAAGTGGAACATCATGGCTGTCATGGTGTCCCTGCTGACAGATTACTCACCTCAGC TCCAGAAGCCTAAATTTTGATAAgaattc	1
hOCT-CO1	GTCGACgcccgcaccATGCTGTTCAACCTGCGAATCCTGCTGAACAACGCCGCTTTT-CGGA- ACGGGCACAACTTTATGGTGAGGAACCTTCGCTGCGGACAGCCCTCCAGAATAAG GTCCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCCTGAAAAATTTACAGGGGAGGAAA-TCAAGTA- TATGCTGTGGCTGTCAGCTGATCTGAAGTTCCGGATCAAGCAGAAGGGCGAATATCT GCCTCTGCTCCAGGGCAAAAGCCTGGGGATGATCTTCGAAAAGCGCAGTACTCG-GACCAGAC- TGTCACCCGAGACTGGATTGCTCTGCTGGGAGGACACCCTTGTCTTCTGACCACTC AGGACATTCACCTGGGAGTGAACGAGTCCCTGACCGACACTGCTCGCGTCTGAG-CTCTA- TGGCCGACGCTGTGCTGGCTCGAGTCTACAAACAGTCCGACCTGGATACCTGGCC AAGGAAGCTTCTATCCCAATTATTAACGGCCTGTCAGACCTGTATCACCCATCCA-GATT- CTGGCCGATTACCTGACCCTCCAGGAGCACTATTCTAGTCTGAAAGGGCTGACACT GAGTTGGATTGGGGACGGAACAATATCCTGCACTCTATTATGATGTCAGCCG-CCAAGTTTG- GAATGCACCTCCAGGCTGCAACCCCAAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCAGTGACA AAGCTGGCTGAACAGTACGCCAAAGAGAACGGCACTAAGCTGCTGCTGAC-CAACGAC- CCTCTGGAGGCCGCTCACGGAGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATTAGTAT GGGACAGGAGGAAGAGAAGAAGAGCGGCTCCAGGCCTTCAGGGCTACCAGG-TGACAA- TGAAAACCGCTAAGGTCGACGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCAGA AAGCCGAAGAGGTGGACGACGAGGTCTTCTACTCTCCAGAAGCCTGGTGTCTT-CCCGAAG- CTGAGAATAGGAAGTGGAACATTATGGCAGTGTGGTCAAGCCTGCTGACTGATTATT CACCTCAGCTCCAGAAACCAAGTTCTGATAAgaattc	2
hOCT-CO2	GTCGACgcccgcaccATGCTGTTCAACCTGCGAATCCTGCTGAACAACGCCGCTTTT-CGGA- ACGGGCACAACTTTATGGTCCGCAACTTTCGCTGCGGACAGCCCTCCAGAATAAG GTCCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCCTGAAAAATTTACAGGGGAGGAAA-TCAAGTA- TATGCTGTGGCTGTCAGCTGATCTGAAGTTCCGGATCAAGCAGAAGGGCGAATATCT GCCACTGCTCAGGGCAAAAGCCTGGGGATGATCTTCGAAAAGCGCAGTACTCG-GACCAGAC- TGTCACCCGAGACTGGATTGCTCTGCTGGGAGGACACCCTTGTCTTCTGACAACTC AGGACATTCACCTGGGAGTGAACGAGTCCCTGACCGACACTGCTCGCGTCTGAG-CTCTA- TGGCCGACGCTGTGCTGGCTCGAGTCTACAAACAGTCCGACCTGGATACCTGGCC AAGGAAGCTTCTATCCCAATTATTAACGGCCTGTCAGACCTGTATCACCCATCCA-GATT- CTGGCCGATTACCTGACCCTCCAGGAGCACTATTCTAGTCTGAAAGGGCTGACACT GAGTTGGATTGGGGACGGAACAATATCCTGCACTCTATTATGATGTCAGCCG-CCAAGTTTG- GAATGCACCTCCAGGCTGCAACCCCAAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCAGTGACA AAGCTGGCTGAACAGTACGCCAAAGAGAACGGCACTAAGCTGCTGCTGAC-CAACGAC- CCTCTGGAGGCCGCTCACGGAGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATTAGTAT GGGACAGGAGGAAGAGAAGAAGAGCGGCTCCAGGCCTTCAGGGCTACCAGG-TGACAA- TGAAAACCGCTAAGGTCGACGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCAGA AAGCCGAAGAGGTGGACGACGAGGTCTTCTACTCTCCAGAAGCCTGGTGTCTT-CCCGAAG- CTGAGAATAGGAAGTGGAACATTATGGCAGTGTGGTCAAGCCTGCTGACTGATTATT CACCTCAGCTCCAGAAACCAAGTTCTGATAAgaattc	3

Nome	Sequência	SEQ ID NO:
	CTCTA- TGGCCGACGCTGTGCTGGCTCGAGTCTACAAACAGTCCGACCTGGATACCCCTGGCC AAGGAAGCTTCTATCCCAATTATTAACGGCCTGTCAGACCTGTATCACCCCATCCA- GATT- CTGGCCGATTACCTGACCCTCCAGGAGCACTATTCTAGTCTGAAAGGGCTGACACT GAGTTGGATTGGGGACGAAACAATATCCTGCACTCTATTATGATGTCAGCCG- CCAAGTTTG- GAATGCACCTCCAGGCTGCAACCCCAAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCAGTGACA AAGCTGGCTGAACAGTACGCCAAAGAGAACGGCACTAAGCTGCTGCTGAC- CAACGAC- CCTCTGGAGGCCGCTCACGGAGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATTAGTAT GGGACAGGAGGAAGAGAAGAAGAAGCGGCTCCAGGCCTTCAGGGCTACCAGGT- CAC- CATGAAAACCGCTAAGGTGCGCAGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCCA GAAAGCCCGAAGAGGTGGACGACGAGGTCTTCTACTCTCCACGCTCCCTGGTGTTT- CCCGAAGCTGAGAATAGGAAGTGGACAATTATGGCAGTGATGGTCAGCCTGCTGAC TGATTATTCACCTCAGCTCCAGAAACCAAGTTCTGATAAgaattc	
hOCT-CO3	GTCGACgcccgcaccATGCTGTTCAACCTGAGAATCCTGCTGAACAACGCCGCTTT- CGGA- ACGGCCACAACCTTCATGGTCCGCAACTTCCGCTGCGGCCAGCCACTGCAGAACAAAG GTGCAGCTGAAGGGCAGAGACCTGCTGACCCTGAAGAACTTCACCGCGCAGGAGA- TCAAATA- CATGCTGTGGCTGAGCGCCGATCTGAAGTTCAAGATCAAGCAGAAGGGCGAGTACC TGCCACTGCTGCAGGGCAAAAGCCTGGGCATGATCTTCGAAAAGCGCTCCACCCG- GACCAGA- CTGAGCACCGAGACCGGCTTCGCTCTGCTGGGAGGCCACCTTGTCTTCTGACAAAC CCAGGACATCCACCTGGGCGTGAAAGAGTCCCTGACCGACACCGCCAGAGTG- CTGAGCTCTA- TGGCCGACGCGCTGCTGGCTCGGGTGTAACAACAGTCCGACCTGGATACCCCTGGC CAAGGAAGCTTCCATCCCAATTATTAACGGCCTGTCCGACCTGTATCACCCCATCCA- GATT- CTGGCCGATTACCTGACCCTGCAGGAGCACTATAGCAGCCTGAAGGGCCTGACACT GTCTTGGATCGGCGACGGAAATAATATCCTGCACTCTATTATGATGTCTGCCG- CCAAGTTTG- GAATGCACCTGCAGGCTGTACCCCTAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCTGTGACA AAGCTGGCTGAACAGTACGCCAAAGAGAACGGCAACAAGCTGCTGCTGAC- CAACGAC- CCTCTGGAGGCCGCTCACGGAGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATTCTAT GGGACAGGAGGAAGAGAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCAGGGCTACCAGGT- CAC- CATGAAAACCGCTAAGGTGGCCGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCCA GAAAGCCCGAAGAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCCCGAGCCTGGTG- TTT- CCCGAAGCTGAGAATCGGAAATGGACAATATGGCTGTGATGGTGTCCCTGCTGACT GATTATTCTCCTCAACTGCAGAAACCTAAATTTTGATAAgaattc	4
hOCT-CO6	GTCGACgcccgcaccATGCTGTTCAACCTGCGCATCCTGCTGAACAACGCCGCTT- CCG- CAACGGCCACAACCTTCATGGTcagaAACTTCCGCTGCGGCCAGCCCCCTGCaaAACAA aGTGCAGCTGAAGGGCCGCGACCTGCTGACCCTGAAGAACTTCACCGCGCAGGA- GATCAaa- TACATGCTGTGGCTGAGCGCCGACCTGAAGTTCCGCATCAAGCAGAAGGGCGAGTA CCTGCCaCTGCTGCaaGGCAAGAGCCTGGGCATGATCTTCGAGAAGCGCAGCAC- CCGCAC- CCGCCTGAGCACCGAGACCGGCTTCGCCCTGCTGGGCGGCCACCCCTGCTTCCTG ACaACaCAGGACATCCACCTGGGCGTGAAACGAGAGCCTGACCGACACCGCCCGCG- TGCTGAG- CAGCATGGCCGACGCCGTGCTGGCCCGCGTGTAAGCAGAGCGACCTGGACACC CTGGCCAAGGAGGCCAGCATCCCCATCATCAACGGCCTGAGCGACCTGTACCAC- CCATCCA- GATCCTGGCCGACTACCTGACCCTGCAGGAGCACTACAGCAGCCTGAAGGGCCTG ACCCTGAGCTGGATCGGCGACGGCAACAAATCCTGCACAGiATiATGATGAGCG- CCG- CCAAGTTCCGgaATGCACCTGCAGGCCGCCACCCCAAGGGCTACGAGCCCCGACGC CAGCGTGACCAAGCTGGCCGAGCAGTACGCCAAGGAGAACGGCACCAAGCTGCTG- CTGAC- CAACGACCCCTGGAGGCCGCCACGGCGGCAACGTGCTGATCACCGACACCTGG ATCtATGGGCCAGGAGGAGGAGAAGAGAAGCGCCTGCAGGCCTTCAGGGC- TACCAGGT- cACiATGAAGACCGCCAAGGTGGCCGCCAGCGACTGGACCTTCTGCACTGCCTGC CCCGCAAGCCCCGAGGAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCCCGAGCCTGG- TGTT- CCCCGAGGCCGAGAACCGCAAGTGGACiATiATGGCCGTGATGGTctccCTGCTGACC GACTACAGCCCCAGCTGCAGAAAGCCCAAGTTCTGATAAgaattc	5
hOTC-CO6-1	GTCGACgcccgcaccATGCTGTTCAACCTGCGGATCCTGCTGAACAACGCCGCTTCA- GAAACGGCCACAACCTTCATGGTCCGAAACTTCAGATGCGGCCAGCCTCTGCAGAAC AAGGTGCAGCTGAAGGGCAGAGATCTGCTGACCCTGAAGAACTTCACCGG- CGAAGAGATCAA- ATACATGCTGTGGCTGAGCGCCGACCTGAAGTTCCGATTAAAGCAGAAGGGCGAGT ACCTGCCACTGCTGCAGGGAAAGTCTCTGGGCATGATCTTCGAGAAGCGGAGCAC-	6

Nome	Sequência	SEQ ID NO:
	CAGAAC- CAGACTGAGCACCGAGACAGGCTTTGCCCTGCTCGGAGGACACCCCTGCTTTCTGA CAACACAGGATATCCACCTGGGCGTGAACGAGAGCCTGACCGATACAGCCAGAG- TGCTGAG- CAGCATGGCTGATGCCGTGCTGGCCAGAGTGTAAGCAGAGCGATCTGGACACC CTGGCCAAAGAGGCCAGCATTCCCATCATCAACGGCCTGAGCGACCTGTATCAC- CCCATCCA- GATCCTGGCCGACTACCTGACACTGCAAGAGCACTACAGCAGCCTGAAGGGACTGA CCCTGTCTTGGATCGGCGACGGCAACAACATCCTGCACTCTATTATGATGAGCG- CCGCCAAG- TTCGGAATGCACCTGCAGGCCGCTACACCCAAGGGCTATGAGCCTGATGCCAGCGT GACAAAGCTGGCCGAGCAGTACGCCAAAGAGAACGGCACAAAGCTGCTGTGAC- CAACGATCCCCTGGAAGCTGCCACGGCGGCAATGTGCTGATCACCAGATACCTGGA TCTCTATGGGCCAAGAGGAAGAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGC- TACCAAG- TGACAATGAAGACCGCCAAGGTGGCCGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTG CCTCGGAAGCCTGAAGAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCTAGAAGCCTGG- TGTT- CCCCGAGGCCGAGAACAGAAAGTGGACCATCATGGCTGTGATGGTGTCCCTGCTGA CCGACTACTCTCCCCAGCTGCAGAAGCCCAAGTTCTGATAAgaattc	
hoCT-CO7	GTCGACgccgccaccATGCTGTTCAACCTGCGGATCCTGCTGAACAACGCCGCCTT- CCGGA- ACGGCCACAACCTTATGGTCCGGAACCTCCGCTGTGGCCAGCCCCCTGCAGAACAA GTGCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCTGAAGAACTTCAACGGCGAAGAGA- TCAAATA- CATGCTGTGGCTGAGCGCCGACCTGAAGTTCCGGATCAAGCAGAAGGGCGAGTAC CTGCCACTGCTGCAGGGCAAGTCTCTGGGCATGATCTTCGAGAAGCGGAGCAC- CCGGAC- CCGGCTGTCTACCGAGACAGGATTTGCCCTGCTGGGCGGCCACCTTGCTTTCTGA CAACACAGGATATCCACCTGGGCGTGAACGAGAGCCTGACCGACACAGCCAGAG- TGCTGAG- CAGCATGGCCGACGCGGTGCTGGCCAGAGTGTAAGCAGAGCGACCTGGACACC CTGGCCAAAGAGGGCAGCATCCCCATCATCAACGGCCTGTCCGACCTGTACCAC- CCCATCCA- GATCCTGGCAGACTACCTCACACTGCAGGAACACTACAGCTCCCTGAAGGGCCTGA CACTGAGCTGGATCGGCGACGGCAACAATATCCTGCACTCTATTATGATGAGCG- CCGCCAAG- TTCGGAATGCACCTGCAGGCCGCCACCCCAAGGGCTACGAGCCTGACGCCAGCG TGACCAAGCTGGCCGAGCAGTACGCCAAAGAGAACGGCACCAAGCTGCTGTGAC- CAACGAC- CCTCTGGAAGCCGCCACGGCGGCAACGTGCTGATACCGATACCTGGATCTCTAT GGGCCAGGAAGAGGAAAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGCTACCAAG- TGACAA- TGAAAGACCGCCAAAGTGGCCGCCAGCGACTGGACCTTCTGCACTGCCTGCCAG AAAGCCCGAAGAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCCCGGTCCCTGGTGTTC- CCCGAGG- CCGAGAACCAGGAAGTGGACAATTATGGCTGTGATGGTGTCTCTGCTGACCGACTAC TCCCCCAGCTGCAGAAGCCCAAGTTCTGATAAgaattc	7
hoTC-CO9	GTCGACgccgccaccATGCTCTTTAATCTGAGAATCCTGCTTAACAACGCCGCCTTCCG- CAACGGACACAACCTTATGGTCCGGAACCTCAGATGCGGCCAGCCTCTCCAAAACA AGGTCCAGCTTAAGGGCAGAGATCTGCTCACCCTCAAAAACCTCACCAGAGAGGAA- ATCAAG- TATATGCTGTGGCTGTCTGCCGATCTTAAGTTCCGGATCAACAGAAGGGGGAGTAC CTTCCGCTGCTGCAAGGGAAGTCACTCGGAATGATCTTCGAGAAGCGCTCCACTCG- GACCA- GGCTCAGCACCGAAACTGGATTGCACTCCTGGGTGGTATCCCTGTTTCCTGACC ACCCAAGATATCCACCTGGGCGTGAACGAATCCCTGACCGACACAGCTCGCGTG- CTG- TCCTCCATGGCCGACGTGTGTTGGCCCGGGTCTACAAGCAGAGCGACCTGGACA CTCTGGCCAAAGGAAGCCTCCATTCCGATCATCAATGGGCTGTCCGACCTGTACCAC- CCAATT- CAGATCCTGGCGGATTACTTGACCCTGCAAGAGCACTACAGCTCCCTGAAGGGACT GACCTCTCCTGGATTGGCGACGGGAACAACATCCTCCACTCGATTATGATGTCGG- CGG- CGAAGTTCGGCATGCATCTGCAAGCCGCCACTCCTAAGGGTTACGAACCGGACGCA AGCGTGACCAAGCTCGCCGAACAGTACGCGAAGGAAAACGGCACTAAGCTGTG- CTGAC- CAACGACCCCTGGAAGCCGCTCACGGCGGAAACGTGCTGATTACGGACACCTGG ATCAGCATGGGACAGGAGGAGGAGAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCGTTCCAGGGA- TACCAGGT- CACCATGAAAACCTGCCAAAGTGGCAGCCTCAGACTGGACTTTCTGCACTGCCTGC CTCGGAAGCCAGAGGAGGTGGACGATGAAGTGTTCCTACTCCCTCGCTCCCTGG- TGTTCCCG- GAGGCGGAAAACAGGAAGTGGACCATCATGGCCGTGATGGTGTCTATTGTTGACCGA TTACTCGCCGCAACTGCAGAAGCCCAAGTTTTGAgattc	8
hoTC-CO9-1	GTCGACgccgccaccATGCTGTTTAACTGAGAATCCTGCTGAACAATGCTGCTTTCCG- CAA- TGGGCACAACCTTTATGGTCCGAACTTCCGATGTGGACAGCCTCTGCAGAACAAAG TGACGCTGAAGGGCCGGGACCTGCTGACCTGAAGAATTTACAGGCGAGGAGAT-	9

Nome	Sequência	SEQ ID NO:
	CAAATA- CATGCTGTGGCTGAGCGCCGATCTGAAGTTTAGGATCAAGCAGAAGGGCGAGTATC TGCCACTGCTGCAGGGCAAGTCCCTGGGCATGATCTTCGAGAAGCGGAGCACCCG- GACAAGA- CTGAGCACCGAGACAGGATTTCGCACTGCTGGGAGGACACCCATGCTTTCTGACAAC ACAGGACATCCACCTGGGCGTGAACGAGTCTCTGACCGACACAGCACGGGTG- CTGAG- CTCCATGGCAGATGCCGTGCTGGCCAGAGTGTAAGCAGAGCGACCTGGATACCC TGGCCAAGGAGGCCTCCATCCCCATCATCAATGGCCTGTCTGACCTGTATACCCA- ATCCA- GATCTGGCCGATTACCTGACCCTGCAGGAGCACTATTCTAGCCTGAAGGGCCTGA CACTGAGCTGGATCGGCGACGGCAACAATATCCTGCACAGCATCATGATGTCCG- CCGCCAAG- TTTGGAATGCACCTGCAGGCAGCAACCCCAAAGGGATACGAGCCCCTGATGCTCCGT GACAAAGCTGGCCGAGCAGTATGCCAAGGAGAACGGCACCAAGCTGCTGCTGA- CAAATGAC- CCACTGGAGGCAGCACACGGAGGAACCTGCTGATCACCGATACATGGATCTCTAT GGGCCAGGAGGAGGAGAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTCCAGGGCTACCAGG- TGAC- CATGAAGACAGCCAAGGTGGCCGCTCTGATTGGACCTTTCTGCACTGTCTGCCCC GGAAGCCTGAGGAGGTGGACGATGAGGTGTTCTATCCCTCGGAGCCTGGTGTT- CCGA- GAGGCAGAGAATCGCAAGTGGACAATCATGGCCGTGATGCTCTCCCTGCTGACTGA CTACTCCCCACAGCTGCAGAAGCCCAAGTTTTGATAAgaattc	
hOTC-CO9-2	GTCGACgccgccaccATGCTCTTCAATCTCCGAATACTCCTGAATAATGCGGCATTCA- GAAA- TGGGCACAATTTTATGGTGCGAAATTTTCGATGTGGGCAGCCCTTGCAAAATAAAGT ACAACTTAAAGGCAGAGATCTTCTTACGCTCAAAAACCTTACC GGCGAAGAGAT- TAAGTATA- TGTTGTGGCTGTCTGCTGACCTTAAATTCGAATAAAACAGAAAGGCGAATACCTTC CGCTCCTCAAGGGAAATCTCTGGGATGATTTTCGAGAAGAGATCTACGCGCACG- CGG- CTTTCAACGGAACTGGATTTCGCACTCTTGGGCGGCCACCCATGTTTTCTGACTACT CAAGATATTCACCTGGGAGTAAATGAGTCACTTACTGACACGGCAAGAGTGCTCTC- TAG- CATGGCTGATGCAGTGCTGGCTAGAGTCTATAAACAATCCGACCTGGATACACTCGC CAAGGAAGCTTCAATACCAATAATCAACGGGTTGTCTGACTTGTACCACCCTA- TCCAAA- TCTTGGCCGATTATTTGACACTCCAGGAACACTACTCAAGTCTGAAGGGACTTACGC TTAGCTGGATAGGTGATGGTAACAACATCCTTCATAGCATTATGATGTCAGCCG- CCAAAT- CGGCATGCATCTGCAAGCAGCGACTCCCAAGGGCTATGAGCCTGATGCCTCAGTCA CCAAACTGGCGGAGCAGTACGCTAAAGAGAATGGGACGAAGCTTTTGCTGA- CGAACGATCCCTGGAGGCGGCTCACGGGGGAAATGTGCTTATCACGGATACCTG GATAAGTATGGGGCAGGAGGAAGAAAAAAGCGATTGCAAGCCTTTCAAGGT- TACCAGG- TTACAATGAAAACGCGAAAGTCGCCGCATCTGACTGGACTTTTCTGCACTGTCTTC CGAGAAAGCCGGAAGAGGTGGACGACGAAGTGTCTACTCTCCGCGCTCTCTCG- TGTT- CCTGAAGCAGAGAACCAGAAAGTGGACCATAATGGCGGTAATGGTCAGCCTCTTGAC TGATTATTCCCCTCAGCTGCAGAAGCCCAAGTTTTGATAAgaattc	10
hOTC-CO18	GTCGACgccgccaccATGCTGTTCAACCTGCGCATCTGCTGAACAACGCCGCCTT- CCG- CAACGGCCACAACCTCATGGTCAGAAACTCCGCTGCGGCCAGCCCTGCAAAACA AAGTGCAGCTGAAGGGCCGCGACCTGCTGACCCTGAAGAACTTACCGGCGAGGA- GATCAAA- TACATGCTGTGGCTGAGCGCCGATCTGAAGTTTCAAGTCAAGCAGAAGGGCGAGTA CTTGCCACTGCTGCAAGGCAAGAGCCTGGGCATGATCTTCGAGAAGCGCAGCAC- CCGCAC- CCGCCTGAGCACCGAGACCGGCTTCGCTCTGCTGGGAGGCCACCCCTGCTTCCTG ACAACCCAGGACATCCACCTGGGCGTGAACGAGAGCCTGACCGACACCGCCCGCG- TGCTGAG- CAGCATGGCCGACGCCGTGCTGGCTCGGGTGTAACAACAGTCCGACCTGGATACC CTGGCCAAGGAAGCTTCCATCCCCATCATCAACGGCCTGAGCGACCTGTACCAC- CCCATCCA- GATCCTGGCCGACTACCTGACCCTGCAGGAGCACTACAGCAGCCTGAAGGGCCTG ACCCTGAGCTGGATCGGCGACGGCAACAATATCCTGCACTCTATTATGATGTCTG- CCG- CCAAGTTTGAATGCACCTGCAGGCTGCTACCCCTAAAGGCTACGAACCCGATGCC TCTGTGACAAAGCTGGCTGAACAGTACGCCAAGAGAACGGCACAAAGCTGCTG- CTGAC- CAACGACCCTCTGGAGGCCGCTCACGGAGGCAACGTGCTGATCACCGACACCTGG ATCTCTATGGGCCAGGAGGAAGAGAAGAAGAAGCGGCTGCAGGCCTTCCAGGGC- TACCAGGT- CACCATGAAAACCGCTAAGGTGGCCGCCAGCGATTGGACCTTCTGCACTGCCTGC CCCGCAAGCCCAGGAGGTGGACGACGAGGTGTTCTACAGCCCCCGCAGCCTGG- TGTT- CCCCAGGGCCGAGAACCAGCAAGTGGACTATTATGGCCGTGATGGTGTCCCTGCTGA CTGATTATTCTCTCACTGCAGAAACCTAAATTTTGATAAgaattc	11

Nome	Sequência	SEQ ID NO:
hOTC CO21 (sequência inteira)	GTCGACgccgccaccATGCTGTTC AACCTGCGAATCCTGCTGAACAACGCCGCTTTT-CGGA- ACGGGCACAACCTTTATGGTGAGGAACCTTCGCTGCGGACAGCCCCCTCCAGAATAAG GTCCAGCTGAAGGGCAGGGACCTGCTGACCCTGAAAAATTTACAGGGGAGGAAA-TCAAATA- CATGCTGTGGCTGAGCGCCGATCTGAAGTTT CAGAATCAAGCAGAAGGGCGAGTACC TGCCCTCTGCTCCAGGGCAAAAGCCTGGGGATGATCTTCGAAAAGCGCAGTACTCG-GACCAGA- CTGTCAACCGAGACTGGCTTCGCTCTGCTGGGAGGCCACCCTTGCTTCCTGACAAC CCAGGACATTCACCTGGGAGTGAACGAGTCCCTGACCGACACTGCTCGCG-TCCTGAGCTCTA- TGGCCGACGCCGTGCTGGCTCGGGGTACAAACAGTCCGACCTGGATACCTGGC CAAGGAAGCTTCCATCCCCATCATCAACGGCCTGAGCGACCTGTACCAC-CCCATCCAGA- TCCTGGCCGACTACCTGACCCTGCAGGAGCACTACAGCAGCCTGAAGGGCCTGAC CCTGAGCTGGATCGGCGACGGCAACAATATCCTGCACCTATTATGATGTCTGCCG-CCAAAG- TTTGGAATGCACCTGCAGGCTGCTACCCCTAAAGGCTACGAACCCGATGCCTCTGT GACAAAGCTGGCTGAACAGTACGCCAAAGAGAACGGCACAAAGCTGCTGCTGAC-CAACGAC- CCTCTGGAGGCCGCTCACGGAGGCAACGTGCTGATCACCGATACCTGGATTAGTAT GGGACAGGAGGAAGAGAAGAAGACGGCTGCAGGCCTTCAGGGCTACCAGGT-CAC- CATGAAAACCGCTAAGGTGGCCGCCAGCGATTGGACCTTTCTGCACTGCCTGCCCA GAAAGCCCCAAGAGGTGGACGACGAGGTCTTCTACTCTCCAGAAAGCCTGGTGTTC- CCCGAAGCTGAGAATAGGAAGTGGACAATTATGGCAGTATGGTGTCCCTGCTGAC TGATTATTCTCTCAACTGCAGAAACCTAAATTTTGATAAgaattc	12
hOTC CO21 (ORF)	ATGCTGTTCAACCTGCGAATCCTGCTGAACAACGCCGCTTTTCGGAACGGGCA-CAACTTTA- TGGTGAGGAACTTTTCGCTGCGGACAGCCCCCTCCAGAATAAGGTCCAGCTGAAGGGC AGGGACCTGCTGACCCTGAAAAATTTACAGGGGAGGAAATCaaatacatgctgtgctgag- cgccgatctgaagttcagaatcaagcagaagggcgagctacTGCCCTGCTCCAGGGCAAAAGCCTG GGGATGATCTTCGAAAAGCGCAGTACTCGGACCAGACTGTCAACCGAGACTggcttcg- ctctgtctggaggccacccttgcttcctgacaaccagGACATTACCTGGGAGTGAACGAGTCCCTG ACCGACACTGCTCGCGTCTCTGAGCTCTatggccgacgcccgtgctgctgggtgtacaaaca- gtccgacctggataccctggccaaggaagcttccATCCCCATCATCAACGGCCTGAGCGACCTGTAC CACCCTATCCAGATCCTGGCCGACTACCTGACCCTGCAGGAGCACTACAGCAG-CCTGAAGGG- CCTGACCCTGAGCTGGATCGGCGACGGCAACAATATCCTGcactctattatgatgtctccgccca agtttggaatgcacctgcaggctgctaccctaaaggctacgaaccgatgcctctgtga- caaagctggctgaacagtacgccaagagaaacggcacaagctgctgctgaccaacgacctggaggccgctcacg gaggcaacGTGCTGATACCGATACCTGGATTAGTATGGGACAGGAGGga- agagaagaagaag- cggctgcaggccttcagggtaccaggtcaccatgaaaaccgctaaggtggccgagcagatTGGACCTTTCTG CACTGCCTGCCAGAAAGCCCCGAAGAGGTGGACGACGAGGTCTTCTACTCTCCCA- GAAG- CCTGGTGTTCCTCGAAGCTGAGAATAGGAAGTGGACAATTATGGCAGTgatgggtgtccctg ctgactgattattctcctcaactgcagaaacctaaatttga	13
hOTC-001_cds_(WT)	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMRNFRCGQLQNKVQLKGRDLLTLKNFTGEE- IKYMLWL- SADLKFRKQKGEYLP LLQKSLGMIFEKRSTRTRLSTETGFALLGGHPCFLT TQDIHLGV NESLTDARVLSMADAVLARVYKQSDLDTLAKEASIPINGLSDLYHP IQI- LADYLT LQEHYSSLKGLT LSWIGDGNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKL AEQYAKENGTKLLLTNDPLEAAHGGNVLTITDWISMGQEEEEKKR- LQAFQGYQVTMTAKVAASDWTFLHCLPRKPEEVDDDEVFYSRSLVFPEAENRKWTIM AVMVSLLTDYSPQLQKPKF*	14
hOTC-CO1	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMRNFRCGQLQNKVQLKGRDLLTLKNFTGEE- IKYMLWL- SADLKFRKQKGEYLP LLQKSLGMIFEKRSTRTRLSTETGFALLGGHPCFLT TQDIHLGV NESLTDARVLSMADAVLARVYKQSDLDTLAKEASIPINGLSDLYHP IQI- LADYLT LQEHYSSLKGLT LSWIGDGNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKL AEQYAKENGTKLLLTNDPLEAAHGGNVLTITDWISMGQEEEEKKR- LQAFQGYQVTMTAKVAASDWTFLHCLPRKPEEVDDDEVFYSRSLVFPEAENRKWTIM AVMVSLLTDYSPQLQKPKF*	15
hOTC-CO2	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMRNFRCGQLQNKVQLKGRDLLTLKNFTGEE- IKYMLWL- SADLKFRKQKGEYLP LLQKSLGMIFEKRSTRTRLSTETGFALLGGHPCFLT TQDIHLGV NESLTDARVLSMADAVLARVYKQSDLDTLAKEASIPINGLSDLYHP IQI- LADYLT LQEHYSSLKGLT LSWIGDGNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKL AEQYAKENGTKLLLTNDPLEAAHGGNVLTITDWISMGQEEEEKKR- LQAFQGYQVTMTAKVAASDWTFLHCLPRKPEEVDDDEVFYSRSLVFPEAENRKWTIM AVMVSLLTDYSPQLQKPKF*	16
hOTC-CO3	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFMRNFRCGQLQNKVQLKGRDLLTLKNFTGEE- IKYMLWL- SADLKFRKQKGEYLP LLQKSLGMIFEKRSTRTRLSTETGFALLGGHPCFLT TQDIHLGV NESLTDARVLSMADAVLARVYKQSDLDTLAKEASIPINGLSDLYHP IQI- LADYLT LQEHYSSLKGLT LSWIGDGNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKL	17

Nome	Sequência	SEQ ID NO:
	AEQYAKENGTKLLLTNDPLEAAHGGNVLTDTWISMGQEEEEKKR- LQAFQGYQVTMTAKVAASDWTFLHCLPRKPEEVDDDEVFYSRSLVFPEAENRKWTIM AVMVSLLTDYSPQLQKPKF*	
hOTC-CO6	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFVNRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTKNFTGEE- IKYMLWL- SADLKFRKQKGEYLP LLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTETGFALLGGHPCFLT TQDIHLGV NESLTD TARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPINGLS DLYHPIQI- LADYLT LQEHYSSKGLT LSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKL AEQYAKENGTKLLLTNDPLEAAHGGNVLTDTWISMGQEEEEKKR- LQAFQGYQVTMTAKVAASDWTFLHCLPRKPEEVDDDEVFYSRSLVFPEAENRKWTIM AVMVSLLTDYSPQLQKPKF*	18
hOTC-CO6-1	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFVNRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTKNFT GEE- IKYMLWLSADLKFRKQKGEYLP LLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALL- GGHPCFLT TQDIHLGVNESLTD TARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPINGLS- DLYHPIQILADYLT LQEHYSSKGLT LSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQA- TPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLTDTWISMGQEEEEKK- KRLQAFQGYQVTMTAKVA ASDWTF LHLCLPRKPEEVDDDEVFYSRSLVFPEAENRKW- TIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	19
hOTC-CO7	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFVNRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTKNFTGEE- IKYMLWL- SADLKFRKQKGEYLP LLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTETGFALLGGHPCFLT TQDIHLGV NESLTD TARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPINGLS DLYHPIQI- LADYLT LQEHYSSKGLT LSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKL AEQYAKENGTKLLLTNDPLEAAHGGNVLTDTWISMGQEEEEKKR- LQAFQGYQVTMTAKVAASDWTFLHCLPRKPEEVDDDEVFYSRSLVFPEAENRKWTIM AVMVSLLTDYSPQLQKPKF*	20
hOTC-CO9	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFVNRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTKNFTGEE- IKYMLWL- SADLKFRKQKGEYLP LLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTETGFALLGGHPCFLT TQDIHLGV NESLTD TARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPINGLS DLYHPIQI- LADYLT LQEHYSSKGLT LSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKL AEQYAKENGTKLLLTNDPLEAAHGGNVLTDTWISMGQEEEEKKR- LQAFQGYQVTMTAKVAASDWTFLHCLPRKPEEVDDDEVFYSRSLVFPEAENRKWTIM AVMVSLLTDYSPQLQKPKF*	21
hOTC-CO9-1	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFVNRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTKNFT GEE- IKYMLWLSADLKFRKQKGEYLP LLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALL- GGHPCFLT TQDIHLGVNESLTD TARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPINGLS- DLYHPIQILADYLT LQEHYSSKGLT LSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQA- TPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLTDTWISMGQEEEEKK- KRLQAFQGYQVTMTAKVA ASDWTF LHLCLPRKPEEVDDDEVFYSRSLVFPEAENRKW- TIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	22
hOTC-CO9-2	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFVNRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTKNFT GEE- IKYMLWLSADLKFRKQKGEYLP LLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALL- GGHPCFLT TQDIHLGVNESLTD TARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPINGLS- DLYHPIQILADYLT LQEHYSSKGLT LSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQA- TPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLTDTWISMGQEEEEKK- KRLQAFQGYQVTMTAKVA ASDWTF LHLCLPRKPEEVDDDEVFYSRSLVFPEAENRKW- TIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	23
hOTC-CO18	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFVNRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTKNFT GEE- IKYMLWLSADLKFRKQKGEYLP LLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTE TGFALL- GGHPCFLT TQDIHLGVNESLTD TARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPINGLS- DLYHPIQILADYLT LQEHYSSKGLT LSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQA- TPKGYEPDASVTKLAEQYAKENGTKLL LTNDPLEAAHGGNVLTDTWISMGQEEEEKK- KRLQAFQGYQVTMTAKVA ASDWTF LHLCLPRKPEEVDDDEVFYSRSLVFPEAENRKW- TIMAVMVSLLT DYSPQLQKPKF*	24
hOTC-CO21	MLFNLRILLNNAAFRNGHNFVNRNFRCGQPLQNKVQLKGRDLLTKNFTGEE- IKYMLWL- SADLKFRKQKGEYLP LLQGKSLGMIFEKRSTRTRLSTETGFALLGGHPCFLT TQDIHLGV NESLTD TARVLSSMADAVLARVYKQSD LDTLAKEASIPINGLS DLYHPIQI- LADYLT LQEHYSSKGLT LSWIGD GNNILHSIMMSAAKFGMHLQAATPKGYEPDASVTKL AEQYAKENGTKLLLTNDPLEAAHGGNVLTDTWISMGQEEEEKKR- LQAFQGYQVTMTAKVAASDWTFLHCLPRKPEEVDDDEVFYSRSLVFPEAENRKWTIM AVMVSLLTDYSPQLQKPKF*	25

EXEMPLO 3: ESTUDOS *IN VIVO* QUE TÊM COMO ALVO O FÍGADO

[00194] Estudos *in vitro* e *in vivo* foram conduzidos em camundongos e primatas não humanos para triar diversas variantes capsidiais AAV para a capacidade de ter como alvo o fígado com alta eficiência. Estudos pré-clínicos adicionais foram conduzidos para avaliar a segurança

e eficiência da combinação de vetores de AAV e nanocarreadores sintéticos que encapsulam rapamicina, o que demonstra a viabilidade de desenvolver uma abordagem terapêutica que permite repetir a dose em doenças com letalidade precoce.

EXEMPLO 4: TESTE *IN VITRO* DOS CONSTRUTOS AAV8-HOTC-CO

[00195] A linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano HUH7 foi usada para avaliar os níveis de expressão de construtos AAV8-hOTC-CO. Os plasmídeos dos construtos AAV8-hOTC-CO1 (CO1), AAV8-hOTC-CO2 (CO2), AAV8-hOTC-CO3 (CO3), AAV8-hOTC-CO6 (CO6), AAV8-hOTC-CO7 (CO7), AAV8-hOTC-CO9 (CO9), junto de um plasmídeo pGFP como um controle interno, foram cotransfectados de maneira transiente em células HUH7 com Lipofectamine (Lipofectamine 2000, Thermo Fisher Scientific). Vinte e quatro horas após a transfecção, o total dos lisados de proteína foi preparado e analisado para expressão de OTC por análise de Western blot.

[00196] Os resultados mostraram um aumento geral de expressão de proteína de OTC para todas as sequências sobre o construto hOTC-wt (WT) (Figura 14). O CO6 foi o construto mais eficiente, com um aumento na eficiência de expressão que foi cerca de 5 vezes maior que o construto WT, seguido por CO3 e CO7, que teve expressão aproximadamente 2,5 vezes maior em comparação aos construtos WT e CO1.

[00197] Duas estratégias foram adotados para gerar construtos AAV8-hOTC-CO adicionais com aprimorada capacidade de tradução: 1) os construtos OTC CO6 e CO9 foram “reotimizados” com o uso de algoritmos de bioinformática (Tabela 2); e 2) com base na análise das regiões mais conservadas da proteína OTC entre espécies (Figura 16), essas regiões foram selecionadas e embaralhadas entre os construtos AAV8-hOTC-CO mais eficientes.

TABELA 2. DESCRIÇÕES DE SEQUÊNCIA DE HOTC-CO

Nome	Descrição
hOTC-WT	Sequência de codificação de OTC humano WT do banco de genes
hOTC-CO1	Sequência de CO LW4 (Wang, L, 2012, Molecular Genetics and Metabolism)
hOTC-CO2	CO1 otimizada removendo-se sítios de splicing crípticos previstos
hOTC-CO3	CO1 otimizada removendo-se sítios adicionais
hOTC-CO6	Otimização feita pelo algoritmo JCat
hOTC-CO7	Otimização feita por GeneArt
hOTC-CO9	Otimização feita por DNA 2.0
hOTC-CO6-1	CO6, reotimizada por GeneArt
hOTC-CO9-1	CO9, reotimizada por GeneArt
hOTC-CO9-2	CO9, reotimizada por IDT
hOTC-CO18	Sequência quimérica com base no embaralhamento das regiões conservadas entre CO1, CO3 e CO6
hOTC-CO21	Sequência quimérica com base no embaralhamento das regiões conservadas entre CO1, CO3 e CO6

[00198] Um grupo de 3 novos construtos reotimizados por códon foi testado (CO6-1, CO9-1 e CO9-2). As células HUH7 foram transfectadas com os construtos WT, CO1, CO3, CO6-1, CO9-1, CO9-2. Os níveis de expressão de proteína OTC das proteínas CO6-1, CO9-1 e CO9-2 foram reduzidos em comparação a WT, CO1 e outros construtos testados anteriormente (Figura 15).

[00199] Um terceiro grupo de sequências de OTC otimizados por códon foi gerado a fim de manter um produto mais eficiente. A análise funcional das sequências de OTC ORF foi analisada a fim de identificar os domínios de proteína e regiões conservadas entre espécies. Essas regiões foram embaralhadas entre as sequências de CO1, CO3 e CO6 para obter as sequências de CO18 e CO21 (Figura 17). Os construtos de CO18 e CO21 foram os mais eficientes no aumento de níveis de proteína de OTC de até 5 a 6 vezes maior que o WT (Figura 18). A CO21 foi selecionada como o candidato para terapia gênica para deficiência

de OTC.

[00200] A localização intracelular dos construtos de WT, CO1 e CO3 na mitocôndria foi testada em células HUH7. As células HUH7 foram transfectadas com os construtos de WT, CO1 e CO3 e após 24 horas, as células foram manchadas com um marcador mitocondrial (MitoTracker® Red CMXRos, Invitrogen) e anticorpo anti-OTC (Abcam ab203859). A preparação resultante foi analisada por microscopia confocal. A localização de todos os construtos hOTC foi na mitocôndria, conforme demonstrado por sua colocalização intensa com o marcador mitocondrial (Figura 9).

EXEMPLO 5: TESTE DE *IN VIVO* DE CONSTRUTOS AAV8-HOTC-CO

[00201] Dois modelos animais de camundongo foram usados para os estudos descritos no presente documento: tipo selvagem (WT) C57Bl/6 camundongos e camundongos OTC^{spf-ash} da Jackson Laboratory (B6EiC3Sn a/A-Otc^{spf-ash}, número de estoque 001811). Após a avaliação *in vitro*, os construtos AAV8-hOTC-CO foram testados *in vivo* em camundongos WT C57Bl/6, e os construtos mais eficientes foram testados nos camundongos OTC^{spf-ash}. Esses experimentos incluíram comparação dos construtos otimizados por códon com hOTC do tipo selvagem.

[00202] Os construtos AAV8-hOTC-CO foram testados em camundongos machos e fêmeas adultos com oito semanas de idade que foram atribuídos aleatoriamente ao grupo de tratamento. Os camundongos foram tratados com uma injeção única na veia da cauda. Cinco doses diferentes (5,0E12 vg/kg, 1,25E12 vg/kg, 1,0E12 vg/kg, 5,0E11 vg/kg, e 2,5E11 vg/kg) foram testados para produzir expressão da proteína OTC substancial. De fato, o nível de expressão de hOTC exógena foi testado como alvo o suficiente para limitar a interferência de OTC endógena na análise.

[00203] Após o tratamento, os camundongos foram sacrificados em um momento específico, os fígados foram coletados e analisados para

níveis de proteína de OTC, atividade catalítica de OTC, e a quantificação de genomas virais por célula. As cópias virais genoma foram determinados por qPCR de DNA genômico extraído do pó hepático com o uso de um kit comercial (Promega Wizard™ Genomic DNA Purification Kit). A medição de genomas virais foi repetida três vezes da mesma preparação de DNA, e os valores médios são relatados.

[00204] Dez miligramas de pó hepático foram lisados com 200 µl de tampão de mitocôndria (0,5% de Triton, HEPES 10 mM, pH 7,4, ditioneitol 2 mM) com uso de um homogeneizador automático. Dejetos celulares foram eliminados por centrifugação a uma velocidade máxima durante 10 minutos e concentração total da proteína foi determinada por ensaio de Bradford. análise de Western blot foi realizada carregando-se quantidades iguais de proteínas (10 µg) em um gel de SDS-PAGE a 10%, que foi, em seguida, transferido em nitrocelulose e incubados com o anticorpo α-OTC (Abcam ab203859, diluição: 1:3.000 em 5% de leite-PBST). Antitubulina ou GAPDH foram usados como controles de carregamento.

[00205] A atividade de enzima de OTC foi medida três vezes. Um micrograma (1 µg) de proteína total do fígado foi incubada com 175 µl de Tampão de Reação preparado recentemente (ornitina 5 mM, fosfato de carbamila 15 mM, trietanolamina 270 mM, pH 7,7) durante 30 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida com 62,5 µl de solução de ácido fosfórico:ácido sulfúrico a 3:1. 12,5 µl de ,3-butanediona monoxima a 3% foram, então, imediatamente adicionados à reação, e as reações foram incubadas a 95 °C durante 15 minutos, protegidos contra luz. As amostras foram transferidas a uma placa com 96 poços, e a absorbância foi medida a 490 nm. A reação foi realizada em duplicata, e valores médios são relatados. Os níveis de proteína e de atividade enzimática foram normalizados pelos valores genômicos virais.

TESTE EM CAMUNDONGOS WT C57BL/6

[00206] Os construtos CO1, CO2, CO3, CO6, CO7, CO9 e WT foram testados em camundongos WT C57Bl/6 que foram atribuídos aleatoriamente a grupos de tratamento. Os camundongos foram tratados com uma injeção única na veia da cauda. O grupo e doses experimentais estão conforme nas Tabelas 13 a 15.

[00207] A transdução de camundongos machos WT C57Bl/6 com uma alta dose ($5,0E12$ vg/kg) resultou em CO3 e CO6 sendo os construtos com máxima eficiência, tanto em termos de expressão de proteína quanto atividade em comparação aos construtos CO1 e WT (Figuras 19 a 20, Tabelas 3 a 6). Em particular, os camundongos injetados com o construto CO3 tiveram níveis e atividade de OTC no fígado 3 a 4 vezes mais altas do que camundongos injetados com WT a concentrações de cópia genômica viral equivalente (Figuras 19 a 20, Tabelas 3 a 6). Além disso, os camundongos injetados com CO6 tiveram níveis e atividade de OTC no fígado 3 a 4 vezes mais altas do que camundongos injetados com WT (Figuras 19 a 20). As cópias genômicas viriais foram consistentes com os níveis e atividade de proteína (Figura 19).

[00208] A transdução de camundongos machos com uma dose inferior ($1,25E12$ vg/kg) confirmou que o construto de CO6 teve máxima eficiente, o que mostra atividade de OTC 3 a 4 vezes maior que a versão WT (Figura 21, Tabelas 7 a 9). O construto de CO3 resultou em atividade de OTC no fígado com 1,5 vez maior que os camundongos injetados com WT em cópias de genoma viral equivalentes (Figura 21, Tabelas 7 a 9).

[00209] Em contrapartida, a transdução de camundongos fêmeas C57Bl/6 mostraram maior variabilidade e um carga genômica viral inferior em alguns animais em comparação a machos (Figura 22, Tabelas 10 a 12). De fato, a transdução AAV reduzida em camundongos fêmeas já foi relatada (Davidoff et al., 2003). Os camundongos fêmeas C57Bl/6 injetados com $5,0E12$ vg/kg de CO3 tiveram expressão e atividade de

OTC de 3 a 4 vezes maior do que WT (Figura 22, Tabelas 10 a 12). Durante a medição dos níveis de mRNA de hOTC no fígado de camundongos transduzidos, não houve diferenças estatísticas entre construtos diferentes, o que sugere que a otimização por códon não afetou a eficiência da transcrição de gene (Figura 23).

[00210] Ao todo, esses dados sugeriram que a transfecção de HUH7 é um método de teste confiável para triar construtos otimizados códon e que a estratégia de otimização por códon foi eficaz na produção de um cassete de hOTC submetido à engenharia que pode ser, na expressão de transgene, mais eficiente que os transgenes tipo selvagem *in vivo*. Em particular, CO3 e CO6 foram confirmados como altamente eficientes na produção de níveis elevados de proteína OTC cataliticamente ativa.

TESTE EM CAMUNDONGOS OTC^{SPF-ASH}

[00211] Um segundo lote de construtos AAV-hOTC-CO foi preparado a fim de realizar experimentos em camundongos OTC^{spf-ash}. Esse segundo lote, foi testado primeira em camundongos machos WT C57BL/6 a fim de comparar a eficiência de transdução àquela do primeiro lote (Figura 24, Tabelas 16 a 19). Resultados semelhantes foram obtidos para a expressão de proteína, atividade catalítica de OTC, e cópias de genoma viral por célula como nos experimentos anteriores.

[00212] Com base em resultados *in vitro*, os construtos de CO21, CO1 e CO3 foram testados em camundongos WT C57BL/6. AAV8-OTC-CO21 teve máxima eficiência no aumento da expressão de proteína, com expressão de OTC e atividade catalítica 6 a 8 vezes maiores em comparação àquela do construto WT, e atividade catalítica 2 vezes maior que o construto de CO3 (Figura 25, Tabelas 20 a 23).

[00213] Os construtos WT, CO1, CO3 e CO6 construtos foram testados em camundongos OTC^{spf-ash} com oito semanas de idade (Tabela 24). Os camundongos OTC^{spf-ash} são um modelo estabelecido de OTCd

e são amplamente usados em estudos clínicos (Moscioni, et al., 2006; Cunningham, et al., 2011; Wang, et al., 2012). Os camundongos OTC^{spf-ash} portam uma mutação hipomórfica de guanina para adenosina nos últimos nucleotídeos do éxon 4 do gene de OTC, localizados no cromossomo X. Isso leva a silenciamento aberrante e produção de apenas 5% de mRNA submetidos corretamente a splicing e 5 a 10% de atividade enzimática residual de OTC. Camundongos macho OTC^{spf-ash} hemizigotos são viáveis, porém mostram vida útil quando mantidos em dieta normal. Clinicamente, os camundongos OTC^{spf-ash} apresentam retardo de crescimento, pele escassa, hiperamonemia e ácido orótico urinário aumentado. Mediante o desafio de crescimento de carga de nitrogênio, esses camundongos desenvolvem encefalopatia induzida por amônia. A ausência de diversos danos neurológicos graves em camundongos sob dieta normal indica que esses camundongos podem ser usados como um modelo para deficiência de OTC de início atrasado, uma forma mais branda da doença.

[00214] Nos camundongos de OTC^{spf-ash}, o tamanho de grupo mínimo necessário para atingir dos experimentos foi calculado com uso do software G*Power (Versão 3.1.9.3), considerando $\alpha=0,05$, $1-\beta=0,8$, duas caudas, tamanho semelhante do grupo, tamanho do efeito alto, considerando um valor de ácido orótico urinário em camundongos OTC^{spf-ash} não tratado de 600 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ de creatinina, e em camundongos tratados de 200 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ de creatinina $\pm$ SD de 100 μmol de ácido orótico/ mmol de creatinina, que corresponde a um efeito brando em correção do defeito (níveis de camundongos do tipo selvagem são cerca de 60 a 100 μmol ácido orótico/ mmol de creatinina). O grupo de tamanho mínimo calculado foi 3 camundongos, e 4 foram usados para experimentos descritos no presente documento.

[00215] Ácido orótico urinário foi usado para avaliar correção fenotípica após a transdução do construto AAV8-hOTC. Ácido orótico urinário

foi quantificado por cromatografia líquida de diluição de isótopo estável-espectrometria de massa, conforme descrito no presente documento. Urina foi coletada em tubos de 1,5 ml e centrifugada durante 1 minuto na velocidade máxima para clareamento. 10 µl de urina foi diluída em 90 µl de tampão isótopo estável (ácido 1,3-(¹⁵N₂)orótico 0,2 mM em NH₄OAc 1,25 mM). As amostras foram analisadas quanto a ácido orótico com uso de cromatografia líquida/espectrometria de massa em tandem com uso da transição 111,1>155,1 e 157>113 para ácido orótico de isótopo nativo e estável, respectivamente. A fase móvel consistiu em acetonitrila-0,1% Ácido fórmico. Os resultados foram padronizados contra níveis de creatinina, medidos com o uso de kit comercial enzimático (kit de Ensaio de Creatinina em Camundongo, 80350, Crystal Chem). Adaptado de Cunningham, et al., 2009.

[00216] O ácido orótico urinário em urina foi medido 1 dia antes da injeção e a cada 2 semanas após injeção. Todos os construtos rAAV8-hOTC injetados em camundongos OTC^{spf-ash} puderam reduzir níveis de ácido orótico, restaurando níveis fisiológicos a 8 semanas após injeção. Todos os vetores rAAV resultaram na normalização de ácido orótico urinário 8 semanas após a entrega do vetor, com CO1 e CO3 que tem cinética mais alta de ácido orótico de retorno a 2 semanas após tratamento (Figura 26, Tabela 25).

[00217] O nível de amônia plasmática foi também medido; no entanto, devido às flutuações deste no sangue de camundongo OTC^{spf-ash}, não pode ser considerado por si só como um parâmetro de teste altamente confiável. 50 µl de sangue foi coletado por perfuração submandibular em tubos que contém EDTA e imediatamente colocados em gelo. O plasma foi extraído por centrifugação a 3.000 rcf durante 15 minutos e amônia foi medida imediatamente com uso de um kit comercial (kit de ensaio amônia, MAK310, Sigma).

[00218] Quatro semanas após injeções com amônia WT, CO1, CO3

e CO6, os níveis foram significativamente reduzidos abaixo do nível fisiológicos (Figura 27, Tabela 26). Os fígados de camundongos machos OTC^{spf-ash} foram analisados para expressão de proteína, atividade catalítica de OTC e número de cópia de genoma viral. Na linhagem com camundongos WT C57Bl/6, CO3 e CO6 eficiência de transdução aprimorada significativamente, mediante um aumento de 4 vezes e 6 vezes na expressão de transgene, respectivamente, quando normalizado para as cópias de genoma viral (Figura 28, Tabelas 27 a 29). A atividade catalítica de OTC mostrou uma correlação intensa com níveis de proteína (Figura 28).

[00219] Os camundongos machos homozigotos OTC^{spf-ash} injetados com dose a 5,0E11 vg/kg foram analisados seguindo a mesma base lógica de experimento como o experimento descrito acima. O ácido orótico foi medido 1 dia antes da injeção e periodicamente a cada 2 semanas após administração viral. Os camundongos foram sacrificados 8 semanas após administração viral e fígados foram coletados para avaliar expressão de proteína OTC, atividade catalítica e número de cópia de genoma viral. Embora os camundongos injetados com CO3 tenham tido um aumento significativa de 3 a 4 vezes na expressão de OTC no fígado e atividade catalítica em comparação a animais WT tratados, cópias de genoma viral gerais e, conseqüentemente, expressão de hOTC e atividade foram reduzidos com importância reduzidos em comparação ao experimento descrito anteriormente (Figuras 29 a 30, Tabelas 34 a 36). Os níveis de ácido orótico foram reduzidos, porém não atingiram valores normais fisiológicos (Figura 30, Tabelas 37 a 38).

[00220] Camundongos machos com OTC^{spf-ash} hemizogotos injetados com uma dose AAV8 de 1,0E12 vg/kg foram sacrificados após 8 semanas, e os fígados foram coletados para avaliar OTC expressão de proteína, atividade catalítica de OTC e número de cópia de genoma vi-

ral. Esse experimento confirmou a eficácia aprimorada de CO3 em termos de expressão de proteína e atividade catalítica, quando em comparação a construtos WT e CO1 (Figura 31, Tabelas 39 a 41).

[00221] Camundongos OTC^{spf-ash} fêmea heterozigotos injetados com construtos de WT, CO1 e CO3 em duas doses (5,0E11 vg/kg e 1,0E12 vg/kg) tiveram uma eficiência reduzida e uma variabilidade aumentada, como já observado em experimentos de em camundongos WT C57Bl/6 (a Figura 32, Tabelas 42-43). No entanto, a análise de quantificação e da atividade de proteína hOTC no fígado de camundongos tratados com 1,0E12 vg/kg confirmou o construto de CO3 como o construto com máxima eficiência, tendo eficiência aumentada em até 4 a 5 vezes em comparação a WT e aumento de 1,5 a 2 vezes com relação a CO1 (Figura 33, Tabelas 44 a 46).

[00222] Em seguida, o construto de CO21 foi avaliado em camundongos OTC^{spf-ash}, em um experimento de comparação lado a lado, junto de construtos de WT e CO3, em uma dose inicial de 1,0E12 vg/ kg. Ademais, a fim de caracterizar ainda o construto CO21 como um candidato clínico potencial, um estudo de constatação de dose para CO21 foi realizado, com uso de três diferentes doses: 1,0E12 vg/kg, 5,0E11 vg/kg e 2,5E11 vg/ kg (Tabelas 47 a 49). O experimento de constatação de dose foi conduzido em uma comparação lado a lado com o construto WT.

[00223] A análise de camundongos OTC^{spf-ash} injetados com uma dose a 1,0E12 vg/kg mostraram que todos os três construtos puderam corrigir o fenótipo OTC, reduzir a concentração de ácido orótico urinário a níveis fisiológicos 2 semanas após injeção (Figura 35, Tabela 53). No entanto, CO21 demonstrou a melhor cinética e eficiência, mostrando uma redução mais estável ao longo do tempo (Figura 35). Os níveis de proteína de OTC e atividade catalítica análise no fígado de camundon-

gos injetados com CO3 ou CO21 mostraram um aprimoramento comparável na comparação ao WT (Figura 34, Tabelas 50 a 52).

[00224] A análise do ácido orótico urinário dos camundongos OTC^{spf-ash} injetados com a dose intermediária (5,0E11 vg/kg) demonstrou a eficácia mais frente de CO21 na correção do fenótipo reduzindo-se os níveis de ácido orótico até a faixa fisiológica. Em contrapartida, os camundongos de OTC^{spf-ash} injetados com WT na mesma dose produzem efeitos subterapêuticos, com ácido orótico acima de níveis fisiológicos (Figura 36, 37, Tabelas 54 a 57). A análise de níveis de proteína de OTC e de atividade catalítica confirmou a medição de ácido orótico. De fato, os camundongos tratados com CO21 tiveram expressão hOTC no fígado 4 vezes mais alta que pareceu corrigir o fenótipo OTC (Figuras 36, 38, Tabelas 55 a 57).

[00225] Por fim, constatou-se que os camundongos OTC^{spf-ash} injetados com a dose inferior (2,5E11 vg/kg) de WT e CO21 (2,5E11) foram parcialmente corrigidos. Conforme mostrado no gráfico de ácido orótico urinário, uma redução significativa de ácido orótico foi observado a 2 semanas após injeção, embora os níveis estivessem flutuando ao redor do limiar patológico e instáveis (Figura 40, Tabela 61). CO21 foi mantido em uma eficiência de expressão de hOTC, aproximadamente 3 vezes, do que WT (Figura 39, Tabelas 58 a 60).

[00226] Embora, esses dados sugerem que o CO21 é cerca de 5 vezes mais eficiente que o WT na expressão de um hOTC cataliticamente ativo no fígado. Devido à eficiência de expressão aumentada, CO21 fornece um efeito terapêutico na dose de 5,0E11 vg/kg, o que fornece proteína o suficiente para corrigir o fenótipo OTC^{spf-ash} (Figura 41, Tabela 62). 5,0E11 vg/kg é uma dose suficiente para restaurar níveis fisiológicos da proteína OTC e reduzir ácido orótico urinário a valores normais em camundongos OTC^{spf-ash}. Desse modo, o construto AAV8-hOTC-CO21 medeia uma correção eficiente e segura da deficiência OTC em

camundongos OTC^{spf-ash}.

EXEMPLO 6: DESAFIO DE AMÔNIA *IN VIVO*

[00227] Os camundongos OTC^{spf-ash} aumentaram níveis de amônia no sangue em comparação a camundongos do tipo selvagem. A eficiência de depuração de amônia (NH₄) do sangue foi examinada em camundongos OTC^{spf-ash} em um experimento de desafio de amônia. Os camundongos OTC^{spf-ash} foram injetados com uma única dose de 5,0E11 vg/kg de AAV8-hOTC-WT (WT) ou AAV8-hOTC-CO21 (CO21) (Tabela 63). 4 e 8 semanas após injeção, os camundongos foram submetidos a um experimento de desafio de amônia no qual 7,5 mmol/kg de uma solução NH₄Cl 0,64 M é injetada por via intraperitoneal. Os camundongos B6EiC3Sn-WT (WT-CH3) foram usados como controle.

[00228] 20 minutos após a injeção NH₄Cl, os camundongos foram submetidos a testes comportamentais para avaliara a crise de amônia (NH₄). Uma pontuação comportamental foi atribuída a cada camundongo de acordo com o esquema na Tabela 64 (Figuras 42, 44). Ataxia foi medida submetendo-se os animais a teste de túnel cego. As patas do camundongo foram imersas em tinta não tóxica (uma cor para as patas dianteiras e uma segunda cor para as patas traseiras), e o camundongo foi colocado em uma extremidade de um túnel cego (10 cm de largura x 50 cm de comprimento x 10 cm de altura). O fundo do túnel foi revestido com papel branco para analisar a maneira de andar. A resposta a som foi determinada colocando-se o camundongo 1,5 metro de um sino de 100 db e observando-se o comportamento após tocar o sino 3 vezes durante 5 segundos cada.

[00229] Após os testes comportamentais, 50 µl de sangue foram coletados dos camundongos, e amônia foi medida com o uso de um kit comercial (kit de ensaio de amônia, MAK310, Sigma). Ácido orótico urinário também foi medido.

TABELA 64: ESCALA DE PONTUAÇÃO COMPORTAMENTAL.

Categoria	Descrição de Comportamento	Pontuação
Intensidade da convulsão	Sem convulsão	2
	Mioclonia: movimentos espasmódicos espontâneos	1
	Convulsões clônicas tônicas: extensões rígidas de membros	0
Ataxia	Maneira de andar normal	2
	Maneira de andar anormal	1
	Incapaz de ficar de pé: deitado de lado	0
Resposta a som	Normal, sem resposta a som	3
	Torção das extremidades	2
	Pulando	1
	Moribundo ou deitado de lado	0

[00230] O experimento de desafio de amônia a 4 semanas após injeção demonstram que CO21 é altamente eficiente em proteger camundongos OTC^{spf-ash} do desafio de amônia, conforme mostrado pela pontuação de teste comportamental pela pontuação de e pela medição de níveis de NH₄ que foram comparáveis a animais wt (Figuras Tabela 65 a 69 Ademais, a correção foi mantida (estável) até que 8 semanas da injeção, quando camundongos tratados com CO21 foram ainda protegidos contra NH₄ e comparáveis a animais wt (Figuras 42, 44). O construto WT foi menos eficiente que o CO21 em depuração de amônia, em particular, durante o segundo experimento de desafio de amônia (Figura 44), em que a pontuação comportamental total atribuída estava pouco acima da pontuação atribuída a animais wt. Todos os dados medidos são consistentes com análise molecular de expressão e atividade de proteína OTC (Figuras 42 a 44).

EXEMPLO 7: A DELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS INTENSIFICADORAS APRIMORA A SEGURANÇA DE AAV8-HOTC-CO21 *IN VIVO*

[00231] O construto AAV8-hOTC-CO21 contém 105 sequências intensificadoras de nucleotídeos (nt) às repetições terminais invertido 5' e 3' (ITRs). As sequências intensificadoras foram apagadas (AAV8-hOTC-Δ-CO21, também denominadas de AAV8-hOTC-Δenh-CO21) para aumentar a segurança do construto AAV8-hOTC-CO21 *in vivo*. Hepatócitos humanos foram transduzidos com AAV8-hOTC-CO21 ou

AAV8-hOTC- Δ -CO21. AAV8-hOTC- Δ -CO21 mostraram níveis de proteína aumentados e níveis de atividade catalítica semelhantes em comparação AAV8-hOTC-CO21 (Figura 45).

[00232] Os camundongos OTC^{spf-ash} foram injetados ou com AAV8-hOTC-CO21 ou AAV8-hOTC- Δ -CO21. O construto AAV8-hOTC- Δ -CO21 reduziu ácido orótico urinário e produziu níveis de proteína que foram similares ao construto AAV8-hOTC-CO21 (Figura 46).

EXEMPLO 8: REDUÇÃO DE IMUNOGENICIDADE EM CAMUNDONGOS

[00233] Os pacientes pediátricos apresentam três desafios principais para terapia gênica: perda de vetor ao longo do tempo conforme o paciente envelhece, a administração de AAVs causa a produção de neutralizar anticorpos que limitam a possibilidade de retratar pacientes e respostas imunes celulares para AAV que causam inflamação no fígado e perda de expressão de transgene.

[00234] Os construtos de AAV8 que codificam transgenes (por exemplo, luciferase, alfa-ácido glucosidase, fator de coagulação Fator IX) foram injetados em camundongos WT C57BL/6 ou primatas não humanos (*Macaca fascicularis*) na presença de nanopartículas sintéticas para examinar a geração de anticorpos contra as proteínas AAV8-transgene.

[00235] Para experimentos em primatas não humanos, três macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) foram selecionados com base em sua falta de anticorpos neutralizantes de AAV8. No dia 0, os animais foram aleatorizados para o grupo de tratamento e infusão intravenosa recebida (30 ml/h de SVP[Rapa] (3 mg/kg de rapamicina, n=2 SVP[Rapa] n° 1 e SVP[Rapa] n° 2 ou SVP[vazio] (n=1) seguido imediatamente pela infusão intravenosa de um vetor AAV8-alfa-ácido glucosidase (AAV8-Gaa) (2,0E12 vg/kg). Um mês depois, cada animal recebeu uma segunda infusão de SVP[Rapa] (3 mg/kg de rapamicina, n=2 SVP[Rapa]n° 1 e SVP[Rapa] n° 2 ou SVP[vazio] (n=1), seguido pela infusão de do vetor

de fator de coagulação humano AAV8 Fator IX (AAV8-hFII.X) (2,0E12 vg/kg).

[00236] No camundongo e experimentos em primatas não humanos, sangue periférico foi coletado, e os soros foram isolados ou imediatamente transferidos aos tubos que contêm citratos ou EDTA para isolar o plasma, na linha basal e instantes indicados. Os linfonodos inguinais e do baço em necropsia em meio de RPMI fresco e diversos órgãos foram coletados e armazenados a -80° para análise adicional.

[00237] As nanopartículas sintéticas (SVPs) compostas pelos ácido polilático de polímeros(PLA) e ácido polilático-polietileno glicol (PLA-PEG) foram sintetizados com uso do método de evaporação de emulsão única de óleo em água como em Kishimoto, et al., 2016, Nat. Nanotechnology and Maldonado, et al., 2015, PNAS. Em suma, copolímeros em bloco de rapamicina, PLA e PLA-PEG foram dissolvidos em solução de diclorometano para formar a fase de óleo. A fase de óleo foi adicionada a uma solução aquosa de álcool polivinílico em tampão de fosfato seguido por sonicação. A emulsão então formada foi adicionada a um béquer que contém solução tampão de fosfato e agitados à temperatura ambiente para 2 horas para permitir que o diclorometano evapore. As nanopartículas resultantes que contêm rapamicina foram lavadas duas vezes por centrifugação a 76.6000xg + 4 °C, e o pélete foi suspenso novamente em solução tampão de fosfato. As nanopartículas puras sem rapamicina foram preparadas em condições idênticas sem rapamicina.

[00238] Os ensaios de medição de anticorpo foram realizados com uso de ELISA e ensaios de neutralização *in vitro* como em Meliani, et al., 2018, Nature Communications, Mingozzi, et al., 2013, Sci. Transl. Med and Meliani, et al., 2017, Blood Adv. Em suma, para o ensaio ELISA, placas Nunc™ MaxiSorp™ (Thermo Fisher Scientific) foram revestidas com partículas AAV (2,0E12 partículas/ml) e com diluição sérica de imunoglobulina purificada (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 para

amostras de murganho; IgG e IgM para amostras de primata não humano) para gerar uma curva padrão. Após a incubação de um dia para o outro a 4 °C, as placas foram bloqueadas com PBS-0,05% Tween-20 que contém 2% de albumina sérica bovina (BSA) e amostras diluídas apropriadamente foram colocadas em placas em duplicata. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 3 horas. Em seguida, as placas foram lavadas, e um anticorpo secundário conjugado a HRP foi adicionado aos poços e incubados durante 1 hora a 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas e, a presença de anticorpos ligados foram detectados com uso de substrato SIGMAFAST™ OPD medindo absorbância a 492 nm.

[00239] Os níveis de plasma do transgene F.IX humano foram medidos como no ensaio ELISA descrito no presente documento. A detecção de níveis de antígeno hFI.X em plasma de camundongo foi realizada com uso de anticorpos monoclonais contra hF.IX (GAFIX-AP, Affinity Biologicals). Em amostras de primata não humano, o anticorpo anti-hFIX (MA1-43012, Thermo Fisher Scientific) e o anticorpo anti-hFiIX-HRP (CL20040APHP, Tebu-bio) foram usados para revestimento e detecção, respectivamente.

[00240] As amostras séricas selecionadas também foram analisadas para titulação de anticorpo de neutralização anti-AAV com uso de um teste com base celular *in vitro* conforme em Meliani, et al., 2015, Hum. Gene. Ther. Methods. Em suma, diluições séricas de amostras inativadas por calor foram misturados com um vetor que expressa luciferase e incubados durante 1 hora. Após a incubação, as amostras foram adicionadas às células, e a expressão de luciferase residual foi medida após 24 horas. A titulação neutralizante foi determinada como a amostra mais alta na qual pelo menos 50% de inibição de expressão de luciferase foi medida em comparação a um controle de não inibição. Nesse ensaio,

uma titulação de anticorpo neutralizante (Nab) de 1:10 representa a titulação de uma amostra na qual após uma diluição em 10 vezes, um sinal de luciferase residual inferior a 50% do controle de não inibição é observado.

[00241] Os camundongos jovens P30 OTC^{spf-ash} foram injetados com 5,0E11 vg/kg de AAV8-hOTC-CO21 (CO21) para avaliar imunogenicidade. O ácido orótico urinário e anticorpos neutralizantes (NAb) foram medidas (Figura 47). A concentração de ácido orótico urinário em camundongos injetados com AAV8-hOTC-CO21 diminuiu para 2 semanas após injeção, porém aumentou subsequentemente. Os anticorpos neutralizantes também foram gerados em camundongos jovens OTC^{spf-ash} injetados com AAV8-hOTC-CO21. Os resultados apresentados no presente documento demonstram que a perda de vetor ocorre ao longo tempo e que a administração de AAVs causa produção de anticorpos neutralizantes. Isso limita potencialmente a possibilidade de tratar novamente pacientes, e causa respostas imunes celulares a AAV, o que causa inflamação de fígado e perda de expressão de transgene.

[00242] Os construtos de AAV8 foram acondicionados em partículas virais sintéticas (SVPs) que contém a rapamicina imunossupressora para examinar a capacidade da rapamicina (rapa) para suprimir imunogenicidade *in vivo*. Os camundongos C57BL/6 foram injetados com 4,0E12 vg/kg da AAV8-luciferase e SVP[rapa] (8 mg/kg) ou SVP[vazio]. 21 dias depois, os camundongos foram injetados com 4,0E12 vg/kg de AAV8-hFIX e SVP[rapa] (8 mg/kg) ou SVP[vazio]. Os níveis de anti-AAV8 IgG e hFIX foram medidos nos camundongos (Figura 48). A administração de SVP[rapa] diminuiu níveis anti-AAV8 IgG em comparação a camundongos que receberam SVP[vazio] ou AAV8-hFIX apenas. Os níveis de hFIX em camundongos que receberam SVP[rapa] foram semelhantes aos camundongos que receberam AAV8-hFIX apenas, e

significativamente aumentados em relação a camundongos administrados SVP[vazio] (Figura 48).

[00243] A imunogenicidade de construtos de AAV8 acondicionados em SVP[rapa] ou SVP[vazio] foi examinada ainda em primatas não humanos (*Macaca fascicularis*). Os primatas não humanos foram injetados ou com 2,0E12 vg/kg de AAV8-Gaa e 3 mg/kg de SVP[rapa] ou SVP[vazio]. 30 dias later, os primatas não humanos foram injetados com 2,0E12 vg/kg de AAV8-hFIX e 3 mg/kg de SVP[rapa] ou SVP[vazio]. Os níveis de anti-AAV8 IgG e hFIX foram medidos nos primatas não humanos (Figura 49). A administração de SVP[rapa] diminuiu os níveis anti-AAV8 IgG em comparação aos primatas não humanos que receberam SVP[vazio]. Os níveis de hFIX em primatas não humanos que receberam SVP[rapa] foram aumentados em relação a primatas não humanos administrados SVP[vazio]. Os resultados apresentados no presente documento sugerem que a administração concomitante de vetores de AAV e nanocarreadores sintéticos pode aumentar a expressão de transgenes e diminuir as respostas imunes ao vetor de AAV.

EXEMPLO 9: SVP-RAPAMICINA INIBE A RESPOSTA ANTI-AAV8 IGG CONTRA CAMUNDONGOS AAV8-OTC CO21 IN OTC^{SPF-ASH}

[00244] Os efeitos de diferentes doses de nanocarreadores sintéticos acoplados a rapamicina (SVP-rapamicina) e o construto AAV8-OTC CO21 na resposta de AAV8 IgG em camundongos OTC^{spf-ash} foram examinados. Os camundongos OTC^{spf-ash} foram dosados de acordo com o seguinte: (1) AAV8-OTC CO21 por si só ("AAV"), (2) AAV8-OTC CO21 + controle de nanopartícula vazia ("AAV + NPc"), (3) AAV8-OTC CO21 + 4 mg/kg SVP-Rapamicina ("AAV + SVP4"), (4) AAV8-OTC CO21 + 8 mg/kg SVP-Rapamicina ("AAV + SVP8"), ou (5) AAV8-OTC CO21 + 12 mg/kg SVP-Rapamicina ("AAV + SVP12") no dia 0. A resposta do anticorpo Anti-AAV8 IgG foi avaliada a 2 semanas após dosagem, e os re-

sultados são mostrados em uma Figura 50. Conforme mostrado na Figura, a administração do vetor AAV9-OTC CO21 e nanocarreadores sintéticos que compreendem rapamicina inibiu a resposta anti-AAV8 IgG independentemente da dose de nanocarreadores sintéticos que compreendem rapamicina administrada.

EXEMPLO 10

[00245] Nesse Exemplo são apresentadas as Tabelas 3 a 69 descritas nos Exemplos 1 a 9.

TABELA 3: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 19.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Intensidade de banda OTC/Tubulina (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Médio	Desvio padrão
1	OTC-wt (1668)	A2901	0,03	0,74	100	41
		A2902	0,03	0,79		
		A2903	0,06	1,47		
2	OT-C01 (1669)	A2904	0,07	1,79	162	15
		A2905	0,06	1,60		
		A2906	0,06	1,48		
3	OTC-C02 (1692)	A2907	0,07	1,81	286	174
		A2908	0,19	4,87		
		A2909	0,07	1,91		
4	OTC-C03 (1678)	A2910	0,10	2,62	329	73
		A2911	0,15	4,06		
		A2912	0,12	3,18		
1	OTC-wt (1668)	A2901	0,05	0,67	100	38
		A2902	0,06	0,91		
		A2903	0,10	1,41		
5	OTC-C06 (1679)	A2913	0,04	0,61	269	186
		A2914	0,22	3,27		
		A2915	0,29	4,19		
6	OTC-C07 (1680)	A2916	0,06	0,83	43	35
		A2917	0,01	0,16		
		A2918	0,02	0,29		
7	OTC-C09 (1681)	A2919	0,04	0,61	36	27
		A2920	0,01	0,08		
		A2921	0,03	0,41		

TABELA 4: QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE OTC DA FIGURA 19.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Atividade de OTC (μmol de citrulina/μg lisado/30 minutos)			Média Individual ± SD	Média Grupal ± SD
			Exemplo 1	Exemplo 2	Exemplo 3		
1	OTC-wt (1668)	A2901	45,36	112,6	88,6	82,2 ± 34,1	105,7±81,1
		A2902	29,32	69,0	18,5	38,9 ± 26,6	
		A2903	35,14	274,6	278,2	196,0 ± 139,3	
2	OT-C01 (1669)	A2904	77,44	116,9	218,2	137,5 ± 72,6	160,8±25,8
		A2905	135,76	139,1	290,7	188,5 ± 88,5	
		A2906	119,72	135,4	214,0	156,4± 50,5	
3	OTC-C02 (1692)	A2907	59,94	154,6	211,6	142,0 ± 76,6	165,5±36,0
		A2908	70,14	197,1	353,7	207,0 ± 142,0	
		A2909	81,8	117,4	243,4	147,5 ±84,9	
4	OTC-C03 (1678)	A2910	74,52	161,9	110,8	115,7 ± 43,9	250,5±119,2
		A2911	77,44	267,0	537,1	293,8 ± 231,0	
		A2912	164,92	306,1	554,9	342,0 ± 197,4	
5	OTC-C06 (1679)	A2913	182,42	161,2	311,7	218,4 ± 81,5	417,1±194,9
		A2914	115,34	386,1	773,5	425,0 ± 330,8	
		A2915	138,68	610,0	1075,3	608,0 ± 468,3	
6	OTC-C07 (1680)	A2916	204,3	156,0	235,2	198,5 ± 39,9	176,7±49,9
		A2917	147,42	200,2	288,5	212,0 ± 71,3	
		A2918	135,76	99,4	124,0	119,7 ± 18,6	
7	OTC-C09 (1681)	A2919	112,42	138,1	208,3	152,9 ± 49,6	136,4±19,9
		A2920	145,96	94,7	185,5	142,1 ± 45,5	
		A2921	131,38	85,9	125,7	114,3 ±24,8	
8	Não tratado	A2922	7,88	55,36	55,4	39,5 ± 27,4	41,2±2,4
		A2923	10,11	62,43	56,1	42,9 ± 28,6	

TABELA 5: QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIA DE GENOMA VIRAL DA FIGURA 19.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Genomas virais/célula		Médio	Média grupal ± SD
			Exemplo 1	Exemplo 2		
1	OTC-wt (1668)	A2901	20,7	18,6	19,6	16,9±3,3
		A2902	24,5	11,4	17,9	
		A2903	9,7	16,9	13,3	
2	OT-C01 (1669)	A2904	39,6	16,9	28,2	28,7±1,6
		A2905	25,1	29,6	27,4	
		A2906	40,9	20,1	30,5	
3	OTC-C02 (1692)	A2907	16,7	13,8	15,2	17,0±10,5
		A2908	8,8	6,2	7,5	
		A2909	29,4	27,1	28,2	
4	OTC-C03 (1678)	A2910	16,6	18,5	17,5	14,8±3,2
		A2911	13,4	9,0	11,2	
		A2912	20,0	11,3	15,6	
5	OTC-C06 (1679)	A2913	56,7	30,9	43,8	20,2±20,5

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Genomas virais/célula		Médio	Média grupal $\pm$ SD
			Exemplo 1	Exemplo 2		
		A2914	11,0	9,0	10,0	
		A2915	7,6	6,1	6,8	
		A2916	39,5	43,0	41,3	
6	OTC-C07 (1680)	A2917	28,6	30,3	29,5	53,3 $\pm$ 31,6
		A2918	88,6	89,7	89,1	
		A2919	52,4	45,3	48,8	
7	OTC-C09 (1681)	A2920	64,3	46,0	55,1	56,4 $\pm$ 8,3
		A2921	75,4	55,0	65,2	

TABELA 6: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 20.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Intensidade de banda OTC/Tubulina (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Médio	Desvio padrão
1	OTC-wt (1668)	A2901	0,48	0,67	100	43
		A2902	0,61	0,85		
		A2903	1,07	1,48		
2	OT-C01 (1669)	A2904	0,99	1,37	125	12
		A2905	0,90	1,24		
		A2906	0,82	1,13		
4	OTC-C03 (1678)	A2910	1,34	1,85	254	61
		A2911	2,04	2,81		
		A2912	2,15	2,97		
5	OTC-C06 (1679)	A2913	0,71	0,97	365	243
		A2914	3,09	4,27		
		A2915	4,13	5,71		

TABELA 7: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 21.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Intensidade de banda OTC/Tubulina (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Médio	Desvio padrão
9	OTC-wt (1668)	A3215	0,30	96%	100%	39
		A3216	0,19	63%		
		A3217	0,43	141%		
10	OT-C01 (1669)	A3218	0,29	96%	131%	31
		A3219	0,45	148%		
		A3220	0,46	150%		
11	OTC-C02 (1692)	A3221	0,41	133%	94%	35
		A3222	0,20	66%		
		A3223	0,25	81%		
12	OTC-C03 (1678)	A3224	0,26	86%	105%	41
		A3225	0,46	151%		
		A3226	0,23	76%		
9	OTC-wt (1668)	A3215	0,36	100%	100%	18
		A3216	0,30	82%		
		A3217	0,43	118%		

13	OTC-C06 (1679)	A3227	0,64	175%	222%	63
		A3228	0,72	196%		
		A3229	1,07	293%		
14	OTC-C07 (1680)	A3230	0,15	42%	58%	17
		A3231	0,28	76%		
		A3232	0,20	55%		
15	OTC-C09 (1681)	A3233	0,25	69%	146%	108
		A3234	0,81	223%		
		A3235				

TABELA 8: QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE OTC DA FIGURA 21.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Atividade de OTC (μmol de citrulina/μg lisado/30 minutos)			Médio	Médio ± SD
			Exp. 1	Exp. 1	Exp. 3		
9	OTC-wt (1668)	A3215	128,7	143,0	92,9	121,6	94,1 1 27,4
		A3216	113,4	101,1	67,3	93,9	
		A3217	85,9	21,0	93,7	66,9	
10	OT-C01 (1669)	A3218	67,7	311,0	114,8	164,5	138,8±29
		A3219	94,6	95,1	133,2	107,6	
		A3220	113,9	157,5	161,9	144,4	
11	OTC-C02 (1692)	A3221	69,0	53,0	70,8	64,3	74,2±30
		A3222	49,2	52,9	49,2	50,4	
		A3223	93,5	130,0	100,2	107,9	
12	OTC-C03 (1678)	A3224	122,5	84,3	150,4	119,1	123,1 1 15,2
		A3225	105,5	92,4	133,0	110,3	
		A3226	85,7	181,3	152,7	139,9	
13	OTC-C06 (1679)	A3227	164,0	93,2	197,6	151,6	305,5±198,6
		A3228	232,3	226,9	246,7	235,3	
		A3229	491,3	596,9	500,8	529,7	
14	OTC-C07 (1680)	A3230	54,7	41,4	95,8	64,0	93,9 1 30,2
		A3231	116,1	62,4	101,7	93,4	
		A3232	85,5	162,4	125,1	124,4	
15	OTC-C09 (1681)	A3233	129,1	143,1	104,2	125,5	108±24,9
		A3234	153,1	31,4	86,5	90,3	
		A3235					
16	Não tratado	A3236	55,1	88,4	57,5	67,0	62,9±6,8
		A3237	55,8	62,3	46,9	55,0	
		A3238	55,6	91,2	53,4	66,7	

TABELA 9: QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIA DE GENOMA VIRAL DA FIGURA 21.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Genomas virais/célula		Médio	Média grupal $\pm$ SD
			Exp. 1	Exp. 2		
9	OTC-wt (1668)	A3215	1,61	1,85	1,73	2,7 $\pm$ 1,1
		A3216	1,98	2,94	2,46	
		A3217	3,15	4,68	3,92	
10	OT-C01 (1669)	A3218	3,58	3,60	3,59	2,3 $\pm$ 1,4
		A3219	0,73	0,94	0,84	
		A3220	2,21	2,84	2,52	
11	OTC-C02 (1692)	A3221	2,16	2,86	2,51	5,4 $\pm$ 2,5
		A3222	6,34	7,78	7,06	
		A3223	5,23	8,13	6,68	
12	OTC-C03 (1678)	A3224	6,92	12,57	9,74	7,6 $\pm$ 3,4
		A3225	3,21	4,14	3,67	
		A3226	9,13	9,75	9,44	
13	OTC-C06 (1679)	A3227	1,91	2,03	1,97	1,7 $\pm$ 1,2
		A3228	2,02	3,45	2,73	
		A3229	0,24	0,41	0,32	
14	OTC-C07 (1680)	A3230	14,28	20,16	17,22	11,8 $\pm$ 5,4
		A3231	5,16	7,56	6,36	
		A3232	9,27	14,12	11,69	
15	OTC-C09 (1681)	A3233	5,97	6,40	6,18	2,9 $\pm$ 3,1
		A3234	1,81	2,86	2,34	
		A3235	0,09	0,21	0,15	

TABELA 10: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 22.

Grupo fêmea	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Intensidade de banda OTC/Tubulina (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Médio	Desvio padrão
1	OTC-wt (1668)	A2929	0,11	195%	100%	86
		A2930	0,01	27%		
		A2931	0,04	78%		
2	OT-C01 (1669)	A2932	0,10	193%	191%	112
		A2933	0,04	77%		
		A2934	0,16	302%		
3	OTC-C02 (1692)	A2935	0,08	142%	122%	51
		A2936	0,03	64%		
		A2937	0,09	160%		
4	OTC-C03 (1678)	A2938	0,13	242%	190%	75
		A2939	0,07	137%		
		A2940				
1	OTC-wt (1668)	A2929	0,11	159%	100%	59
		A2930	0,03	41%		
		A2931	0,07	100%		
5	OTC-C06	A2941	0,10	145%	103%	37

Grupo fêmea	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Intensidade de banda OTC/Tubulina (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Médio	Desvio padrão
	(1679)	A2942	0,06	90%		
		A2943	0,05	75%		
		A2944	0,26	375%		
6	OTC-C07 (1680)	A2945	0,15	213%	261%	100
		A2946	0,13	193%		
		A2947	0,05	71%		
7	OTC-C09 (1681)	A2948	0,12	169%	107%	54
		A2949	0,06	81%		

TABELA 11: QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE OTC DA FIGURA 22.

Grupo fêmea	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Atividade de OTC (μmol de citrulina/μg lisado/30 minutos)			Média Individual ± SD	Média Grupal ± SD
			Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		
1	OTC-wt (1668)	A2929	29,39	28,1	17,2	24,9 ± 6,7	16,3±8,2
		A2930	8,41	3,4	13,7	8,5 ± 5,2	
		A2931	14,29	9,9	22,2	15,5 ± 6,2	
2	OT-C01 (1669)	A2932	49,04	29,2	48,2	42,1 ± 11,2	33,6±21
		A2933	11,20	11,3	6,8	9,8 ± 2,6	
		A2934	60,23	56,1	30,7	49,0 ± 16,0	
3	OTC-C02 (1692)	A2935	38,60	20,6	32,7	30,6 ± 9,2	26,4±10,5
		A2936	14,27	9,2	20,0	14,5 ± 5,4	
		A2937	36,94	26,4	39,0	34,1 ± 6,8	
4	OTC-C03 (1678)	A2938	59,79	24,4	43,4	42,5 ± 17,7	35,3±10,2
		A2939	41,05	19,7	23,7	28,2 ± 11,3	
		A2940					
5	OTC-C06 (1679)	A2941	24,92	19,9	20,7	21,8 ± 2,7	16,3±4,8
		A2942	14,18	11,9	14,8	13,6 ± 1,5	
		A2943	12,54	12,1	15,9	13,5 ± 2,1	
6	OTC-C07 (1680)	A2944	76,87	32,5	93,2	67,5 ± 31,4	41,8±23,3
		A2945	40,60	30,1	36,7	35,8 ± 5,3	
		A2946	23,97	21,8	20,2	22,0 ± 1,9	
7	OTC-C09 (1681)	A2947	16,72	8,4	8,6	11,2 ± 4,7	28,1±30,7
		A2948	79,82	38,3	72,3	63,5 ± 22,1	
		A2949	23,23	4,8	0,5	9,5 ± 12,1	
8	Não tratado	A2950	29,39	7,8	13,3	16,8 ± 11,2	10,8±3,7
		A2951	8,41	13,7	4,2	8,8 ± 4,8	

TABELA 12: QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIA DE GENOMA VIRAL DA FIGURA 22.

Grupo fêmea	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Genomas virais/célula		Médio	Média grupal ± SD
			Exp. 1	Exp. 2		
1	OTC-wt (1668)	A2929	4,2	4,39	4,3	17,2±15,3
		A2930	31,4	36,85	34,1	
		A2931	12,6	13,90	13,3	
2	OT-C01 (1669)	A2932	6,6	9,82	8,2	12±7,9
		A2933	22,0	20,05	21,0	
		A2934	6,9	6,49	6,7	
3	OTC-C02 (1692)	A2935	15,5	14,42	15,0	21,3±15,3
		A2936	27,4	50,22	38,8	
		A2937	9,0	11,37	10,2	
4	OTC-C03 (1678)	A2938	10,1	9,10	9,6	8,5±7,7
		A2939	17,3	13,93	15,6	
		A2940	0,2	0,59	0,4	
5	OTC-C06 (1679)	A2941	28,3	21,11	24,7	31,1±7,4
		A2942	36,7	41,63	39,2	
		A2943	32,9	26,11	29,5	
6	OTC-C07 (1680)	A2944	6,2	9,74	7,9	16,8±8,7
		A2945	15,9	18,54	17,2	
		A2946	27,6	23,05	25,3	
7	OTC-C09 (1681)	A2947	45,4	36,86	41,1	22,2±17,3
		A2948	7,2	7,39	7,3	
		A2949	17,3	18,89	18,1	

TABELA 13: EXPERIMENTO 1 – ALTA DOSE – MACHOS.

Tabelas (machos)	Nome do vírus (código)	Lote viral	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/ camundongo	vírus a µl	PBS
1	OTC-wt (1668)	Primeira preparação	A2901	5,0E12	23,5	1,15E11	90,4	
			A2902	5,0E12	23,6	1,18E11	90,8	
			A2903	5,0E12	25,4	1,27E11	97,7	
2	OT-C01 (1669)	Primeira preparação	A2904	5,0E12	22,4	1,12E11	70	20
			A2904	5,0E12	22,4	1,12E11	70	20
			A2906	5,0E12	22,5	1,12E11	70,3	19,7
3	OTC-C02 (1692)	Primeira preparação	A2907	5,0E12	26	1,13E11	17,8	72,2
			A2908	5,0E12	22,3	1,15E11	15,3	74,7
			A2909	5,0E12	21	1,05E11	14,4	75,6
4	OTC-C03 (1678)	Primeira preparação	A2910	5,0E12	26,3	1,35E11	18,8	71,2
			A2911	5,0E12	26,1	1,35E11	18,6	71,4
			A2912	5,0E12	22,9	1,35E11	16,4	73,6
5	OTC-C06 (1679)	Primeira preparação	A2913	5,0E12	23	1,15E11	31,9	58
			A2914	5,0E12	26,8	1,34E11	37,2	52,8
			A2915	5,0E12	22,3	1,15E11	31	59
6	OTC-C07 (1680)	Primeira preparação	A2916	5,0E12	25	1,25E11	11,4	78,6
			A2917	5,0E12	23,8	1,19E11	10,8	79,2
			A2918	5,0E12	25,8	1,29E11	11,7	78,3
7	OTC-C09 (1681)	Primeira	A2919	5,0E12	25,3	1,25E11	17,1	72,9

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote viral	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/ camundongo	vírus a µl	PBS
8	sem tratamento	preparação	A2920	5,0E12	25,8	1,29E11	17,4	72,6
			A2921	5,0E12	22,1	1,15E11	14,9	75
			A2922		23,4			90
			A2923		23,8			90
			A2924		20,6			90

TABELA 14: EXPERIMENTO 1 – ALTA DOSE – FÊMEAS.

Grupo (fêmea)	Nome do vírus (código)	Lote viral	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/camundongo	vírus a µl	PBS
1	OTC-wt (1668)	Primeira preparação	A2929	5,0E12	18	9,0E10	69,2	20,7
			A2930	5,0E12	16,7	8,35E10	64,2	25,8
			A2931	5,0E12	18,8	9,4E10	72,3	17,7
2	OT-C01 (1669)	Primeira preparação	A2932	5,0E12	19,3	9,65E10	60,3	30
			A2933	5,0E12	16	8,0E10	50	40
			A2934	5,0E12	16,5	8,25E10	51,6	38
3	OTC-C02 (1692)	Primeira preparação	A2935	5,0E12	18	9E10	12,3	77,7
			A2936	5,0E12	17,9	8,95E10	12,3	77,7
			A2937	5,0E12	17	8,5E10	11,6	78
4	OTC-C03 (1678)	Primeira preparação	A2938	5,0E12	18,1	9,05E10	12,9	77
			A2939	5,0E12	17,4	8,7E10	12,4	77,5
			A2940	5,0E12	10,2	5,1E10	7,3	83
5	OTC-C06 (1679)	Primeira preparação	A2941	5,0E12	17,2	8,6E10	23,9	66
			A2942	5,0E12	18,4	9,2E10	25,6	64
			A2943	5,0E12	19	9,5E10	26,4	64
6	OTC-C07 (1680)	Primeira preparação	A2944	5,0E12	17,3	8,65E10	7,8	82
			A2945	5,0E12	17,1	8,55E10	7,7	82
			A2946	5,0E12	15,9	7,95E10	7,2	78
7	OTC-C09 (1681)	Primeira preparação	A2947	5,0E12	17	8,5E10	11,5	78
			A2948	5,0E12	18,1	9,05E10	12,2	72,6
			A2949	5,0E12	17,7	8,85E10	12	75
8	sem tratamento		A2950		17,1			90
			A2951		16,3			90
			A2952		18,7			90

TABELA 15: EXPERIMENTO 1 – BAIXA DOSE – FÊMEAS.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote viral	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/camundongo	vírus a µl	PBS
9	OTC-wt (1668)	Primeira preparação	A3215	1,25E+12	31	3,88 E+11	29,8	60,2
			A3216	1,25E+12	30	3,7E+11	28,8	61,2
			A3217	1,25E+12	29	3,6E+11	27,9	62,1
10	OT-C01 (1669)	Primeira preparação	A3218	1,25E+12	28	3,5E+11	21,9	68,1
			A3219	1,25E+12	31	3,8E+11	24,2	65,8
			A3220	1,25E+12	30	3,75E+11	23,4	66,6
11	OTC-C02	Primeira	A3221	1,25E+12	31	3,8E+11	5,3	84,7

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote viral	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/camundongo	vírus a µl	PBS
	(1692)	preparação	A3222	1,25E+12	32	4,0E+11	5,5	84,5
			A3223	1,25E+12	30,5	3,8E+11	5,2	84,8
12	OTC-C03 (1678)	Primeira preparação	A3224	1,25E+12	28	3,5E+11	5	85
			A3225	1,25E+12	27	3,4E+11	4,8	85,2
			A3226	1,25E+12	30	3,7E+11	5,4	84,6
13	OTC-C06 (1679)	Primeira preparação	A3227	1,25E+12	30	3,7E+11	10,4	79,6
			A3228	1,25E+12	29,5	3,7E+11	10,2	79,8
			A3229	1,25E+12	30	3,75E+11	10,4	79,6
14	OTC-C07 (1680)	Primeira preparação	A3230	1,25E+12	29	3,7E+11	3,3	86,7
			A3231	1,25E+12	32	4,0E+11	3,6	86,4
			A3232	1,25E+12	30	3,75E+11	3,4	86,6
15	OTC-C09 (1681)	Primeira preparação	A3233	1,25E+12	30	3,75E+11	5	84,9
			A3234	1,25E+12	30	3,75E+11	5	84,9
			A3235	1,25E+12	29	3,63E+11	4,9	85,1
16	sem tratamento		A3236	1,25E+12	28			90
			A3237	1,25E+12	32			90
			A3238	1,25E+12	29			90

TABELA 16: GRUPOS E DOSES EXPERIMENTAIS - SEGUNDA PREPARAÇÃO.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/camundongo	vírus a µl	PBS
17	OTC-wt (16137)	2ª preparação	A3250	1,25E+12	29	3,63E+10	3	47
			A3251	1,25E+12	32	4,00E+10	3,3	46,7
			A3252	1,25E+12	31	3,88E+10	3,2	46,8
18	OT-C01 (16138)	2ª preparação	A3253	1,25E+12	34	4,25E+10	4,4	45,6
			A3254	1,25E+12	31,5	3,94E +10	4,1	45,9
			A3255	1,25E+12	34	4,25E+10	4,4	45,6
19	OTC-C03 (16139)	2ª preparação	A3256	1,25E+12	25	3,13E+10	4,7	45,3
			A3257	1,25E+12	30	3,75E+10	5,7	44,3
			A3258	1,25E+12	30	3,75E+10	5,7	44,3
20	OTC-C06 (16140)	2ª preparação	A3259	1,25E+12	40	5,00E+10	6,9	43,1
			A3260	1,25E+12	30	3,75E+10	5,2	44,8
			A3261	1,25E+12	30	3,75E+10	5,2	44,8
21	sem tratamento		A3262	1,25E+12	36			50
			A3263	1,25E+12	36			50

TABELA 17: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 24.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Intensidade de Banda OTC/Tubulina (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Médio	Desvio padrão
17	OTC-wt (16137)	A3250	0,07	87%	100%	31%
		A3251	0,06	79%		
		A3252	0,10	135%		
18	OT-C01 (16138)	A3253	0,19	253%	253%	78%
		A3254	0,16	206%		

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Intensidade de Banda OTC/Tubulina (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Médio	Desvio padrão
		A3255	0,28	359%		
19	OTC-C03 (16139)	A3256	0,64	836%	459%	329%
		A3257	0,24	314%		
		A3258	0,17	227%		
		A3259	0,27	345%		
20	OTC-C06 (16140)	A3260	0,43	557%	451%	150%
		A3261	0,04			

TABELA 18: QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE OTC DA FIGURA 24.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Atividade de OTC (μmol de citrulina/μg lisado/30 minutos)		Fold change/ wtOTC/vg	Média ± SD
			Exp. 1	Exp. 2		
17	OTC-wt (16137)	A3250	44,1	43,4	68%	100 ± 33
		A3251	28,8	31,5	99%	
		A3252	52,1	44,2	133%	
18	OT-C01 (16138)	A3253	105,6	46,4	115%	86 ± 27
		A3254	95,4	38,1	82%	
		A3255	88,8	32,1	62%	
19	OTC-C03 (16139)	A3256				229 ± 67
		A3257	158,2	58,6	276%	
		A3258	132,7	58,5	181%	
20	OTC-C06 (16140)	A3259	96,4	34,7	74%	204 ± 145
		A3260	214,6	76,2	360%	
		A3261	162,2	52,8	179%	
21	sem tratamento	A3262	28,9	16,4		
		A3263	32,7	24,4		

TABELA 19: QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIA DE GENOMA VIRAL DA FIGURA 24.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Genomas virais/célula		Médio	Média grupal ± SD
			Exp. 1	Exp. 2		
17	OTC-wt (16137)	A3250	10,2	10,71	10,5	7,1 ± 3,0
		A3251	5,7	4,36	5,0	
		A3252	5,8	6,01	5,9	
18	OT-C01 (16138)	A3253	11,7	9,99	10,8	13,4 ± 2,6
		A3254	14,1	12,54	13,3	
		A3255	16,3	15,81	16,0	
19	OTC-C03 (16139)	A3256	1,4	1,27	1,4	5,5 ± 3,7
		A3257	6,9	6,03	6,4	
		A3258	9,4	7,85	8,6	
20	OTC-C06 (16140)	A3259	16,1	12,84	14,5	10,3 ± 4,0
		A3260	7,4	5,77	6,6	
		A3261	10,6	9,08	9,8	

TABELA 20: GRUPOS E DOSES EXPERIMENTAIS – CO1, CO3, CO21,

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso corporal (g)	Vg/camundongo	vírus a µl	PBS
22	OTCwt (16137)	2º preparação	A4723	1,25E+12	25	3,13E+10	2,31	47,69
			A4724	1,25E+12	27	3,38E+10	2,50	47,50
			A4709	1,25E+12	29	3,63E+10	2,69	47,31
			A4710	1,25E+12	28	3,50E+10	2,59	47,41
23	OTC1 (16138)	2º preparação	A4711	1,25E+12	28	3,50E+10	3,10	46,90
			A4712	1,25E+12	27	3,38E+10	2,99	47,01
			A4713	1,25E+12	28	3,50E+10	3,10	46,90
			A4722	1,25E+12	25	3,13E+10	2,77	47,23
24	OTC 3 (16139)	2º preparação	A4715	1,25E+12	30	3,75E+10	5,24	44,76
			A4716	1,25E+12	25	3,13E+10	4,37	45,63
			A4717	1,25E+12	26	3,25E+10	4,55	45,45
			A4720	1,25E+12	23	2,88E+10	4,02	45,98
25	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A4719	1,25E+12	26	3,25E+10	19,12	30,88
			A4721	1,25E+12	25	3,13E+10	18,38	31,62
			A4718	1,25E+12	25	3,13E+10	18,38	31,62
			A4708	1,25E+12	30	3,75E+10	22,06	27,94
26	sem tratamento		A4726					
			A4727					

TABELA 21: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 25.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Intensidade de Banda OTC/TUBULIN (normalizado em Vg)	Fold change/OT C-wt	Médio	médio
22	OTCwt (16137)	A4723	0,016	103%	100%	42
		A4724	0,021	140%		
		A4709	0,009	57%		
23	OTC1 (16138)	A4711	0,045	296%	345%	60
		A4712	0,050	327%		
		A4713	0,063	412%		
24	OTC 3 (16139)	A4715	0,051	330%	359%	75
		A4716	0,068	444%		
		A4717	0,046	303%		
25	OTC 21 (17115)	A4719	0,078	505%	561%	56
		A4721	0,086	562%		
		A4718	0,095	616%		

TABELA 22: QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE OTC DA FIGURA 25.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	OD 490 nm/vg	Fold change/wtOTC	Média ± SD
22	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A4723	0,0153	129%	100 ± 20
			A4724	0,0112	94%	
			A4709	0,0102	86%	
			A4710	0,0106	90%	
23	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A4711	0,0343	290%	341 ± 37
			A4712	0,0439	371%	
			A4713	0,0400	338%	
			A4722	0,0431	365%	
24	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A4715	0,0537	454%	477 ± 59
			A4716	0,0565	478%	
			A4717	0,0493	417%	
			A4720	0,0658	557%	
25	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A4719	0,0733	620%	618 ± 8
			A4721	0,0721	610%	
			A4718	0,0742	627%	
			A4708	0,0727	615%	

TABELA 23: QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIA DE GENOMA VIRAL DA FIGURA 25.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Genomas virais/célula		Médio	Média grupal ± SD
				Exp. 1	Exp. 2		
22	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A4723	20,3	23,4	21,9	25±7,8
			A4724	16,0	15,4	15,7	
			A4709	36,3	30,5	33,4	
			A4710	31,1	27,0	29,1	
23	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A4711	21,5	26,6	24,1	22,6±3,8
			A4712	26,3	28,2	27,2	
			A4713	16,7	20,4	18,6	
			A4722	20,0	21,1	20,5	
24	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A4715	31,1	31,1	31,1	23,9±6,5
			A4716	17,8	19,9	18,9	
			A4717	23,5	31,6	27,6	
			A4720	17,5	18,4	18,0	
25	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A4719	13,7			18,1±4,8
			A4721	24,6			
			A4718	18,7			
			A4708	15,4			

TABELA 24: GRUPOS E DOSES EXPERIMENTAIS - ESTUDO PILOTO OTC^{SPF-ASH}.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/camundongo	vírus a µl	PBS
27	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3633	5,0E+11	23,4	1,17E+10	9,00	41,00
			A3635	5,0E+11	25,5	1,28E+10	9,81	40,19
			A3636	5,0E+11	26,7	1,34E+10	10,27	39,73
			A3637	5,0E+11	28,7	1,44E+10	11,04	38,96
28	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3638	5,0E+11	28	1,40E+10	8,75	41,25
			A3640	5,0E+11	19,4	9,70E+09	6,06	43,94
			A3641	5,0E+11	26,8	1,34E+10	8,37	41,63
			A3642	5,0E+11	22	1,10E+10	6,87	43,13
29	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3643	5,0E+11	25	1,25E+10	1,79	48,21
			A3644	5,0E+11	23,3	1,17E+10	1,66	48,34
			A3645	5,0E+11	15	7,50E+09	1,07	48,93
			A3646	5,0E+11	17,1	8,55E+09	1,22	48,78
30	OTC 6 (17115)	Segunda preparação	A3647	5,0E+11	22,7	1,14E+10	3,15	46,85
			A3648	5,0E+11	21,4	1,07E+10	2,97	47,03
			A3657	5,0E+11	20,9	1,05E+10	2,90	47,10
			A3658	5,0E+11	22,4	9,50E+09	2,64	47,36
31	Sem tratamento		A3649					
			A3650					

TABELA 25: MEDIÇÃO DE ÁCIDO ORÓTICO URINÁRIO EM CAMUNDONGOS MACHO OTC^{SPF-ASH} NA FIGURA 26.

Grupo	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	µmol de ácido orótico/ mmol de creatinina				
			T0	T2 semanas	T4 semanas	T6 semanas	T8 semanas
27	OTCwt (16137)	A3633	530,6	-23,8	99,0	12,1	28,77
		A3635	1790,7	747,7	439,2	569,2	123,82
		A3636	84,6	62,8	94,4	328,8	87,54
		A3637	67,7	17,4	60,7	7,0	76,32
28	OTC1 (16138)	A3638	346,6	-12,6	44,4	11,2	43,25
		A3640	340,8	208,3	32,1	32,4	33,2
		A3641					
		A3642	240,8	6,0	215,1	5,0	28,81
29	OTC 3 (16139)	A3643	687,4	118,2	226,2	173,4	76,66
		A3644	77,6	566,5	305,9	6	52,55
		A3645	1247,8	423,7	5,0	167,9	59,43
		A3646	492,7	18,6	21,0	53,2	56,2
30	OTC 6 (17115)	A3647	273,4	519,6	183,2	134,7	173,62
		A3648	223,4	103,3	296,4	75,5	63,47
		A3657	657,9	425,8	76,1	18	69,75
		A3658	354,6	712,7	760,4	50,3	49,66
31	untr	A3649	1200,0	523,8	757,4	573,5	481,42
		A3650	670,0	577,6	991,5	500	703,48

TABELA 26: NÍVEIS DE AMÔNIA PLASMÁTICA EM CAMUNDONGOS OTC^{SPF-ASH} MACHO NA FIGURA 27.

Grupo	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	NH ₄ a mmol			
			T0		T4 semanas	
27	OTCwt (16137)	A3633	2,42	2,25 ± 0,21	0,79	0,72 ± 0,05
		A3635	2,03		0,71	
		A3636	2,44		0,71	
		A3637	2,1		0,68	
28	OTC1 (16138)	A3638	2,56	2,31 ± 0,24	1,25	1,02 ± 0,19
		A3640	2,01		1,07	
		A3641	2,25		0,79	
		A3642	2,41		0,96	
29	OTC 3 (16139)	A3643	3,07	2,92 ± 0,53	0,68	0,72 ± 0,11
		A3644	3,09		0,82	
		A3645	3,37		0,79	
		A3646	2,16		0,57	
30	OTC 6 (17115)	A3647	2,26	2,60 ± 0,60	0,75	0,74 ± 0,04
		A3648	1,93		0,79	
		A3657	2,97		0,71	
		A3658	3,22		0,71	
31	Não tratado		3,26	2,93 ± 0,47	3,93	3,76 ± 0,24
			2,59		3,59	
	WT		1,82	1,84 ± 0,02	1,89	1,78 ± 0,30
			1,85		1,46	

TABELA 27: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 28.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Vg/Kg	Intensidade de Banda OTC/Tubulina (normalizado em Vg)	Fold change vs. OTC-wt	Média ± SD
27	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3633	5,0E+11	1,813	94%	100 ± 28
			A3635	5,0E+11	2,041	105%	
			A3636	5,0E+11	2,598	134%	
			A3637	5,0E+11	1,287	67%	
28	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3638	5,0E+11	5,175	267%	191 ± 117
			A3640	5,0E+11	4,822	249%	
			A3641	5,0E+11			
			A3642	5,0E+11	1,093	57%	
29	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3643	5,0E+11	7,186	349%	357 ± 143
			A3644	5,0E+11	5,176	264%	
			A3645	5,0E+11	14,581	561%	
			A3646	5,0E+11	3,411	254%	
27	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3633	5,0E+11	2,244	105%	100 ± 26
			A3635	5,0E+11	2,237	105%	
			A3636	5,0E+11	2,697	126%	
			A3637	5,0E+11	1,374	64%	
29	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3643	5,0E+11	7,186	336%	355 ± 230
			A3644	5,0E+11	5,176	242%	

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Vg/Kg	Intensidade de Banda OTC/Tubulina (normalizado em Vg)	Fold change vs.OTC-wt	Média ± SD
30	OTC 6 (17115)	Segunda preparação	A3645	5,0E+11	14,581	682%	512 ± 298
			A3646	5,0E+11	3,411	160%	
			A3647	5,0E+11	19,657	919%	
			A3648	5,0E+11	5,335	250%	
			A3657	5,0E+11	7,201	337%	
			A3658	5,0E+11	11,615	543%	

TABELA 28: QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE OTC DA FIGURA 28.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	μmol de citrulina	Média ± SD	OD 490 nm / vg	Fold change/wtOTC	Média ± SD
27	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A4723	85,9	37,2 ± 32,7	0,03	139%	100 ± 20
			A4724	18,2		0,02	70%	
			A4709	17,9		0,03	130%	
			A4710	26,6		0,01	61%	
28	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A4711	62,8	94,8 ± 107,2	0,09	372%	236 ± 37
			A4712	52,0		0,05	191%	
			A4713	12,2		0,08		
			A4722	252,3		0,04	146%	
29	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A4715	70,3	79,9 ± 65,1	0,12	486%	365 ± 59
			A4716	46,3		0,06	239%	
			A4717	28,7		0,07	270%	
			A4720	174,1		0,11	465%	
30	OTC 6 (17115)	Segunda preparação	A4719	92,5	143,3 ± 57,1	0,30		802 ± 79
			A4721	218,4		0,23	934%	
			A4718	156,1		0,15	624%	
			A4708	106,0		0,21	847%	

TABELA 29: QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIA DE GENOMA VIRAL DA FIGURA 28.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Genomas virais/célula	Média ± SD
27	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A4723	1,07	0,5 ± 0,4
			A4724	0,30	
			A4709	0,15	
			A4710	0,58	
28	OTC 1 (16138)	Segunda preparação	A4711	0,30	1,0 ± 1,6
			A4712	0,45	
			A4713	0,03	
			A4722	3,39	
29	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A4715	0,23	0,3 ± 0,3
			A4716	0,26	
			A4717	0,14	
			A4720	0,72	
30	OTC 6 (17115)		A4719	0,14	0,3 ± 0,2

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Genomas virais/célula	Média ± SD
		Segunda preparação	A4721	0,44	
			A4718	0,47	
			A4708	0,21	

TABELA 30: GRUPOS E DOSES EXPERIMENTAIS- OTC^{SPF-ASH} MACHOS-DOSE INTERMEDIÁRIA.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/camundongo	vírus a µl	PBS
32	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3917	5,0E+11	20	1,00E+10	0,83	49,17
			A3918	5,0E+11	20	1,00E+10	0,83	49,17
			A3919	5,0E+11	22	1,10E+10	0,92	49,08
			A3920	5,0E+11	22	1,10E+10	0,92	49,08
			A3921	5,0E+11	20	1,00E+10	0,83	49,17
33	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3922	5,0E+11	14	7,00E+09	0,73	49,27
			A3923	5,0E+11	19	9,50E+09	0,99	49,01
			A3924	5,0E+11	22	1,10E+10	1,15	48,85
			A3925	5,0E+11	22	1,10E+10	1,15	48,85
			A3926	5,0E+11	22	1,10E+10	1,15	48,85
34	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3927	5,0E+11	20	1,00E+10	1,52	48,48
			A3930	5,0E+11	20	1,00E+10	1,52	48,48
			A3931	5,0E+11	16	8,00E+09	1,21	48,79
			A3932	5,0E+11	18	9,00E+09	1,36	48,64
			A3933	5,0E+11	19	9,50E+09	1,44	48,56

TABELA 31: GRUPOS E DOSES EXPERIMENTAIS- MACHOS OTC^{SPF-ASH} - ALTA DOSE.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/camundongo	vírus a µl	PBS
35	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3937	1,0E+12	22	2,20E+10	1,83	48,17
			A3938	1,0E+12	22	2,20E+10	1,83	48,17
			A3939	1,0E+12	22	2,20E+10	1,83	48,17
			A3940	1,0E+12	19	1,90E+10	1,58	48,42
			A3941	1,0E+12	19	1,90E+10	1,58	48,42
36	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3976	1,0E+12	20	2,00E+10	2,08	47,92
			A3977	1,0E+12	23	2,30E+10	2,40	47,60
			A3978	1,0E+12	22	2,20E+10	2,29	47,71
			A3979	1,0E+12	21	2,10E+10	2,19	47,81
			A3991	1,0E+12	18	1,80E+10	1,88	48,13
37	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3992	1,0E+12	17	1,70E+10	2,58	47,42
			A3993	1,0E+12	15	1,50E+10	2,27	47,73
			A3994	1,0E+12	21	2,10E+10	3,18	46,82
			A3995	1,0E+12	21	2,10E+10	3,18	46,82
			A3996	1,0E+12	19	1,90E+10	2,88	47,12
38	Sem tratamento		A3934					
			A3935					

**TABELA 32: GRUPOS E DOSES EXPERIMENTAIS- OTC^{SPF-ASH} FÊ-
MEAS-DOSE INTERMEDIÁRIA.**

Grupo fêmea	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/camundongo	vírus a µl	PBS
32	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3865	5,0E+11	20,8	1,04E+10	0,87	49,13
			A3866	5,0E+11	20,4	1,02E+10	0,85	49,15
			A3867	5,0E+11	25	1,25E+10	1,04	48,96
			A3868	5,0E+11	21,5	1,08E+10	0,90	49,10
			A3869	5,0E+11	23	1,15E+10	0,96	49,04
33	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3870	5,0E+11	22	1,10E+10	1,15	48,85
			A3871	5,0E+11	21	1,05E+10	1,09	48,91
			A3872a	5,0E+11	23	1,15E+10	1,20	48,80
			A3872b	5,0E+11	20,5	1,03E+10	1,07	48,93
			A3873	5,0E+11	26,5	1,33E+10	1,38	48,62
34	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3874	5,0E+11	23,3	1,17E+10	1,77	48,23
			A3875	5,0E+11	25	1,25E+10	1,89	48,11
			A3876	5,0E+11	23,5	1,18E+10	1,78	48,22
			A3877	5,0E+11	22	1,10E+10	1,67	48,33
			A3878	5,0E+11	21	1,05E+10	1,59	48,41

**TABELA 33: GRUPOS E DOSES EXPERIMENTAIS- OTC^{SPF-ASH} FÊ-
MEAS-DOSE ALTA.**

Grupo fêmea	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/camundongo	vírus a µl	PBS
35	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3888	1,0E+12	23	2,30E+10	1,92	48,08
			A3889	1,0E+12	22	2,20E+10	1,83	48,17
			A3890	1,0E+12	21	2,10E+10	1,75	48,25
			A3891	1,0E+12	22	2,20E+10	1,83	48,17
			A3892	1,0E+12	20	2,00E+10	1,67	48,33
36	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3893	1,0E+12	22	2,20E+10	2,29	47,71
			A3894	1,0E+12	21,5	2,15E+10	2,24	47,76
			A3895	1,0E+12	18,5	1,85E+10	1,93	48,07
			A3896	1,0E+12	18	1,80E+10	1,88	48,13
			A3897	1,0E+12	18,5	1,85E+10	1,93	48,07
37	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3898	1,0E+12	18	1,80E+10	2,73	47,27
			A3899	1,0E+12	19	1,90E+10	2,88	47,12
			A3900	1,0E+12	17	1,70E+10	2,58	47,42
			A3901	1,0E+12	17	1,70E+10	2,58	47,42
			A3902	1,0E+12	19	1,90E+10	2,88	47,12

TABELA 34: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 29.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Intensidade de Banda OTC/Tubulina (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Média ± SD
32	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3917	4,26	84%	100 ± 25
			A3918	5,54	109%	
			A3919	3,28	64%	

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Intensidade de Banda OTC/Tubulina (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Média ± SD
			A3920	6,43	126%	
			A3921	5,97	117%	
33	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3922	6,26	123%	214 ± 108
			A3923	10,38	204%	
			A3924	5,06	99%	
			A3925	17,94	352%	
			A3926	14,82	291%	
32	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3917	7,04	102%	100 ± 27
			A3918	3,95	57%	
			A3919	7,17	104%	
			A3920	9,11	132%	
			A3921	7,18	104%	
34	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3927	15,66	227%	171 ± 70
			A3930	5,40	78%	
			A3931	10,25	149%	
			A3932	15,78	229%	
			A3933			

TABELA 35: QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE OTC DA FIGURA 29.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	mmol de citrulina	OD 490 nm/vg	Fold change/wtOTC	Média ± Desvio Padrão
32	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3917	6,06	6,39	56%	100 ± 32,7
			A3918	6,35	9,16	80%	
			A3919	7,02	14,63	128%	
			A3920	6,30	11,69	102%	
			A3921	5,77	15,34	134%	
33	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3922	20,20	50,28	439%	194 ± 143,3
			A3923	8,80	21,59	189%	
			A3924	6,83	13,17	115%	
			A3925	8,66	8,97	78%	
			A3926	8,85	16,76	147%	
34	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3927	9,33	20,85	182%	397 ± 275,5
			A3930	41,18	90,58	792%	
			A3931	21,93	43,28	378%	
			A3932	19,05	27,16	237%	
			A3933				
38	Não tratado		A3934	5,14			

TABELA 36: QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIA DE GENOMA VIRAL DA FIGURA 29.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Genomas Virais/ células	Média ± SD
32	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3917	0,05	0,086 ± 0,034
			A3918	0,06	
			A3919	0,13	

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Genomas Virais/ células	Média ± SD
			A3920	0,08	
			A3921	0,11	
33	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3922	0,31	0,146 ± 0,098
			A3923	0,13	
			A3924	0,07	
			A3925	0,07	
			A3926	0,15	
34	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3927	0,15	0,325 ± 0,160
			A3930	0,52	
			A3931	0,37	
			A3932	0,26	
			A3933		

TABELA 37: MEDIÇÃO DE ÁCIDO ORÓTICO URINÁRIO EM CAMUNDONGOS MACHO OTC^{SPF-ASH} NA FIGURA 30.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	μmol de ácido orótico/ mmol de creatinina				
			T0	T2 semanas	T4 semanas	T6 semanas	T8 semanas
32	OTCwt (16137)	A3917	377,0	605,7	480,6	324,2	387,2
		A3918	558,2	378,2	387,5	575,0	415,9
		A3919	345,4	336,2	175,8	150,0	218,5
		A3920	348,2	237,6	127,0	438,8	321,0
		A3921	306,8	348,0	120,9	591,4	399,2
33	OTC1 (16138)	A3922	279,3	493,6	138,9	468,0	149,5
		A3923	537,5	247,6	120,3	544,7	220,5
		A3924	497,1	390,3	512,8	310,5	170,8
		A3925		351,4	264,4	250,7	308,3
		A3926	469,8	391,4	263,8	152,3	232,8
34	OTC 3 (16139)	A3927	546,0	372,0	315,1	177,7	304,1
		A3930	404,2	80,9	63,2	39,1	68,8
		A3931	331,7	451,5	150,6	184,5	204,8
		A3932	291,9	229,1	143,0	242,7	171,9
		A3933	286,9	79,2	125,9	107,1	158,4
38	Não tratado	A3934	400,2	561,0	525,0	689,5	535,2

TABELA 38: QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ORÓTICO URINÁRIO EM CAMUNDONGOS OTC^{SPF-ASH} NA FIGURA 30.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	μmol de citrulina	Média ± SD
32	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3917	6,06	6,3 ± 4,6
			A3918	6,35	
			A3919	7,02	
			A3920	6,30	
			A3921	5,77	
33	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3922	20,20	10,7 ± 5,4
			A3923	8,80	
			A3924	6,83	

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	μmol de citrulina	Média ± SD
34	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3925	8,66	22,9 ± 13,3
			A3926	8,85	
			A3927	9,33	
			A3930	41,18	
			A3931	21,93	
			A3932	19,05	
			A3933		
38	Não tratado		A3934	5,14	
	C57Bl/6 WT			47	51,5 ± 6,4
				56	

TABELA 39: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 31.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Intensidade de Banda OTC/HSP70 (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Médio	Desvio padrão
35	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3937	0,91	54%	100%	30
			A3938	2,06	122%		
			A3939	1,51	89%		
			A3940	2,21	131%		
			A3941	1,77	105%		
36	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3976	4,36	258%	340%	184
			A3977	9,51	562%		
			A3978	1,27	75%		
			A3979	7,11	420%		
			A3991	6,55	387%		
35	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3937	0,96	51%	100%	47
			A3938	1,56	84%		
			A3939	1,52	81%		
			A3940	3,30	177%		
			A3941	2,01	107%		
37	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3992	25,33	1355%	535%	483
			A3993	3,65	196%		
			A3994	10,23	547%		
			A3995	3,44	184%		
			A3996	7,33	392%		

TABELA 40: QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE OTC DA FIGURA 31.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	μmol de citrulina	OD 490 nm/vg	Fold change/wt OTC	Média ± SD
35	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3937	59,7	0,18	81%	100 ± 32
			A3938	35,8	0,25	115%	
			A3939	32,9	0,14	64%	
			A3940	12,8	0,20	93%	
			A3941	44,0	0,32	147%	
36	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3976	50,6	1,12	516%	369 ± 214
			A3977	16,8	0,81	372%	

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	μmol de citrulina	OD 490 nm/vg	Fold change/wt OTC	Média ± SD
37	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3978	41,0	0,22	101%	
			A3979	15,8	0,49	224%	
			A3991	51,6	1,37	632%	
			A3992	11,5	0,81	373%	419 ± 399
			A3993	15,1	0,46	210%	
			A3994	54,4	2,43	1120%	
			A3995	28,1	0,42	192%	
			A3996	17,6	0,44	200%	
38	Não tratado			6,1			

TABELA 41: QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIA DE GENOMA VIRAL DA FIGURA 31.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Genoma viral/célula		Médio	Média Grupal ± SD
				Exemplo 1	Exemplo 2		
35	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3937	13,8	3,4	8,6	4,4 ± 2,8
			A3938	5,5	1,5	3,5	
			A3939	8,7	2,5	5,6	
			A3940	1,6	0,3	1,0	
			A3941	5,3	1,7	3,5	
36	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3976	1,9	0,5	1,2	1,5 ± 1,8
			A3977	0,6	0,2	0,4	
			A3978	7,3	2,1	4,7	
			A3979	0,9	0,3	0,6	
			A3991	1,4	0,4	0,9	
37	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3992	0,3	0,2	0,2	0,7 ± 0,4
			A3993	0,9	0,2	0,6	
			A3994	1,0	0,3	0,7	
			A3995	2,3	0,6	1,4	
			A3996	1,2	0,4	0,8	

TABELA 42: QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE OTC DA FIGURA 32.

Grupo fêmea	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	μmol de citrulina	OD 490 nm/vg	Fold change/wtOTC	Média ± SD
32	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3865	59,7	0,11	34%	100 ± 82
			A3866	35,8	0,26	81%	
			A3867	32,9	0,60	192%	
			A3868	12,8	0,56	180%	
			A3869	44,0	0,04	13%	
33	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3870	50,6	0,72	230%	101 ± 73
			A3871	16,8	0,27	86%	
			A3872a	41,0	0,21	66%	
			A3872b	15,8	0,17	54%	
			A3873	51,6	0,22	69%	
34	OTC 3		A3874	11,5	0,13	43%	61 ± 27

Grupo fêmea	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	μmol de citulina	OD 490 nm/vg	Fold change/wtOTC	Média ± SD
	(16139)	Segunda preparação	A3875	15,1	0,15	48%	
			A3876	54,4	0,13	41%	
			A3877	28,1	0,33	104%	
			A3878	17,6	0,22	70%	
	Não tratado			6,1			

TABELA 43: QUANTIFICAÇÃO DO GENOMA VIRAL DA FIGURA 32.

Grupo (fêmea)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Genomas virais/célula	Média ± SD
32	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3865	1,13	1,77 ± 1,70
			A3866	1,62	
			A3867	0,59	
			A3868	0,78	
			A3869	4,74	
33	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3870	0,99	2,33 ± 0,96
			A3871	2,84	
			A3872a	2,35	
			A3872b	1,93	
			A3873	3,55	
34	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3874	7,39	3,60 ± 2,33
			A3875	2,18	
			A3876	3,48	
			A3877	1,31	
			A3878	3,60	

TABELA 44: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 33.

Grupo (fêmea)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Intensidade de Banda OTC/HSP70 (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Médio	Desvio padrão
35	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3888	0,458	97%	100%	30
			A3889	0,563	119%		
			A3890	0,230	49%		
			A3891	0,537	114%		
			A3892	0,574	122%		
36	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3893	0,642	136%	237%	130
			A3894	1,534	325%		
			A3895	0,447	95%		
			A3896	1,932	409%		
			A3897	1,044	221%		
35	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3888	0,458	93%	100%	33
			A3889	0,659	134%		
			A3890	0,230	47%		
			A3891	0,537	109%		
			A3892	0,574	117%		
37	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3898	1,483	302%	351%	88
			A3899	1,365	278%		
			A3900	2,228	453%		

Grupo (fêmea)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Intensidade de Banda OTC/HSP70 (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Médio	Desvio padrão
			A3901	2,166	441%		
			A3902	1,378	280%		

TABELA 45: QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE OTC DA FIGURA 33.

Grupo (fêmea)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	μmol de citrulina	OD 490 nm/vg	Fold change/wtOTC	Média ± SD
35	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3888	90,12	0,254	102%	100 ± 19
			A3889	51,61	0,287	116%	
			A3890	58,07	0,223	90%	
			A3891	37,20	0,178	72%	
			A3892	69,72	0,298	120%	
36	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3893	88,54	0,334	135%	218 ± 136
			A3894	84,37	0,889	358%	
			A3895	92,24	0,176	71%	
			A3896	59,49	0,914	368%	
			A3897	57,83	0,389	157%	
37	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3898	37,05	0,375	151%	265 ± 226
			A3899	77,13	0,458	185%	
			A3900	53,98	0,606	245%	
			A3901	52,95	1,627	656%	
			A3902	35,94	0,213	86%	
38	Não tratado			28,70			

TABELA 46: QUANTIFICAÇÃO DO GENOMA VIRAL DA FIGURA 33.

Grupo (fêmea)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Genomas virais/célula	Média ± SD
35	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A3888	3,35	1,96 ± 0,91
			A3889	1,26	
			A3890	1,99	
			A3891	1,00	
			A3892	1,98	
36	OTC1 (16138)	Segunda preparação	A3893	2,49	1,99 ± 1,83
			A3894	0,87	
			A3895	4,98	
			A3896	0,50	
			A3897	1,13	
37	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A3898	0,47	0,72 ± 0,48
			A3899	1,50	
			A3900	0,64	
			A3901	0,23	
			A3902	0,76	

TABELA 47: CONDIÇÕES E DOSES EXPERIMENTAIS - ALTA DOSE DE CO21.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/camundongo	vírus a µl	PBS
39	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A4670	1,0E+12	22	2,20E+10	1,83	48,17
			A4672	1,0E+12	25	2,50E+10	2,08	47,92
			A4673	1,0E+12	22	2,20E+10	1,83	48,17
			A4681	1,0E+12	30	3,00E+10	2,50	47,50
			A4692	1,0E+12	30	3,00E+10	2,50	47,50
40	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A4696	1,0E+12	20	2,00E+10	2,08	47,92
			A4675	1,0E+12	23	2,30E+10	2,40	47,60
			A4676	1,0E+12	26	2,60E+10	2,71	47,29
			A4677	1,0E+12	21	2,10E+10	2,19	47,81
			A4678	1,0E+12	24	2,40E+10	2,50	47,50
41	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A4876	1,0E+12	17	1,70E+10	2,58	47,42
			A4877	1,0E+12	25	2,50E+10	3,79	46,21
			A4878	1,0E+12	21	2,10E+10	3,18	46,82
			A4882	1,0E+12	25	2,50E+10	3,79	46,21
			A4884	1,0E+12	24	2,40E+10	3,64	46,36

TABELA 48: CONDIÇÕES E DOSES EXPERIMENTAIS - ALTA INTERMEDIÁRIA DE CO21.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/camundongo	vírus a µl	PBS
42	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A5395	5,0E+11	24	1,20E+10	0,9	49,1
			A5398	5,0E+11	25,5	1,28E+10	0,9	49,1
			A5399	5,0E+11	29	1,45E+10	1,1	48,9
			A5400	5,0E+11	28	1,40E+10	1,0	49,0
			A5393	5,0E+11	23	1,15E+10	0,9	49,1
43	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A5394	5,0E+11	23	1,15E+10	6,8	43,2
			A5396	5,0E+11	24	1,20E+10	7,1	42,9
			A5401	5,0E+11	31	1,55E+10	9,1	40,9
			A5402	5,0E+11	26	1,30E+10	7,6	42,4
			A5409	5,0E+11	29	1,45E+10	8,5	41,5

TABELA 49: CONDIÇÕES E DOSES EXPERIMENTAIS - BAIXA DOSE DE CO21.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/camundongo	vírus a µl	PBS
44	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A5272	2,5E+11	38	9,50E+09	0,7	49,3
			A5273	2,5E+11	25	6,25E+09	0,5	49,5
			A5278	2,5E+11	26	6,50E+09	0,5	49,5
			A5281	2,5E+11	23	5,75E+09	0,4	49,6
			A5272	2,5E+11	38	9,50E+09	0,7	49,3
45	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A5275	2,5E+11	23	5,75E+09	3,4	46,6
			A5277	2,5E+11	22,5	5,63E+09	3,3	46,7
			A5279	2,5E+11	26	6,50E+09	3,8	46,2
			A5284	2,5E+11	30	7,50E+09	4,4	45,6
			A5361	2,5E+11	24	6,00E+09	3,5	46,5
46	Não tratado		A5410					
			A4795					
			A4701					

TABELA 50: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 34.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Intensidade de Banda OTC/HSP70 (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Média ± SD
39	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A4670	0,036	112%	100 ± 49
			A4672	0,022	69%	
			A4673	0,022	69%	
			A4681	0,020	62%	
			A4692	0,062	193%	
40	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A4696	0,030	94%	417 ± 120
			A4675	0,151	470%	
			A4676	0,172	537%	
			A4677	0,064	199%	
			A4678	0,145	451%	
39	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A4670	0,051	195%	100 ± 54
			A4672	0,017	64%	
			A4673	0,013	50%	
			A4681	0,020	77%	
			A4692	0,035	132%	
41	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A4876	0,105	404%	406 ± 54
			A4877	0,089	341%	
			A4878	0,091	348%	
			A4882	0,083	317%	
			A4884	0,119	457%	

TABELA 51: QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE OTC DA FIGURA 34.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	µmol de citrulina	OD 490 nm/vg	Fold change/wtOTC	Média ± SD
39	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A4670	66,4	0,016	106%	100 ± 68
			A4672	6,4	0,010	64%	
			A4673	1,5	0,007	43%	
			A4681	3,5	0,010	63%	
			A4692	20,1	0,035	223%	
40	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A4696	12,1	0,008	54%	179 ± 81
			A4675	58,9	0,047	301%	
			A4676	51,5	0,032	206%	
			A4677	90,6	0,021	137%	
			A4678	49,6	0,031	197%	
41	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A4876	20,8	0,048	306%	265 ± 85
			A4877	47,0	0,044	284%	
			A4878	20,4	0,017	112%	
			A4882	113,6	0,052	350%	
			A4884	117,1	0,042	271%	
	Não tratado			6,1			

TABELA 52: QUANTIFICAÇÃO DO GENOMA VIRAL DA FIGURA 34.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Genomas virais/célula	Média ± SD
39	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A4670	39,6	14,66 ± 14,25
			A4672	10,7	
			A4673	10,9	
			A4681	8,5	
			A4692	3,6	
40	OTC 3 (16139)	Segunda preparação	A4696	16,5	16,74 ± 9,66
			A4675	10,5	
			A4676	10,1	
			A4677	33,4	
			A4678	13,2	
41	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A4876	6,4	14,38 ± 7,34
			A4877	11,3	
			A4878	11,3	
			A4882	17,4	
			A4884	25,5	

TABELA 53: QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ORÓTICO URINÁRIO DA FIGURA 35.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	μmol de ácido orótico/ mmol de creatinina				
			T0	T2 semanas	T3 semanas	T6 semanas	T8 semanas
39	OTCwt (16137)	A4670	235,4	29,4	43,1	17,4	31,6
		A4672	1.648,9	79,0	33,9	47,4	29,3
		A4673	127,2	90,0	17,8	62,8	55,4
		A4681	75,1	64,1	70,4	92,2	114,1
		A4692	197,3	38,3	19,5	43,1	43,0
40	OTC 3 (16139)	A4696	307,62	49,2	39,8	101,4	85,14
		A4675	214,95	79,3	51,3	200,5	113,52
		A4676	575,46	154,3	60	62,3	38,29
		A4677	252,58	61	61,1	74,2	65,9
		A4678	512,53	66,1	70	91,6	44,73
41	OTC 21 (17115)	A4876	316,0	28,3	14,8	31,3	32,2
		A4877	217,2	37,1	21,5	30,2	24,7
		A4878	273,6	6,3	34,5	63,2	49,9
		A4882	157,1	27,9	28,5	27,0	34,1
		A4884		31,2	14,8	31,7	38,7
46	Não tratado		851,3	511,8		309	405,2

TABELA 54: QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ORÓTICO URINÁRIO DA FIGURA 37.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	μmol de ácido orótico/ mmol de creatinina				
			T0	T2 semanas	T4 semanas	T6 semanas	T8 semanas
42	OTCwt (16137)	A5395	559,02	470,19	580,13	305,10	62,97
		A5398	429,38	78,11	31,35	68,17	116,55
		A5399	519,97	46,97	50,99	56,61	165,75
		A5400	440,58	64,12	167,41	224,87	

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	μmol de ácido orótico/ mmol de creatinina				
			T0	T2 semanas	T4 semanas	T6 semanas	T8 semanas
		A5393	187,13	395,56	264,16	300,05	
43	OTC 21 (17115)	A5394	333,56	58,71	65,14	58,52	76,58
		A5396	559,02	23,52	31,11	23,52	56,60
		A5401	429,38	44,84	53,38	92,60	75,40
		A5402	519,97	20,46	23,67	35,93	58,22
		A5409	405,13	55,9	20,68	72,33	95,12

TABELA 55: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 38.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Intensidade de Banda OTC/HSP70 (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Média ± SD
42	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A5395	0,33	51%	100 ± 49
			A5398	0,31	104%	
			A5399	0,30	79%	
			A5400	0,45	166%	
			A5393	0,33	51%	
43	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A5394	2,01	151%	325 ± 232
			A5396	1,74	165%	
			A5401	1,69	352%	
			A5402	0,98	715%	
			A5409	1,40	242%	

TABELA 56: QUANTIFICAÇÃO CATALÍTICA ÁCIDO ORÓTICO DA FIGURA 38.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	μmol de citrulina	OD 490 nm/vg	Fold change/wtOTC	Média ± SD
42	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A5395	1,17	0,50	209%	100 ± 74
			A5398	10,23	0,19	81%	
			A5399	6,70	0,14	58%	
			A5400	8,47	0,12	52%	
			A5393	2,81			
43	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A5394	140,02	0,26	110%	220 ± 106
			A5396	140,48	0,77	323%	
			A5401	135,60	0,55	231%	
			A5402	86,99	0,77	323%	
			A5409	44,61	0,27	112%	
	Não tratado			1,75			

TABELA 57: QUANTIFICAÇÃO DO GENOMA VIRAL DA FIGURA 38.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Genomas virais/célula	Média ± SD
42	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A5395	0,17	0,74 ± 0,61
			A5398	1,00	
			A5399	1,10	
			A5400	1,40	
			A5393	0,01	
43	OTC 21 (17115)	Terceira	A5394	6,77	3,19 ± 2,08

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Genomas virais/célula	Média ± SD
		preparação	A5396	2,31	
			A5401	3,12	
			A5402	1,47	
			A5409	2,30	

TABELA 58: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 39.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Intensidade de Banda OTC/HSP70 (normalizado em Vg)	Fold change/OTC-wt	Média ± SD
44	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A5272	0,90	97%	100 ± 21
			A5273	0,68	74%	
			A5278	0,94	102%	
			A5281	1,16	126%	
45	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A5275	2,53	193%	192 ± 58
			A5277	1,40	275%	
			A5279	1,16	152%	
			A5284	1,98	125%	
			A5361	0,90	215%	

TABELA 59: QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE OTC DA FIGURA 39.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	µmol de citrulina	OD 490 nm/vg	Fold change/wtOTC	Média ± SD
44	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A5272	11,09	0,50	153%	100 ± 38
			A5273	8,95	0,19	103%	
			A5278	49,80	0,14	72%	
			A5281	45,25	0,12	73%	
45	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A5275	26,30	0,26	97%	227 ± 156
			A5277	2,05	0,77	489%	
			A5279	10,80	0,55	229%	
			A5284	164,15	0,77	197%	
			A5361	15,05	0,27	121%	
	Não tratado			1,75			

TABELA 60: QUANTIFICAÇÃO DO GENOMA VIRAL DA FIGURA 39.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Genomas virais/célula		Médio	Média Grupal ± SD
				Exp1	Exemplo 2		
44	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A5272	0,31	0,5	0,41	2,19±1,85
			A5273	0,58	1,0	0,79	
			A5278	2,04	6,0	4,02	
			A5281	1,65	5,4	3,54	
45	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A5275	0,85	2,5	1,67	1,53±1,76
			A5277	0,13	0,1	0,11	
			A5279	0,34	0,5	0,43	
			A5284	2,16	6,8	4,50	
			A5361	0,62	1,3	0,94	

TABELA 61: QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ORÓTICO URINÁRIO DA FIGURA 40.

Tabelas (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	μmol de ácido orótico/ mmol de creatinina				
			T0	T2 semanas	T4 semanas	T6 semanas	T8 semanas
44	OTCwt (16137)	A5272	204,8	89,63	78,47	130,8	111,84
		A5273	1723,4	278,25	408,82	150,96	118
		A5278	139,9	339,79	932,68	283	86,2
		A5281	335,8	36,62	51,76	73,16	87
45	OTC 21 (17115)	A5277	400	378,36	225,73	177,03	261,88
		A5279	355	59,82	67,54	33,74	67,47
		A5284	600	55,58	82,89	88,18	114,99
		A5361	1.255,9	92,19	180,56	140,2	107,25
	Não tratado		1.140	334	279,9	511,8	252,4

TABELA 62: quantificação de atividade catalítica de OTC IN FIG. 41.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Dose	Código do camundongo	μmol de citrulina	Média ± SD
44	OTCwt (16137)	2,5E11	A5272	1,26	6,02 ± 5,7
			A5273	11,50	
			A5278	10,33	
			A5281	1,00	
42	OTCwt (16137)	5,0E11	A5395	5,59	3,94 ± 1,65
			A5398	5,11	
			A5399	3,35	
			A5400	4,23	
			A5393	1,41	
39	OTCwt (16137)	1,0E12	A4670	66,4	20,28 ± 38
			A4672	6,4	
			A4673	5,0	
			A4681	3,5	
			A4692	20,1	
41	OTC 21 (17115)	2,5E11	A5275	5,6	12,8 ± 18,2
			A5277	1,8	
			A5279	40	
			A5284	3,8	
43	OTC 21 (17115)	5E11	A5394	50	48,11 ± 24,66
			A5396	70,24	
			A5401	67,8	
			A5402	43,5	
			A5409	9	
45	OTC 21 (17115)	1E12	A4876	47	49,72 ± 39,1
			A4877	20	
			A4878	113,6	
			A4882	52	
			A4884	16	
	Não tratado			0,87	1,04±0,23
				1,20	
	C57-WT			49	45,63±4,9

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Dose	Código do camundongo	μmol de citrulina	Média ± SD
				39,9	
				48	

TABELA 63: GRUPOS EXPERIMENTAIS DE DESAFIO DE AMÔNIA E DOSAGEM

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Lote do vírus	Código do camundongo	Vg/Kg	Peso do camundongo (g)	Vg/camundongo	vírus a μl	PBS
47	OTCwt (16137)	Segunda preparação	A5819	5,0E+11	22	2,20E+10	1,83	48,17
			A5820	5,0E+11	25	2,50E+10	2,08	47,92
			A5830	5,0E+11	22	2,20E+10	1,83	48,17
			A5935	5,0E+11	30	3,00E+10	2,50	47,50
48	OTC 21 (17115)	Terceira preparação	A5821	5,0E+11	20	2,00E+10	2,08	47,92
			A5822	5,0E+11	23	2,30E+10	2,40	47,60
			A5932	5,0E+11	26	2,60E+10	2,71	47,29
			A5934	5,0E+11	21	2,10E+10	2,19	47,81
49	Não tratado		A6416		17			50
			A6417		25			50
			A6422		21			50
			A6423		25			50
50	Camundongos WT		A5405		26			50
			A5406		30			50
			A5404		21			50
			A5965		30			50

TABELA 65: PRIMEIRA QUANTIFICAÇÃO DE DESAFIO DE AMÔNIA DA FIGURA 42.

Grupo	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	mmol NH4	OA a μmol/creatinina a mmol	Teste comportamental (pontuação)			
					Convulsões	Sensibilidade a som	Maneira de andar	Total
47	OTCwt (16137)	A5819	2,58	65,3	1,5	1	2	4,5
		A5820	1,27	125,2	2	3	2	7
		A5830	0,92	93,0	1,5	2	2	5,5
		A5935	2,60	49,3	2	2	2	6
48	OTC 21 (17115)	A5821	1,19	45,6	2	3	2	7
		A5822	0,94	50,0	2	3	2	7
		A5932	1,32	57,2	2	3	2	7
		A5934	0,96	45,6	2	2,5	2	6,5
49	Não tratado	A6416	2,62	210	0	1	0	1
		A6417	4,59	353	1	1	1	3
		A6422	5,96	420	0	1	1	2
		A6423	10,48		0	0	0	0
50	Camundongos WT	A5405	3,86	70	1	2	2	5
		A5406	3,62	38	2	2	2	6
		A5404	3,24		2	2	2	6
		A5965	3,24		2	2	2	6

TABELA 66: SEGUNDA QUANTIFICAÇÃO DE DESAFIO DE AMÔNIA DA FIGURA 44.

Grupo	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	mmol NH4	OA a $\mu\text{mol}/\text{creatinina}$ a mmol	Teste Comportamental (pontuação)			
					Convulsões	Sensibilidade a som	Maneira de andar	Total
47	OTCwt (16137)	A5819	3,37	140,7	1	1	2	4
		A5820	2,56	117,7	2	2	1	5
		A5830	2,84	93,9	1,5	2	1	4,5
		A5935	1,58	89,2	1	2	2	5
48	OTC 21 (17115)	A5821	1,86	90,9	2	2	2	6
		A5822	3,62	78,8	2	2	1	5
		A5932	1,66	81,8	1	2	1	4
		A5934	2,44	81,2	1	2	2	5
49	Não tratado	A6416	5,57	582,7	0	0	0 MORTES **	0
		A6417	4,23	341,1	0	0	0 MORTES **	0
		A6422	4,76	472,0	0	1	1	2
		A6423	6,80	378,0	0	1	1	0
50	Camundongos WT	A5405	3,87	102,3	1	2	2	5
		A5406	2,54	108,0	2	2	2	6
		A5404	2,62		2	2	2	6

TABELA 67: QUANTIFICAÇÃO WESTERN BLOT DA FIGURA 44.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Vg/Kg	Intensidade de Banda OTC/Tubulina (normalizada em Vg)	Fold change/OTC-wt	Média $\pm$ SD
47	OTCwt (16137)	A5819	5,00E+11	1,179	138%	100 $\pm$ 29
		A5820	5,00E+11	0,741	87%	
		A5830	5,00E+11	0,601	70%	
		A5935	5,00E+11	0,905	106%	
48	OTC 21 (17115)	A5821	5,00E+11	6,145	717%	600,7 $\pm$ 115
		A5822	5,00E+11	4,436	518%	
		A5932	5,00E+11	5,826	680%	
		A5934	5,00E+11	4,183	488%	

TABELA 68: QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE OTC DA FIGURA 44.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	μmol de citrulina	Média $\pm$ SD
47	OTCwt (16137)	A5819	7,27	6,75 $\pm$ 2,9
		A5820	9,67	
		A5830	2,77	
		A5935	7,27	
48	OTC 21 (17115)	A5821	78,57	95,10 $\pm$ 22,15
		A5822	76,37	
		A5932	102,07	
		A5934	123,37	
49	Não tratado	A6416	1,87	0,87 $\pm$ 1,4
		A6417	-0,13	

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	μmol de citrulina	Média ± SD
50	Camundongos WT	A6422		82,52±14,3
		A6423		
		A5405	92,67	
		A5406	72,37	
		A5404		
		A5965		

TABELA 69: QUANTIFICAÇÃO DO GENOMA VIRAL DA FIGURA 44.

Grupo (macho)	Nome do vírus (código)	Código do camundongo	Genomas virais/célula	Média ± SD
47	OTCwt (16137)	A5819	1,4	1,0 ± 0,5
		A5820	1,0	
		A5830	0,3	
		A5935	1,3	
48	OTC 21 (17115)	A5821	1,0	1,5 ± 0,5
		A5822	1,5	
		A5932	1,3	
		A5934	2,1	

REIVINDICAÇÕES

1. Método, caracterizado pelo fato de que compreende:
administrar de modo concomitante um vetor de vírus adeno-associado (AAV) a um indivíduo que tem ou tem suspeitas de ter um distúrbio de ciclo de ureia e nanocarreadores sintéticos acoplados a um imunossupressor, em que o vetor de AAV compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma enzima associada ao distúrbio de ciclo de ureia e uma sequência de controle de expressão.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o distúrbio de ciclo de ureia é deficiência de ornitina transcarbamilase sintetase (OTC).
3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o vetor de AAV e nanocarreadores sintéticos acoplados a um imunossupressor estão em uma quantidade eficaz para reduzir respostas imunes humorais e celulares ao vetor de AAV.
4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o vetor de AAV e nanocarreadores sintéticos acoplados a um imunossupressor são administrados de modo concomitante durante início de doença precoce.
5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que, ao indivíduo, não é administrado a esteroide como um agente terapêutico adicional.
6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar um esteroide como um agente terapêutico adicional em uma quantidade reduzida.
7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que, ao indivíduo, foi anteriormente administrado o vetor de AAV e nanocarreadores sintéticos acoplados a um imunossupressor de modo concomitante.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda administrar o vetor de AAV ao indivíduo em um ponto subsequente no tempo.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a administração concomitante do vetor de AAV e nanocarreadores sintéticos acoplados a um imunossupressor é repetido.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a sequência que codifica a enzima associada ao distúrbio de ciclo de ureia é uma sequência otimizada por códon.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a enzima associada ao distúrbio de ciclo de ureia é OTC.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a sequência que codifica a OTC é a sequência que codifica a OTC de OTC-CO3 ou OTC-CO21.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a sequência que codifica a OTC é uma sequência conforme definida na SEQ ID NO: 1 a 11 ou 13, ou uma porção das mesmas.

14. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a sequência que codifica a OTC é a sequência que codifica a OTC de SEQ ID NO: 13.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a sequência de controle de expressão é um promotor específico de fígado.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações

precedentes, caracterizado pelo fato de que o imunossupressor é rapamicina.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o vetor de AAV é um vetor de AAV8.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o imunossupressor é encapsulado nos nanocarreadores sintéticos.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que os nanocarreadores sintéticos compreendem nanopartículas poliméricas.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que as nanopartículas poliméricas compreendem um poliéster ou um poliéster fixado a um poliéter.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o poliéster compreende um ácido (poli)lático, ácido (poli)glicólico, ácido (poli)lático-co-glicólico ou policaprolactona.

22. Método, de acordo com a reivindicação 20 ou 21, caracterizado pelo fato de que as nanopartículas poliméricas compreendem um poliéster e um poliéster fixado a um poliéter.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 22, caracterizado pelo fato de que o poliéter compreende polietileno glicol ou polipropileno glicol.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a média de uma distribuição de tamanho de partícula obtida com uso de difusão de luz dinâmica de uma população dos nanocarreadores sintéticos é um diâmetro maior do que 110 nm.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o diâmetro é maior do que 150 nm.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o diâmetro é maior do que 200 nm.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o diâmetro é maior do que 250 nm.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 27, caracterizado pelo fato de que o diâmetro é menor do que 5 μm .

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o diâmetro é menor do que 4 μm .

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o diâmetro é menor do que 3 μm .

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o diâmetro é menor do que 2 μm .

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o diâmetro é menor do que 1 μm .

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o diâmetro é menor do que 500 nm.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o diâmetro é menor do que 450 nm.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o diâmetro é menor do que 400 nm.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o diâmetro é menor do que 350 nm.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o diâmetro é menor do que 300 nm.

38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a carga de imunossupressor compreendida nos nanocarreadores sintéticos, em média através dos nanocarreadores sintéticos, está entre 0,1% e 50% (peso/peso).

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado

pelo fato de que a carga é entre 0,1% e 25%.

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que a carga é entre 1% e 25%.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a carga é entre 2% e 25%.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que uma razão de aspecto de uma população dos nanocarreadores sintéticos é maior do que 1:1, 1:1,2, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 ou 1:10.

43. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:

uma dose do vetor de AAV, como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes.

44. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de que a composição compreende ainda uma dose dos nanocarreadores sintéticos, como definidos em qualquer uma das reivindicações precedentes.

45. Composição, de acordo com a reivindicação 43 ou 44, caracterizada pelo fato de que a composição é um kit.

46. Composição, de acordo com a reivindicação 45, caracterizada pelo fato de que o kit compreende ainda instruções para uso.

47. Composição, de acordo com a reivindicação 45, caracterizada pelo fato de que o kit compreende ainda instruções para realizar um método, como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes.

48. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um ácido nucleico que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica qualquer uma das OTCs fornecidas no presente documento.

49. Composição, de acordo com a reivindicação 48, caracterizada pelo fato de que a sequência codifica a OTC de OTC-CO3 ou OTC-CO21.

50. Composição, de acordo com a reivindicação 48, caracterizada pelo fato de que a sequência que codifica a OTC é uma sequência conforme definida na SEQ ID NO: 1 a 11 ou 13, ou uma porção das mesmas.

51. Composição, de acordo com a reivindicação 48, caracterizada pelo fato de que a sequência que codifica a OTC é uma sequência que codifica a OTC de SEQ ID NO: 13.

52. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 51, caracterizada pelo fato de que a sequência do ácido nucleico inclui uma sequência de controle de expressão.

53. Composição, de acordo com a reivindicação 52, caracterizada pelo fato de que a sequência de controle de expressão é um promotor.

54. Composição, de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de que o promotor é um promotor específico de fígado.

55. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um ácido nucleico que compreende uma sequência conforme definida em qualquer uma das sequências fornecidas no presente documento, tais como SEQ ID NO: 4, 8 ou 9, ou uma porção dos mesmos, e que codifica uma OTC.

56. Composição, de acordo com a reivindicação 55, caracterizada pelo fato de que o ácido nucleico compreende ainda uma sequência de controle de expressão.

57. Composição, de acordo com a reivindicação 56, caracterizada pelo fato de que a sequência de controle de expressão é um promotor.

58. Composição, de acordo com a reivindicação 57, caracterizada pelo fato de que o promotor é um promotor específico de fígado.

59. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um vetor viral que compreende uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 48 a 58.

60. Composição, de acordo com a reivindicação 59, caracterizada pelo fato de que o vetor viral é um vetor de AAV.

61. Composição, de acordo com a reivindicação 60, caracterizada pelo fato de que o vetor de AAV é um vetor de AAV8.

62. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um vetor viral, como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes.

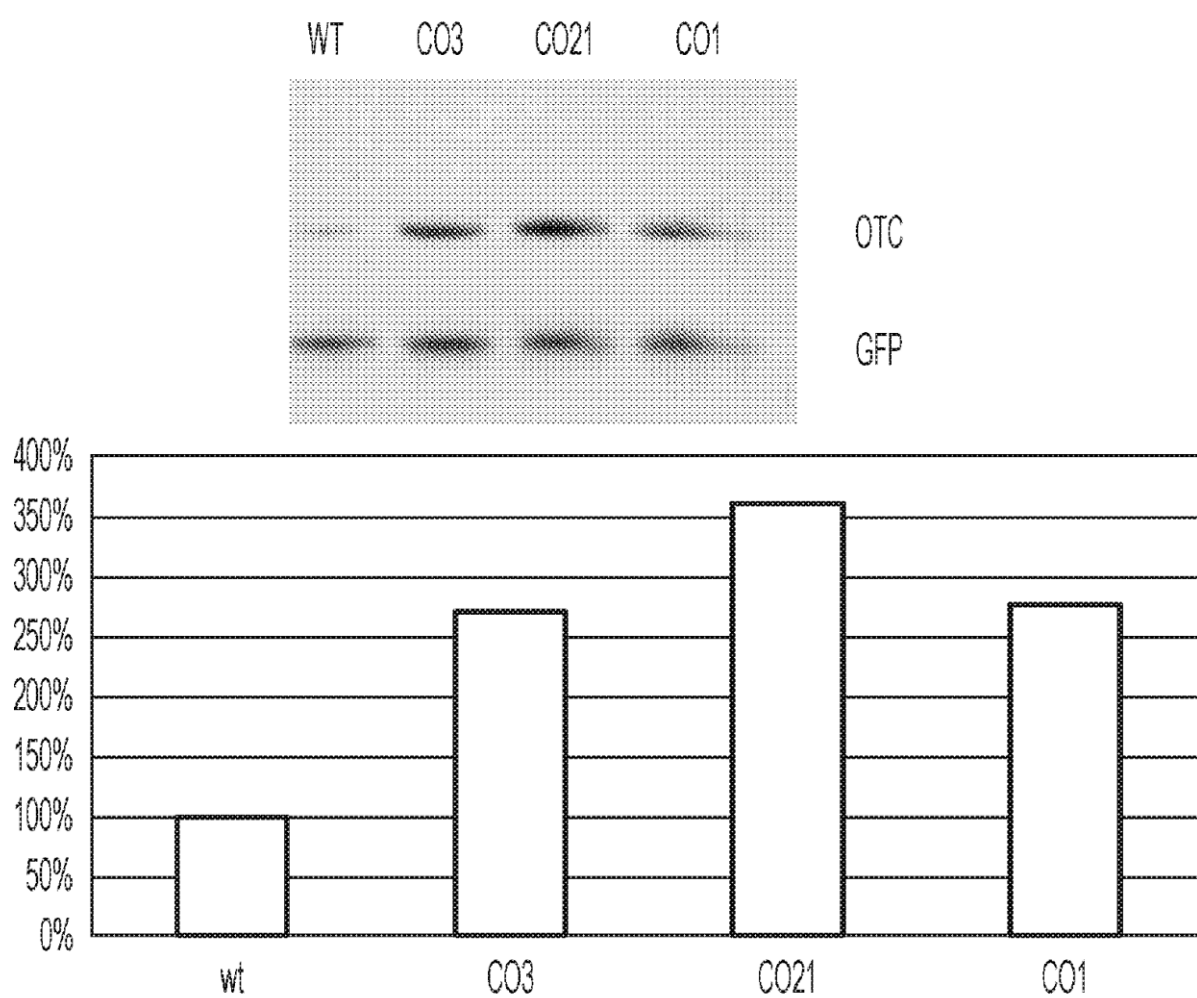


FIG. 1

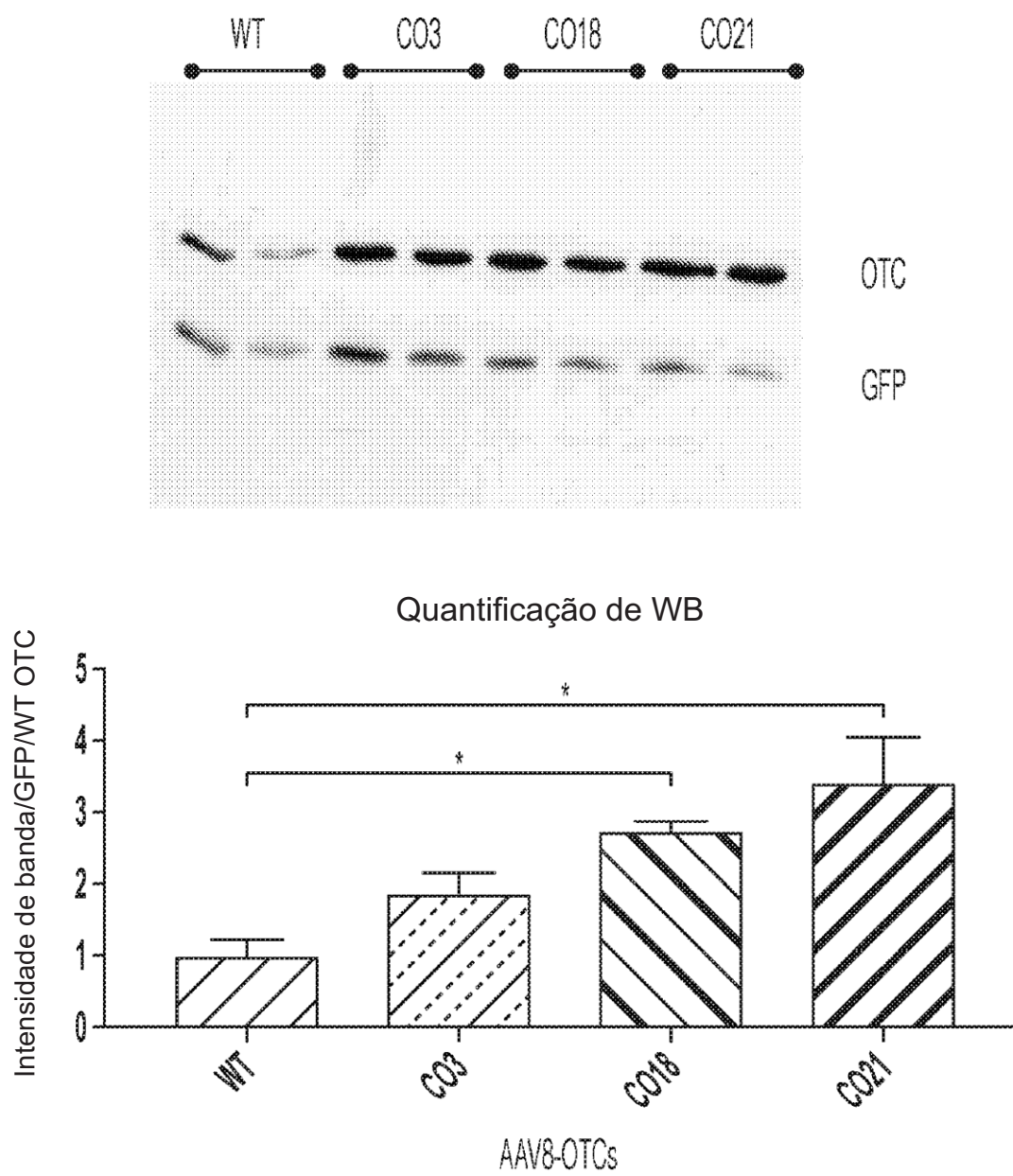


FIG. 2

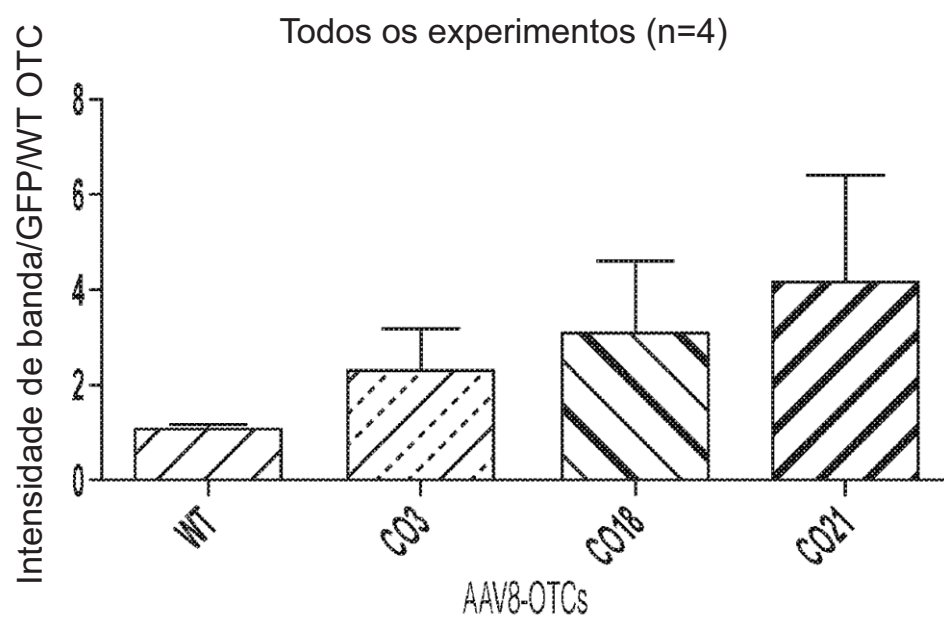


FIG. 3

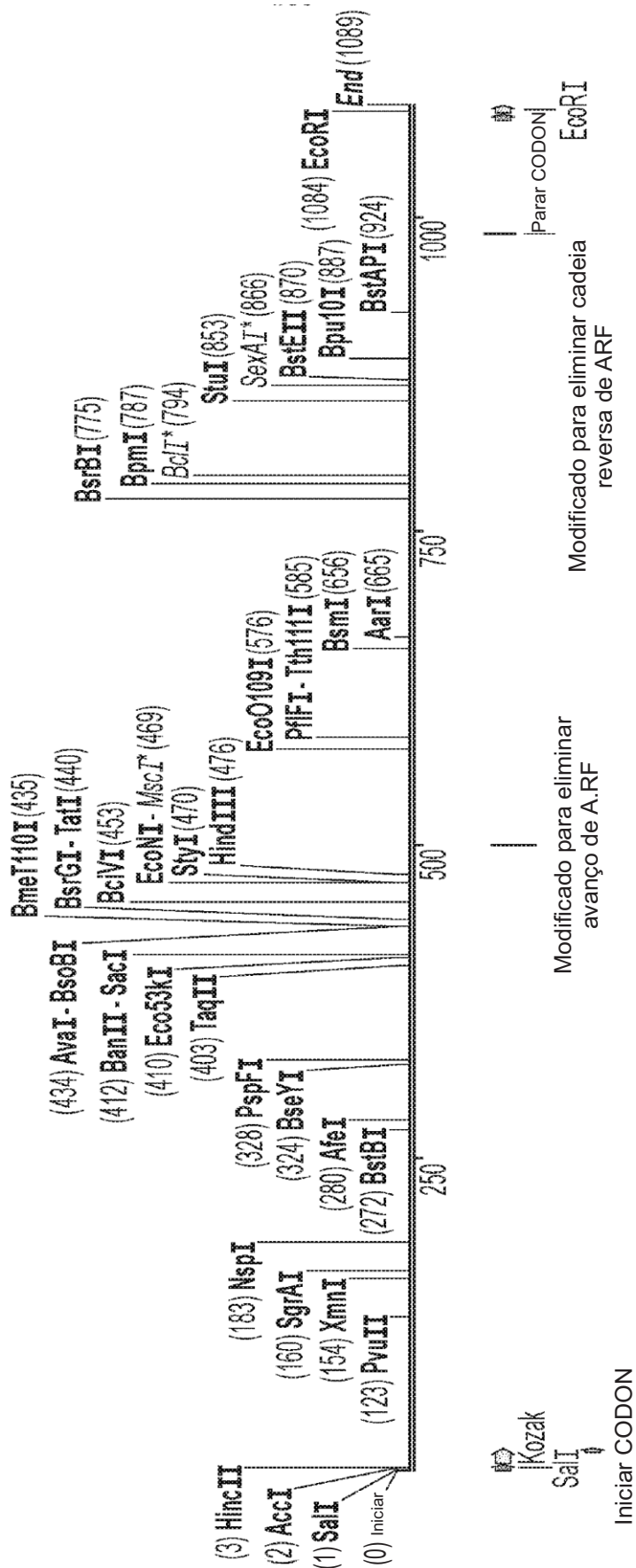


FIG. 4

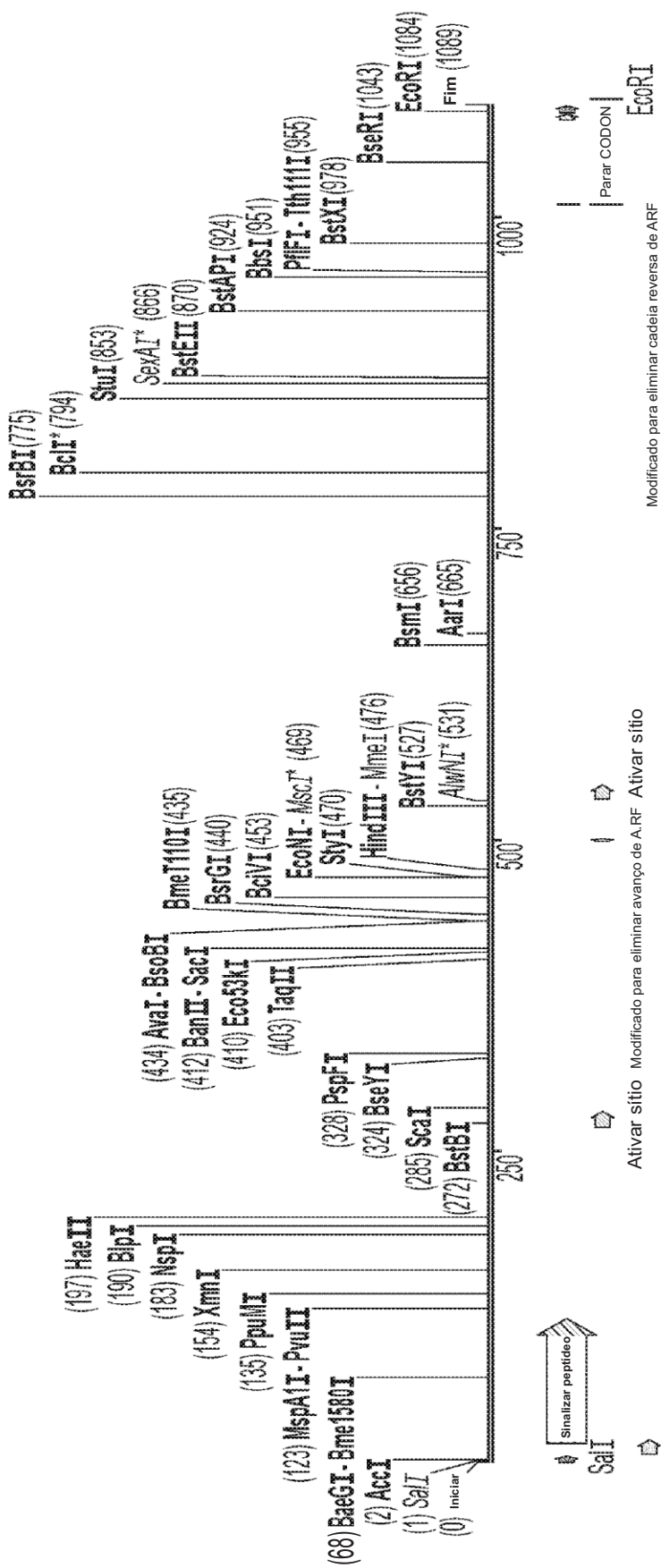


FIG. 5

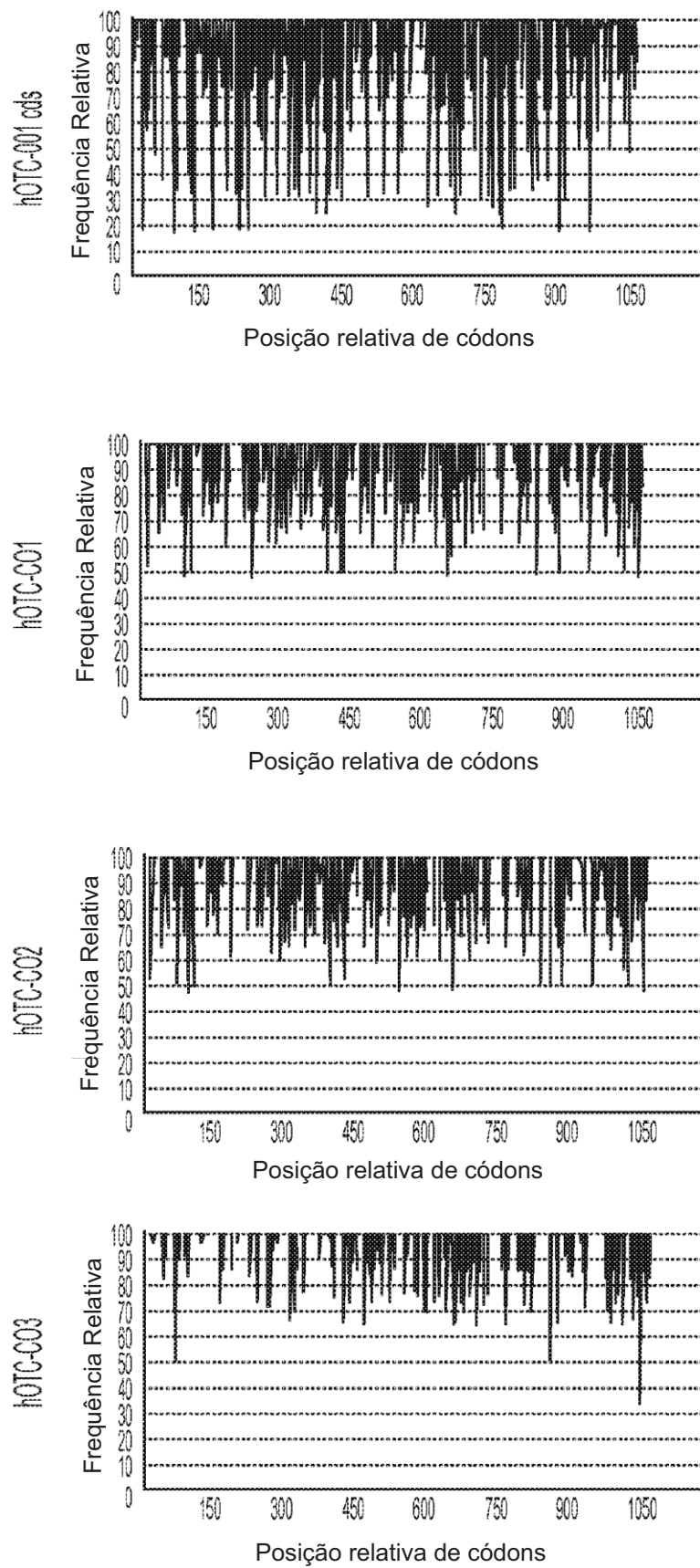


FIG. 6

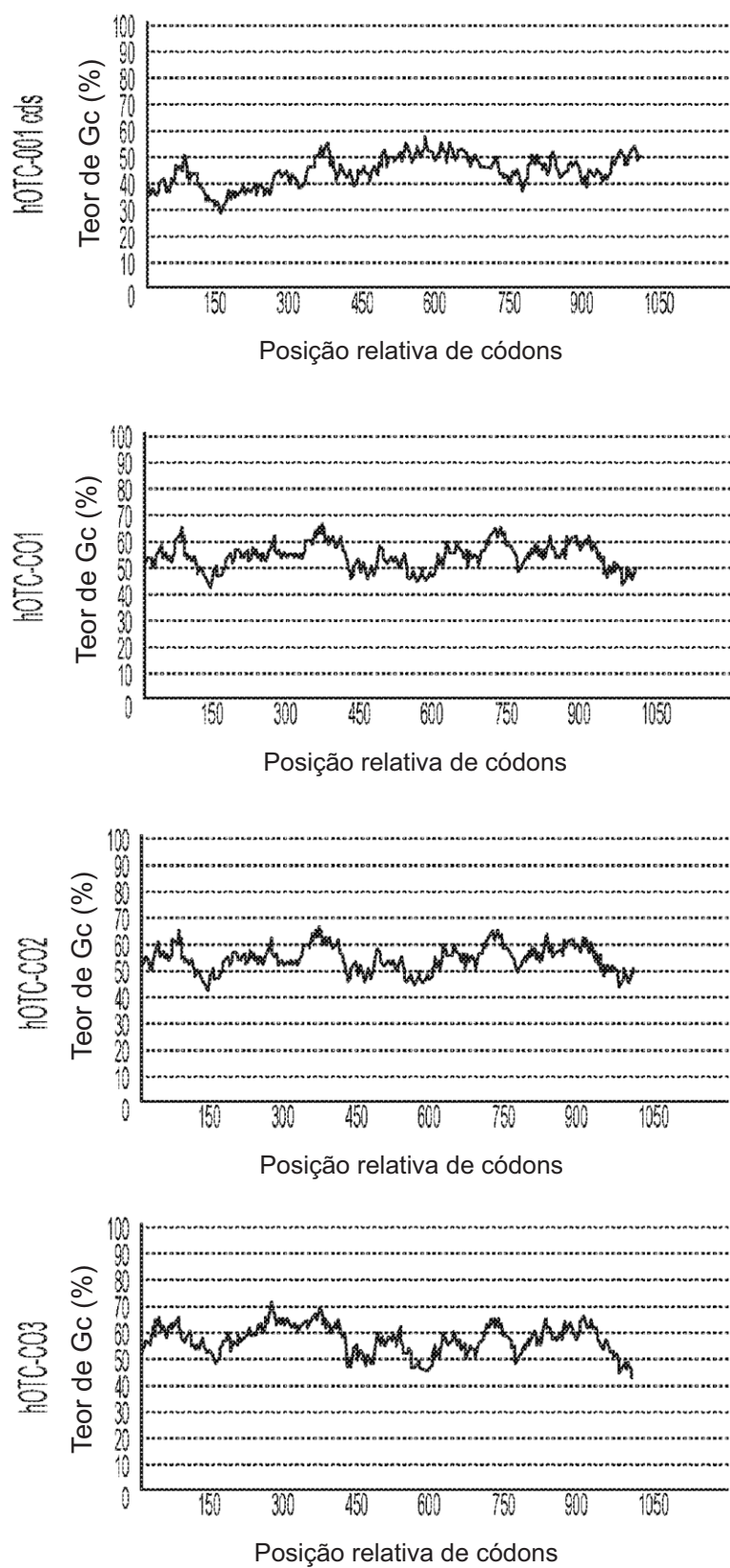


FIG. 6
CONTINUAÇÃO

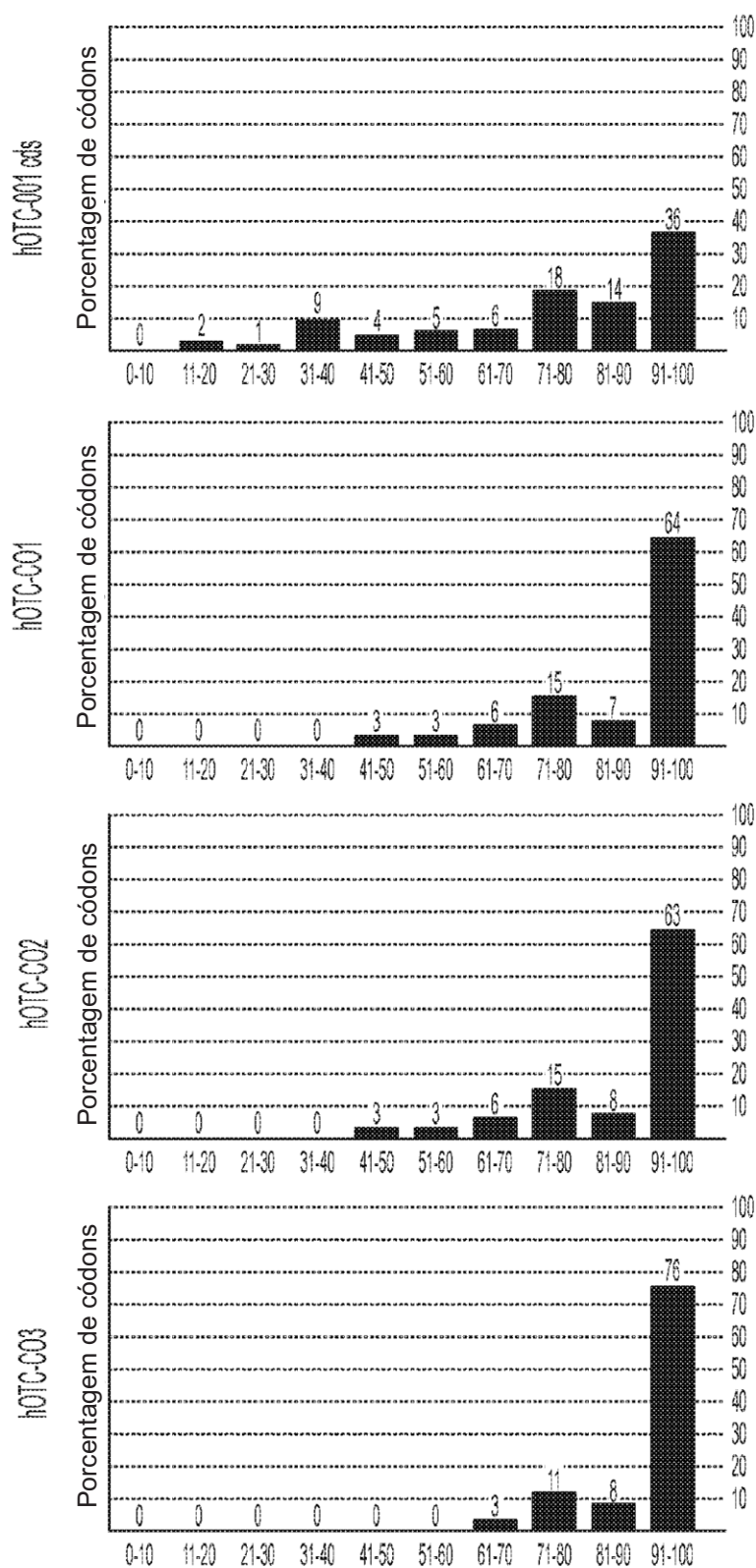


FIG. 6

CONTINUAÇÃO

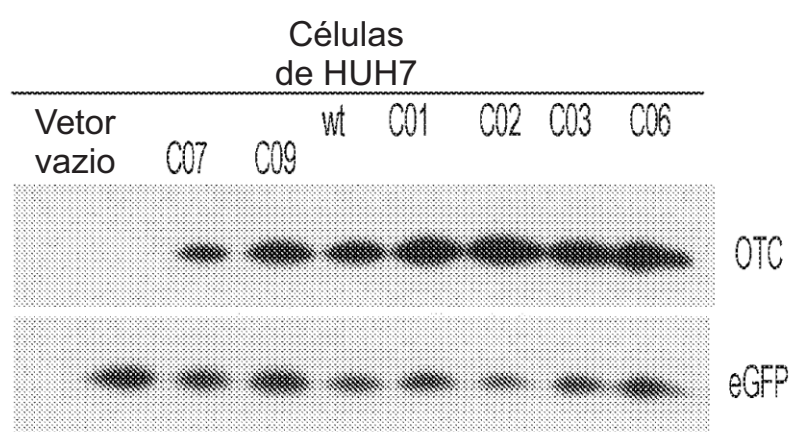
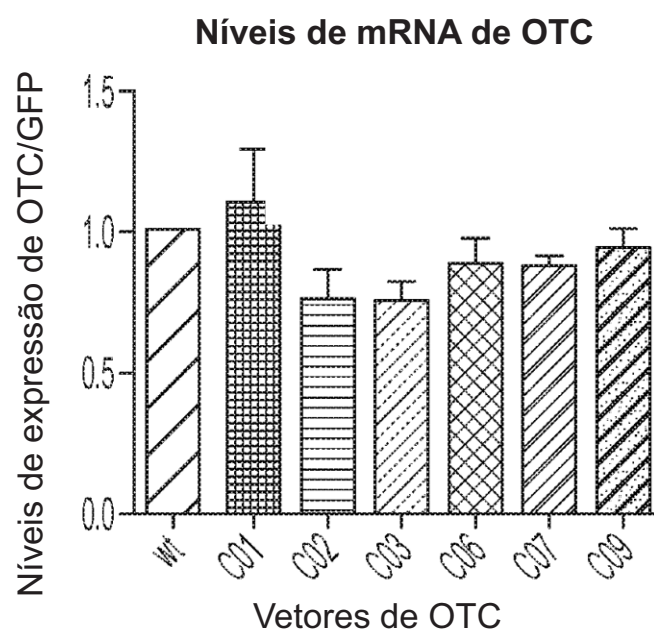


FIG. 8A

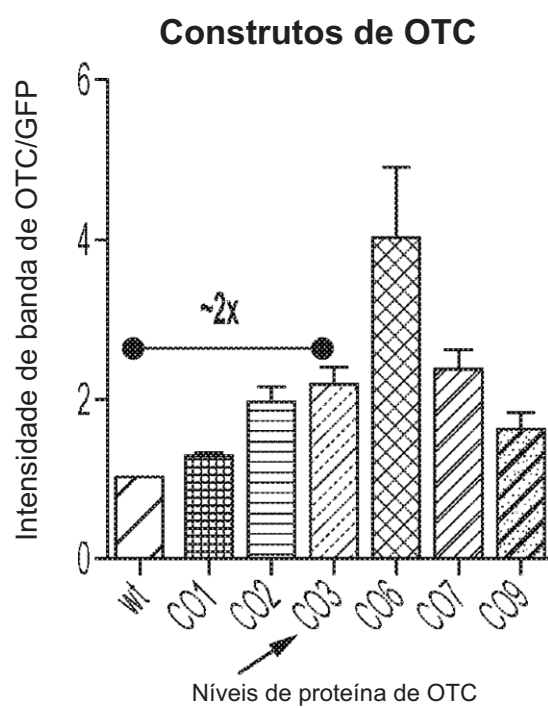


FIG. 8B

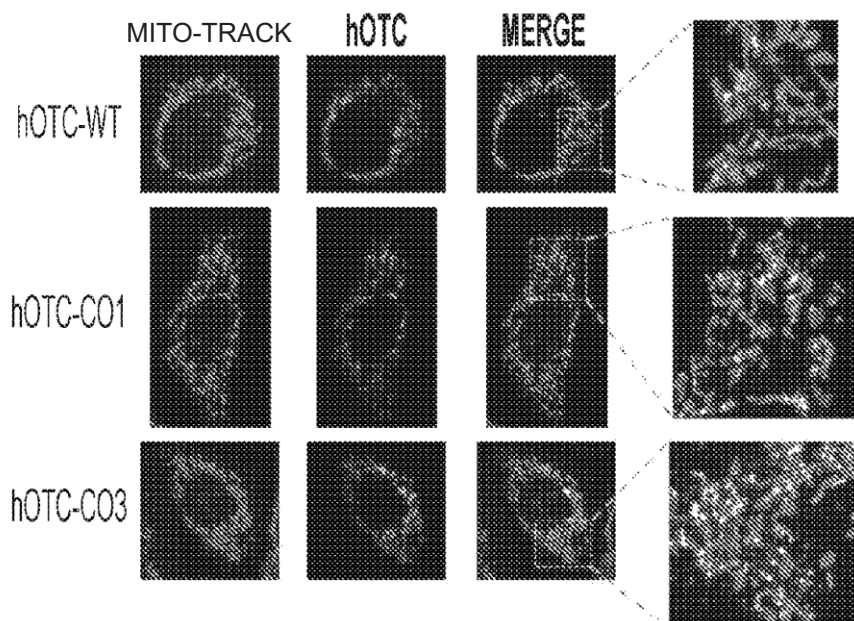


FIG. 9

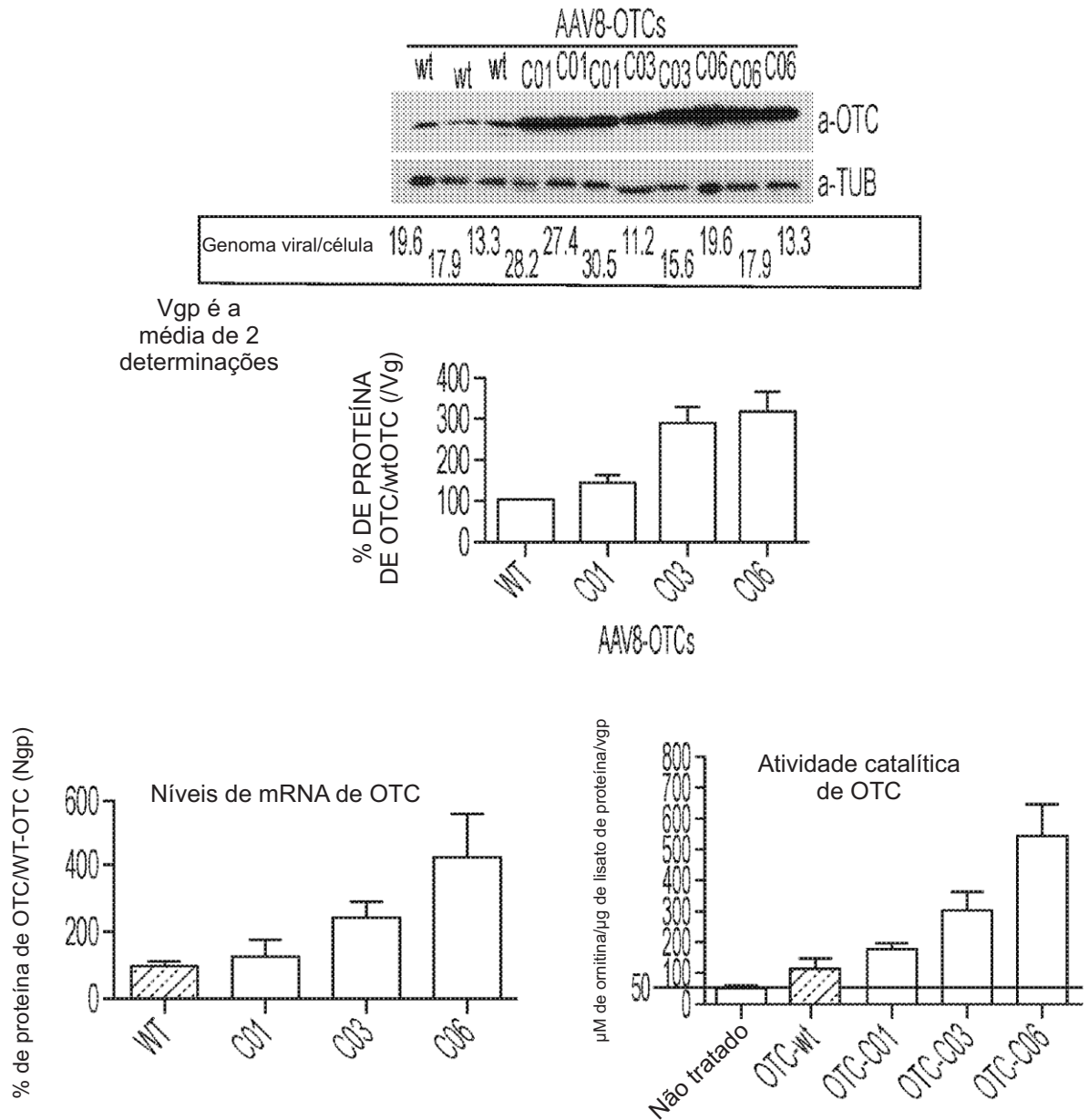


FIG. 10

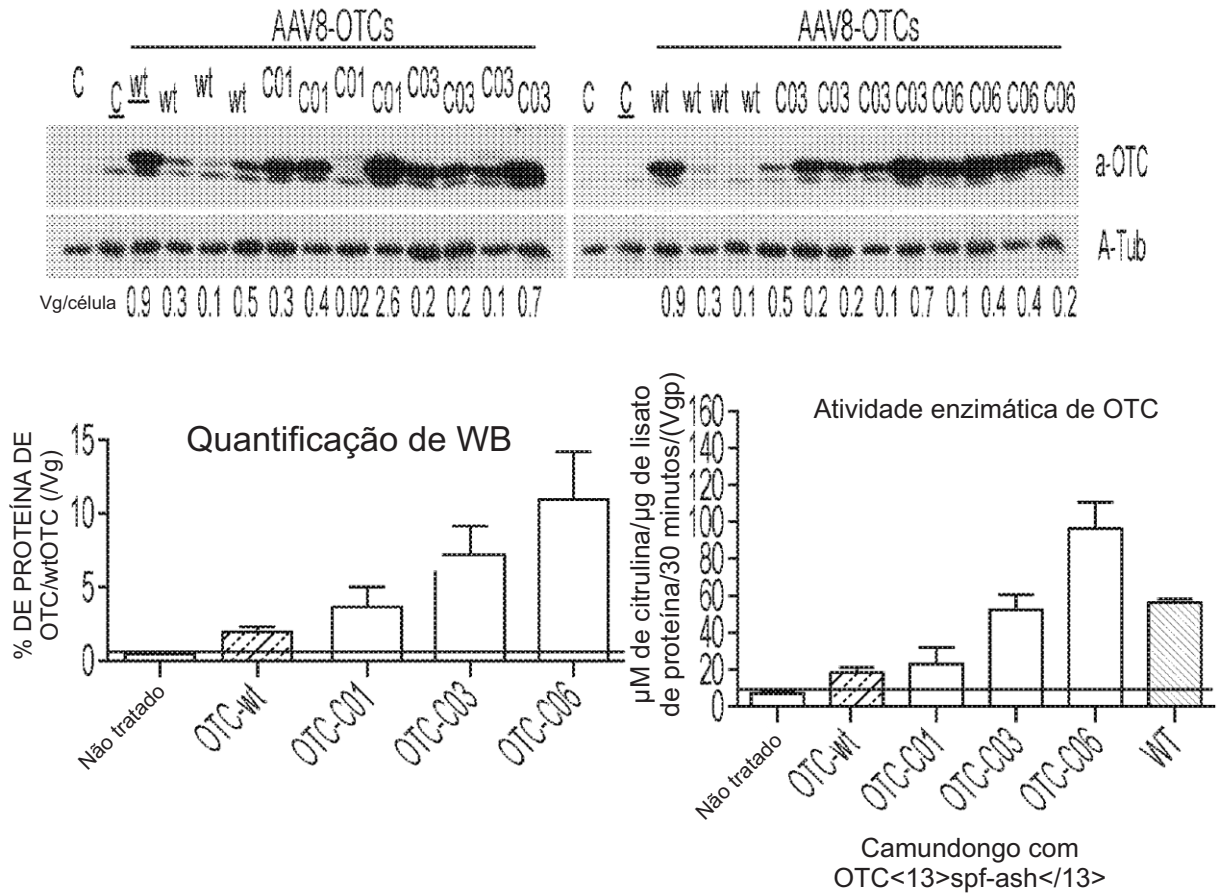


FIG. 11

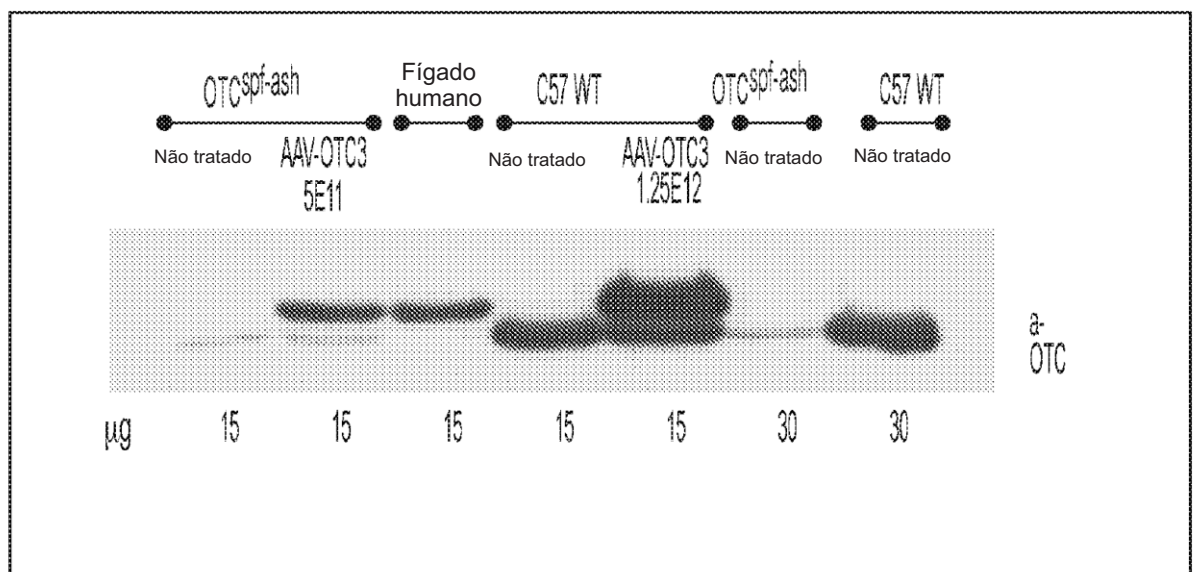


FIG. 12

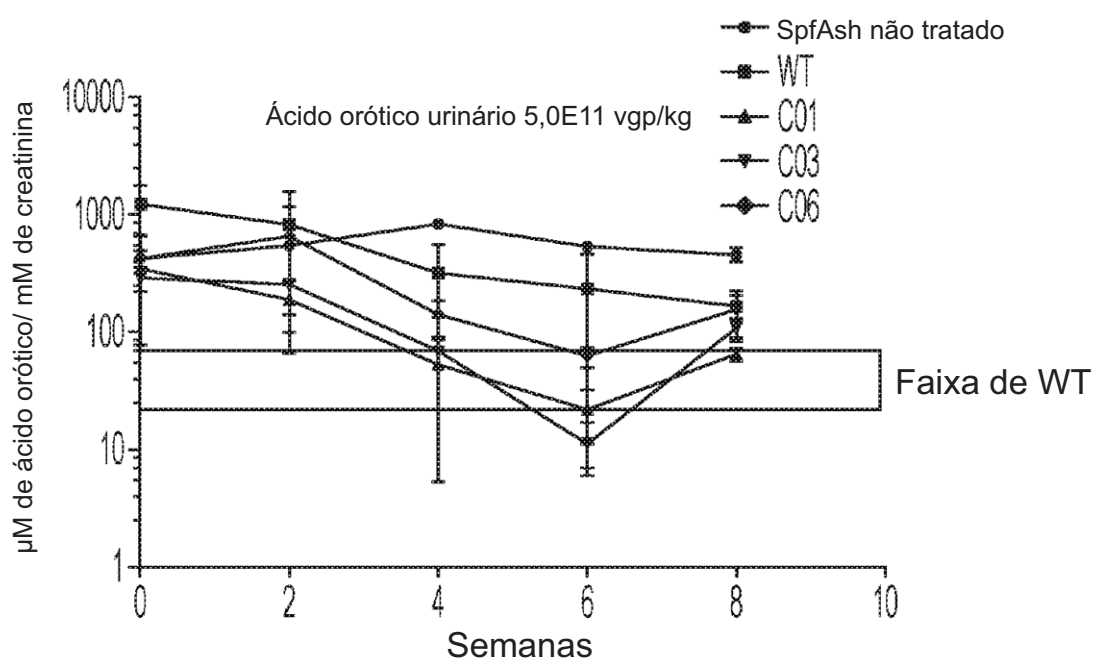


FIG. 13

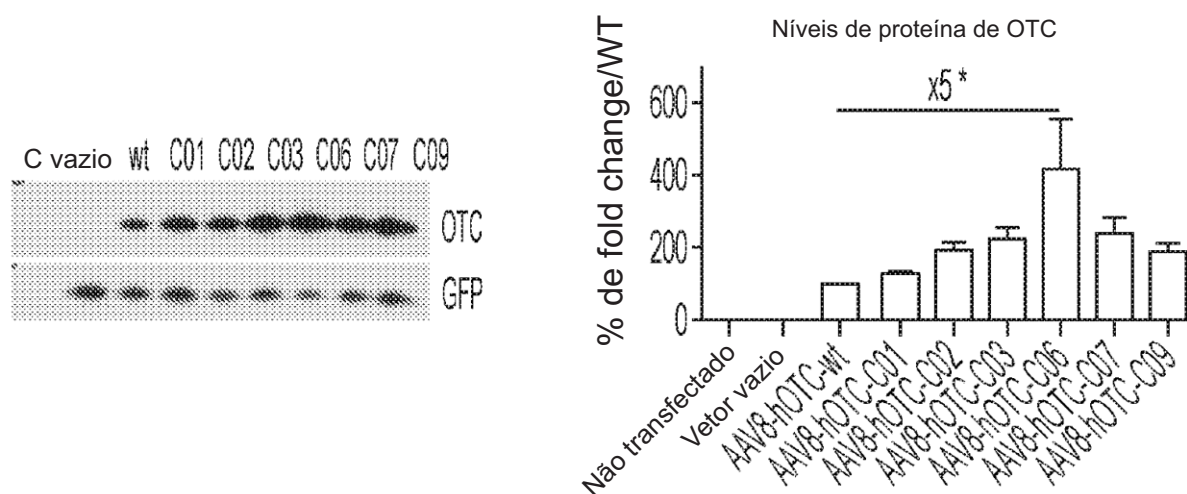


FIG. 14

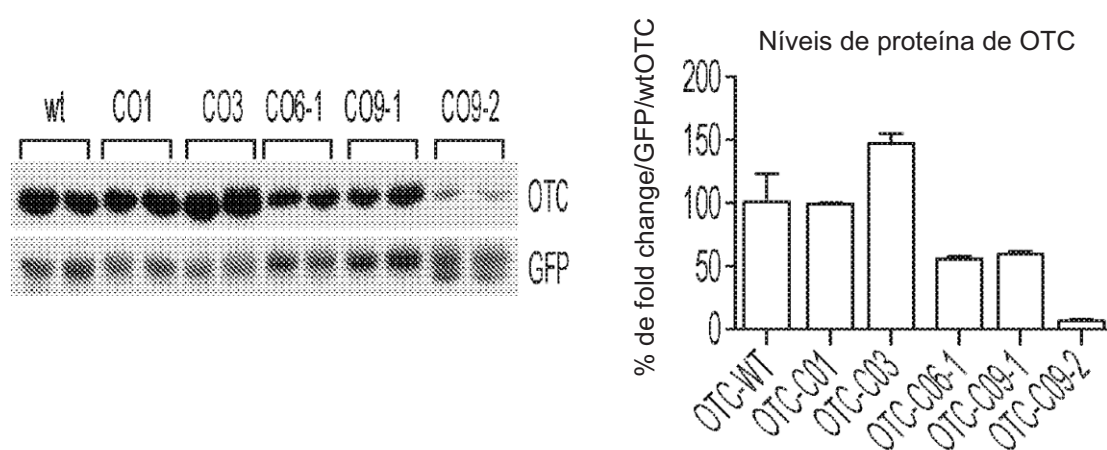
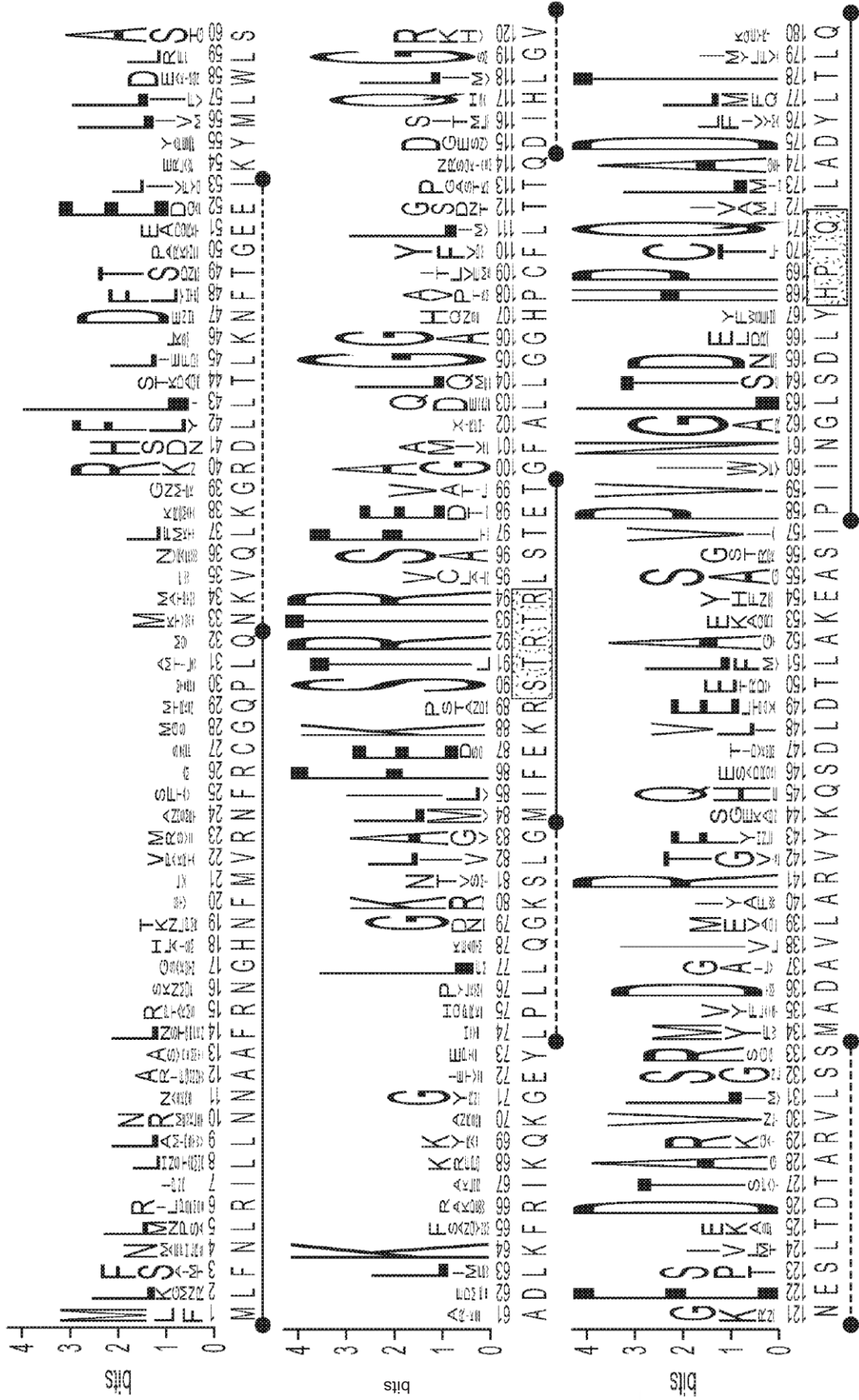


FIG. 15



১৫

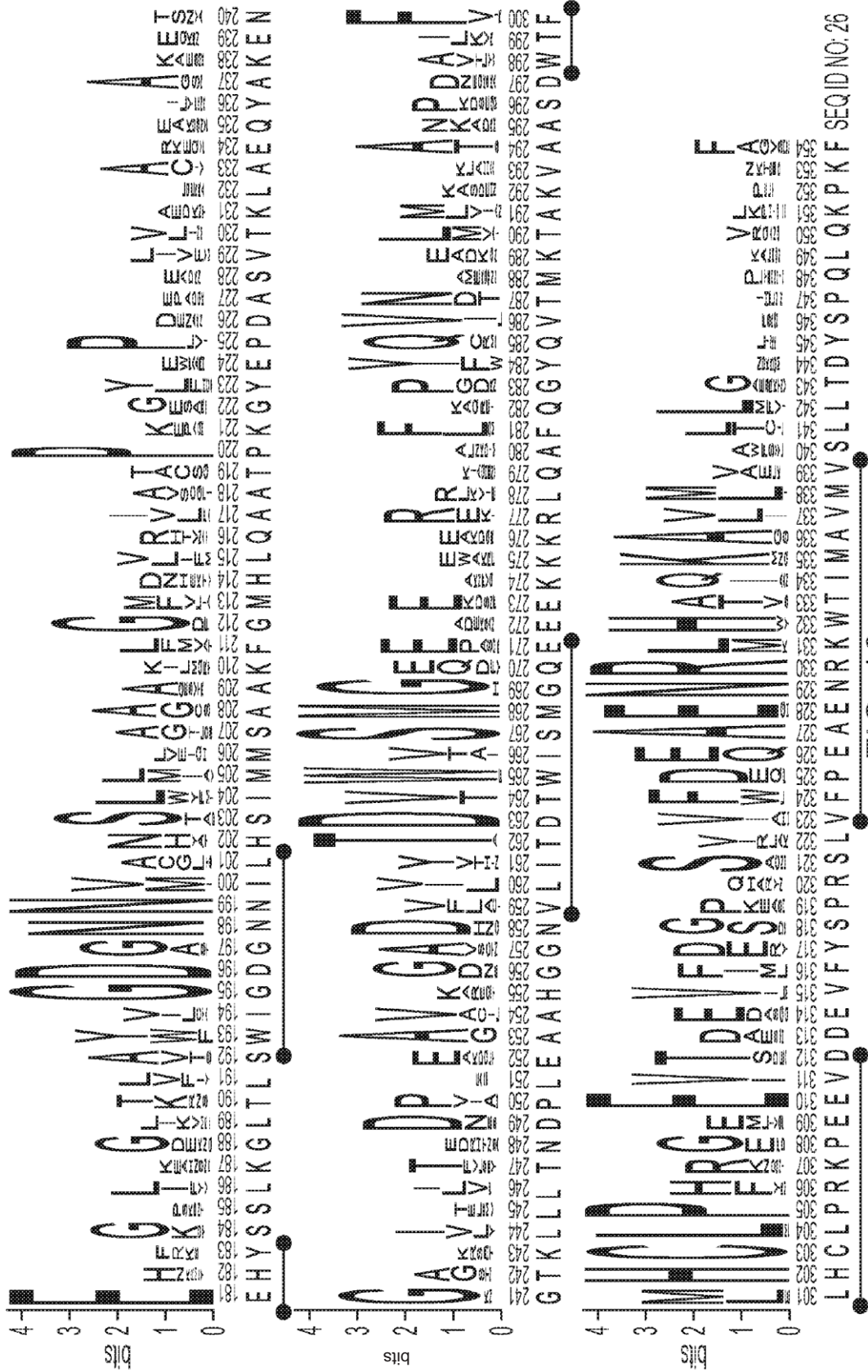


FIG. 16
CONTINUAÇÃO

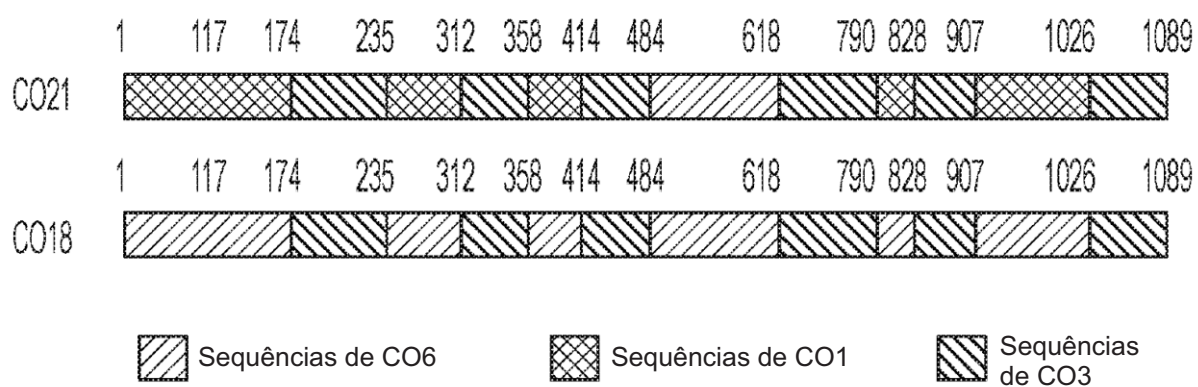


FIG. 17

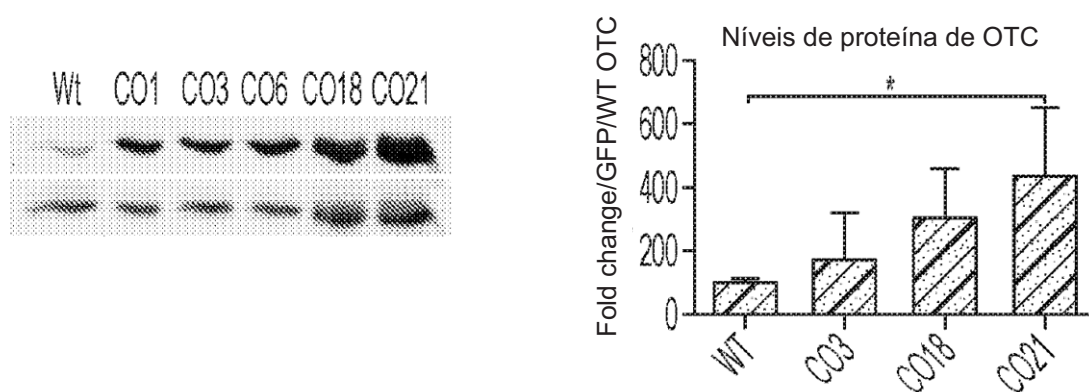


FIG. 18

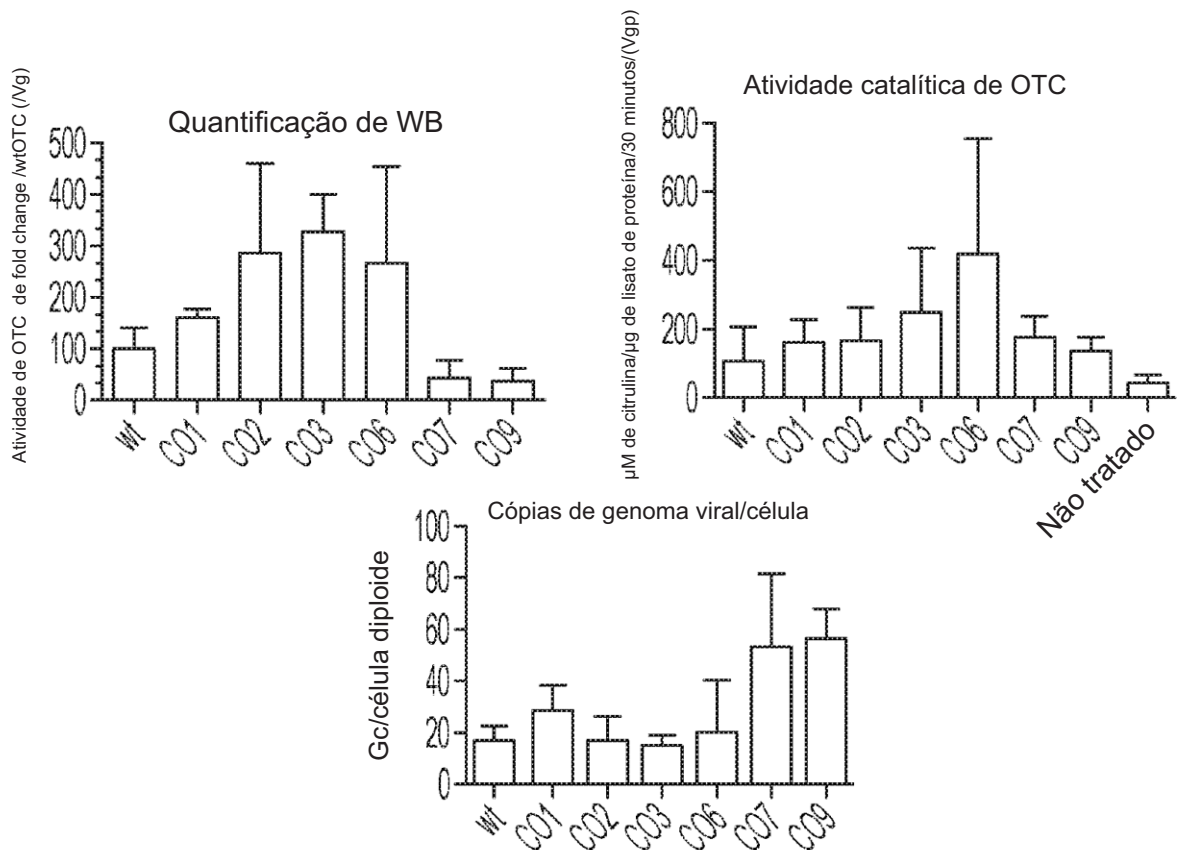
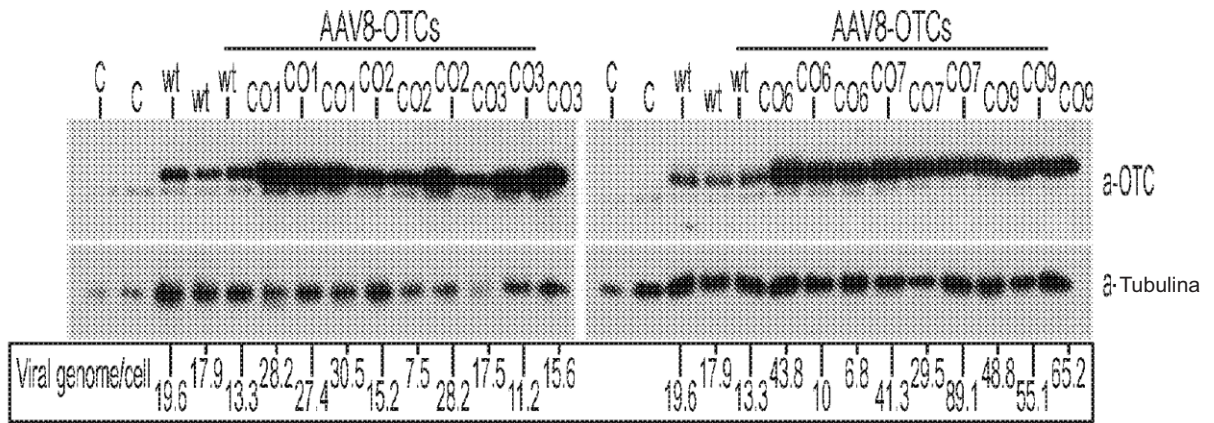


FIG. 19

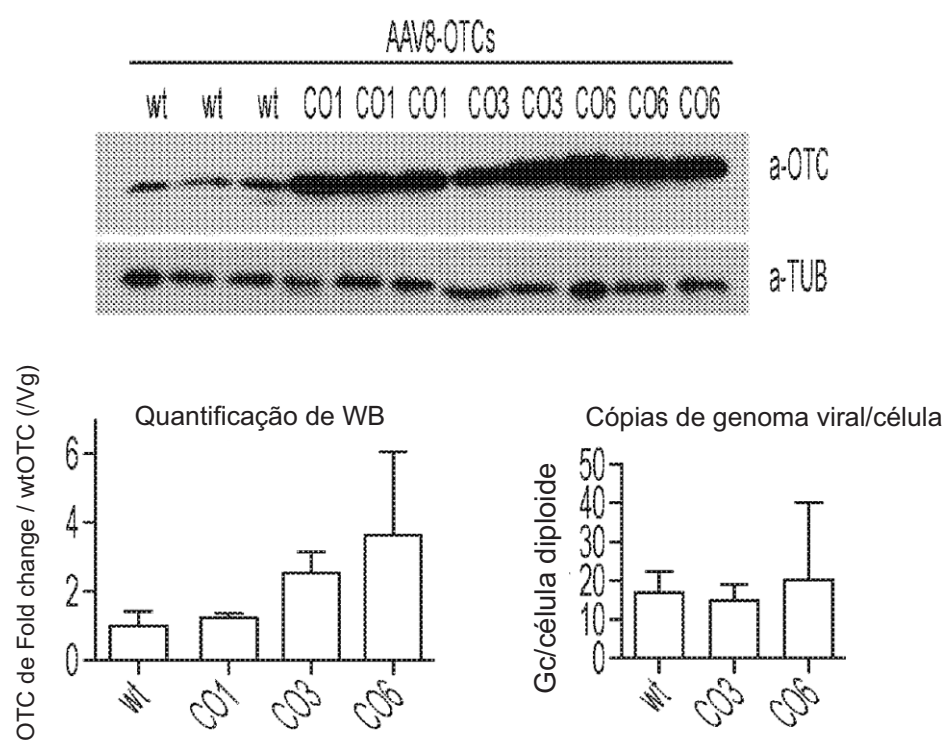


FIG. 20

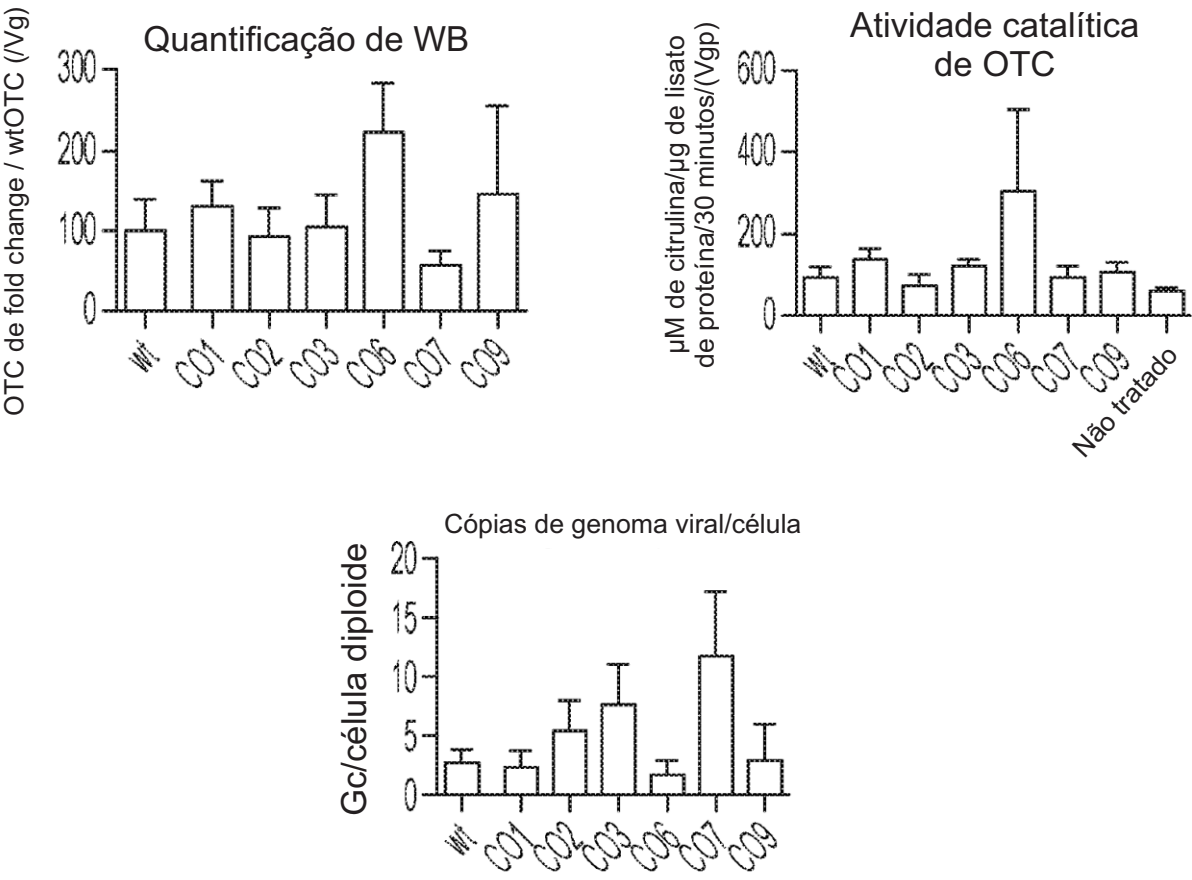
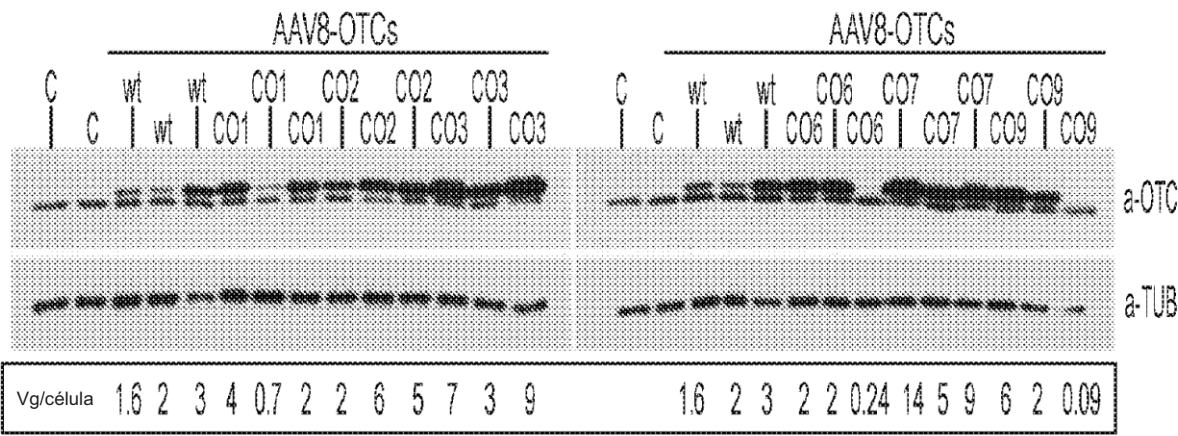


FIG. 21

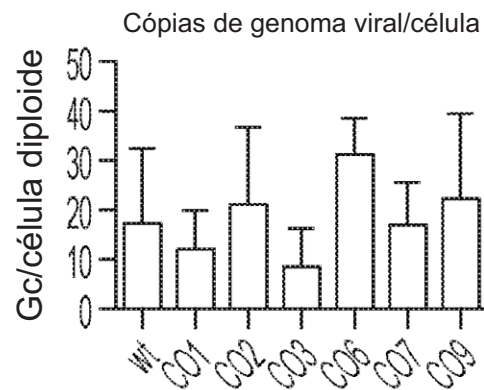
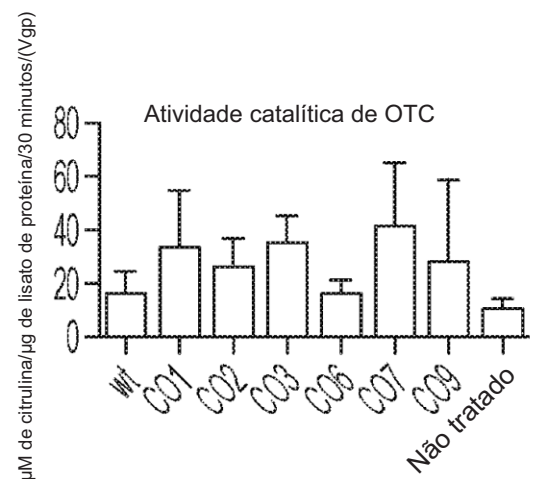
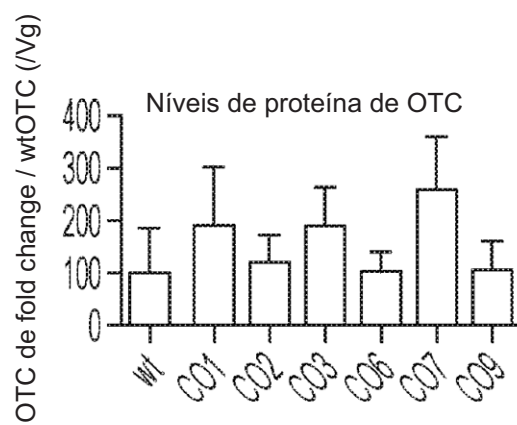
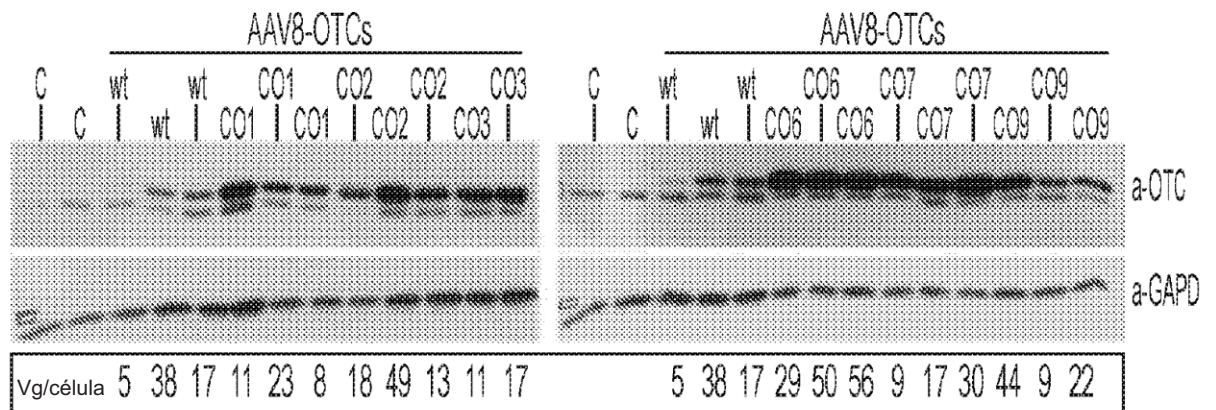


FIG. 22

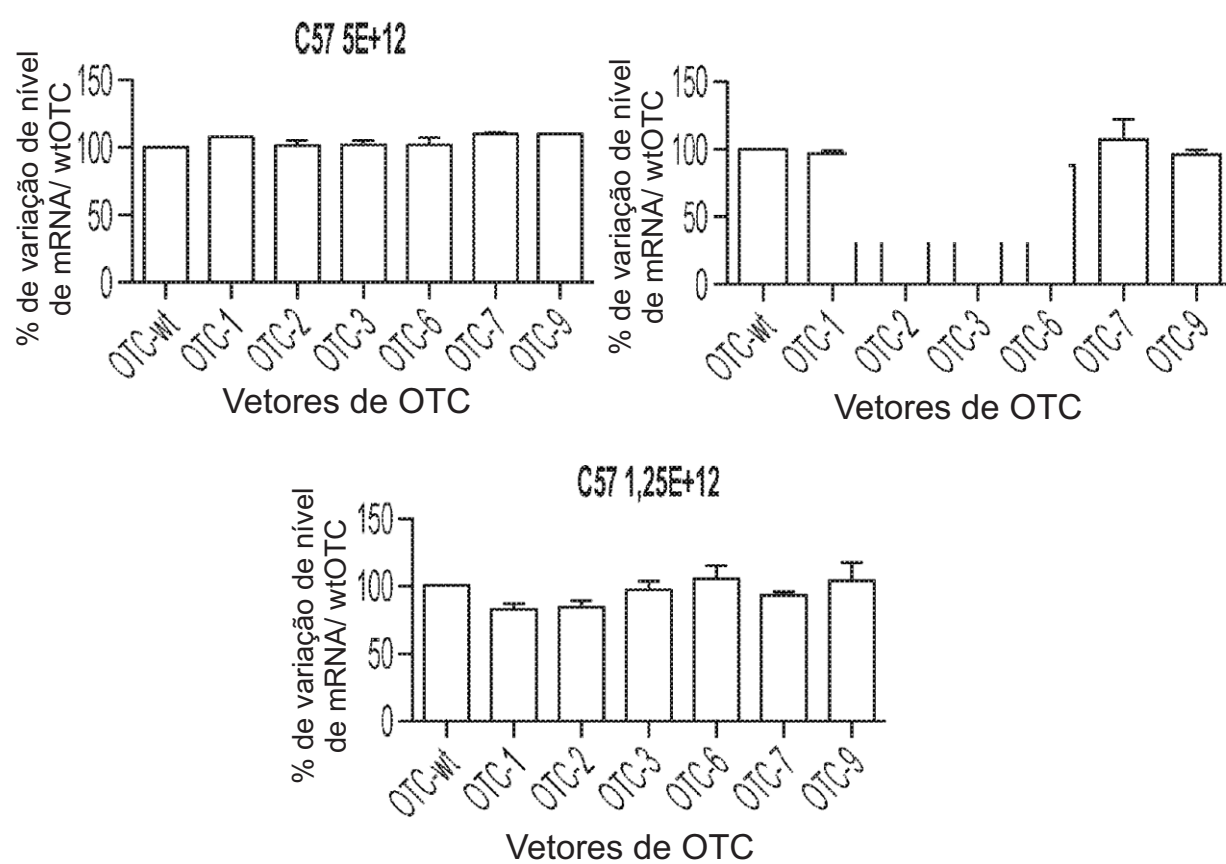


FIG. 23

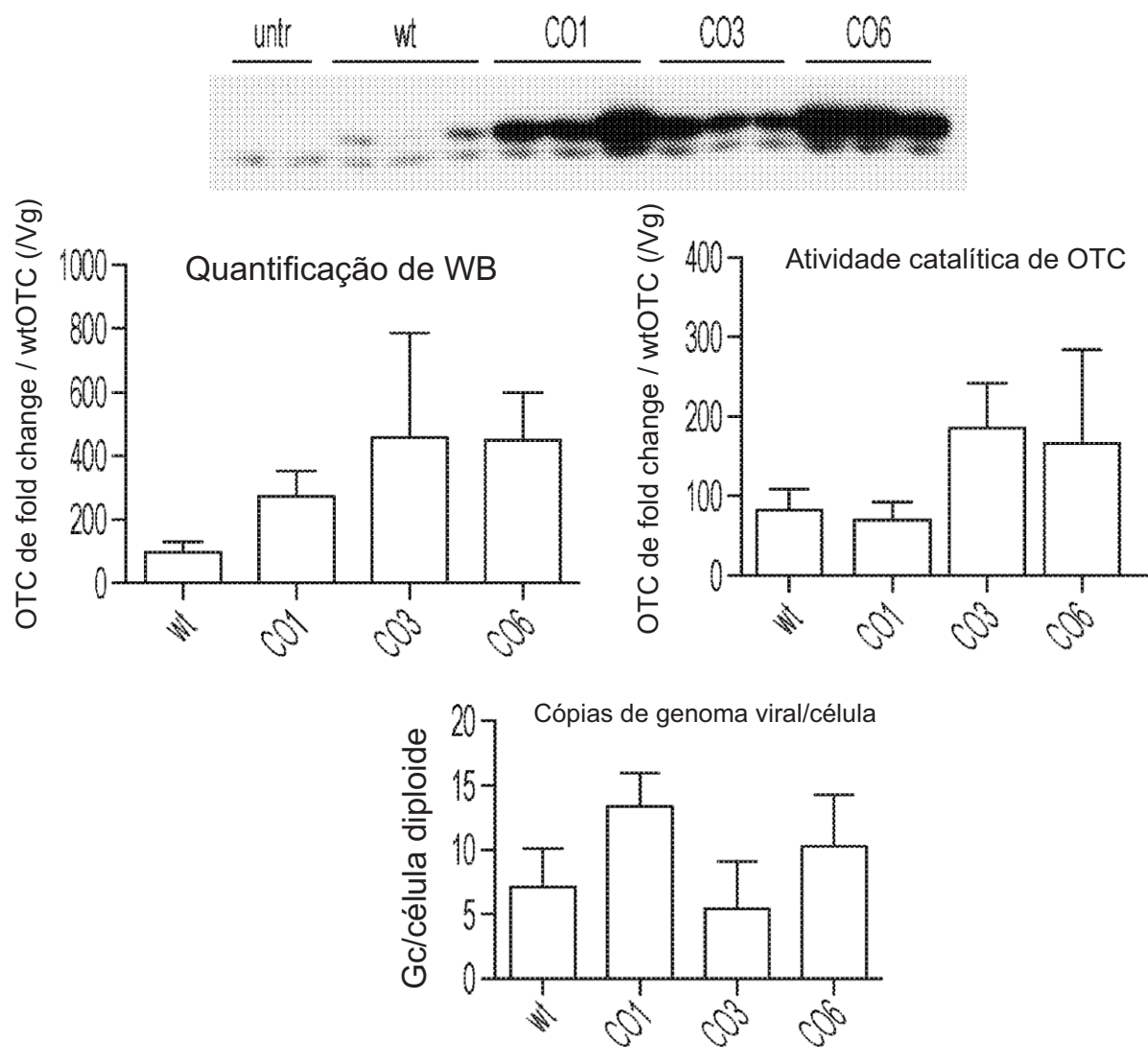


FIG. 24

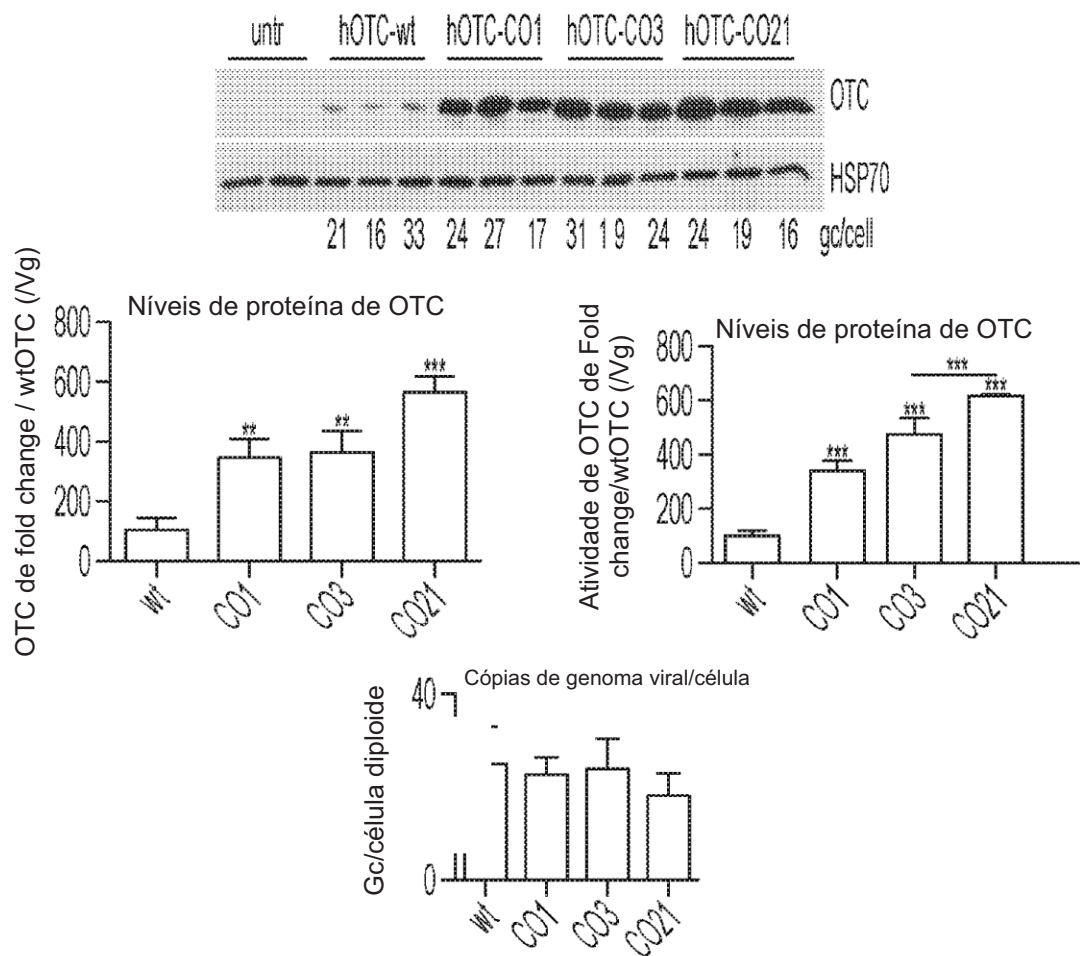


FIG. 25

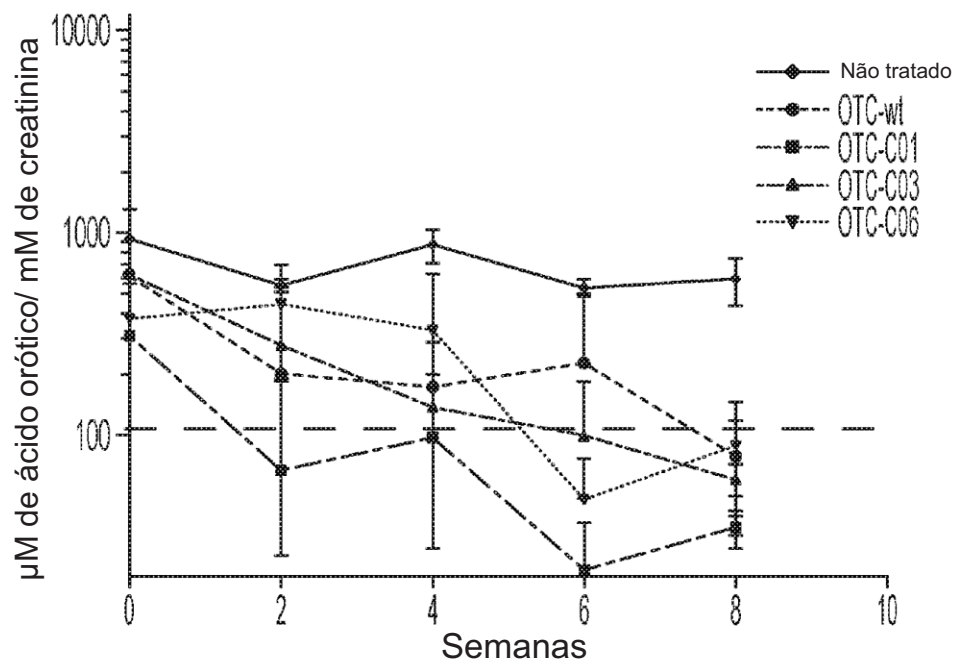


FIG. 26

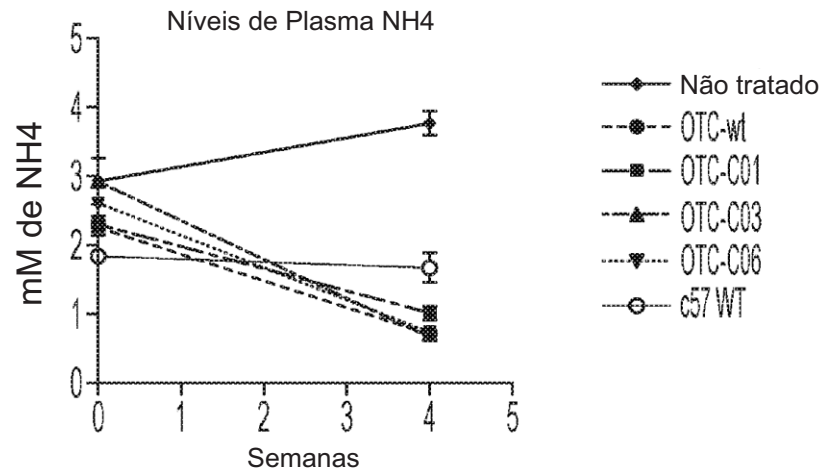


FIG. 27

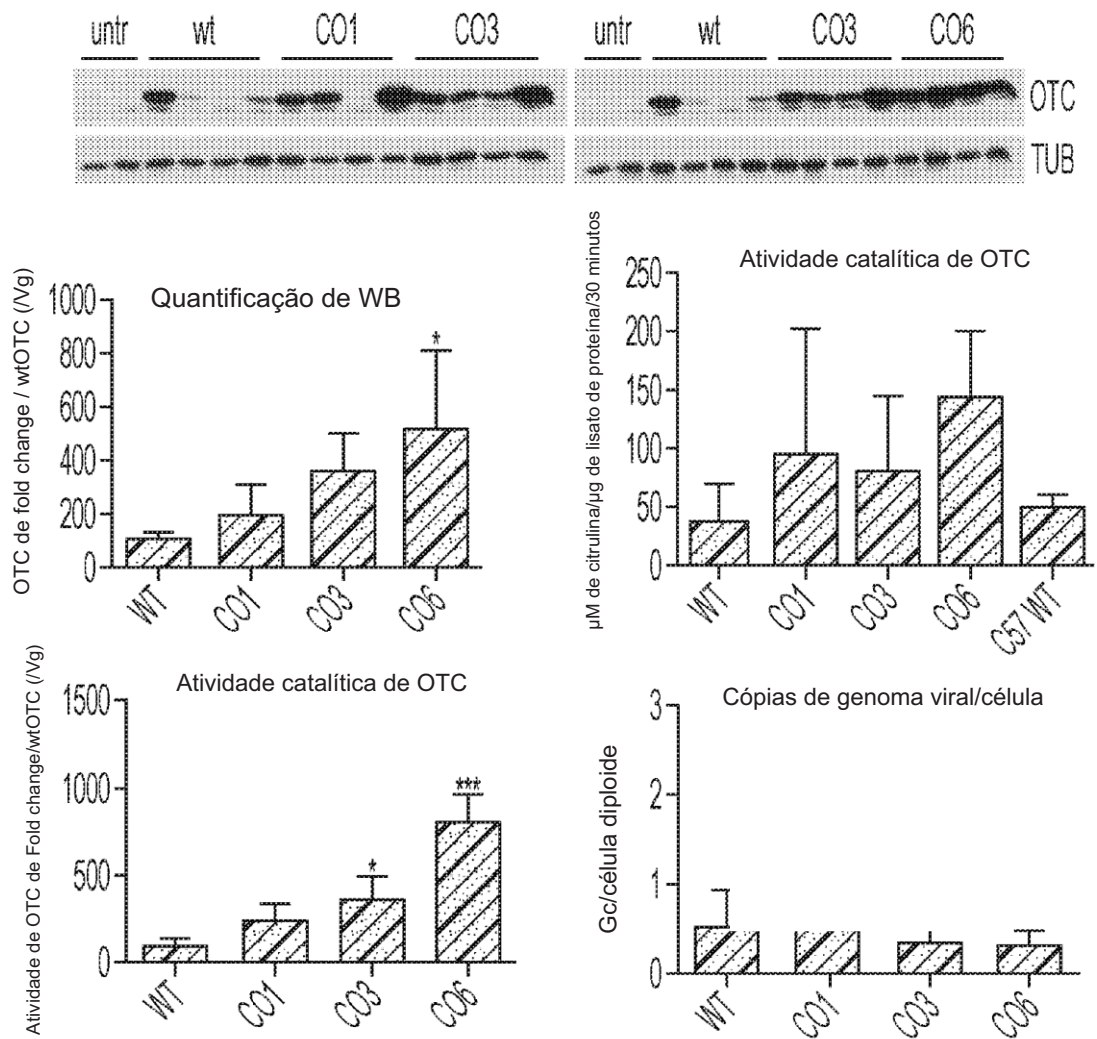


FIG. 28

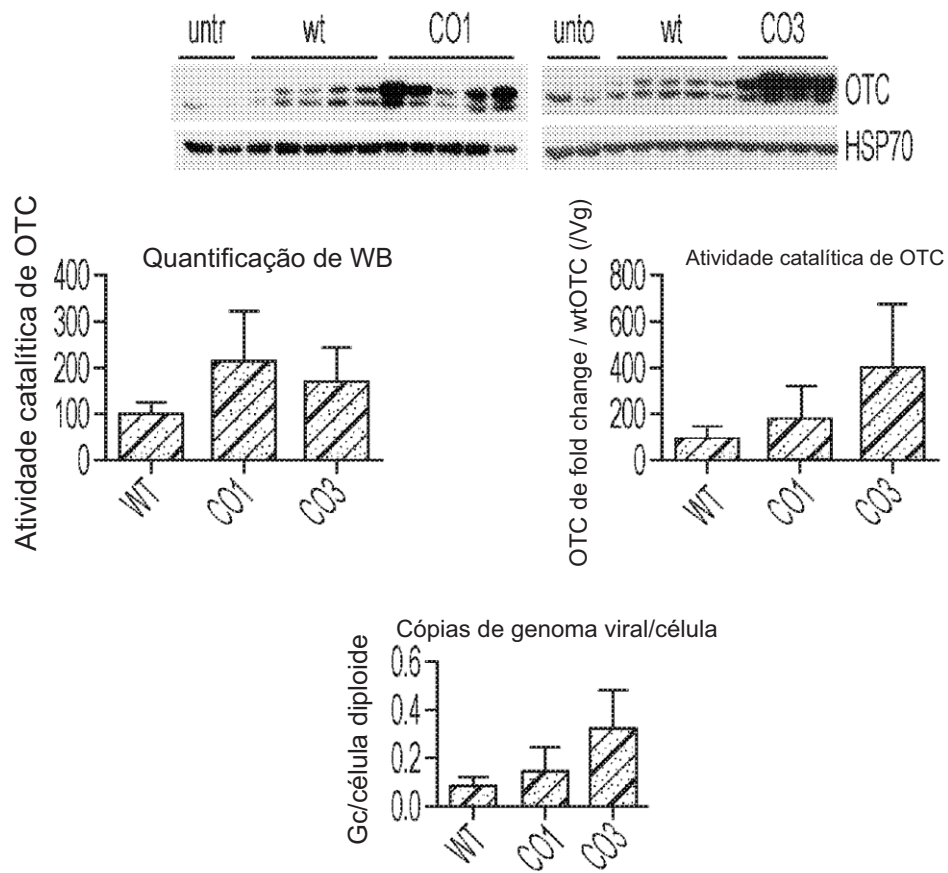


FIG. 29

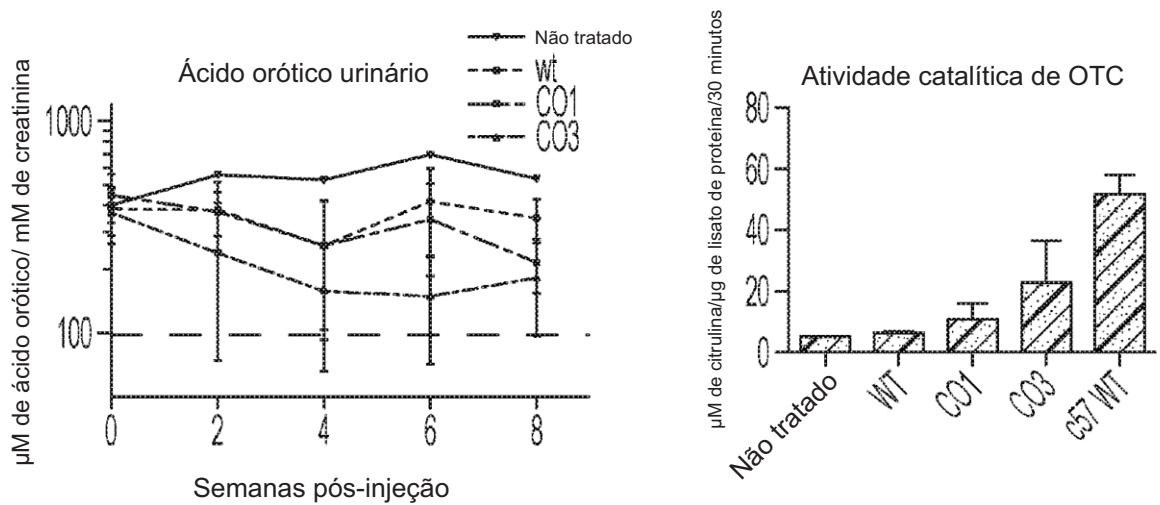


FIG. 30

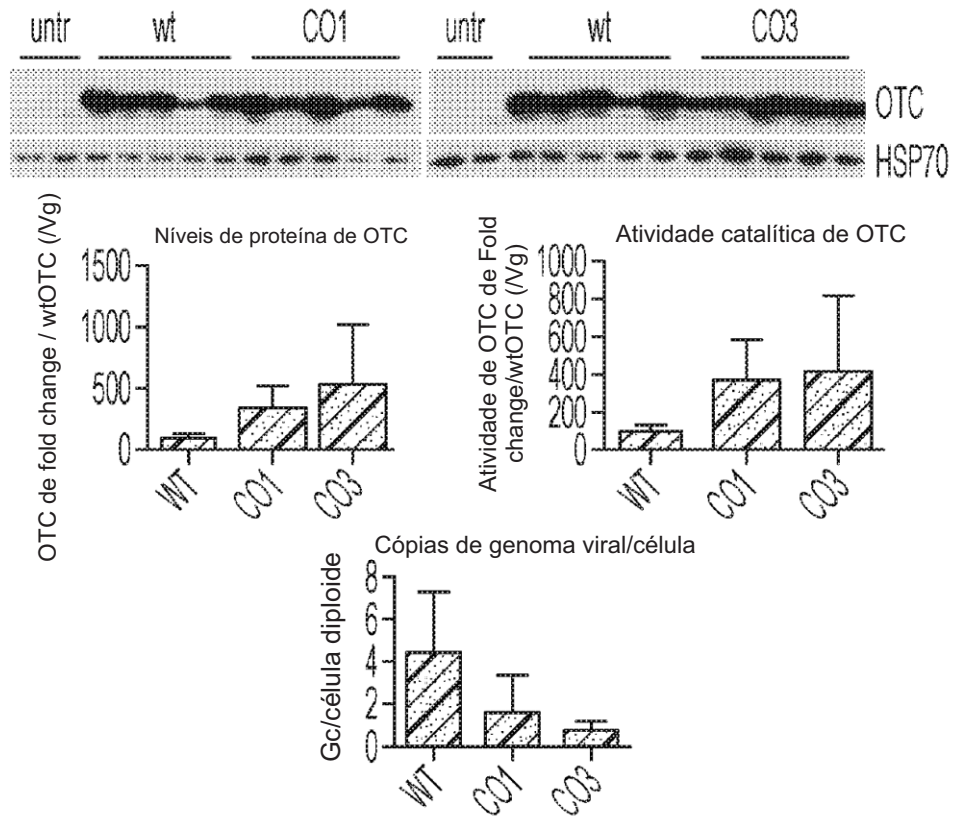


FIG. 31

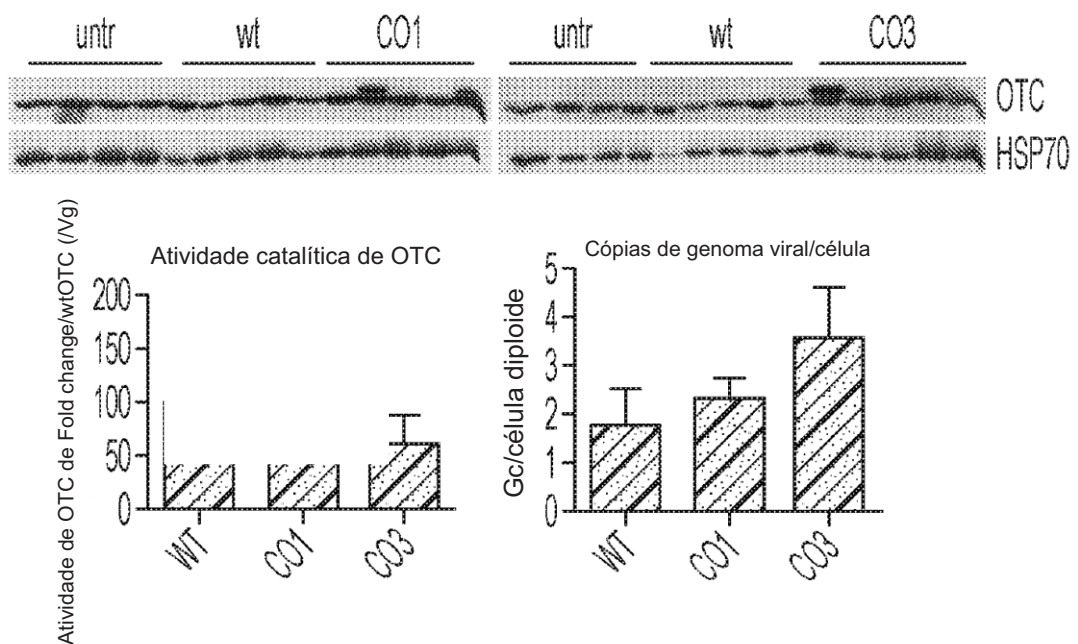


FIG. 32

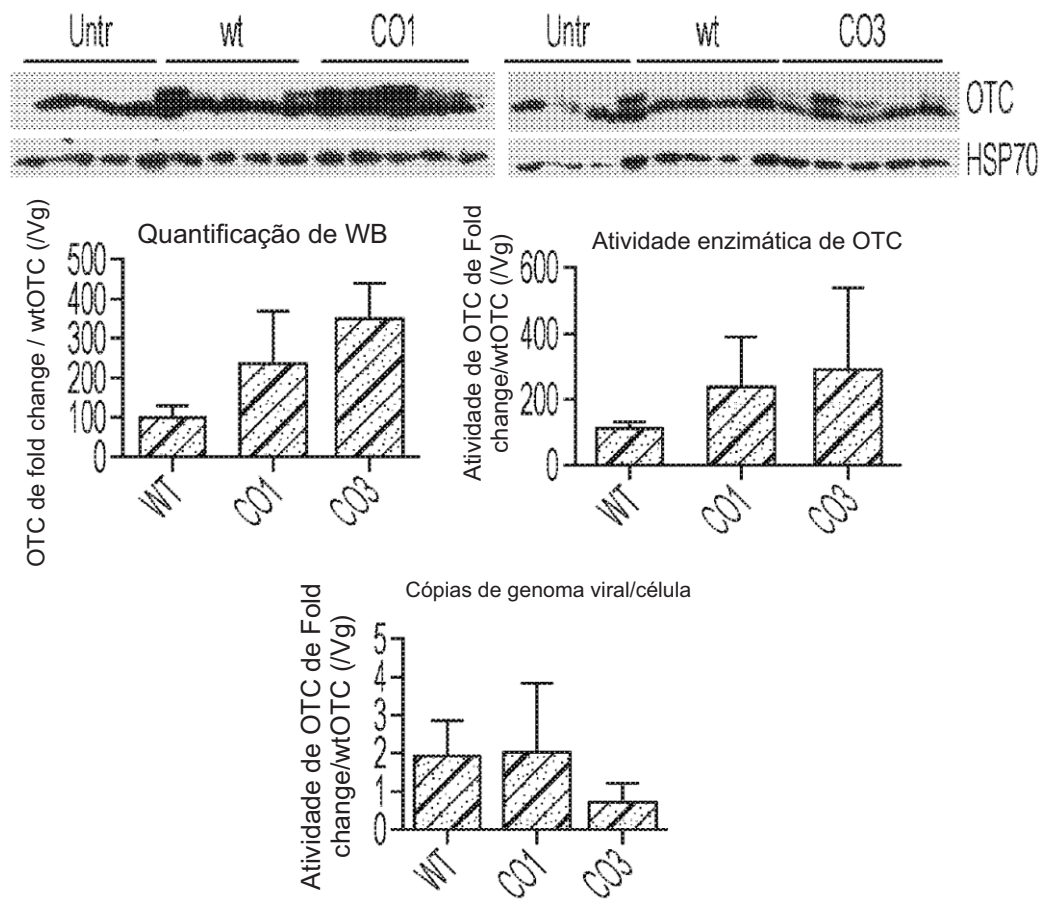


FIG. 33

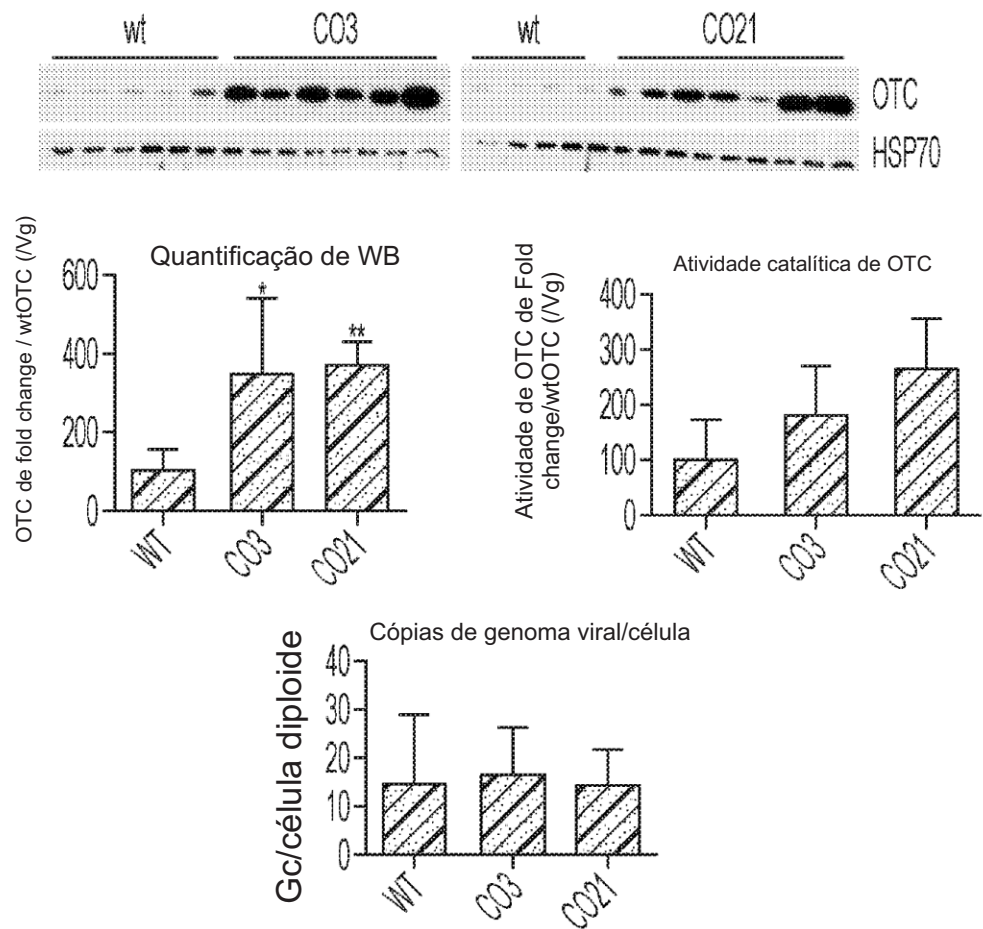


FIG. 34

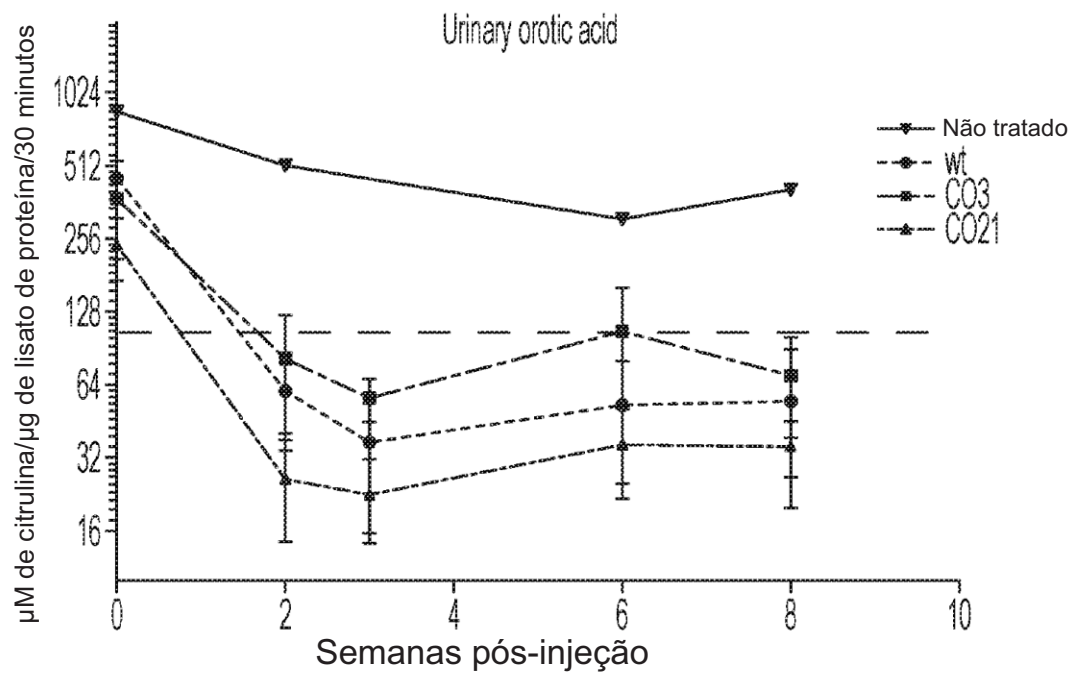


FIG. 35

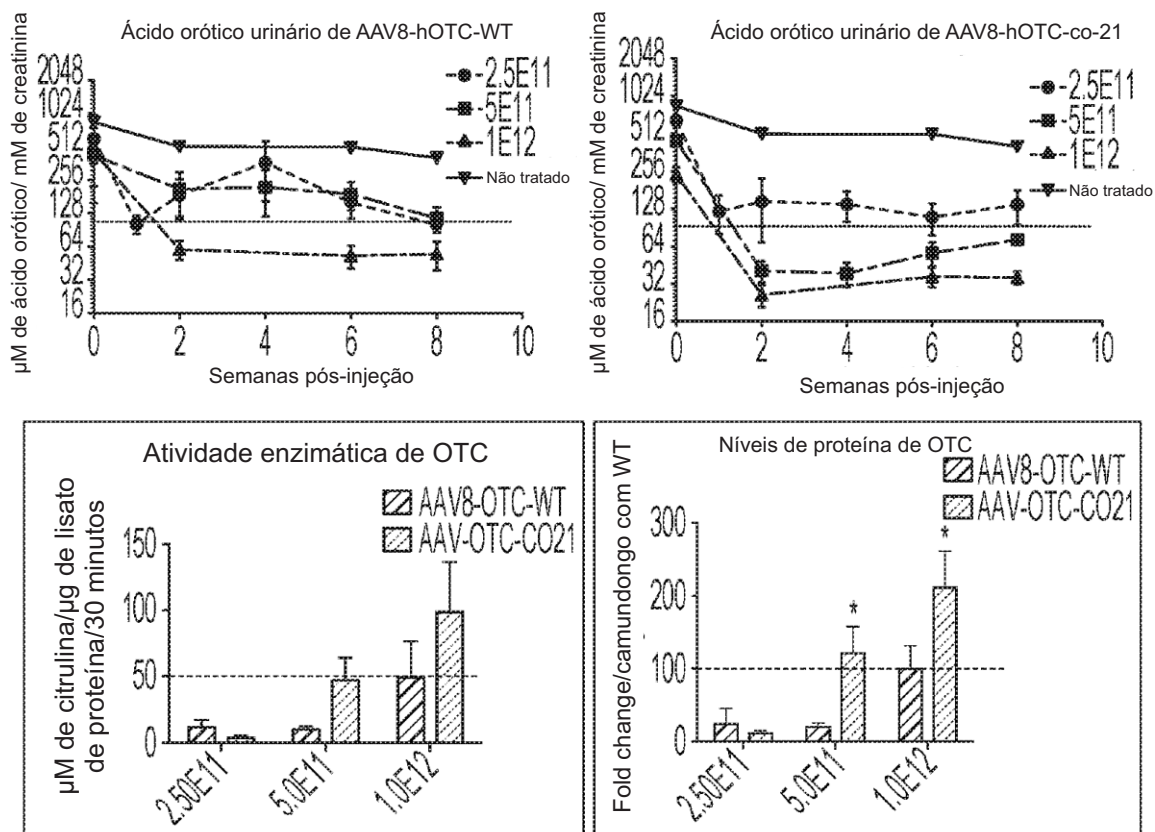


FIG. 36

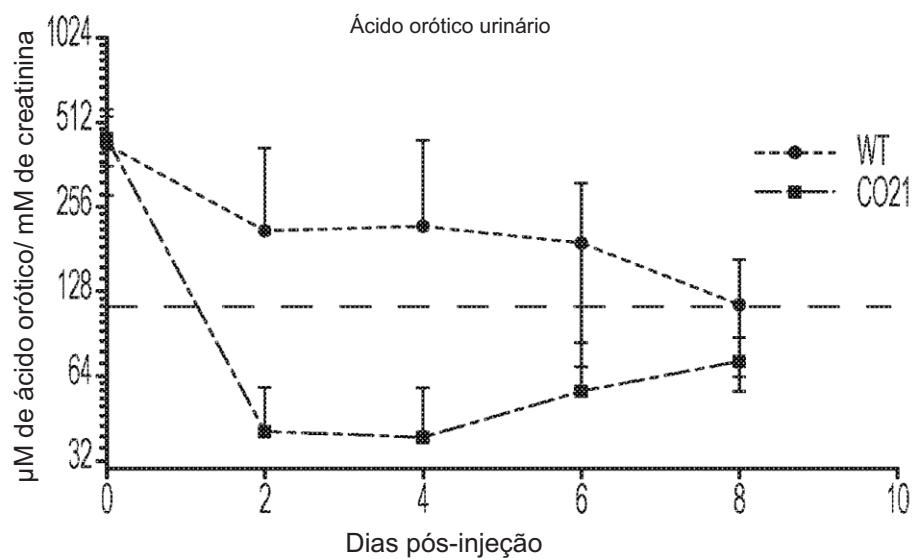


FIG. 37

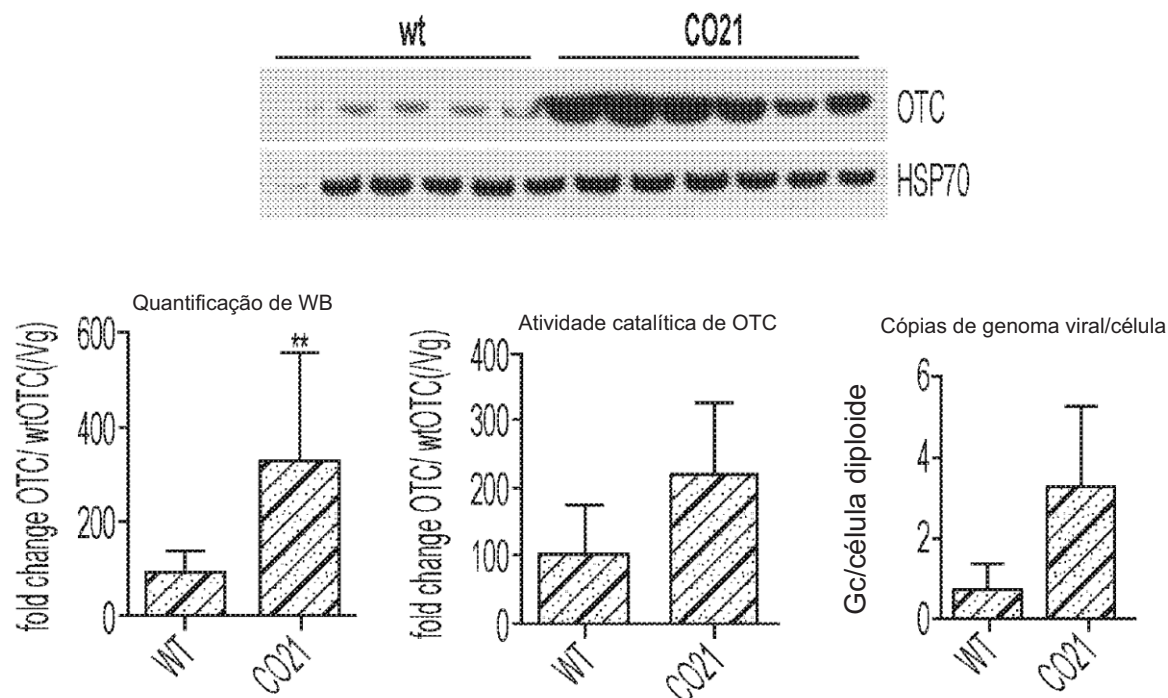


FIG. 38

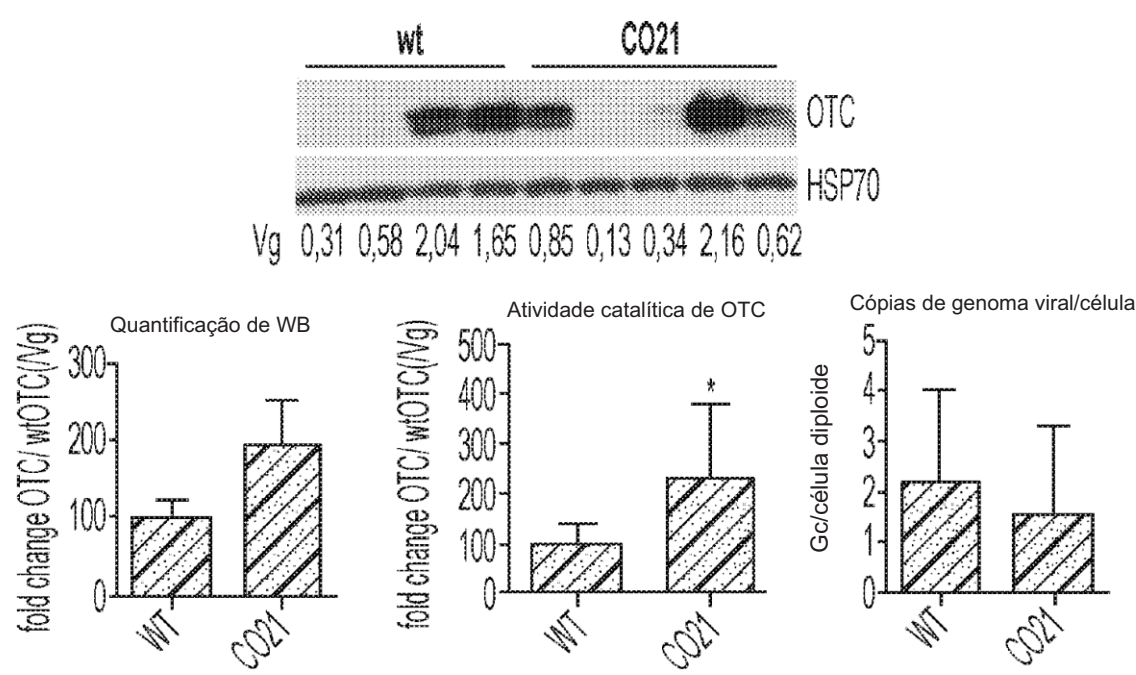


FIG. 39

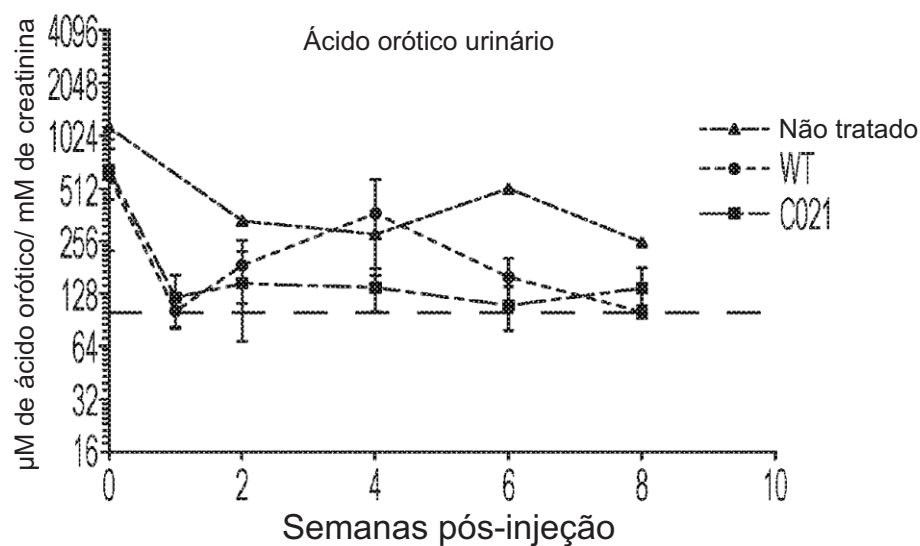


FIG. 40

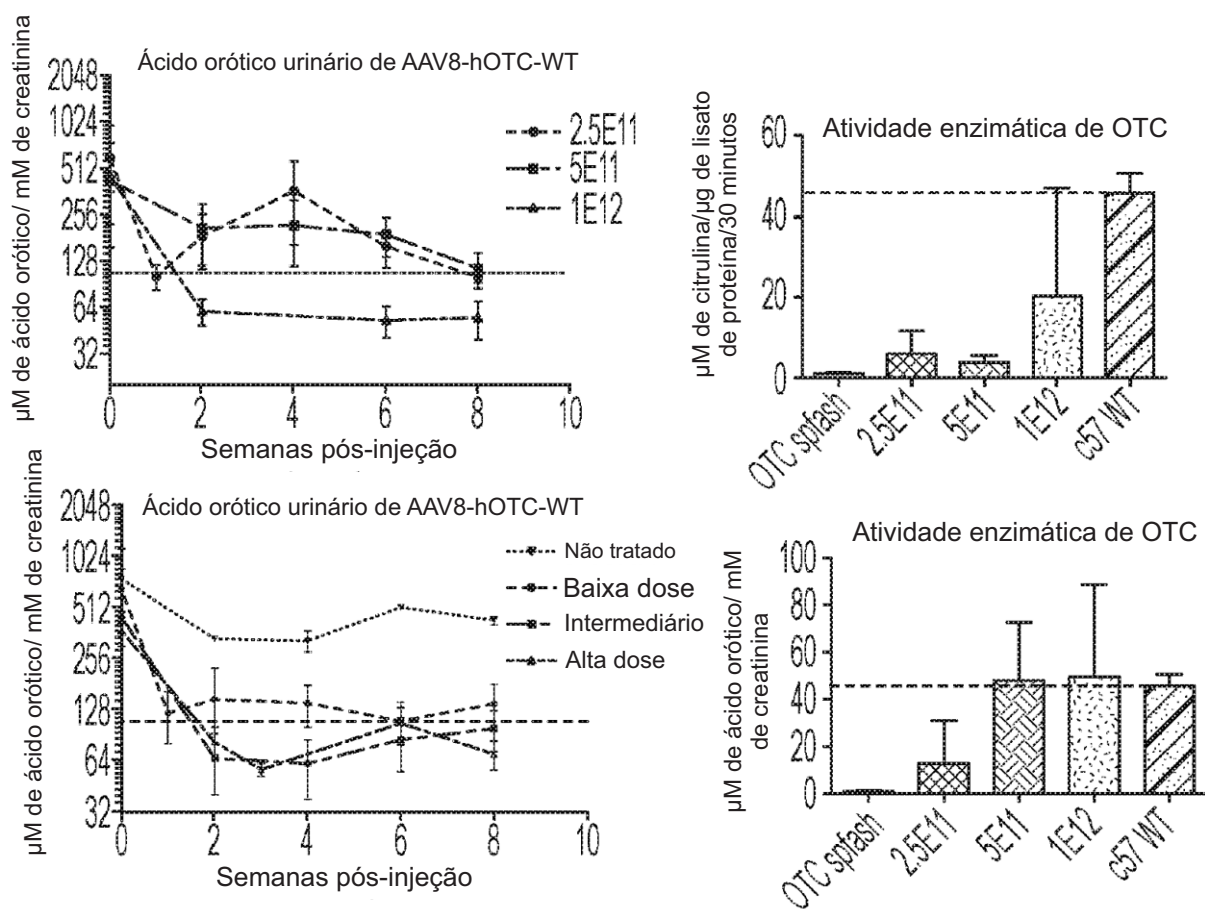


FIG. 41

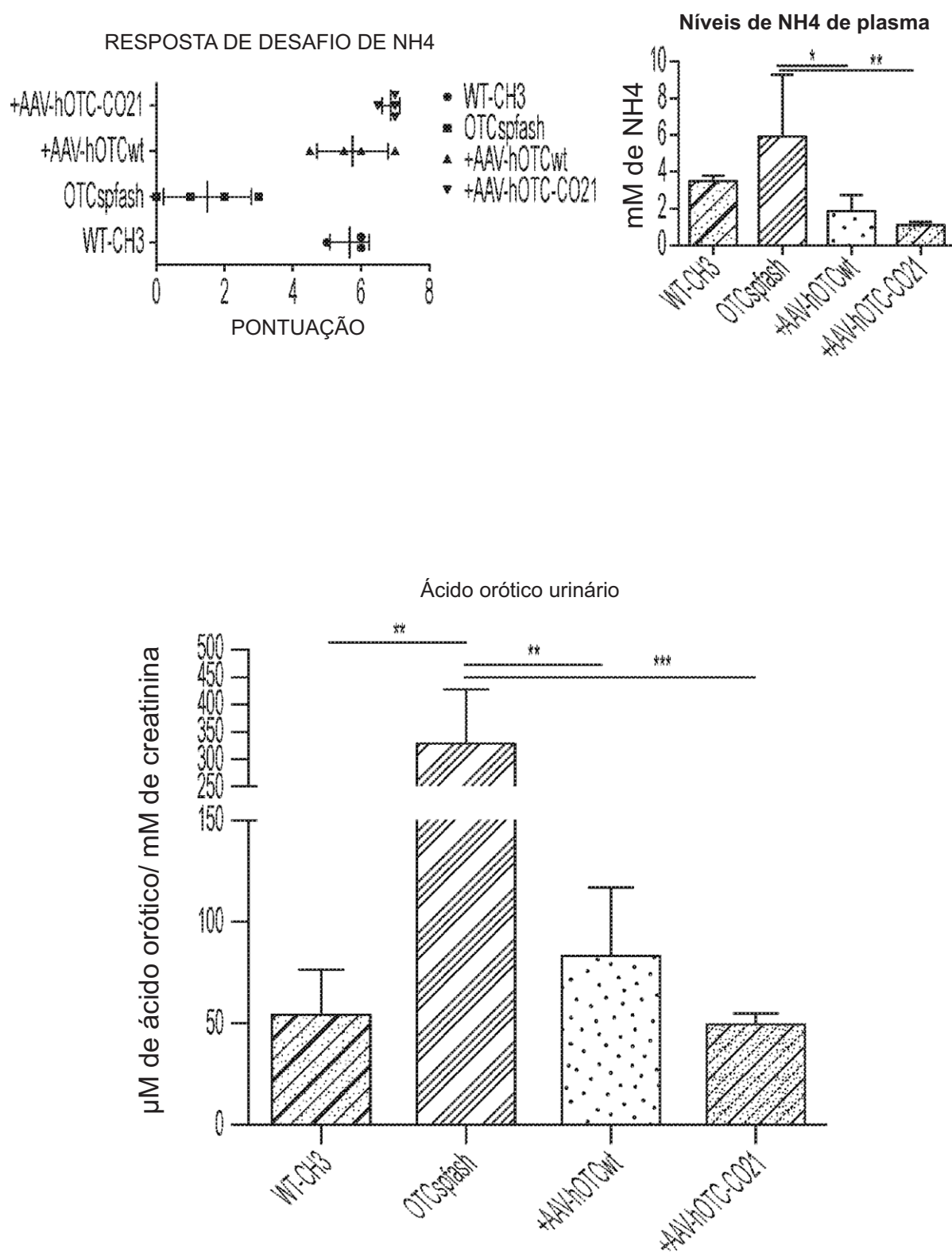


FIG. 42

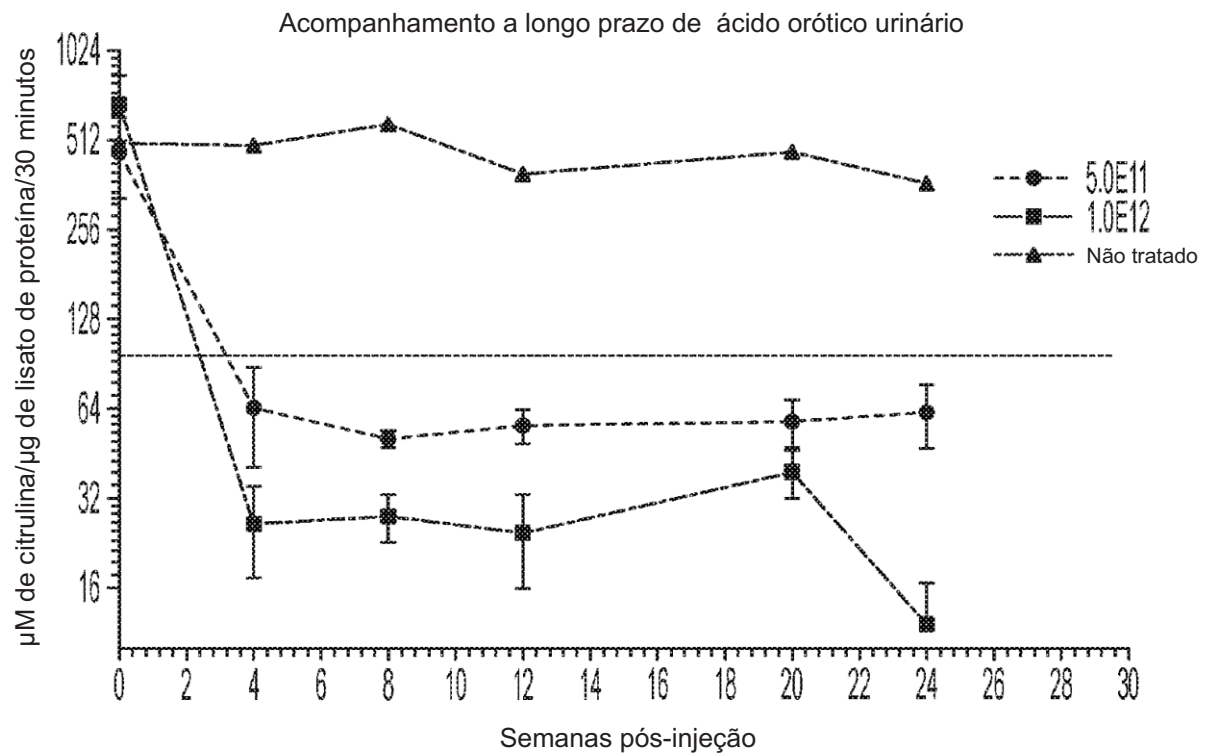


FIG. 43

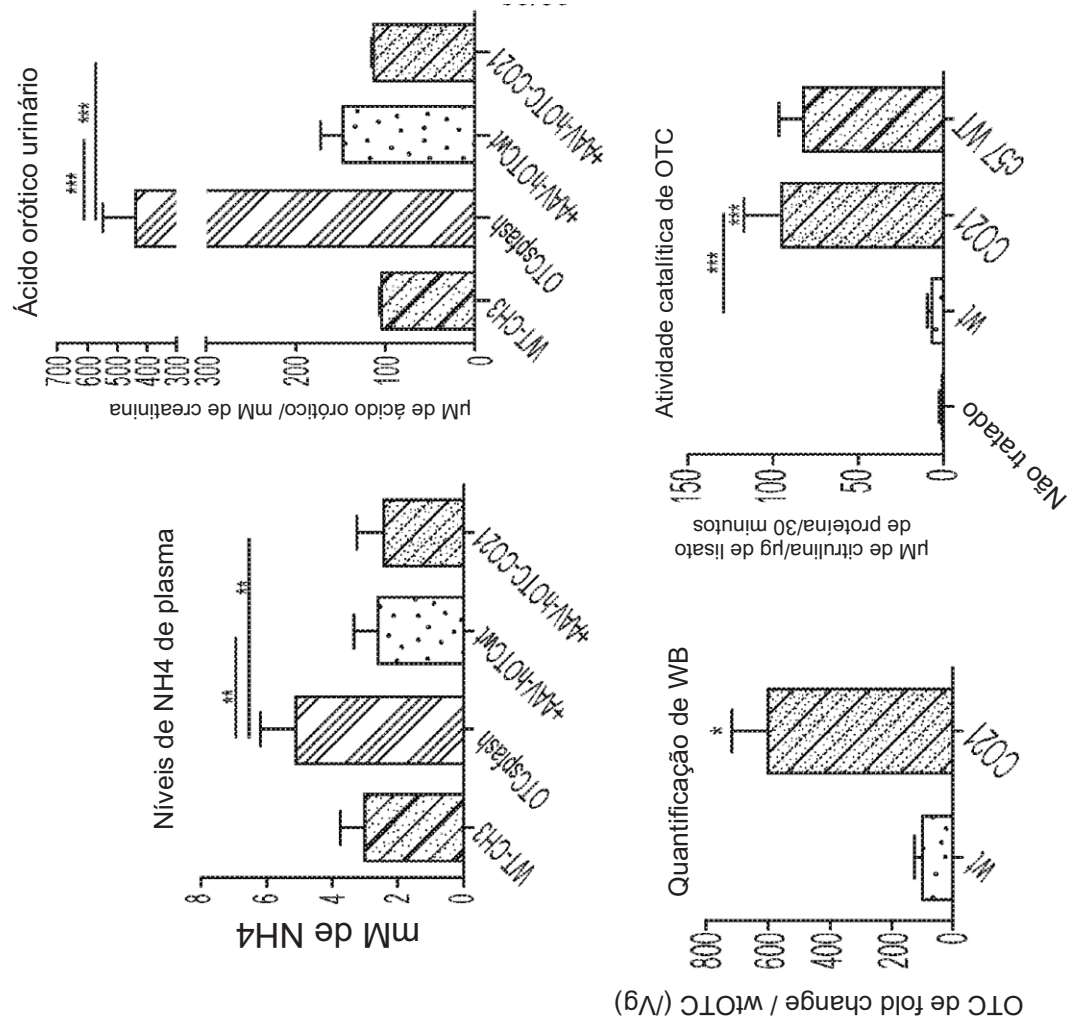
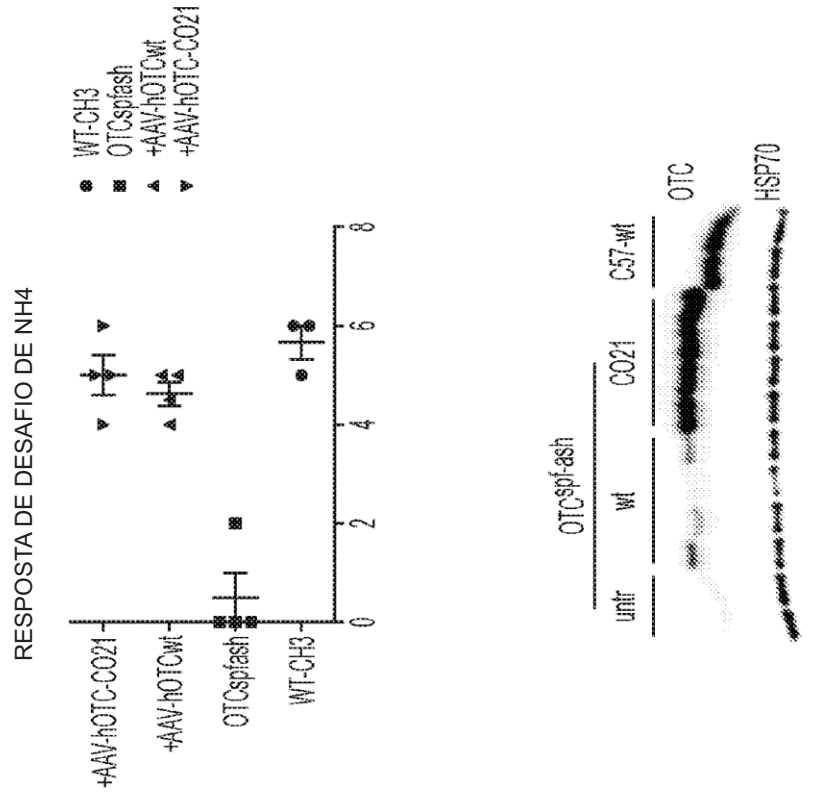


FIG. 44



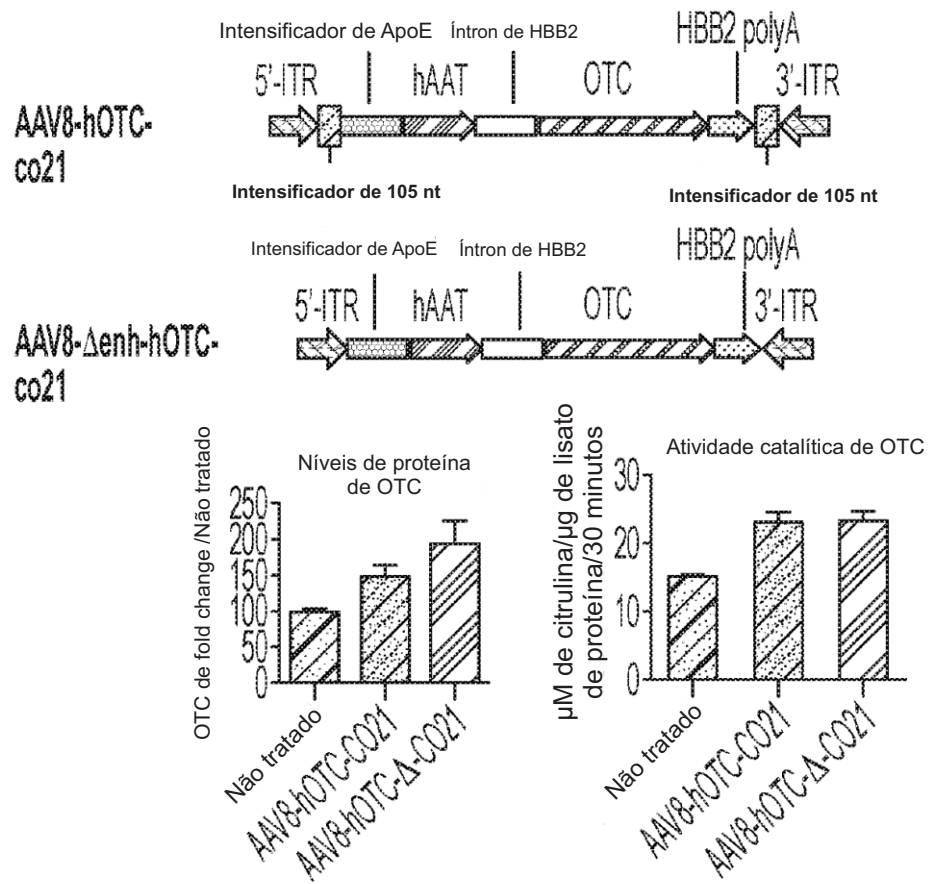


FIG. 45

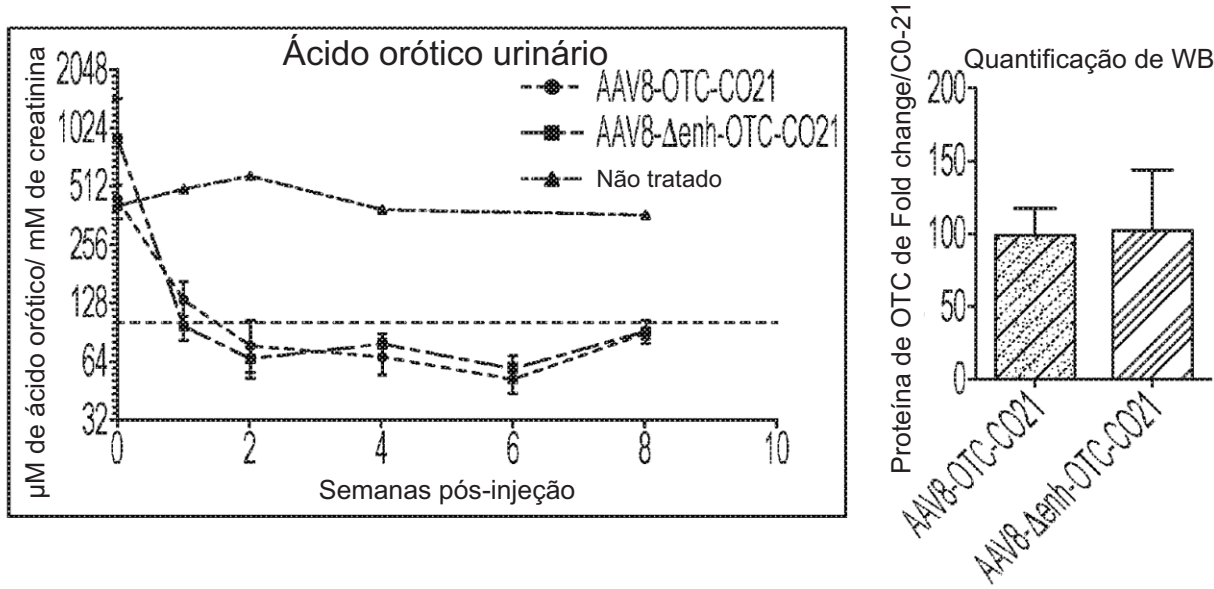


FIG. 46

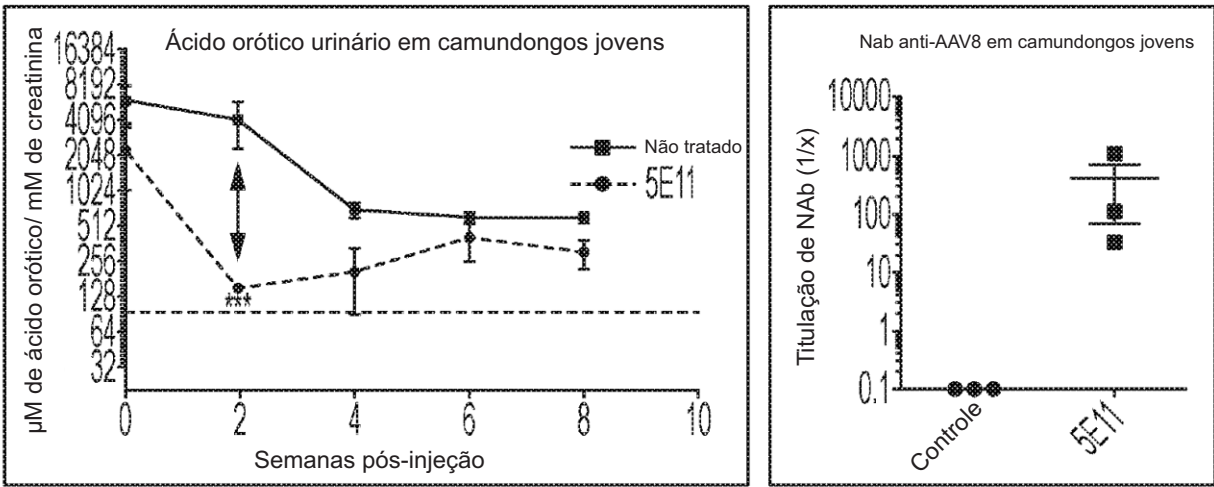


FIG. 47

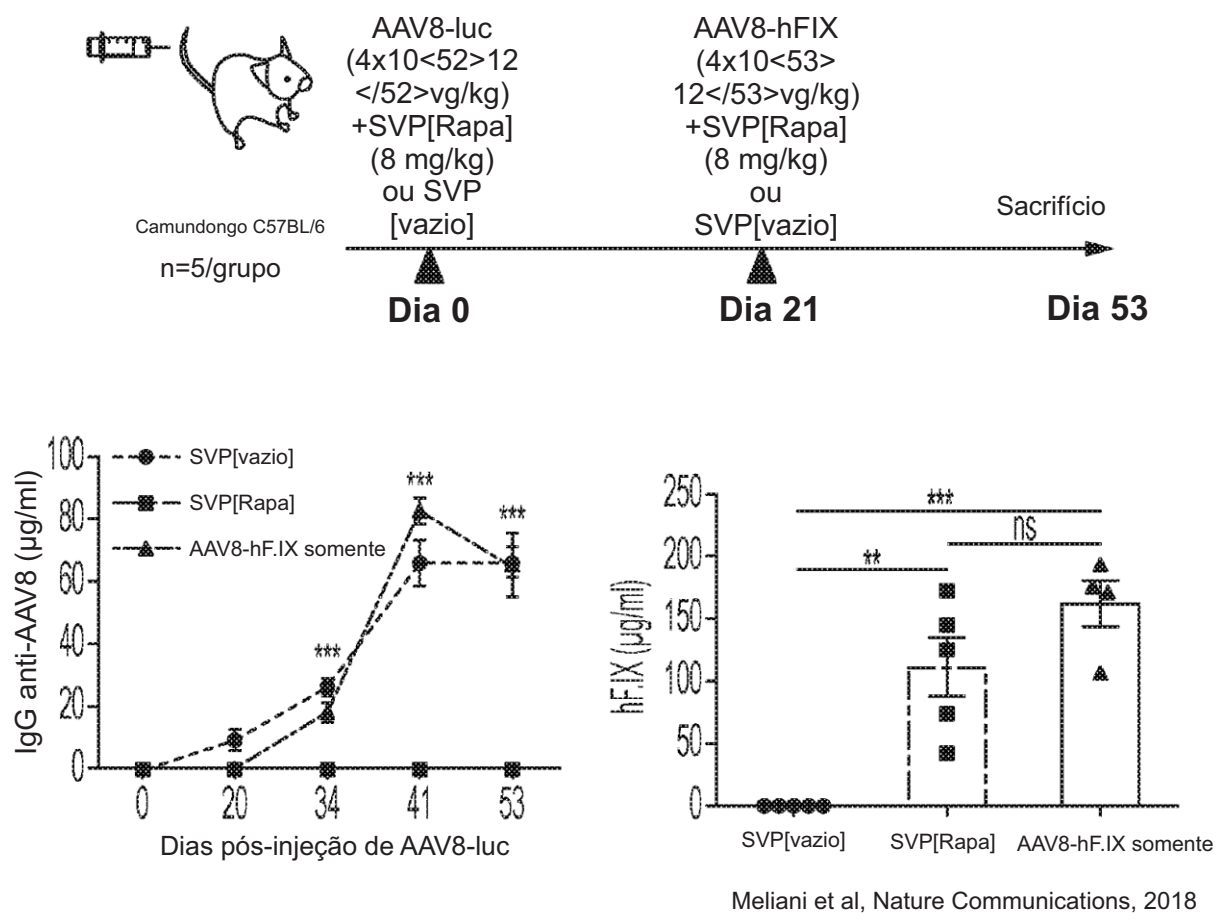
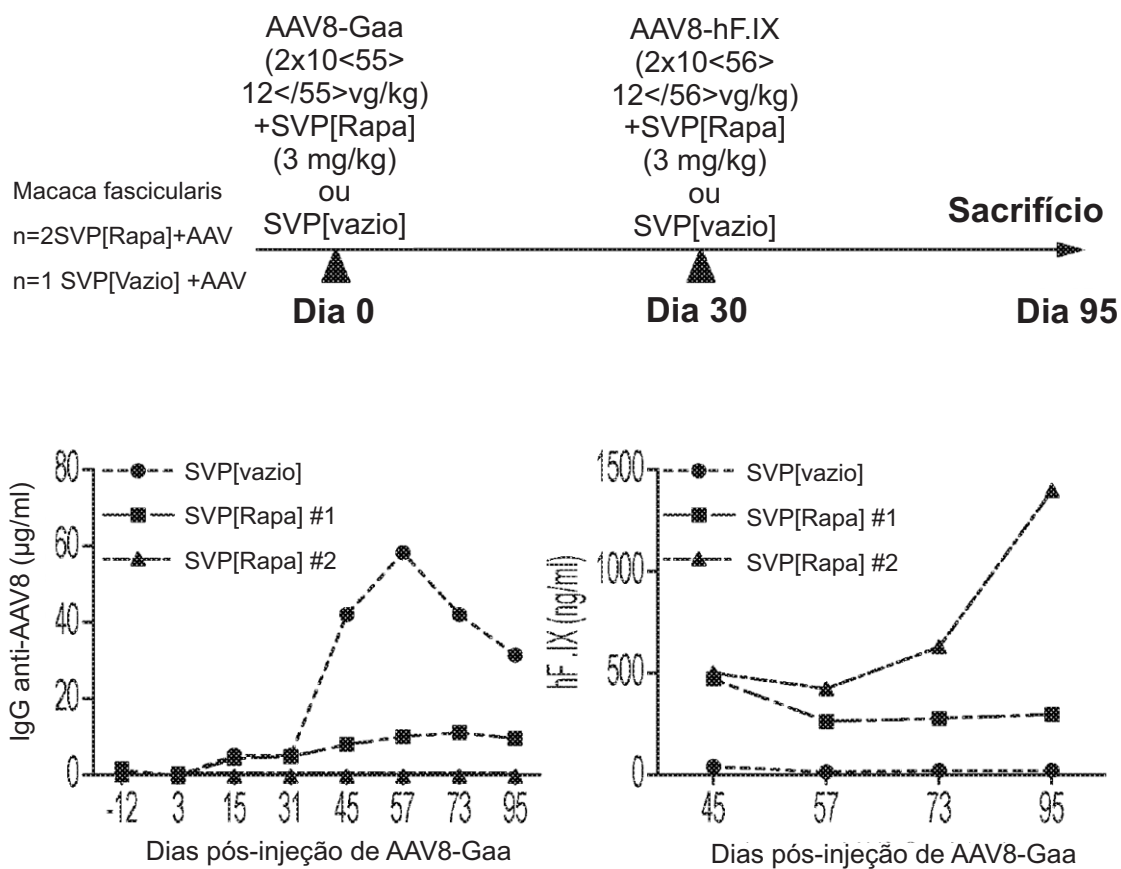


FIG. 48



Meliani et al, Nature Communications, 2018

FIG. 49

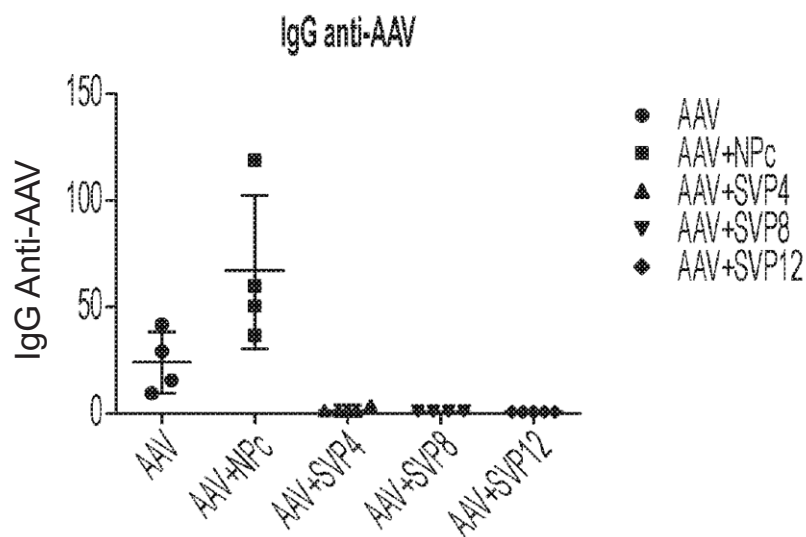


FIG. 50

RESUMO

Patente de Invenção: **“MÉTODOS E COMPOSIÇÕES DE CONSTRU-
TOS E VETORES DE OTC”**.

A presente invenção refere-se a métodos e composições relacionadas a ácidos nucleicos que codificam ornitina transcarbamilase (OTC), tais como ácidos nucleicos que compreendem uma sequência otimizada por códon de OTC, assim como vetores relacionados, tais como vetores de AAV. Além disso, são fornecidos métodos para administrar vetores de AAV que compreendem uma sequência que codifica uma enzima associada a um distúrbio de ciclo de ureia e uma sequência de controle de expressão, em combinação com nanocarreadores sintéticos acoplados a um imunossupressor.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagem de sequência p251540.TXT
- Data de Geração do Código: 15/01/2021
- Hora de Geração do Código: 14:27:51
- Código de Controle:
 - Campo 1: E311D8C9AA06C37D
 - Campo 2: 415EEC31FF77749F