



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

(21) BR 112020017348-7 A2



(22) Data do Depósito: 27/02/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 29/12/2020

(54) **Título:** VETORES DE VÍRUS ADENOASSOCIADOS (AAV), VETORES DE AAV TENDO DESAMIDAÇÃO DE CAPSÍDEOS REDUZIDA E USOS DOS MESMOS

(51) **Int. Cl.:** A61K 35/76; A61K 35/761; C12N 7/00; C12N 15/09; C12N 15/86; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 24/08/2018 US 62/722,382; 26/07/2018 US 62/703,670; 27/02/2018 US 62/635,964; 29/05/2018 US 62/677,471; 29/05/2018 US 62/667,585.

(71) **Depositante(es):** THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA.

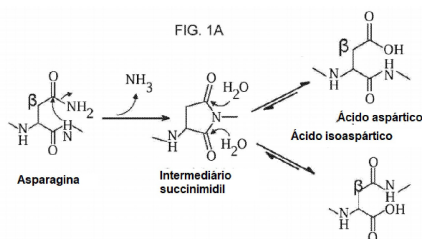
(72) **Inventor(es):** JAMES M. WILSON; APRIL TEPE; KEVIN TURNER; JOSHUA JOYNER SIMS.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019019804 de 27/02/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/168961 de 06/09/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 25/08/2020

(57) **Resumo:** VETORES DE VÍRUS ADENOASSOCIADOS (AAV), VETORES DE AAV TENDO DESAMIDAÇÃO DE CAPSÍDEOS REDUZIDA E USOS DOS MESMOS. A presente invenção refere-se a um vetor de vírus adenoassociado recombinante (rAAV) compreendendo um capsídeo de AAV tendo uma população heterogênea de proteínas vp1, uma população heterogênea de proteína vp2 e uma população heterogênea de proteínas vp3. O capsídeo contém aminoácidos modificados em comparação com a sequência de aminoácidos VP1 codificada, o capsídeo contendo resíduos de asparagina altamente desamidados no par asparagina-glicina, e compreendendo ainda vários outros resíduos de asparagina menos desamidada e opcionalmente glutamina. Métodos de redução da desamidação no capsídeo de AAV de um rAAV são fornecidos.



**"VETORES DE VÍRUS ADENOASSOCIADOS (AAV),
VETORES DE AAV TENDO DESAMIDAÇÃO DE CAPSÍDEOS
REDUZIDA E USOS DOS MESMOS".**

DECLARAÇÃO DE PESQUISA PATROCINADA PELO GOVERNO
FEDERAL

[001] Esta invenção foi feita com o apoio do governo sob o número de concessão P01HL059407 concedido pelo National Institute of Health's National Heart, Lung, and Blood Institute. O governo tem determinados direitos sobre a invenção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O capsídeo do vírus adenoassociado (AAV) é icosaédrico na estrutura e é composto por 60 monômeros de proteína viral (VP) (VP1, VP2 e VP3) em uma razão de 1:1:10 (Xie Q, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(16):10405-10). A totalidade da sequência da proteína VP3 (519aa) está contida no terminal C de VP1 e VP2, e as sequências VP3 compartilhadas são principalmente responsáveis pela estrutura geral do capsídeo. Devido à flexibilidade estrutural das regiões únicas VP1/VP2 e à baixa representação dos monômeros VP1 e VP2 em relação aos monômeros VP3 no capsídeo montado, VP3 é a única proteína do capsídeo a ser resolvida por cristalografia de raios-x (Nam HJ, et al. *J Virol*. 2007; 81(22):12260-71).. VP3 contém nove regiões hipervariáveis (HVRs) que são a fonte primária de variação de sequência entre sorotipos AAV (Govindasamy L, et al. *J Virol*. 2013; 87(20):11187-99). Dada sua flexibilidade e localização na superfície do capsídeo, os HVRs são amplamente responsáveis pelas interações com as células-alvo, bem como com o sistema imunológico (Huang LY, et al. *J Virol*. 2016; 90(11):5219-30; Raupp C, et al. *J Virol*. 2012; 86(17):9396-408). Embora as estruturas de uma série de sorotipos sejam publicadas (Protein Data Bank (PDB) IDs 1LP3, 4RSO, 4V86, 3UX1, 3KIC, 2QA0, 2G8G do banco de dados do Research Collaboratory for Structural

Bioinformatics (RCSB)) para as entradas de estrutura para AAV2, AAVrh.8, AAV6, AAV9, AAV3B, AAV8 e AAV4, respectivamente), há muito pouca informação na literatura a respeito de modificações na superfície desses capsídeos. A pesquisa sugere que a fosforilação intracelular do capsídeo ocorre em resíduos de tirosina específicos (Zhong L, et al. *Virology*. 2008; 381(2):194-202). Apesar dos sítios de glicosilação putativos na sequência VP3 primária, nenhum evento de glicosilação foi identificado em AAV2 (Murray S, et al. *J Virol*. 2006; 80(12):6171-6; Jin X, et al. *Hum Gene Ther Methods*. 2017; 28(5):255-267); outros sorotipos de AAV ainda não foram avaliados para glicosilação de capsídeo.

[003] Os vetores de terapia genética de AAV foram submetidos a menos do escrutínio de nível molecular que normalmente acompanha o desenvolvimento e fabricação de terapêuticas de proteínas recombinantes. As modificações pós-tradução do capsídeo de AAV (PTM) têm sido amplamente inexploradas, portanto, pouco se sabe sobre seu potencial para impactar a função, ou sobre estratégias para controlar os níveis de PTM em terapias de AAV fabricadas.

[004] Variações nas modificações pós-tradução de terapias com proteínas de terapia não genética complicaram seu desenvolvimento como drogas. Jenkins, N, Murphy, L e Tyther, R (2008). Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals. *Mol Biotechnol* 39: 113-118; Houde, D, Peng, Y, Berkowitz, SA, and Engen, JR (2010). Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol Cell Proteomics* 9: 1716-1728. Por exemplo, a desamidação de aminoácidos selecionados modula a estabilidade e a resposta imune à vacina contra antraz à base de antígeno protetor recombinante. (Powell BS, et al. *Proteins*. 2007; 68(2):45879; Verma A, et al. *Clin Vaccine Immunol*. 2016; 23(5):396-402). Em alguns casos, este processo é catalisado por

desamidases virais ou bacterianas para modular as vias de sinalização da célula hospedeira ou respostas imunes inatas (Zhao J, et al. *J Virol*. 2016; 90(9):4262-8; Zhao J, et al. *Cell Host Microbe*. 2016; 20(6):770-84). Mais comumente, a desamidação endógena é um processo espontâneo independente de enzima. Embora o propósito da desamidação espontânea não tenha sido totalmente elucidado, estudos anteriores sugeriram que esse evento serve como um relógio molecular para indicar a idade relativa de uma proteína e regular sua dobra (Robinson NE e Robinson AB. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(3):944-9).

[005] A desamidação ocorre quando o grupo amida da asparagina ou menos frequentemente da glutamina sofre ataque nucleofílico de um átomo de nitrogênio adjacente e o grupo amida é perdido. Este processo leva a um intermediário succinimidil (Yang H e Zubarev RA. *Electrophoresis*. 2010; 31(11):1764-72) que, por meio de hidrólise, se resolve em uma mistura de ácido aspártico e ácido isoaspártico (ou ácido glutâmico e ácido isoglutâmico) (Catak S, et al. *J Phys Chem A*. 2009; 113(6):1111-20). Estudos de peptídeos sintéticos curtos estimam que essa hidrólise resulta em uma mistura 3:1 de ácido isoaspártico em ácido aspártico (Geiger T. and Clarke S. *J Biol Chem*. 1987; 262(2):785-94).

[006] Continua a haver uma necessidade de composições compreendendo construtos baseados em AAV para distribuição de moléculas heterólogas que têm ligação ao receptor estável e/ou capsídeos estáveis, evitam anticorpos neutralizantes e/ou retêm pureza no armazenamento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007] Em uma modalidade, é fornecida uma composição que compreende uma população mista de vírus adenoassociado recombinante (rAAV), cada um dos referidos rAAV compreendendo: (a)

um capsídeo de AAV compreendendo cerca de 60 proteínas vp1 do capsídeo, proteínas vp2 e proteínas vp3, em que as proteínas vp1, vp2 e vp3 são: uma população heterogênea de proteínas vp1 que são produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos AAV vp1 selecionada, uma população heterogênea de proteínas vp2 que são produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos AAV vp2 selecionada, uma população heterogênea de proteínas vp3 que produziu a partir de uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos AAV vp3 selecionada, em que: as proteínas vp1, vp2 e vp3 contêm subpopulações com modificações de aminoácidos compreendendo pelo menos duas asparaginas altamente desamidadas (N) em pares de asparagina-glicina em um capsídeo de AAV e, opcionalmente, compreendendo ainda subpopulações compreendendo outros aminoácidos desamidados, em que a desamidação resulta em uma mudança de aminoácido; e (b) um genoma de vetor no capsídeo de AAV, o genoma de vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo sequências de repetição terminal invertida de AAV e uma sequência de ácido nucleico não AAV que codifica um produto operacionalmente ligado a sequências que direcionam a expressão do produto em uma célula hospedeira. Uma população mista de rAAV resulta de um sistema de produção usando um único tipo de sequência de ácido nucleico do capsídeo de AAV que codifica uma sequência de aminoácidos de VP1 de AAV predita de um tipo de AAV. No entanto, o processo de produção e fabricação fornece a população heterogênea de proteínas do capsídeo descritas acima. Em certas modalidades, a composição é conforme descrito neste parágrafo, com a condição de que o rAAV não seja AAVhu68. Em certas modalidades, a composição é conforme descrito neste parágrafo, com a condição de que o rAAV

não seja AAV2.

[008] Em certas modalidades, as asparaginas desamidadas são desamidadas em ácido aspártico, ácido isoaspártico, um par interconvertido de ácido aspártico/ácido isoaspártico ou combinações dos mesmos. Em certas modalidades, o capsídeo compreende ainda glutamina(s) desamidada(s) que são desamidadas em ácido (α)-glutâmico, ácido γ -glutâmico, um par interconvertido de ácido (α)-glutâmico/ácido γ -glutâmico ou combinações dos mesmos.

[009] Em certas modalidades, é fornecido um método para reduzir a desamidação de um capsídeo de AAV. Tal método compreende produzir um capsídeo de AAV a partir de uma sequência de ácido nucleico contendo códons vp de AAV modificados, a sequência de ácido nucleico compreendendo códons de glicina independentemente modificados em um a três dos pares asparagina - glicina em relação a uma sequência AAV vp1 de referência, de modo que o códon modificado codifica um aminoácido diferente de glicina.

[0010] Em outras modalidades, é fornecido um método para reduzir a desamidação de um capsídeo de AAV. Tal método compreende produzir um capsídeo de AAV a partir de uma sequência de ácido nucleico contendo códons vp de AAV modificados, a sequência de ácido nucleico compreendendo códons de asparagina independentemente modificados de pelo menos um par asparagina - glicina em relação a uma sequência AAV vp1 de referência, de modo que o códon modificado codifica um aminoácido diferente de asparagina.

[0011] Um método para aumentar o título, potência e/ou eficiência de transdução de um AAV é fornecido. O método compreende produzir um capsídeo de AAV a partir de uma sequência de ácido nucleico contendo pelo menos um códon vp de AAV modificado para alterar a asparagina ou glicina de pelo menos um par de asparagina - glicina no capsídeo para um aminoácido diferente. Em certas modalidades, o(s)

códon(s) modificado(s) está/estão na região v2 e/ou vp3. Em certas modalidades, o par asparagina - glicina na região única de vp1 é retido no rAAV modificado. Em certas modalidades, são fornecidas sequências de moléculas de ácido nucleico que codificam esses capsídeos de AAV mutantes.

[0012] Em certas modalidades, um sítio de desamidação (por exemplo, um par asparagina-glicina ou um Gln) é modificado em um local diferente de: (a) N57, N263, N385, N514 e/ou N540 de SEQ ID NO: 6 (AAV8 vp1 codificado], com base na numeração do AAV8 vp1, com o M inicial, para um capsídeo AAV8; (b) N57, N329, N452 e/ou N512, com base na numeração da SEQ ID NO: 7 (AAV9 vp1 codificado), com o M inicial, para um capsídeo de AAV9; ou (c) N263, N385 e/ou N514, com base na numeração de SEQ ID NO: 112 (AAVrh10 vp1 codificado), com o M inicial, para um capsídeo AAVrh10. Em certas modalidades, o local de desamidação modificado é selecionado a partir de um sítio na Tabela F ou Tabela G. Em certas modalidades, o sítio de desamidação modificado é selecionado a partir de um local na Tabela F ou Tabela G, exclusivo das posições em (a) - (c) acima. Em certas modalidades, um sítio de desamidação (por exemplo, um par asparagina-glicina ou um Gln (Q) é modificado em um sítio diferente de: (a) N57, N383, N512 e/ou N718, com base na numeração de SEQ ID NO: 1, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo AAV1; (b) N57, N382, N512 e/ou N718, com referência à numeração de SEQ ID NO: 2, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo de AAV3B; (c) N56, N347, N347 e/ou N509, com referência à numeração de SEQ ID NO: 3, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo de AAV5; (d) N41, N57, N384 e/ou N514, com referência à numeração de SEQ ID NO: 4, com base na numeração da sequência

de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo AAV7; (e) N57, N264, N292 e/ou N318, com referência à numeração de SEQ ID NO: 5, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo AAVrh32.33; ou (f) N56, N264, N318 e/ou N546, com referência à numeração de SEQ ID NO: 111, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo de AAV4. Em certas modalidades, o sítio de desamidação modificado é selecionado de um sítio na Tabela A, Tabela B, Tabela C, Tabela D, Tabela E, Tabela F ou Tabela G. Em certas modalidades, o sítio de desamidação modificado é exclusivo das posições em (a) - (f) listados acima.

[0013] Em certas modalidades, o método envolve gerar AAVs recombinantes com um capsídeo de AAV8 mutante selecionado com uma mutação de: AAV8 G264A/G515A (SEQ ID NO: 21), AAV8G264A/G541A (SEQ ID NO: 23), AAV8G515A/G541A (SEQ ID NO: 25), ou AAV8 G264A/G515A/G541A (SEQ ID NO: 27), AAV8 G264A/G541A/N499Q (SEQ ID NO: 115); (c) AAV8 G264A/G541A/N459Q (SEQ ID NO: 116); (d) AAV8 G264A/G541A/N305Q/N459Q (SEQ ID NO: 117); (e) AAV8 G264A/G541A/N305Q/N499Q (SEQ ID NO: 118); AAV8 G264A/G541A/N459Q/N499Q (SEQ ID NO: 119); ou AAV8 G264A/G541A/ N305Q/N459Q/N499Q (SEQ ID NO: 120); com base na numeração de AAV8 ou em outro AAV com base no alinhamento de uma sequência selecionada com AAV8. Em certas modalidades, o método envolve gerar rAAV com um capsídeo de AAV9 mutante selecionado de: AAV9 G330/G453A (SEQ ID NO: 29), AAV9G330A/G513A (SEQ ID NO: 31), AAV9G453A/G513A (SEQ ID NO 33), e/ou AAV9 G330/G453A/G513A (SEQ ID NO: 35).

[0014] Em certas modalidades, são fornecidas sequências de moléculas de ácido nucleico que codificam esses capsídeos de AAV

mutantes. Em certas modalidades, as sequências de ácido nucleico são fornecidas, por exemplo, SEQ ID NO: 20 (AAV8 G264A/G515A), SEQ ID NO: 22 (AAV8G264A/G541A), SEQ ID NO: 24 (AAV8G515A/G541A) ou SEQ ID NO: 26 (AAV8 G264A/G515A/G541A). Em certas modalidades, as sequências de ácido nucleico são fornecidas em, por exemplo, SEQ ID NO: 28 (9G330AG453A); SEQ ID NO: 30 (9G330AG513A), SEQ ID NO: 32 (9G453AG513A), SEQ ID NO: 34 (9G330AG453AG513A). Em certas modalidades, outros AAVs podem ser mutados para ter tais mudanças nestes ou em pares NG correspondentes, com base em um alinhamento com AAV9.

[0015] É fornecida uma composição que compreende uma população de rAAV com título, potência ou transdução aumentados. Em certas modalidades, a composição compreende rAAV com capsídeos que são modificados para ter uma diminuição da desamidação total em comparação com um rAAV com um padrão de desamidação com um padrão de desamidação de capsídeo de acordo com qualquer um da Tabela A (AAV1), Tabela B (AAV3B), Tabela C (AAV5), Tabela D (AAV7), Tabela E (AAVrh32.33), Tabela F (AAV8), Tabela G (AAV9) ou Tabela H (AAVhu37). Em certas modalidades, o rAAV não é modificado nas posições altamente desamidadas aqui identificadas.

[0016] Estes e outros aspectos da invenção serão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0017] FIG. 1A – FIG. 1G. Análise eletroforética de isoformas AAV8 VP. (FIG. 1A) Diagrama ilustrando o mecanismo pelo qual resíduos de asparagina sofrem ataque nucleofílico por átomos de nitrogênio adjacentes, formando um intermediário succinimidil. Este intermediário então sofre hidrólise, resolvendo-se em uma mistura de ácido aspártico e ácido isoaspártico. O carbono beta é marcado como tal. O diagrama foi gerado no BIOVIA Draw 2018. (FIG. 1B) 1 µg de vetor AAV8 foi

executado em um SDS-PAGE unidimensional desnaturante. (FIG. 1C) Os pontos isoelétricos das manchas do marcador pl da anidrase carbônica são mostrados. (FIG. 1D) 5 µg de vetor AAV8 foram analisados por eletroforese em gel bidimensional e corados com Coomassie Blue. As manchas 1-20 são marcadores pl da anidrase carbônica carbamilada. As regiões em caixas são as seguintes: a = VP1, b = VP2, c = VP3, d = marcador de tropomiosina interno (seta: mancha de tropomiosina de MW = 33kDa, pl = 5,2). A focagem isoelétrica foi realizada com um intervalo de pl de 4-8. FIG. 1E - FIG. 1G) Resultados de focagem isoelétrica realizada com um intervalo de pl de 4-8. 1e11 GC de wtAAV8 (FIG. 1E) ou vetor mutante (FIG. 1F e FIG. 1G), que foram analisados por eletroforese em gel 2D e corados com Sypro Ruby. Marcação de proteínas: A = VP1; B = VP2; C = VP3, D = marcador de conalbumina de clara de ovo de frango, E = marcador de turbonuclease. A focagem isoelétrica foi realizada com um intervalo de pl de 6-10. As manchas primárias da isoforma VP1/2/3 estão circulados e a distância de migração das manchas principais dos marcadores são indicadas por linhas verticais (turbonuclease = tracejado, conalbumina = sólido).

[0018] FIG. 2A – FIG. 2E. Análise da desamidação de asparagina e glutamina em proteínas do capsídeo AAV8. (FIG. 2A - FIG. 2B) Espectrometria de massa de ionização por eletropulverização (ESI) e massas teóricas e observadas do peptídeo 3+ (93-103) contendo Asn-94 (FIG. 2A) e Asp-94 (FIG. 2B) são mostradas. (FIG. 2C - FIG. 2D) espectrometria de massa ESI e massas teóricas e observadas do peptídeo 3+ (247-259) contendo Asn-254 (FIG. 2C) e Asp-254 (FIG. 2D) são mostradas. As mudanças de massa observadas para Asn-94 e Asn-254 foram de 0,982 Da e 0,986 Da, respectivamente, versus uma mudança de massa teórica de 0,984 Da. (FIG. 2E) A porcentagem de desamidação em resíduos específicos de asparagina e glutamina de interesse é mostrada para os peptídeos trípticos AAV8 purificados por

diferentes métodos. As barras que indicam a desamidação nos resíduos de asparagina com N+1 glicinas estão hachuradas. Resíduos determinados como sendo pelo menos 2% desamidados, em pelo menos uma preparação analisada, foram incluídos. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão.

[0019] FIG. 3A – FIG. 3E. Modelagem estrutural do monômero AAV8 VP3 e análise de sítios desamidados. (FIG. 3A) O monômero AAV8 VP3 (identificador de PDB: 3RA8) é mostrado em uma representação de bobina. A cor da fita indica o grau relativo de flexibilidade (azul = mais rígido/fator de temperatura normal, vermelho = mais flexível/fator de alta temperatura). As esferas indicam resíduos de interesse. Os diagramas expandidos são representações esféricas de resíduos de interesse e seus resíduos circundantes para demonstrar a estrutura da proteína local (Azul = nitrogênio, vermelho = oxigênio). Os resíduos sublinhados são aqueles em motivos NG. FIG. 3B - FIG. 3E: Modelos isoaspárticos de asparaginas desamidadas com N + 1 glicinas são mostrados. O mapa de densidade de elétrons 2FoFc (nível de 1 sigma) gerado a partir do refinamento da estrutura cristalina AAV8 (PDB ID: 3RA8) com (FIG. 3B) um modelo de asparagina de N410 em comparação com modelos de ácido isoaspártico de (FIG. 3C) N263, (FIG. 3D) N514 e (FIG. 3E) N540. O mapa de densidade de elétrons é mostrado na grade magenta. O carbono beta é marcado como tal. A seta indica a densidade do elétron correspondente ao grupo R do resíduo de interesse.

[0020] FIG. 4A – FIG. 4D. Determinação dos fatores que influenciam a desamidação do capsídeo de AAV8. Uma preparação AAV8 foi (FIG. 4A) incubada a 70°C por três ou sete dias, (FIG. 4B) exposta a pH 2 ou pH 10 por sete dias, ou (FIG. 4C) preparada para espectrometria de massa usando D₂O no lugar de H₂O para determinar possíveis fontes de desamidação não intrínsecas à formação de

capsídeo de AAV. (FIG. 4D) Um dot blot de vetor tratado como na FIG. 4A usando o anticorpo B1 (reage ao capsídeo desnaturado) e um anticorpo específico da conformação AAV8 (reage aos capsídeos intactos) para avaliar a integridade estrutural do capsídeo.

[0021] FIG. 5A – FIG. 5B. Frequências de desamidação em proteínas não AAV. As porcentagens de desamidação são mostradas para duas proteínas recombinantes não AAV contendo motivos NG suscetíveis de serem desamidados, anidrase carbônica humana (FIG. 5A) e fenilalanina-hidroxilase de rato (FIG. 5B), para comparação com as porcentagens de desamidação de AAV.

[0022] FIG. 6. Comparação da desamidação AAV8 por cento calculada usando tubos de análise de dados de duas instituições. A porcentagem de desamidação em resíduos específicos de asparagina e glutamina de interesse é mostrada para os peptídeos trípticos AAV8 avaliados em duas instituições diferentes.

[0023] FIG. 7A - FIG. 7C ilustra substituições funcionais de asparagina em sítios não NG com alta variabilidade entre os lotes. (FIG. 7A) Os títulos de wtAAV8 e vetores mutantes foram produzidos por transfecção tripla em pequena escala em células 293, conforme medido por PCR quantitativa (qPCR). Os títulos são relatados em relação ao controle wtAAV8. As eficiências de transdução foram medidas conforme descrito na FIG. 8B. Os títulos e as eficiências de transdução são normalizados para o valor do controle wtAAV8. (FIG. 7B) Imagens representativas da luciferase no dia 14 pós-injeção são mostradas para camundongos que receberam vetor mutante de capsídeo wtAAV8.CB7.ffluc e N499Q. (FIG. 7C) A expressão de luciferase no dia 14 dos períodos de estudo de camundongos C57BL/6 injetados por via intravenosa com wtAAV8 ou vetores mutantes (n = 3 ou 4) foi medida por imageamento de luciferase e relatada em unidades de fluxo total. Todos os dados são representados como média + desvio padrão.

[0024] FIG. 8A e FIG. 8B mostram os resultados da análise *in vitro* do impacto da desamidação genética no desempenho do vetor. (FIG. 8A) Os títulos de wtAAV8 e vetores mutantes de desamidação genética produzidos por transfecção tripla em pequena escala em células 293, conforme medido por PCR quantitativa (qPCR). Os títulos são relatados em relação ao controle wtAAV8. Sítios NG com alta desamidação (barras padronizadas), sítios com baixa desamidação (barras brancas) e sítios altamente variáveis (barras pretas) são apresentados com wtAAV8 e um controle negativo. (FIG. 8B) Eficiência de transdução de vetores mutantes AAV8 produzindo luciferase de pirilampo relatada em relação ao controle wtAAV8. A eficiência de transdução é medida em unidades de luminescência geradas por GC adicionado às células HUH7 e é determinada realizando transduções com vetor bruto em diluições múltiplas. Os dados de eficiência de transdução são normalizados para a referência de tipo selvagem. Todos os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão.

[0025] FIG. 9A - FIG. 9D ilustram que a perda de atividade do vetor ao longo do tempo está correlacionada à desamidação progressiva. (FIG. 9A) Produção de vetor (cópias do genoma resistentes a DNaseI, GC) para um curso de tempo de células HEK 293 triplamente transfectadas produzindo vetor AAV8 que empacota um gene repórter de luciferase. Os níveis de GC são normalizados para o valor máximo observado. (FIG. 8B) O vetor de curso de tempo purificado foi usado para transduzir células Huh7. A eficiência de transdução (unidades de luminescência por GC adicionadas às células alvo) foi medida como na FIG. 8B usando múltiplas diluições de amostras de vetor de curso do tempo purificadas. Barras de erro representam o desvio padrão de pelo menos 10 réplicas técnicas para cada tempo de amostra. Desamidação de sítios AAV8 NG (FIG. 9C) e sítios não NG (FIG. 9D) para o vetor coletado 1, 2 e 5 dias após a transfecção.

[0026] FIG. 10A - FIG. 10D ilustra o impacto da estabilização das asparaginas no desempenho do vetor. A FIG. 10A mostra os títulos de wtAAV8 e vetores mutantes na posição +1 produzidos por transfecção tripla em pequena escala em células 293, conforme medido por PCR quantitativa (qPCR). Os títulos são relatados em relação ao controle wtAAV8. A FIG 10B mostra a eficiência de transdução de vetores mutantes AAV8 produzindo luciferase de pirilampo relatada em relação ao controle wtAAV8. A eficiência de transdução foi medida como na FIG. 8B usando material vetorial bruto. Um teste t de duas amostras (*p<0,005) foi executado para determinar a significância entre wtAAV8 e a eficiência de transdução mutante para G264A/G515A e G264A/G541A. FIG. 10C mostra a expressão de luciferase no dia 14 do período de estudo na região do fígado de camundongos C57BL/6 injetados por via intravenosa com wtAAV8 ou vetores mutantes (n = 3 a 5) medidos por imageamento de luciferase e relatados em unidades de fluxo total. A FIG. 10D mostra os títulos e a eficiência de transdução de vetores mutantes AAV8 de múltiplos sítios que produzem luciferase de pirilampo relatados em relação ao controle wtAAV8. Todos os dados são representados como média ± desvio padrão.

[0027] FIG. 11A – FIG. 11C. Análise da desamidação de asparagina e glutamina em proteínas do capsídeo AAV9. (FIG. 11A) 1e11 GCs de wtAAV9 foram analisados por eletroforese em gel 2D e corados com Sypro Ruby. Marcação de proteínas: A = VP1; B = VP2; C = VP3, D = marcador de conalbumina de clara de ovo de frango, E = marcador de turbonuclease. A focagem isoelétrica foi realizada com um intervalo de pI de 6-10. (FIG. 11B) A porcentagem de desamidação em resíduos específicos de asparagina e glutamina de interesse é mostrada para os peptídeos trípticos AAV9 purificados por diferentes métodos. As barras que indicam a desamidação nos resíduos de asparagina com N+1 glicinas estão hachuradas. Resíduos determinados como sendo pelo

menos 2% desamidados, em pelo menos uma preparação analisada, foram incluídos. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão. (FIG. 11C) O modelo isoaspártico de N512 é mostrado no mapa de densidade de elétrons 2FoFc gerado por refinamento não polarizado da estrutura cristalina AAV9 (PDB ID: 3UX1). A seta indica a densidade do elétron correspondente ao grupo R do resíduo N512.

[0028] FIG. 11D– FIG. 11F. Determinação dos fatores que influenciam a desamidação do capsídeo de AAV9. (FIG. 11D) Duas preparações de AAV9 foram incubadas a 70°C três ou sete dias ou (FIG. 11F) expostas a pH 2 ou pH 10 por sete dias para determinar possíveis fontes de desamidação não intrínsecas à formação de capsídeo de AAV. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão. (FIG. 11F) Um dot blot de vetor tratado como na FIG. 11D usando o anticorpo B1 (reage ao capsídeo desnaturado) para avaliar a integridade estrutural do capsídeo.

[0029] FIG. 11G e FIG. 11H ilustram a análise *in vitro* do impacto da desamidação genética no desempenho do vetor para AAV9.(FIG. 11G) Os títulos de wtAAV9 e vetores mutantes de desamidação genética foram produzidos por transfecção tripla em pequena escala em células 293, conforme medido por PCR quantitativa (qPCR). Os títulos são relatados em relação ao controle wtAAV9. Sítios NG com alta desamidação (barras padronizadas), sítios com baixa desamidação (barras brancas) e sítios altamente variáveis (barras pretas) são apresentados com wtAAV8 e um controle negativo. (FIG. 11H) A eficiência de transdução de vetores mutantes AAV9 que produzem luciferase de pirilampo é relatada em relação ao controle wtAAV9. Todos os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão.

[0030] FIG. 11I - FIG. 11K mostram a potência *in vitro* do vetor AAV9 ao longo do tempo. (FIG. 11I) Produção de vetor (cópias do genoma resistentes a DNaseI, GC) para um curso de tempo de células HEK 293

triplamente transfectadas produzindo vetor AAV9 que empacota um gene repórter de luciferase. Os níveis de GC são normalizados para o valor máximo observado. (FIG. 11J) O vetor de curso de tempo bruto foi usado para transduzir células Huh7. (FIG. 11K) As eficiências de transdução do vetor coletado 1 dia após a transfecção vs 5 dias após a transfecção são mostradas para amostras de vetor em bruto e purificadas. A eficiência de transdução é expressa como atividade de luciferase/GC, normalizada para o valor no dia 1.

[0031] FIG. 12A – FIG. 12B. Caracterização do anticorpo monoclonal PAV9.1 e estratégia de mutagênese com base no epítopo PAV9.1. FIG. 12A: reconhecimento de PAV9.1 de vários sorotipos de AAV com base em ELISA de captura com proteína de capsídeo nativa ou desnaturada. FIG. 12B: Alinhamento de sequências de aminoácidos AAV VP1 (SEQ ID NOs: 10-19, de cima para baixo); os resíduos de interesse para o epítopo de PAV9.1 estão dentro da caixa preta.

[0032] FIG. 13A – FIG. 13D. Reconstrução crio-EM de AAV9 em complexo com PAV9.1 Fab. FIG. 13A: Representação da superfície molecular do capsídeo AAV9 (fúcsia) ligado com PAV9.1 Fab (azul na protrusão do eixo triplo reconstruído com uma resolução de 4,2Å. Embalamos 3.022 partículas e usamos Auto3dEM para reconstrução por microscopia eletrônica. FIG. 13B: Representação de uma seção transversal do complexo AAV9-PAV9.1. FIG. 13C: Modelo pseudo-atômico do trímero AAV9-PAV9.1 construído em densidade conforme obtido a partir da crio-reconstrução. Os monômeros VP3 são mostrados em verde, cinza e ciano. As esferas representam resíduos ligados. Ilustramos um único Fab PAV9.1 com a cadeia pesada em índigo e a cadeia leve em vermelho. FIG. 13D: "Roteiro" bidimensional de resíduos envolvidos na ligação de PAV9.1.

[0033] FIG. 14A – FIG. 14E. Efeito das mutações do epítopo no EC50 do mAb PAV9.1 para AAV9. Usamos ELISA de captura de

capsídeo contra AAV9 para analisar e gerar curvas de ligação para PAV9.1. FIG. 14A - FIG. 14E ilustram o seguinte: 586-590 mutantes de troca (FIG. 14A); 494-498 mutantes (FIG. 14B); 586-590 mutantes pontuais (FIG. 14C); AAV9.TQAAA e AAV9.Mutantes simples e de combinação de SAQAN (FIG. 14D); AAV9.TQAAA e AAV9.Mutantes simples e de combinação de SAQAA (FIG. 14E). Normalizamos a absorbância para a absorbância máxima de cada capsídeo. Determinamos a linha de melhor ajuste e EC50 usando a função de resposta à dose no Prism.

[0034] FIG. 15A – FIG. 15K. Caracterização do impacto das mutações do epítipo PAV9.1 na transdução do vetor in vitro e título neutralizante do mAb PAV9.1 eficaz. FIG. 15A: Eficiência de transdução de mutantes do capsídeo PAV9.1 em relação a AAV9.WT em células HEK293. Determinamos a significância usando um teste t bilateral de uma amostra e comparamos a transdução percentual de cada mutante com a transdução de AAV9.WT (definido como 100%). Valores de P indicados como segue: $p^* < 0,05$, $p^{***} < 0,001$. FIG. 15B - FIG. 15K: Determinação do título neutralizante de PAV9.1 ao transduzir células HEK293 com AAV9.WT.CMV.LacZ (FIG. 15B); AAV9.AAQAA (FIG. 15C); AAV9.QQNAA (FIG. 15D); AAV9.SSNTA (FIG. 15E); AAV9.RGNRQ (FIG. 15F); AAV9.RGHRE (FIG. 15G); AAV9.TQAAA (FIG. 15H); AAV9.AANNN (FIG. 15I); AAV9.SAQAN (FIG. 15J); ou AAV9.SAQAA (FIG. 15K). Definimos o título de neutralização como a diluição antes do ponto de tempo em que poderíamos atingir níveis de transdução de 50% ou mais do que o vetor sem mAb (níveis medidos em unidades de luz relativa). Todos os dados são relatados como média $\pm$ SD.

[0035] FIG. 16. Correlação entre PAV9.1 EC50 e título neutralizante para um painel de mutantes AAV9. Calculamos a redução de vezes no título de neutralização de PAV9.1 contra cada mutante em relação ao

título de neutralização de PAV9.1 contra AAV9.WT. Representamos os dados em uma escala logarítmica contra o aumento de vezes em PAV9.1 EC50 para cada mutante em relação a PAV9.1 EC50 para AAV9.WT em uma escala linear (gráfico semi-log). Usamos o GraphPad Prism para determinar a linha semilogista de melhor ajuste; $R^2 = 0,8474$.

[0036] FIG. 17A – FIG. 17G. Análise in vivo de vetores mutantes AAV9 PAV9.1. Os camundongos C57BL/6 receberam injeções intravenosas de 1×10^{11} GC por camundongo (FIG. 17A - FIG. 17C) ou 1×10^{12} GC por camundongo (FIG. 17D - FIG. 17F) AAV9.CMV.LacZ (WT ou mutante; $n = 3$). Sacrificamos camundongos no dia 14 e coletamos tecidos para análise de biodistribuição (FIG. 17A e FIG. 17D) usando Taqman qPCR. Valores são relatados como média $\pm$ SD. Também coletamos fígado (FIG. 17B e FIG. 17E), coração (FIG. 17C e FIG. 17F) e músculo (FIG. 17G) para histoquímica β -gal para determinar a atividade enzimática. Imagens representativas de 10X são mostradas; barras de escala = 200 μ m.

[0037] FIG. 18A – FIG. 18D. Efeito de mutações de epítipo em EC50 de plasma de camundongo injetado para AAV9. Usando ELISA de captura de capsídeo, analisamos o plasma do dia 56 de camundongos que receberam injeções intravenosas de 7,5 e 8 GC/camundongo (FIG. 18A); ou $7,5 \times 10^9$ GC/camundongo (FIG. 18B) wtAAV9.LSP.hFIX para AAV9.WT ou ligação de mutante AAV9 PAV9.1. Normalizamos a absorbância para a absorbância máxima alcançada de cada capsídeo. Determinamos a linha de melhor ajuste e EC50 usando a função de resposta à dose no Prism. Cada gráfico corresponde a um único animal. Compilamos os valores de EC50 para $7,5 \times 10^8$ GC/camundongo (FIG. 18C); ou $7,5 \times 10^9$ GC/camundongo (FIG. 18D) para determinar a média para cada mutante. Um teste t bilateral de uma amostra foi usado para determinar se havia uma diferença significativa entre o EC50 do plasma para cada mutante em relação ao EC50 do

plasma para AAV9.WT (definido como 1). A correção de Bonferroni foi aplicada para controlar o erro tipo 1. Os valores P são representados da seguinte forma: ** = $p < 0,05$, *** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,001$. Os dados de EC50 são relatados como média $\pm$ SD.

[0038] FIG. 19A - FIG. 19D. Efeito de mutações de epítipo em EC50 de soro policlonal NHP para AAV9. Usando ELISA de captura de capsídeo, analisamos os soros de (FIG. 19A) NHPs tratados com AAV9.WT ou hu68.Vetor WT; ou (FIG. 19B) NHPs ingênuos que são AAV9 NAb(+) para AAV9.WT ou ligação de mutante AAV9 PAV9.1. Normalizamos a absorbância para a absorbância máxima alcançada de cada capsídeo. Usamos a função de resposta à dose no Prism para determinar a linha de melhor ajuste e EC50. Cada gráfico corresponde a um único animal. Compilamos os valores de EC50 para NHPs tratados com vetor (FIG. 19C); e NAb(+) NHPs ingênuos para determinar (FIG. 19D) a média para cada mutante. Utilizamos um teste t bilateral de uma amostra para determinar se havia uma diferença significativa entre o EC50 do plasma para cada mutante em relação ao EC50 do plasma para AAV9.WT (definido como 1). A correção de Bonferroni foi aplicada para controlar o erro tipo 1. Os dados de EC50 são relatados como média $\pm$ SD.

[0039] FIG. 20A – FIG. 20B. Efeito de mutações de epítipo em EC50 de soros policlonais de doadores humanos para AAV9. FIG. 20A: Analisamos os soros de doadores humanos ingênuos que eram AAV9 NAb(+) para AAV9.WT ou ligação de mutante AAV9 PAV9.1 usando ELISA de captura de capsídeo. Determinamos a linha de melhor ajuste e EC50 usando a função de resposta à dose no Prism. Cada gráfico corresponde a um único doador. FIG. 20B: Compilamos os valores de EC50 para soro de doador humano NAb(+) para determinar a média de cada mutante. Determinamos a significância usando um teste t bilateral de uma amostra e comparamos o EC50 do plasma para cada mutante

em relação ao EC50 do plasma para AAV9.WT (definido como 1). A correção de Bonferroni foi aplicada para controlar o erro tipo 1. Os dados de EC50 são relatados como média $\pm$ SD.

[0040] FIG. 21A - FIG. 21B mostram titulação in vitro de AAV8 e dados de transdução de experiências em escala de placa de 6 poços, incluindo N57Q, N263Q, N385Q, N514Q, N540Q, N94Q. e mutantes N410Q para AAV8.

[0041] FIG. 22A - FIG. 22B mostram titulação in vitro de AAV9 e dados de transdução de experimentos em escala de placa de 6 poços, incluindo N57Q, N329Q, N452Q, N270Q, N409Q, N668Q, N94Q, N253Q, N663Q e mutantes N704Q para AAV9.

[0042] FIG. 23A - FIG. 23B fornecem dados de transdução in vivo para AAV8 e AAV9, respectivamente, em camundongos testados para expressão de fígado em camundongos no dia 14 (imageamento de luciferase). A FIG.23A ilustra os mutantes de AAV8 N57Q, N263Q, e N385Q, em comparação com o tipo selvagem para AAV8. A FIG.23B ilustra mutantes AAV9 N57Q, G58A, G330A, em comparação com AAV9 de tipo selvagem.

[0043] FIG. 24A - FIG. 24B ilustram o título relativo (GC) e a eficiência de transdução para mutantes duplos e triplos AAV9 G330/G453A, G330A/G513A, G453A/G513A e G330/G453A/G513A. A FIG.24A compara o título relativo dos mutantes para AAV9wt e a FIG.24B compara a eficiência de transdução relativa (luciferase/GC) dos mutantes para AAV9wt.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0044] São fornecidos aqui vírus adenoassociados recombinantes (rAAV) com sequência e heterogeneidade de carga em cada uma das três populações de proteínas do capsídeo VP1, VP2 e VP3 encontradas no capsídeo de um AAV recombinante e composições contendo os mesmos. São fornecidos neste documento novos rAAV, bem como

métodos para reduzir a desamidação e, opcionalmente, outras modificações de monômero de capsídeo. Além disso, são fornecidos neste documento o rAAV modificado com modificações diminuídas, que são úteis para fornecer rAAV com capsídeos que retêm maior estabilidade, potência e/ou pureza. Em certas modalidades, o rAAV não é AAVhu68. Em certas modalidades, o rAAV não é AAV2.

[0045] Em uma modalidade, é fornecida uma composição que compreende uma população mista de vírus adenoassociado recombinante (rAAV), cada um dos referidos rAAV compreendendo: (a) um capsídeo de AAV compreendendo cerca de 60 proteínas vp1 do capsídeo, proteínas vp2 e proteínas vp3, em que as proteínas vp1, vp2 e vp3 são: uma população heterogênea de proteínas vp1 que são produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos AAV vp1 selecionada, uma população heterogênea de proteínas vp2 que são produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos AAV vp2 selecionada, uma população heterogênea de proteínas vp3 que produziu a partir de uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos AAV vp3 selecionada, em que: as proteínas vp1, vp2 e vp3 contêm subpopulações com modificações de aminoácidos compreendendo pelo menos duas asparaginas altamente desamidadas (N) em pares de asparagina-glicina em um capsídeo de AAV e, opcionalmente, compreendendo ainda subpopulações compreendendo outros aminoácidos desamidados, em que a desamidação resulta em uma mudança de aminoácido; e (b) um genoma de vetor no capsídeo de AAV, o genoma de vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo sequências de repetição terminal invertida de AAV e uma sequência de ácido nucleico não AAV que codifica um produto operacionalmente ligado a sequências que direcionam a expressão do

produto em uma célula hospedeira. Em certas modalidades, a composição é conforme descrito neste parágrafo, com a condição de que o rAAV não seja AAVhu68. Como usado neste documento, AAVhu68 é conforme definido no WO 2018/160582. A sequência de aminoácidos predicada de AAVhu68 VP1 é reproduzida na SEQ ID NO: 114 e a sequência de ácido nucleico nativa é fornecida na SEQ ID NO: 113. Em certas modalidades, a composição é conforme descrito neste parágrafo, com a condição de que o rAAV não seja AAV2.

[0046] Em certas modalidades, a população mista de rAAV resulta de um sistema de produção usando uma única sequência de ácido nucleico do capsídeo de AAV que codifica uma sequência de aminoácidos de VP1 de AAV predita de um tipo de AAV. No entanto, o processo de produção e fabricação fornece a população heterogênea de proteínas do capsídeo descritas acima.

[0047] Em certas modalidades, AAVs recombinantes são produzidos tendo capsídeos de AAV8 mutantes tendo uma ou mais propriedades melhoradas em relação ao capsídeo de AAV8 não modificado. Tais propriedades melhoradas podem incluir, por exemplo, título aumentado e/ou eficiência de transdução relativa aumentada em comparação com AAV8. Em certas modalidades, os mutantes podem incluir AAV8 G264A/G515A (SEQ ID NO: 21), AAV8G264A/G541A (SEQ ID NO: 23), AAV8G515A/G541A (SEQ ID NO: 25) ou AAV8 G264A/G515A/G541A (SEQ ID NO: 27). Em certas modalidades, são fornecidas sequências de ácido nucleico que codificam esses capsídeos de AAV8 mutantes. Em certas modalidades, as sequências de ácido nucleico são fornecidas, por exemplo, SEQ ID NO: 20 (AAV8 G264A/G515A), SEQ ID NO: 22 (AAV8G264A/G541A), SEQ ID NO: 24 (AAV8G515A/G541A) ou SEQ ID NO: 26 (AAV8 G264A/G515A/G541A). Em certas modalidades, um mutante AAV8 pode ser N499Q, N459Q, N305Q/N459Q, N305QN499Q, N459Q,

N305Q/N459Q, N305q/N499Q, ou N205Q, N459Q, ou N305Q/N459Q, N499Q. Em certas modalidades, essas mutações são combinadas com uma mutação G264A/G541A. Em certas modalidades, a mutação é AAV8 G264A/G541A/N499Q (SEQ ID NO: 115); AAV8 G264A/G541A/N459Q (SEQ ID NO: 116); AAV8 G264A/G541A/N305Q/N459Q (SEQ ID NO: 117); AAV8 G264A/G541A/N305Q/N499Q (SEQ ID NO: 118); G264A/G541A/N459Q/N499Q (SEQ ID NO: 119); ou AAV8 G264A/G541A/ N305Q/N459Q/N499Q (SEQ ID NO: 120). Em outras modalidades, mutantes únicos, como AAV8N263A, AAV8N514A, AAV8N540A ou podem ser selecionados. Em certas modalidades, outros AAVs podem ser mutados para ter mudanças nestes ou em pares NG correspondentes, com base em um alinhamento com AAV8. Tais AAVs podem ser clade E AAVs. Ver, por exemplo, um mutante AAV8 descrito no Exemplo 2 (SEQ ID NO: 9).

[0048] Em certas modalidades, os mutantes AAV8 evitam alterar os pares NG nas posições N57, N94, N263, N305, G386, Q467, N479 e/ou N653. Em certas modalidades, outros AAVs evitam a mutação nas posições N correspondentes, conforme determinado com base em um alinhamento com AAV8, usando a numeração de AAV8 como referência.

[0049] Em certas modalidades, AAVs recombinantes são produzidos tendo capsídeos de AAV9 mutantes tendo uma ou mais propriedades melhoradas em relação ao capsídeo de AAV9 não modificado. Tais propriedades melhoradas podem incluir, por exemplo, título aumentado e/ou eficiência de transdução relativa aumentada em comparação com AAV9. Em certas modalidades, os capsídeos AAV9 mutantes podem incluir, por exemplo, AAV9 G330/G453A (SEQ ID NO: 29), AAV9G330A/G513A (SEQ ID NO: 31), AAV9G453A/G513A (SEQ ID NO 33) e/ou AAV9 G330/G453A/G513A (SEQ ID NO: 35). Em certas

modalidades, são fornecidas sequências de ácido nucleico que codificam esses capsídeos de AAV9 mutantes. Em certas modalidades, as sequências de ácido nucleico são fornecidas em, por exemplo, SEQ ID NO: 28 (9G330AG453A); SEQ ID NO: 30 (9G330AG513A), SEQ ID NO: 32 (9G453AG513A), SEQ ID NO: 34 (9G330AG453AG513A). Em certas modalidades, outros AAVs podem ser mutados para ter tais mudanças nestes ou em pares NG correspondentes, com base em um alinhamento com AAV9. Tais AAVs podem ser clade F AAVs.

[0050] Em certas modalidades, os rAAVs com capsídeos de AAV mutantes do Clade A, Clade B, Clade C ou Clade D podem ser engenheirados para ter modificações de aminoácidos dos pares NG correspondentes àqueles identificados acima para o Clade E e Clade F. Em certas modalidades, Mutantes do Clade A (por exemplo, AAV) podem incluir mutações nas posições N303, N497 ou N303/N497, com referência à numeração de SEQ ID NO: 1 (AAV1). Em certas modalidades, o mutante é N497Q. Em certas modalidades, os mutantes de AAV3B podem incluir mutações nas posições N302, N497 ou N302/N497, com referência à numeração da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o mutante é N497Q. Em certas modalidades, os mutantes de AAV5 podem incluir mutações nas posições N302, N497 ou N302/N497, com referência à numeração da SEQ ID NO: 3. Em certas modalidades, o mutante é N497Q.

[0051] Sem desejar estar limitado pela teoria, a espectrometria de massa revelou desamidação da asparagina em vários sítios no capsídeo como uma explicação para a presença de múltiplas isoformas VP, que não foram descritas anteriormente para AAV. Além disso, a distribuição e a extensão da desamidação foram consistentes em vários métodos de purificação do vetor, sugerindo que esse fenômeno ocorre independentemente do processamento do vetor. O significado funcional dessas desamidações foi questionado pela mutação individual de

algumas asparaginas em ácidos aspárticos. Um subconjunto dessas mutações impactou não apenas a eficiência da montagem de partículas, mas também a capacidade do vetor de transduzir células alvo tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A modelagem de novo desses resíduos desamidados na estrutura de AAV8 também revelou evidências estruturais para a presença desses eventos de desamidação e forneceu uma explicação computacional de por que o capsídeo AAV8 tolera essas mudanças na identidade e propriedades de aminoácidos. Resultados virtualmente idênticos de desaminação foram observados com AAV9 e uma variedade de AAVs adicionais. Assim, o rAAV é caracterizado por uma heterogeneidade estrutural do capsídeo de AAV previamente desconhecido.

[0052] Nos estudos aqui relatados, encontramos asparagina generalizada e ocasional desamidação de glutamina com 17 resíduos afetados. Fatores que controlam a desamidação de AAV8, principalmente a sequência primária e restrições estruturais 3D, são provavelmente conservados em toda a filogenia de AAV, já que todos os sorotipos analisados por nós até o momento exibem um padrão de modificação surpreendentemente semelhante. Assim, a desamidação é um fator potencialmente crítico no desenvolvimento de todas as futuras terapêuticas de AAV.

[0053] Com esta descoberta, ficamos motivados a explorar os impactos funcionais da desamidação de AAV. A natureza multimérica dos capsídeos do vetor AAV, a extensão e o número de resíduos do capsídeo modificado e a diversidade do mosaico resultante nas composições de partículas do vetor apresentaram alguns desafios especiais para esta análise. O repertório experimental que pode parametrizar suficientemente o impacto da modificação pós-tradução (PTM) em um contexto de proteína mais simples não se aplica diretamente à análise do capsídeo de AAV. Por exemplo, seria

impossível purificar ou mesmo enriquecer uma preparação para uma determinada espécie de vetor desamidado para testar sua função direta e isoladamente.

[0054] A substituição genética para aspartato é uma abordagem que tentamos forçar uma aproximação da modificação em um determinado sítio. Além das diferenças observadas anteriormente entre as distribuições de modificação específica de posição em conjuntos de capsídeo com desamidação endógena (mosaico) vs genética (completa), nossos dados apontam considerações adicionais para a interpretação desses dados. Por exemplo, observamos perda de transdução > 50 vezes para o mutante N263D em relação ao wtAAV8 (Figura 8B). Isso foi surpreendente, dado que a mudança no teor de aspartato nessa posição após a conversão genética seria marginal; N263 é desamidado em 99% em wtAAV8. Uma explicação para esta discrepância é que o aspartato codificado geneticamente e o produto da desamidação da asparagina são molecularmente distintos (L-aspartato vs uma mistura presumida de 3:1 de L/D-isoaspartato: L/D-aspartato). Assim, a aproximação genética pode ser insuficiente em algumas posições. Outro resíduo, o N57 altamente conservado, também não foi tolerante à substituição pelo aspartato, embora tenha sido em média 80% e 97% desamidado em AAV8 e AAV9, respectivamente (Figuras 8B e 11). Aqui, as amidas intactas residuais podem tamponar a atividade das preparações wt por meio de efeitos de mosaico, embora também tenhamos detectado o potencial de interferência com outras asparaginas para confundir a análise de N57; o N66 vizinho tornou-se significativamente desamidado quando a posição 57 amida foi preservada mutagenicamente (N57Q, G58A e G58S para AAV8; N57Q e G58A para AAV9; dados não mostrados). Este foi o único caso de cross-talk aparente que detectamos na análise de espectrometria de massa de nossos mutantes, mas destaca outra complicação de

interpretar nossos dados mutagênicos de perda de função.

[0055] Dadas essas advertências, desenvolvemos evidências do impacto da desamidação por meio de experimentos de mutagênese com curso de tempo e ganho de função. Nossos dados são consistentes com o papel de um subconjunto de sítios NG na perda funcional associada à desamidação de ponto de tempo muito precoce. Até onde sabemos, esse fenômeno não foi relatado anteriormente. De fato, o procedimento experimental particular que usamos para identificar esse declínio foi informado pela nova observação da desamidação NG do vetor de meia-vida muito curta; armazenar as primeiras amostras por um único dia na geladeira provavelmente diminuiria sua distinção em relação às amostras de ponto de tempo tardio, dada a velocidade da desamidação espontânea que observamos. Experimentos de estabilidade de armazenamento comparando a atividade de preparações de vetores durante dias ou semanas após o processamento são rotineiros em nosso laboratório e outros grupos de fabricação, mas essas comparações são quase sempre feitas com material de vetor com pelo menos 7 dias de idade, quando a maior parte ou toda a decadência de atividade (e desamidação do sítio NG) está completa. Os dados destacam uma oportunidade para intervenções de processo ou abordagens mutagênicas de estabilização de N para produzir capsídeos aprimorados. De uma perspectiva mais ampla, também é interessante considerar o papel de um "relógio de desamidação" na ecologia natural de AAVs, onde este fenômeno presumivelmente seria uma vantagem para as partículas de vírus traduzidas mais recentemente de uma célula infectada para a próxima rodada de infecção.

[0056] Não foram explorados os fundamentos mecanicistas da perda funcional induzida pela desamidação NG, embora existam algumas possibilidades proeminentes. Todos os motivos NG em AAV8

e AAV9 VP3 são encontrados em laços de superfície HVR. Em AAV8, NG 514 e 540 estão localizados próximos ao eixo de 3 vezes em uma área conhecida por desempenhar um papel significativo na transdução devido às interações com receptores celulares. Embora nenhum sítio de ligação ao receptor AAV8 tenha sido totalmente interrogado, o receptor LamR foi implicado na transdução de AAV8. Esses estudos identificam aa 491-557 como importante para essas interações. A ligação do receptor para AAV9 é mais bem caracterizada do que a do AAV8, uma vez que a interrogação funcional do capsídeo identificou os resíduos no domínio de ligação da galactose AAV9. Destes resíduos, encontramos uma única asparagina, N515, desamidada em um nível baixo (3%), enquanto duas outras asparaginas neste domínio, N272 e N470, não foram desamidadas. Portanto, embora haja um potencial para a desamidação de influenciar a ligação da galactose, é provável que seja apenas em um pequeno grau.

[0057] Em resumo, identificou-se que a desamidação do vetor AAV pode impactar a eficiência da transdução e estratégias demonstradas para estabilizar amidas e melhorar o desempenho do vetor. Um objetivo futuro chave será estender essas descobertas para sistemas de modelos animais apropriados e começar a considerar o impacto da desamidação e o desempenho de nossas variantes estabilizadas em contextos funcionais mais complexos. O tropismo dos tecidos e as interações do capsídeo com o sistema imunológico podem ser afetados e devem ser avaliados cuidadosamente. Como esses efeitos complexos provavelmente serão muito difíceis de determinar conclusivamente para cada resíduo desamidado no capsídeo, pode ser prudente direcionar o número limitado de resíduos com alta variabilidade lote a lote na desamidação para estabilização por mutagênese, como demonstramos com sucesso para asparaginas AAV8 variáveis 459 e 499. Além disso, a análise de desamidação de preparações de vetor usando nosso fluxo

de trabalho de espectrometria de massa pode ser benéfica para alcançar consistência funcional em lotes fabricados de produtos farmacêuticos de terapia genética de AAV.

[0058] Um "AAV recombinante" ou "rAAV" é uma partícula viral resistente a DNase contendo dois elementos, um capsídeo de AAV e um genoma de vetor contendo pelo menos sequências de codificação não AAV empacotadas dentro do capsídeo de AAV. A menos que especificado de outra forma, este termo pode ser usado alternadamente com a frase "vetor rAAV". O rAAV é um "vírus de replicação defeituosa" ou "vetor viral", uma vez que carece de qualquer gene rep de AAV funcional ou gene cap de AAV funcional e não pode gerar progênie. Em certas modalidades, as únicas sequências de AAV são as sequências de repetição terminal invertida (ITRs) de AAV, normalmente localizadas nas extremidades 5' e 3' extremas do genoma do vetor, a fim de permitir que o gene e as sequências regulatórias localizadas entre as ITRs sejam empacotadas dentro do capsídeo AAV.

[0059] Como usado neste documento, um "genoma de vetor" se refere à sequência de ácido nucleico empacotada dentro do capsídeo de rAAV que forma uma partícula viral. Essa sequência de ácido nucleico contém sequências de repetição terminal invertida (ITRs) de AAV. Nos exemplos aqui descritos, um genoma de vetor contém, no mínimo, de 5'a 3', um AAV 5' ITR, sequência(s) de codificação e um AAV 3' ITR. ITRs de AAV2, um AAV de fonte diferente do capsídeo, ou diferente de ITRs de comprimento total podem ser selecionados. Em certas modalidades, as ITRs são da mesma fonte de AAV que o AAV, que fornece a função rep durante a produção ou um AAV de transcomplementação. Além disso, outras ITRs podem ser usadas. Além disso, o genoma do vetor contém sequências regulatórias que dirigem a expressão dos produtos de gene. Componentes adequados de um genoma de vetor são discutidos em mais detalhes neste

documento.

[0060] Um rAAV é composto de um capsídeo de AAV e um genoma de vetor. Um capsídeo AAV é um conjunto de uma população heterogênea de vp1, uma população heterogênea de vp2 e uma população heterogênea de proteínas vp3. Como usado neste documento, quando usado para se referir a proteínas do capsídeo vp, o termo "heterogêneo" ou qualquer variação gramatical do mesmo, refere-se a uma população que consiste em elementos que não são iguais, por exemplo, tendo monômeros vp1, vp2 ou vp3 (proteínas) com diferentes sequências de aminoácidos modificados.

[0061] Como usado neste documento, o termo "heterogêneo", conforme usado em conexão com as proteínas vp1, vp2 e vp3 (alternativamente chamadas de isoformas), refere-se a diferenças na sequência de aminoácidos das proteínas vp1, vp2 e vp3 dentro de um capsídeo. O capsídeo de AAV contém subpopulações dentro das proteínas vp1, dentro das proteínas vp2 e dentro das proteínas vp3 que possuem modificações dos resíduos de aminoácidos preditos. Essas subpopulações incluem, no mínimo, certos resíduos de asparagina desamidada (N ou Asn). Por exemplo, certas subpopulações compreendem pelo menos uma, duas, três ou quatro posições de asparaginas (N) altamente desamidadas em pares asparagina-glicina e, opcionalmente, compreendendo ainda outros aminoácidos desamidados, em que a desamidação resulta em uma mudança de aminoácido e outras modificações opcionais.

[0062] Como usado neste documento, uma "subpopulação" de proteínas vp refere-se a um grupo de proteínas vp que tem pelo menos uma característica definida em comum e que consiste em pelo menos um membro do grupo a menos do que todos os membros do grupo de referência, a menos que especificado de outra forma.

[0063] Por exemplo, uma "subpopulação" de proteínas vp1 é pelo

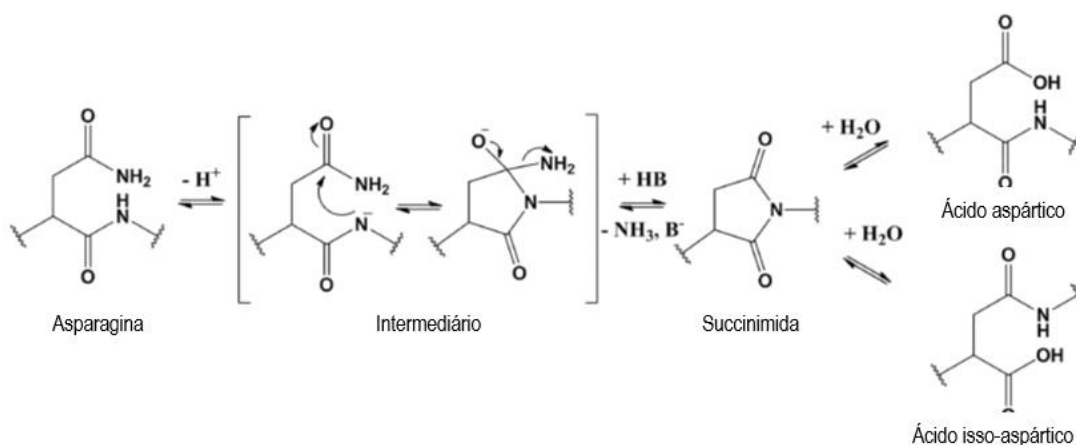
menos uma (1) proteína vp1 e menos do que todas as proteínas vp1 em um capsídeo AAV montado, a menos que especificado de outra forma. Uma "subpopulação" de proteínas vp3 pode ser uma (1) proteína vp3 para menos do que todas as proteínas vp3 em um capsídeo de AAV montado, a menos que especificado de outra forma. Por exemplo, as proteínas vp1 podem ser uma subpopulação de proteínas vp; as proteínas vp2 podem ser uma subpopulação separada de proteínas vp, e vp3 é ainda uma subpopulação adicional de proteínas vp em um capsídeo de AAV montado. Em outro exemplo, as proteínas vp1, vp2 e vp3 podem conter subpopulações com diferentes modificações, por exemplo, pelo menos uma, duas, três ou quatro asparaginas altamente desamidadas, por exemplo, em pares asparagina - glicina.

[0064] A menos que especificado de outra forma, altamente desamidado refere-se a pelo menos 45% desamidado, pelo menos 50% desamidado, pelo menos 60% desamidado, pelo menos 65% desamidado, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99% ou até cerca de 100% desamidado em uma posição de aminoácido referenciada, em comparação com a sequência de aminoácidos predita na posição de aminoácido de referência (por exemplo, pelo menos 80% das asparaginas no aminoácido 57 com base na numeração da SEQ ID NO: 1 [AAV1], 2 [AAV3B], 4 [AAV7], 5, [AAVrh32.33], 6 [AAV8], 7 [AAV9], 9 [AAV8 triplo], ou 111 [AAVhu37] ou aminoácido 56 com base na numeração de SEQ ID NO: 3 [AAV5], pode ser desamidado com base nas proteínas vp1 totais podem ser desamidadas com base nas proteínas vp1, vp2 e vp3 totais). Essas porcentagens podem ser determinadas usando gel 2D, técnicas de espectrometria de massa ou outras técnicas adequadas.

[0065] Como usado neste documento, um AAV "desamidado" é aquele em que um ou mais dos resíduos de aminoácidos foram

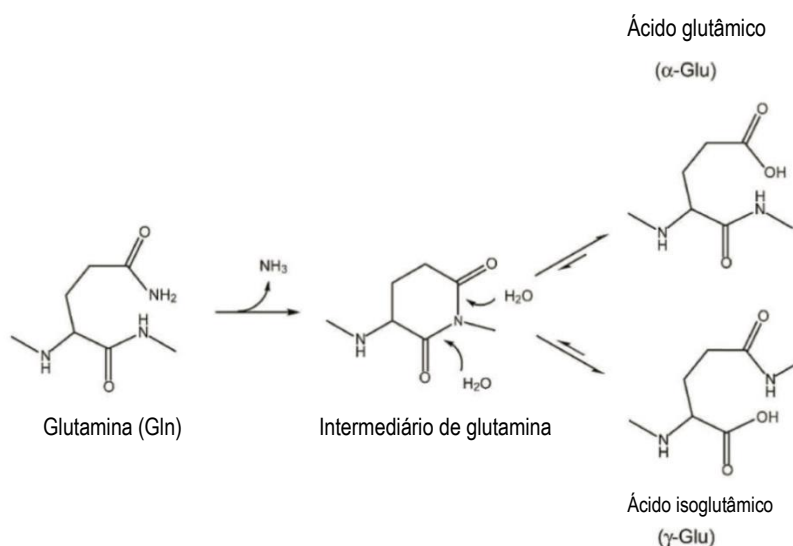
derivatizados em um resíduo que difere daquele que o codifica na sequência de ácido nucleico correspondente.

[0066] Sem desejar estar limitado pela teoria, acredita-se que a desamidação de pelo menos resíduos altamente desamidados nas proteínas vp no capsídeo de AAV seja principalmente não enzimática, sendo causada por grupos funcionais dentro da proteína do capsídeo que desamidam asparaginas selecionadas, e em menor grau, resíduos de glutamina. A montagem eficiente do capsídeo da maioria das proteínas vp1 de desamidação indica que esses eventos ocorrem após a montagem do capsídeo ou que a desamidação em monômeros individuais (vp1, vp2 ou vp3) é bem tolerada estruturalmente e não afeta amplamente a dinâmica da montagem. A desamidação extensiva na região única de VP1 (VP1-u) (~aa 1-137), geralmente considerada como localizada internamente antes da entrada celular, sugere que a desamidação de VP pode ocorrer antes da montagem do capsídeo. A desamidação de N pode ocorrer através do átomo de nitrogênio da espinha dorsal de seu resíduo C-terminal conduz um ataque nucleofílico ao átomo de carbono do grupo amida da cadeia lateral de Asn. Pensa-se que se forma um resíduo de succinimida de anel fechado intermediário. O resíduo de succinimida então conduz a hidrólise rápida para levar ao produto final ácido aspártico (Asp) ou ácido iso-aspártico (IsoAsp). Portanto, em certas modalidades, a desamidação da asparagina (N ou Asn) leva a um Asp ou IsoAsp, que pode se interconverter através do intermediário succinimida, por exemplo, conforme ilustrado abaixo.



[0067] Conforme fornecido neste documento, cada N desamidado em VP1, VP2 ou VP3 pode ser independentemente ácido aspártico (Asp), ácido isoaspártico (isoAsp), aspartato e/ou uma mistura de interconversão de Asp e isoAsp, ou combinações dos mesmos. Qualquer razão adequada de ácido α - e isoaspártico pode estar presente. Por exemplo, em certas modalidades, a razão pode ser de 10:1 a 1:10 aspártico para isoaspártico, cerca de 50:50 aspártico:isoaspártico ou cerca de 1:3 aspártico:isoaspártico ou outra razão selecionada.

[0068] Em certas modalidades, uma ou mais glutamina (Q) podem ser derivados (desamidar) em ácido glutâmico (Glu), ou seja, ácido α -glutâmico, ácido γ -glutâmico (Glu) ou uma mistura de ácido α e γ -glutâmico, que pode se interconverter através de um intermediário comum de glutarínimida. Qualquer razão adequada de ácido α - e γ -glutâmico pode estar presente. Por exemplo, em certas modalidades, a razão pode ser de 10:1 a 1:10 α a γ , cerca de 50:50 α : γ , ou cerca de 1:3 α : γ , ou outra razão selecionada.



[0069] Assim, um rAAV inclui subpopulações dentro do capsídeo de rAAV das proteínas vp1, vp2 e/ou vp3 com aminoácidos desamidados, incluindo, no mínimo, pelo menos uma subpopulação compreendendo pelo menos uma asparagina altamente desamidada. Além disso, outras modificações podem incluir isomerização, particularmente em posições de resíduo de ácido aspártico (D ou Asp) selecionadas. Em ainda outras modalidades, as modificações podem incluir uma amidação em uma posição Asp.

[0070] Em certas modalidades, um capsídeo de AAV contém subpopulações de vp1, vp2 e vp3 tendo pelo menos 4 a pelo menos cerca de 25 posições de resíduos de aminoácidos desamidados, dos quais pelo menos 1 a 10% são desamidados em comparação com a sequência de aminoácidos codificada de proteínas vp. A maioria destes pode ser resíduos de N. No entanto, os resíduos Q também podem ser desamidados.

[0071] Em certas modalidades, um rAAV tem um capsídeo de AAV com proteínas vp1, vp2 e vp3 tendo subpopulações que compreendem combinações de dois, três, quatro ou mais resíduos desamidados nas posições estabelecidas nas tabelas fornecidas nos exemplos e aqui incorporadas por referência. A desamidação no rAAV pode ser determinada usando eletroforese em gel 2D e/ou espectrometria de

massa e/ou técnicas de modelagem de proteína. A cromatografia online pode ser realizada com uma coluna Acclaim PepMap e um sistema Thermo UltiMate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um Q Exactive HF com uma fonte NanoFlex (Thermo Fisher Scientific). Os dados de MS são adquiridos usando um método top-20 dependente de dados para o Q Exactive HF, escolhendo dinamicamente os íons precursores ainda não sequenciados mais abundantes das varreduras de pesquisa (200-2000 m/z). O sequenciamento é realizado por meio de fragmentação de dissociação colisional de alta energia com um valor alvo de íons $1e5$ determinado com controle de ganho automático preditivo e um isolamento de precursores foi realizado com uma janela de 4 m/z. Varreduras de pesquisa foram adquiridas com uma resolução de 120.000 em m/z 200. A resolução para os espectros de HCD pode ser definida para 30.000 em m/z200 com um tempo máximo de injeção de íons de 50 ms e uma energia de colisão normalizada de 30. O nível de RF da lente S pode ser definido em 50, para dar a transmissão ideal da região m/z ocupada pelos peptídeos do digest. Os íons precursores podem ser excluídos com estados de carga simples, não atribuídos ou seis e mais altos da seleção de fragmentação. O software BioPharma Finder 1.0 (Thermo Fischer Scientific) pode ser usado para análise dos dados adquiridos. Para o mapeamento de peptídeos, as pesquisas são realizadas usando um banco de dados FASTA de proteína de entrada única com carbamidometilação definida como uma modificação fixa; e oxidação, desamidação e fosforilação definidas como modificações variáveis, uma precisão de massa de 10 ppm, uma alta especificidade de protease e um nível de confiança de 0,8 para espectros de MS/MS. Exemplos de proteases adequadas podem incluir, por exemplo, tripsina ou quimotripsina. A identificação por espectrometria de massa de peptídeos desamidados é relativamente simples, pois a desamidação adiciona à massa da molécula intacta +0,984 Da (a diferença de massa

entre os grupos—OH e —NH₂). A percentagem de desamidação de um peptídeo particular é determinada pela área de massa do peptídeo desamidado dividida pela soma da área dos peptídeos desamidados e nativos. Considerando o número de sítios de desamidação possíveis, as espécies isobáricas que são desamidadas em diferentes sítios podem comigrar em um único pico. Consequentemente, fragmentos de íons originários de peptídeos com múltiplos sítios de desamidação potenciais podem ser usados para localizar ou diferenciar múltiplos sítios de desamidação. Nestes casos, as intensidades relativas dentro dos padrões de isótopos observados podem ser usadas para determinar especificamente a abundância relativa dos diferentes isômeros de peptídeo desamidado. Este método presume que a eficiência de fragmentação para todas as espécies isoméricas é a mesma e independente do sítio de desamidação. Será entendido por aqueles versados na técnica que uma série de variações desses métodos ilustrativos pode ser usada. Por exemplo, espectrômetros de massa adequados podem incluir, *por exemplo*, um espectrômetro de massa de tempo de voo quadrupolo (QTOF), como um Waters Xevo ou Agilent 6530 ou um instrumento orbitrap, como o Orbitrap Fusion ou Orbitrap Velos (Thermo Fisher). Os sistemas de cromatografia líquida adequados incluem, *por exemplo*, o sistema Acquity UPLC da Waters ou os sistemas Agilent (séries 1100 ou 1200). O software de análise de dados adequado pode incluir, *por exemplo*, MassLynx (Waters), Pinpoint and Pepfinder (Thermo Fischer Scientific), Mascot (Matrix Science), Peaks DB (Bioinformatics Solutions). Ainda outras técnicas podem ser descritas, por exemplo, em X. Jin et al, Hu Gene Therapy Methods, Vol. 28, No. 5, pp. 255-267, publicado online em 16 de junho de 2017.

[0072] Além de desamidações, outras modificações podem ocorrer, não resultando na conversão de um aminoácido em um resíduo de

aminoácido diferente. Essas modificações podem incluir resíduos acetilados, isomerizações, fosforilações ou oxidações.

[0073] Modulação da Desamidação: Em certas modalidades, o AAV é modificado para alterar a glicina em um par asparagina-glicina, para reduzir a desamidação. Em outras modalidades, a asparagina é alterada para um aminoácido diferente, por exemplo, uma glutamina que desamida a uma taxa mais lenta; ou a um aminoácido que carece de grupos amida (por exemplo, glutamina e asparagina contêm grupos amida); e/ou a um aminoácido que carece de grupos amina (por exemplo, lisina, arginina e histidina contêm grupos amina). Como usado neste documento, aminoácidos sem amida ou grupos laterais de amina referem-se a, por exemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cistina, fenilalanina, tirosina ou triptofano e/ou prolina. As modificações, tal como descritas, podem ser em um, dois ou três dos pares asparagina-glicina encontrados na sequência de aminoácidos AAV codificada. Em certas modalidades, tais modificações não são feitas em todos os quatro pares asparagina - glicina. Um método para reduzir a desamidação de AAV e/ou variantes de AAV engenheiradas com taxas de desamidação mais baixas é fornecido aqui. Adicionalmente, ou alternativamente, um ou mais outros aminoácidos amida podem ser alterados para um aminoácido não amida para reduzir a desamidação do AAV. Em certas modalidades, um capsídeo de AAV mutante, conforme descrito neste documento, contém uma mutação em um par asparagina-glicina, de modo que a glicina seja alterada para uma alanina ou uma serina. Um capsídeo de AAV mutante pode conter um, dois ou três mutantes em que o AAV de referência contém nativamente quatro pares NG. Em certas modalidades, um capsídeo de AAV pode conter um, dois, três ou quatro mutantes, onde o AAV de referência contém nativamente cinco pares de NG. Em certas modalidades, um capsídeo de AAV mutante contém apenas uma única mutação em um

par NG. Em certas modalidades, um capsídeo de AAV mutante contém mutações em dois pares NG diferentes. Em certas modalidades, um capsídeo de AAV mutante contém mutação em dois pares NG diferentes que estão localizados em um local estruturalmente separado no capsídeo de AAV. Em certas modalidades, a mutação não está na região única de VP1. Em certas modalidades, uma das mutações está na região única de VP1. Opcionalmente, um capsídeo de AAV mutante não contém modificações nos pares NG, mas contém mutações para minimizar ou eliminar a desamidação em uma ou mais asparaginas, ou uma glutamina, localizada fora de um par NG.

[0074] Em certas modalidades, é fornecido um método para aumentar a potência de um vetor rAAV que compreende a engenharia de um capsídeo de AAV que elimina um ou mais dos NGs no capsídeo de AAV de tipo selvagem. Em certas modalidades, a sequência de codificação para o "G" do "NG" é engenheirada para codificar outro aminoácido. Em certos exemplos abaixo, um "S" ou um "A" é substituído. No entanto, podem ser selecionadas outras sequências de codificação de aminoácidos adequadas. Ver, por exemplo, as tabelas abaixo nas quais com base na numeração de AAV8, a sequência de codificação para pelo menos uma das seguintes posições: N57+1, N263+1, N385+1, N514+1, N540+1, é modificada. Em certas modalidades, os mutantes AAV8 evitam alterar os pares NG nas posições N57, N94, N263, N305, Q467, N479, e/ou N653. Em certas modalidades, outros AAVs evitam a mutação nas posições N correspondentes, conforme determinado com base em um alinhamento com AAV8, usando a numeração de AAV8 como referência.

[0075] Estas modificações de aminoácidos podem ser feitas por técnicas convencionais de engenharia genética. Por exemplo, uma sequência de ácido nucleico contendo códons vp de AAV modificados pode ser gerada em que um a três dos códons que codificam glicina em

pares asparagina - glicina são modificados para codificar um aminoácido diferente de glicina. Em certas modalidades, uma sequência de ácido nucleico contendo códons de asparagina modificados pode ser engenheirada em um a três dos pares asparagina-glicina, de modo que o códon modificado codifique um aminoácido diferente de asparagina. Cada códon modificado pode codificar um aminoácido diferente. Alternativamente, um ou mais dos códons alterados podem codificar o mesmo aminoácido. Em certas modalidades, essas sequências de ácido nucleico de AAV modificadas podem ser usadas para gerar um rAAV mutante com um capsídeo com desamidação mais baixa do que o capsídeo nativo. Tal rAAV mutante pode ter imunogenicidade reduzida e/ou aumentar a estabilidade no armazenamento, particularmente armazenamento na forma de suspensão.

[0076] Também são fornecidas neste documento as sequências de ácido nucleico que codificam os capsídeos de AAV com desamidação reduzida. É do conhecimento da técnica conceber sequências de ácidos nucleicos que codificam esse capsídeo do AAV, incluindo DNA (genômico ou cDNA) ou RNA (*por exemplo*, mRNA). Essas sequências de ácido nucleico podem ser otimizadas por códons para expressão em um sistema selecionado (isto é, tipo de célula) pode ser projetado por vários métodos. Essa otimização pode ser realizada usando métodos que estão disponíveis on-line (*por exemplo*, GeneArt), métodos publicados ou uma empresa que fornece serviços de otimização de codificação, *por exemplo*, como DNA2.0 (Menlo Park, CA). Um método de otimização por códon é descrito, *por exemplo*, na Publicação de Patente Internacional US WO 2015/012924, que é aqui incorporado por referência na sua totalidade. *Ver também, por exemplo*, a Publicação de Patente U.S. 2014/0032186 e a Publicação de Patente U.S. 2006/0136184. Adequadamente, o comprimento total da estrutura de leitura aberta (ORF) para o produto é modificado. No entanto, em

algumas modalidades, apenas um fragmento da ORF pode ser alterado. Utilizando um destes métodos, pode-se aplicar as frequências a qualquer sequência polipeptídica e produzir um fragmento de ácido nucleico de uma região de codificação otimizada por códons que codifica o polipeptídeo. Estão disponíveis várias opções para realizar alterações reais aos códons ou para sintetizar as regiões de codificação otimizadas por códons concebidas como aqui descrito. Tais modificações ou sínteses podem ser realizadas usando manipulações biológicas moleculares padrão e de rotina bem conhecidas pelos versados na técnica. Numa abordagem, uma série de pares de oligonucleotídeos complementares de 80-90 nucleotídeos cada um em comprimento e abrangendo o comprimento da sequência desejada são sintetizados por métodos padrão. Estes pares de oligonucleotídeos são sintetizados de modo a que, após recozimento, formem fragmentos de fita dupla de 80-90 pares de bases, *contendo extremidades coesivas, por exemplo*, cada oligonucleotídeo no par é sintetizado para estender 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, ou mais bases além da região que é complementar ao outro oligonucleotídeo no par. As extremidades de fita simples de cada par de oligonucleotídeos são concebidas para recozer com a extremidade de fita simples de outro par de oligonucleotídeos. Os pares de oligonucleotídeos são autorizados a recozer e aproximadamente cinco a seis destes fragmentos de fita dupla são então permitidos recozerem juntos através das extremidades coesivas de fita simples, e depois são ligados e clonados num vetor de clonagem bacteriano padrão, por exemplo, um Vetor TOPO® disponível na Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif. O construto é, então, sequenciado por métodos padrão. Vários destes construtos consistem em 5 a 6 fragmentos de fragmentos de 80 a 90 pares de bases ligados entre si, *isto é*, são preparados fragmentos de cerca de 500 pares de bases, de tal modo que a sequência inteira desejada é representada numa série

de construtos de plasmídeo. Os insertos destes plasmídeos são, então, cortados com enzimas de restrição apropriadas e ligadas em conjunto para formar o construto final. O construto final é, então, clonado num vetor de clonagem bacteriana padrão e sequenciado. Métodos adicionais seriam imediatamente evidentes para o versado na técnica. Além disso, a síntese genética está prontamente disponível comercialmente.

[0077] Em certas modalidades, são fornecidos capsídeos de AAV que têm uma população heterogênea de isoformas de capsídeo de AAV (isto é, VP1, VP2, VP3) que contêm múltiplas posições "NG" altamente desamidadas. Em certas modalidades, as posições altamente desamidadas estão nos locais identificados abaixo, com referência à sequência de aminoácidos de VP1 de comprimento total predita. Em outras modalidades, o gene do capsídeo é modificado de modo que o "NG" referenciado seja removido e um "NG" mutante seja projetado em outra posição.

[0078] Em certas modalidades, AAV1 é caracterizado por uma composição de capsídeo de uma população heterogênea de isoformas de VP que são desamidadas conforme definido na tabela a seguir, com base na quantidade total de proteínas de VP no capsídeo, conforme determinado usando espectrometria de massa.

[0079] Em certas modalidades, o capsídeo de AAV é modificado em uma ou mais das seguintes posições, nos intervalos fornecidos abaixo, conforme determinado usando espectrometria de massa. Modificações adequadas incluem aquelas descritas no parágrafo acima, modulação de desamidação marcada, que é incorporada aqui.

[0080] Em certas modalidades, uma ou mais das seguintes posições ou a glicina após o N é modificada conforme descrito neste documento. Em certas modalidades, um mutante AAV1 é construído em que a glicina após o N na posição 57, 383, 512 e/ou 718 é preservada

(ou seja, permanece inalterada). Em certas modalidades, o NG nas quatro posições identificadas na frase anterior são preservados com a sequência nativa. Os números de resíduos são baseados no AAV1 VP1 publicado, reproduzido em SEQ ID NO: 1.

[0081] Em certas modalidades, um NG artificial é introduzido em uma posição diferente de uma das posições identificadas abaixo.

[0082] Os números de resíduos são baseados na sequência AAV1 publicada, reproduzida em SEQ ID NO: 1.

TABELA A	
Capsídeo AAV1 Posição com base na numeração VP1	%
N35+Desamidação	1-15, 5-10
~N57+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N113+Desamidação	0-8
~ N223+Desamidação	0-30, 0, 20-28
N227+Desamidação	0, 1-5
~N253+Desamidação	0, 1-35
Q259+Desamidação	0, 10-25
~N269+Desamidação	0-25
~N271+Desamidação	0-25
N286+Desamidação	2-10
~N302+Desamidação	10-50
~N303+Desamidação	0-55
~N383+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
~N408+Desamidação	30-65
~N451+Desamidação	0-25
~Q452+Desamidação	0-5
N477+Desamidação	0-45
~N496+Desamidação	0-75
N512+Desamidação	75 - 100, 80-100, 90-100

TABELA A	
Capsídeo AAV1 Posição com base na numeração VP1	%
N651+Desamidação	0-3
N691+Desamidação	0, 1-60
~N704+Desamidação	0-10
N718+Desamidação	75 - 100, 80-100, 90-100

[0083] Em certas modalidades, um capsídeo AAV3B é caracterizado por uma composição de capsídeo de uma população heterogênea de isoformas de VP que são desamidadas conforme definido na tabela a seguir, com base na quantidade total de proteínas de VP no capsídeo, conforme determinado usando espectrometria de massa. Em certas modalidades, o capsídeo de AAV é modificado em uma ou mais das seguintes posições, nos intervalos fornecidos abaixo, conforme determinado usando espectrometria de massa. Modificações adequadas incluem aquelas descritas no parágrafo acima, modulação de desamidação marcada, que é incorporada aqui. Em certas modalidades, uma ou mais das seguintes posições ou a glicina após o N é modificada conforme descrito neste documento. Em certas modalidades, um mutante AAV3 é construído em que a glicina após o N na posição 57, 383, 512 e/ou 718 é preservada (ou seja, permanece inalterada). Em certas modalidades, o NG nas quatro posições identificadas na frase anterior é preservado com a sequência nativa. Os números de resíduos são baseados no AAV3B VP1 publicado, reproduzido em SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, um NG artificial é introduzido em uma posição diferente de uma das posições identificadas abaixo. Em certas modalidades, o capsídeo é modificado para reduzir "N" ou "Q" em posições diferentes dos pares "NG". Os números de resíduos são baseados na sequência AAV3B publicada,

reproduzida em SEQ ID NO: 2.

TABELA B	
Posição do capsídeo AAV3B com base na numeração VP1	%
~N57+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
~ N223+Desamidação	10-30, 15-25
N227+Desamidação	0-5
~N253+Desamidação	1-10, 2-8
~Q259+Desamidação	0-3
~N302+Desamidação	1-30, 5- 25, 10-25
~ N382+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N477+Desamidação	0-1
~N512+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
~N582+Desamidação	1-20, 5-15
~Q599+Desamidação	0-5
N691+Desamidação	5-20
N718+Desamidação	75 - 100

[0084] Em certas modalidades, um capsídeo AAV5 é caracterizado por uma composição de capsídeo de uma população heterogênea de isoformas de VP que são desamidadas conforme definido na tabela a seguir, com base na quantidade total de proteínas de VP no capsídeo, conforme determinado usando espectrometria de massa. Em certas modalidades, o capsídeo de AAV é modificado em uma ou mais das seguintes posições, nos intervalos fornecidos abaixo, conforme determinado usando espectrometria de massa. Modificações adequadas incluem aquelas descritas no parágrafo acima, modulação de desamidação marcada, que é incorporada aqui. Em certas modalidades, uma ou mais das seguintes posições ou a glicina após o N é modificada conforme descrito neste documento. Em certas

modalidades, um NG artificial é introduzido em uma posição diferente de uma das posições identificadas abaixo. Em certas modalidades, o capsídeo é modificado para reduzir "N" ou "Q" em posições diferentes dos pares "NG". Os números de resíduos são baseados na sequência AAV5 publicada, reproduzida em SEQ ID NO: 3.

TABELA C	
Posição do capsídeo AAV5 com base na numeração VP1	%
N34+Desamidação	1 - 15, 2-10
N56+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N112+Desamidação	1-5
~N213+Desamidação	5 - 25, 15-25
~N243+Desamidação	15- 45, 30-35
~N292+Desamidação	15-40, 20-30
N325+Desamidação	5-15
N347+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
~N400+Desamidação	1-10
~Q421+Desamidação	1-10
~N442+Desamidação	5-30, 10-30
~N459+Desamidação	5-20, 10-15
~N509+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
~N691+Desamidação	10-40, 15-30

[0085] Em certas modalidades, um capsídeo AAV7 é caracterizado por uma composição de capsídeo de uma população heterogênea de isoformas de VP que são desamidadas conforme definido na tabela a seguir, com base na quantidade total de proteínas de VP no capsídeo, conforme determinado usando espectrometria de massa. Em certas modalidades, o capsídeo de AAV é modificado em uma ou mais das seguintes posições, nos intervalos fornecidos abaixo, conforme

determinado usando espectrometria de massa. Modificações adequadas incluem aquelas descritas no parágrafo acima, modulação de desamidação marcada, que é incorporada aqui. Em certas modalidades, uma ou mais das seguintes posições ou a glicina após o N é modificada conforme descrito neste documento. Em certas modalidades, um NG artificial é introduzido em uma posição diferente de uma das posições identificadas abaixo. Em certas modalidades, o capsídeo é modificado para reduzir "N" ou "Q" em posições diferentes dos pares "NG". Os números de resíduos são baseados na sequência AAV7 publicada, reproduzida em SEQ ID NO: 4.

TABELA D	
Posição do capsídeo AAV7 com base na numeração VP1	%
N41+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
~N57+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N66+Desamidação	5-25, 10-20
~N224+Desamidação	5-20, 5-15
N228+Desamidação	0-5
~N304+Desamidação	15 - 35, 20-30
~N384+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N479+Desamidação	0-5
~N499+Desamidação	1-30, 5-25
N514+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
~N517+Desamidação	1-15, 5-15
N705+Desamidação	1-15, 5-15
N736+Desamidação	1-20, 5-20

[0086] Em certas modalidades, um capsídeo AAVrh32.33 é caracterizado por uma composição de capsídeo de uma população heterogênea de isoformas de VP que são desamidadas conforme

definido na tabela a seguir, com base na quantidade total de proteínas de VP no capsídeo, conforme determinado usando espectrometria de massa. Em certas modalidades, o capsídeo de AAV é modificado em uma ou mais das seguintes posições, nos intervalos fornecidos abaixo, conforme determinado usando espectrometria de massa. Modificações adequadas incluem aquelas descritas no parágrafo acima, modulação de desamidação marcada, que é incorporada aqui. Em certas modalidades, uma ou mais das seguintes posições ou a glicina após o N é modificada conforme descrito neste documento. Em certas modalidades, um NG artificial é introduzido em uma posição diferente de uma das posições identificadas abaixo. Em certas modalidades, o capsídeo é modificado para reduzir "N" ou "Q" em posições diferentes dos pares "NG". Os números de resíduos são baseados na sequência AAVrh32.33 publicada, reproduzida em SEQ ID NO: 5.

TABELA E	
Posição de AAVrh32.33 com base na numeração VP1	% média
N14+Desamidação	1-10
N57+Desamidação	50-100
N113+Desamidação	0-3
Q210+Desamidação	0-20, 5-20, 10-20
N247+Desamidação	10-40, 20-35, 25-35
~N264+Desamidação	50-100
~N292+Desamidação	25 - 75, 30 - 60, 40-55
Q310+Desamidação	1-8
~ N318+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N383+Desamidação	0-5
~N400+Desamidação	10-40, 20-40, 30-40
~Q449+Desamidação	0-5
N470+Desamidação	0-5
N498+Desamidação	0-1

[0087] Em certas modalidades, um capsídeo AAV8 é caracterizado por uma composição de capsídeo de uma população heterogênea de isoformas de VP que são desamidadas conforme definido na tabela a seguir, com base na quantidade total de proteínas de VP no capsídeo, conforme determinado usando espectrometria de massa. Modificações adequadas incluem aquelas descritas no parágrafo acima, modulação de desamidação marcada, que é incorporada aqui. Em certas modalidades, o capsídeo de AAV é modificado em uma ou mais das seguintes posições, nos intervalos fornecidos abaixo, conforme determinado usando espectrometria de massa. Em certas modalidades, uma ou mais das seguintes posições ou a glicina após o N é modificada conforme descrito neste documento. Em certas modalidades, um NG artificial é introduzido em uma posição diferente de uma das posições identificadas abaixo. Em certas modalidades, um NG artificial é introduzido em uma posição diferente de uma das posições identificadas abaixo. Em certas modalidades, uma ou mais das seguintes posições ou a glicina após o N é modificada conforme descrito neste documento. Por exemplo, em certas modalidades, um G pode ser modificado para um S ou um A, por exemplo, na posição 58, 67, 95, 216, 264, 386, 411, 460, 500, 515, ou 541. Redução significativa na desamidação é observada quando NG57/58 é alterado para NS 57/58 ou NA57/58. No entanto, em certas modalidades, um aumento na desamidação é observado quando NG é alterado para NS ou NA. Em certas modalidades, um N de um par NG é modificado para um Q enquanto retém o G. Em certas modalidades, ambos os aminoácidos de um par NG são modificados. Em certas modalidades, N385Q resulta em redução significativa da desamidação nesse local. Em certas modalidades, o N499Q resulta em um aumento significativo da desamidação nesse local. Em certas modalidades, uma mutação NG é feita no par localizado em N263 (por exemplo, para N263A). Em certas

modalidades, uma mutação NG é feita no par localizado em N514 (por exemplo, para N514A). Em certas modalidades, uma mutação NG é feita no par localizado em N540 (por exemplo, N540A). Em certas modalidades, os mutantes de AAV contendo múltiplas mutações e pelo menos uma das mutações nestas posições são engenheirados. Em certas modalidades, nenhuma mutação é feita na posição N57. Em certas modalidades, nenhuma mutação é feita na posição N94. Em certas modalidades, nenhuma mutação é feita na posição N305. Em certas modalidades, nenhuma mutação é feita na posição G386. Em certas modalidades, nenhuma mutação é feita na posição Q467. Em certas modalidades, nenhuma mutação é feita na posição N479. Em certas modalidades, nenhuma mutação é feita na posição N653. Em certas modalidades, o capsídeo é modificado para reduzir "N" ou "Q" em posições diferentes dos pares "NG". Os números de resíduos são baseados na sequência AAV8 publicada, reproduzida em SEQ ID NO: 6.

TABELA F	
Modificação AAV8 com base na numeração VP1	%
N35+Desamidação	1
N57+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N66+Desamidação	0-10
N94+Desamidação	1-15
N113+Desamidação	0-10
~Q166+Desamidação	0-10
~N173+Desamidação	0-10
N254/N255+Desamidação	5-45
N263+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
~N304+Desamidação	0-10
~N305+Desamidação	10-40
N320+Desamidação	0-10

TABELA F	
Modificação AAV8 com base na numeração VP1	%
~Q322+Desamidação	0-10
N385+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N410+Desamidação	15-70
~Q431+Desamidação	0-10
N438+Desamidação	0-10
~N459+Desamidação	0-10
~Q467+Desamidação	0-10
~N479+Desamidação	0-10
N498/N499+Desamidação	0-10
N502+Desamidação	0-10
N514+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N517+Desamidação	15 - 40
N540+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
~N554+Desamidação	0-10
~Q589+Desamidação	0-10
~N590+Desamidação	0-10
~N599+Desamidação	35 - 75
~Q601+Desamidação	45-75
~Q610+Desamidação	0-10
Q617+Desamidação	0-10
N630+Desamidação	5-30
Q648+Desamidação	0-10
N653+Desamidação	0-10
N665+Desamidação	5-30
N670+Desamidação	0-10
N693+Desamidação	0-10
~N706+Desamidação	0-10
N718+Desamidação	0-10
N737+Desamidação	0-10

[0088] Em certas modalidades, os mutantes podem incluir AAV8 G264A/G515A (SEQ ID NO: 21), AAV8G264A/G541A (SEQ ID NO: 23), AAV8G515A/G541A (SEQ ID NO: 25) ou AAV8 G264A/G515A/G541A (SEQ ID NO: 27). Em certas modalidades, são fornecidas sequências de ácido nucleico que codificam esses capsídeos de AAV8 mutantes. Em certas modalidades, as sequências de ácido nucleico são fornecidas, por exemplo, SEQ ID NO: 20 (AAV8 G264A/G515A), SEQ ID NO: 22 (AAV8G264A/G541A), SEQ ID NO: 24 (AAV8G515A/G541A) ou SEQ ID NO: 26 (AAV8 G264A/G515A/G541A). Em certas modalidades, um mutante AAV8 pode ser N499Q, N459Q, N305Q/N459Q, N305QN499Q, N459Q, N305Q/N459Q, N305q/N499Q, ou N205Q, N459Q, ou N305Q/N459Q, N499Q. Em certas modalidades, essas mutações são combinadas com uma mutação G264A/G541A. Em certas modalidades, a mutação é AAV8 G264A/G541A/N499Q (SEQ ID NO: 115); AAV8 G264A/G541A/N459Q (SEQ ID NO: 116); AAV8 G264A/G541A/N305Q/N459Q (SEQ ID NO: 117); AAV8 G264A/G541A/N305Q/N499Q (SEQ ID NO: 118); G264A/G541A/N459Q/N499Q (SEQ ID NO: 119); ou AAV8 G264A/G541A/ N305Q/N459Q/N499Q (SEQ ID NO: 120). Também são englobadas as sequências de ácido nucleico que codificam esses mutantes AAV8.

[0089] Em certas modalidades, um capsídeo AAV9 é caracterizado por uma composição de capsídeo de uma população heterogênea de isoformas de VP que são desamidadas conforme definido na tabela a seguir, com base na quantidade total de proteínas de VP no capsídeo, conforme determinado usando espectrometria de massa. Em certas modalidades, o capsídeo de AAV é modificado em uma ou mais das seguintes posições, nos intervalos fornecidos abaixo, conforme determinado usando espectrometria de massa. Modificações adequadas incluem aquelas descritas no parágrafo acima, modulação

de desamidação marcada, que é incorporada aqui. Em certas modalidades, uma ou mais das seguintes posições ou a glicina após o N é modificada conforme descrito neste documento. Em certas modalidades, a posição de codificação do capsídeo AAV9 N214/G215 é modificada para N214Q, que se observa ter desamidação significativamente aumentada. Em certas modalidades, uma mutação NG é feita no par localizado em N452 (por exemplo, para N452A). Em certas modalidades, nenhuma mutação é feita na posição N57. Em certas modalidades, os mutantes de AAV contendo múltiplas mutações e pelo menos uma das mutações nestas posições são engenheirados. Em certas modalidades, um NG artificial é introduzido em uma posição diferente de uma das posições identificadas abaixo. Em certas modalidades, o capsídeo é modificado para reduzir "N" ou "Q" em posições diferentes dos pares "NG". Os números de resíduos são baseados na sequência AAV9 publicada, reproduzida em SEQ ID NO: 7.

TABELA G	
Modificações AAV9 com base na numeração VP1	%
N57+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N94+Desamidação	1-10, 2-8
N113+Desamidação	0-10
~N214+Desamidação	0-10
N227+Desamidação	0-10
N253+Desamidação	5-15
N254+Desamidação	1-5
Q259+Desamidação	0-10
N270+Desamidação	5-20, 5-15
N304+Desamidação	10-30, 15-30
N314+Desamidação	0-10
N319+Desamidação	0-10

TABELA G	
Modificações AAV9 com base na numeração VP1	%
Q321+Desamidação	0-1-
N329+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N383+Desamidação	
N409+Desamidação	5 - 20, 5-15
N437+Desamidação	
N452+Desamidação	
N470+Desamidação	
N477+Desamidação	1-5
~N497+Desamidação	
N512+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N515+Desamidação	1-5
N519+Desamidação	1-5
N628+Desamidação	
N651+Desamidação	1-3
N663+Desamidação	1-10, 2-8
~N668+Desamidação	5 - 20
~N704+Desamidação	1-10
N709+Desamidação	1-10

[0090] Adicionalmente, ou alternativamente, um capsídeo AAVhu37 compreende: uma população heterogênea de proteínas vp1 que são o produto de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 36, uma população heterogênea de proteínas vp2 que são o produto de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos de pelo menos cerca dos aminoácidos 138 a 738 da SEQ ID NO: 36, e uma população heterogênea de proteínas vp3 que são o produto de uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos os aminoácidos 204 a 738 da SEQ ID NO: 36, em que: as proteínas vp1, vp2 e vp3 contêm

subpopulações com modificações de aminoácidos compreendendo pelo menos duas asparaginas altamente desamidadas (N) em pares asparagina-glicina na SEQ ID NO: 36 e opcionalmente compreendendo ainda subpopulações compreendendo outros aminoácidos desamidados, em que a desamidação resulta em uma mudança de aminoácidos. AAVhu37 é caracterizado por ter resíduos altamente desamidados, por exemplo, nas posições N57, N263, N385 e/ou N514 com base na numeração do AAVhu37 VP1 (SEQ ID NO: 36).

[0091] A desamidação foi observada em outros resíduos, como mostrado na tabela abaixo e nos exemplos. Em certas modalidades, um capsídeo AAVhu37 é modificado em uma ou mais das seguintes posições, nas faixas fornecidas abaixo, conforme determinado usando espectrometria de massa com uma enzima tripsina. Em certas modalidades, uma ou mais das seguintes posições ou a glicina após o N é modificada conforme descrito neste documento. Por exemplo, em certas modalidades, um G pode ser modificado para um S ou um A, por exemplo, na posição 58, 264, 386, ou 515. Em uma modalidade, o capsídeo AAVhu37 é modificado na posição N57/G58 para N57Q ou G58A para proporcionar um capsídeo com desamidação reduzida nesta posição. Em outra modalidade, N57/G58 é alterado para NS57/58 ou NA57/58. No entanto, em certas modalidades, um aumento na desamidação é observado quando NG é alterado para NS ou NA. Em certas modalidades, um N de um par NG é modificado para um Q enquanto retém o G. Em certas modalidades, ambos os aminoácidos de um par NG são modificados. Em certas modalidades, N385Q resulta em redução significativa da desamidação nesse local. Em certas modalidades, o N499Q resulta em um aumento significativo da desamidação nesse local.

[0092] Em certas modalidades, AAVhu37 pode ter estes ou outros resíduos desamidados, por exemplo, tipicamente em menos de 10%

e/ou pode ter outras modificações, incluindo metilação (por exemplo, ~R487) (tipicamente menos que 5%, mais tipicamente menos que 1% em um dado resíduo), isomerização (por exemplo, em D97) (tipicamente menos que 5%, mais tipicamente menos que 1% em um determinado resíduo, fosforilação (por exemplo, quando presente, na faixa de cerca de 10 a cerca de 60%, ou cerca de 10 a cerca de 30%, ou cerca de 20 a cerca de 60%) (por exemplo, em um ou mais de S149, ~S153, ~S474, ~T570, ~S665) ou oxidação (por exemplo, em um ou mais de W248, W307, W307, M405, M437, M473, W480, W480, W505, M526, M544, M561, W621, M637, e/ou W697). Opcionalmente, o W pode oxidar em quinurenina.

TABELA H	
Desamidação de AAVhu37 baseada na numeração VP1	% de Desamidação
N57+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N94+Desamidação	5 - 15, cerca de 10
~N254+Desamidação	10 - 20
~N263+Desamidação	75 - 100
~N305+Desamidação	1 - 5
~N385+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
~N410+Desamidação	1 - 25,
N479+Desamidação	1 - 5, 1-3
~N514+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
~Q601+Desamidação	0-1
N653+Desamidação	0 -2

[0093] Ainda outras posições podem ter essas ou outras modificações (por exemplo, acetilação ou desamidações adicionais). Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico que codifica a proteína do capsídeo AAVhu37 vp1 é fornecida na SEQ ID NO: 37. Em

outras modalidades, uma sequência de ácido nucleico de 70% a 99,9% de identidade com a SEQ ID NO: 37 pode ser selecionada para expressar as proteínas do capsídeo AAVhu37. Em certas outras modalidades, a sequência de ácido nucleico é pelo menos cerca de 75% idêntica, pelo menos 80% idêntica, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% idêntica ou pelo menos 99% a 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 37. No entanto, outras sequências de ácido nucleico que codificam a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 podem ser selecionadas para uso na produção de capsídeos de rAAVhu37. Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico tem a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 37 ou uma sequência pelo menos 70% a 99% idêntica, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99%, idêntica à SEQ ID NO: 37 que codifica a SEQ ID NO: 36. Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico tem a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 37 ou uma sequência pelo menos 70% a 99%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99%, idêntica a cerca de nt412 a cerca de nt 2214 de SEQ ID NO: 37 que codifica a proteína de capsídeo vp2 (cerca de aa 138 a 738) de SEQ ID NO: 36. Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico tem a sequência de ácido nucleico de cerca de nt 610 a cerca de nt 2214 da SEQ ID NO: 37 ou uma sequência pelo menos 70% a 99%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99%, idêntica a nt SEQ ID NO: 37 que codifica a proteína de capsídeo vp3 (cerca de aa 204 a 738) de SEQ ID NO: 36. Ver, EP 2 345 731 B1 e SEQ ID NO: 88 nele, que são incorporados por referência.

[0094] Como usado neste documento, "sequência de aminoácidos codificada" refere-se ao aminoácido que é predito com base na tradução

de um códon de DNA conhecido de uma sequência de ácido nucleico referenciada sendo traduzida para um aminoácido. A tabela a seguir ilustra os códons de DNA e vinte aminoácidos comuns, mostrando o código de uma letra (SLC) e o código de três letras (3LC).

Aminoácido	SLC	3 LC	Códons de DNA
Isoleucina	I	Ile	ATT, ATC, ATA
Leucina	L	Leu	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Valina	V	Val	GTT, GTC, GTA, GTG
Fenilalanina	F	Phe	TTT, TTC
Metionina	M	Met	ATG
Cisteína	C	Cys	TGT, TGC
Alanina	A	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG
Glicina	G	Gly	GGT, GGC, GGA, GGG
Prolina	P	Pro	CCT, CCC, CCA, CCG
Treonina	T	Thr	ACT, ACC, ACA, ACG
Serina	S	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Tirosina	Y	Tyr	TAT, TAC
Triptofano	W	Trp	TGG
Glutamina	Q	Gln	CAA, CAG
Asparagina	N	Asn	AAT, AAC
Histidina	H	His	CAT, CAC
Ácido glutâmico	E	Glu	GAA, GAG
Ácido aspártico	D	Asp	GAT, GAC
Lisina	K	Lys	AAA, AAG
Arginina	R	Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Códons de parada	Parada		TAA, TAG, TGA

Vetores rAAV

[0095] Como indicado acima, as novas sequências e proteínas de AAV são úteis na produção de rAAV e também são úteis em vetores de AAV recombinantes que podem ser vetores de distribuição antissentido, vetores de terapia genética ou vetores de vacina. Além disso, os capsídeos de AAV engenheirados aqui descritos podem ser usados para engenheirar vetores de rAAV para distribuição de uma série de moléculas de ácido nucleico adequadas a células e tecidos alvo.

[0096] As sequências genômicas que são empacotadas em um capsídeo de AAV e distribuídas a uma célula hospedeira são tipicamente compostas por, no mínimo, um transgene e suas sequências regulatórias e repetições terminais invertidas de AAV (ITRs). Ambos AAV de fita simples e AAV autocomplementar (sc) estão incluídos no rAAV. O transgene é uma sequência de codificação de ácido nucleico, heterólogo às sequências do vetor, que codifica um polipeptídeo, proteína, molécula de RNA funcional (*por exemplo*, miRNA, inibidor de miRNA) ou outro produto de gene de interesse. A sequência de codificação de ácido nucleico está operacionalmente ligada a componentes regulatórios de uma maneira que permite a transcrição, tradução e/ou expressão do transgene em uma célula de um tecido alvo.

[0097] As sequências AAV do vetor compreendem tipicamente as sequências de repetição terminal invertida 5' e 3' de ação cis (*Ver, por exemplo*, B. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)). As sequências ITR têm cerca de 145 bp de comprimento. De preferência, substancialmente todas as sequências que codificam as ITRs são utilizadas na molécula, embora algum grau de modificação menor dessas sequências seja permissível. A capacidade de modificar essas sequências ITR está dentro da habilidade na técnica. (*Ver, por exemplo*, textos como Sambrook *et al*,

"Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); and K. Fisher et al., J. Virol., 70:520 532 (1996)). Um exemplo de tal molécula empregada na presente invenção é um plasmídeo de "ação cis" contendo o transgene, no qual a sequência do transgene selecionada e os elementos regulatórios associados são flanqueados pelas sequências ITR 5' e 3' AAV. Numa modalidade, as ITRs são de um AAV diferente daquele que fornece um capsídeo. Em uma modalidade, as sequências ITR de AAV2. Uma versão abreviada da ITR 5', denominada Δ ITR, foi descrita na qual o sítio de resolução de terminal e sequência-D (trs) são eliminados. Em outras modalidades, são utilizadas as ITRs AAV 5'e 3' de comprimento total. No entanto, as ITRs de outras fontes de AAV podem ser selecionadas. Onde a fonte das ITRs é de AAV2 e o capsídeo AAV é de outra fonte de AAV, o vetor resultante pode ser denominado pseudotipado. No entanto, outras configurações desses elementos podem ser adequadas.

[0098] Além dos elementos principais identificados acima para o vetor AAV recombinante, o vetor também inclui elementos de controle convencionais necessários que estão operacionalmente ligados ao transgene de uma maneira que permite sua transcrição, tradução e/ou expressão em uma célula transfectada com o vetor de plasmídeo ou infectado com o vírus produzido pela invenção. Como usado neste documento, sequências "operacionalmente ligadas" incluem ambas as sequências de controle de expressão que são contíguas com o gene de interesse e sequências de controle de expressão que atuam in trans ou a uma distância para controlar o gene de interesse.

[0099] Os elementos de controle regulatórios tipicamente contêm uma sequência promotora como parte das sequências de controle de expressão, por exemplo, localizada entre a sequência 5' ITR selecionada e a sequência de codificação. Os promotores constitutivos,

promotores reguláveis [ver, *por exemplo*, WO 2011/126808 e WO 2013/04943], promotores específicos de tecido, ou um promotor responsivo a pistas fisiológicas podem ser utilizados nos vetores aqui descritos. O(s) promotor(es) podem ser selecionados a partir de fontes diferentes, *por exemplo*, intensificador/promotor imediato-precoc de citomegalovírus humano (CMV), o intensificador/promotor precoc de SV40, o promotor de poliomavírus JC, proteína básica de mielina (MBP) ou promotores de proteína glial fibrilar acídica (GFAP), promotor associado à latência (LAP) do vírus herpes simplex (HSV-1), promotor de repetição do terminal longo (LTR) do vírus do rouse sarcoma (RSV), promotor específico de neurônio (NSE), promotor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), hSYN, promotor do hormônio de concentração de melanina (MCH), CBA, promotor de metaloproteína de matriz (MPP) e o promotor de beta-actina de frango. Além de um promotor, um vetor pode conter uma ou mais outras sequências de iniciação, terminação, intensificadoras de transcrição apropriadas, sinais de processamento de RNA eficientes, tais como sinais de emenda e poliadenilação (poliA); sequências que estabilizam o mRNA citoplasmático, *por exemplo* WPRE; sequências que intensificam a eficiência da tradução (ou seja, sequência de consenso Kozak); sequências que intensificam a estabilidade da proteína; e quando desejado, sequências que intensificam a secreção do produto codificado. Um exemplo de um intensificador adequado é o intensificador de CMV. Outros intensificadores adequados incluem aqueles que são apropriados para as indicações desejadas do tecido alvo. Em uma modalidade, o cassete de expressão compreende um ou mais intensificadores de expressão. Em uma modalidade, o cassete de expressão contém dois ou mais intensificadores de expressão. Esses intensificadores podem ser iguais ou podem diferir uns dos outros. *Por exemplo*, um intensificador pode incluir um intensificador precoc

imediatamente de CMV. Este intensificador pode estar presente em duas cópias localizadas adjacentes uma à outra. Alternativamente, as cópias duplas do intensificador podem ser separadas por uma ou mais sequências. Em ainda outra modalidade, o cassete de expressão contém ainda um íntron, por exemplo, o íntron de beta-actina de galinha. Outros íntrons adequados incluem aqueles conhecidos na técnica, por exemplo, como são descritos em WO 2011/126808. Exemplos de sequências poliA adequadas incluem, por exemplo, SV40, SV50, hormônio de crescimento bovino (bGH), hormônio de crescimento humano e poliAs sintéticos. Opcionalmente, uma ou mais sequências podem ser selecionadas para estabilizar o mRNA. Um exemplo de tal sequência é uma sequência WPRE modificada, que pode ser projetada a montante da sequência poliA e a jusante da sequência de codificação [ver, por exemplo, MA Zanta-Boussif, et al, Gene Therapy (2009) 16: 605-619].

[00100] Estes rAAVs são particularmente adequados para distribuição de genes para fins terapêuticos e para imunização, incluindo a indução de imunidade protetora. Além disso, as composições da invenção também podem ser usadas para a produção de um produto de gene desejado *in vitro*. Para a produção *in vitro*, um produto desejado (por exemplo, uma proteína) pode ser obtido a partir de uma cultura desejada após a transfecção de células hospedeiras com um rAAV contendo a molécula que codifica o produto desejado e cultivando a cultura de células em condições que permitem a expressão. O produto expresso pode então ser purificado e isolado, conforme desejado. As técnicas adequadas para transfecção, cultura de células, purificação e isolamento são conhecidas dos versados na técnica.

Transgenes terapêuticos

[00101] Produtos úteis codificados pelo transgene incluem uma variedade de produtos de gene que substituem um gene defeituoso ou

deficiente, inativam ou "knock-out", ou "knock-down" ou reduzem a expressão de um gene que está se expressando em um nível indesejavelmente alto, ou distribuindo um produto de gene que tem um efeito terapêutico desejado. Na maioria das modalidades, a terapia será "terapia genética somática", ou seja, transferência de genes para uma célula do corpo que não produz espermatozoides ou óvulos. Em certas modalidades, os transgenes expressam proteínas têm a sequência de sequências humanas nativas. No entanto, em outras modalidades, proteínas sintéticas são expressas. Essas proteínas podem ser destinadas ao tratamento de humanos, ou em outras modalidades, projetadas para o tratamento de animais, incluindo animais de companhia, como populações caninas ou felinas, ou para o tratamento de gado ou outros animais que entram em contato com populações humanas.

[00102] Exemplos de produtos de genes adequados podem incluir aqueles associados com hipercolesterolemia familiar, distrofia muscular, fibrose cística e doenças raras ou órfãs. Exemplos de tais doenças raras podem incluir atrofia muscular espinhal (SMA), Doença de Huntington, Síndrome de Rett (por exemplo, proteína 2 de ligação a metil-CpG (MeCP2); UniProtKB - P51608), Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS), distrofia Muscular do Tipo Duchenne, Friedrichs Ataxia (por exemplo, frataxina), progranulina (PRGN) (associada a degenerações cerebrais não relacionadas ao Alzheimer, incluindo demência frontotemporal (FTD), afasia não fluente progressiva (PNFA) e demência semântica), entre outras. Veja, por exemplo, www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_List.php; rarediseases.info.nih.gov/diseases.

[00103] Exemplos de genes adequados podem incluir, por exemplo, hormônios e fatores de crescimento e diferenciação incluindo, sem limitação, insulina, glucagon, peptídeo -1 semelhante ao glucagon

(GLP1), hormônio do crescimento (GH), hormônio da paratireoide (PTH), fator de liberação do hormônio do crescimento (GRF), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), gonadotrofina coriônica humana (hCG), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), angiopoietinas, angiostatina, fator estimulador de colônia de granulócitos (GCSF), eritropoietina (EPO) (incluindo, por exemplo, epo humano, canino ou felino), fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), fatores neutróficos, incluindo, por exemplo, fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), fator de crescimento de fibroblasto ácido (aFGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fatores de crescimento de insulina I e II (IGF-I e IGF-II), qualquer um da superfamília do fator de crescimento de transformação α , incluindo TGF α , ativinas, inibinas ou qualquer uma das proteínas morfogênicas ósseas (BMP) BMPs 1-15, qualquer um da família de fatores de crescimento hereglúina/neuregulina/ARIA/fator de diferenciação neu (NDF), fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 e NT-4/5, fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF), neurturina, agrina, qualquer um da família das semaforinas/colapsinas, netrin-1 e netrin-2, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), efrinas, nogina, hedgehog sônico e tirosina hidroxilase.

[00104] Outros produtos transgênicos úteis incluem proteínas que regulam o sistema imunológico, incluindo, sem limitação, citocinas e linfocinas, tais como trombopoietina (TPO), interleucinas (IL) IL-1 a IL-36 (incluindo, *por exemplo*, interleucinas humanas IL-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-11, IL-12, IL-13, IL-18, IL-31, IL-35), proteína quimioatraente de monócitos, fator inibidor de leucemia, fator de estimulação de colônia de granulócitos-macrófagos, ligando Fas, fatores de necrose tumoral α e β , interferons α , β e γ , fator de células-

tronco, ligando flk-2/flt3. Os produtos de gene produzidos pelo sistema imunológico também são úteis na invenção. Estes incluem, sem limitações, imunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, imunoglobulinas quiméricas, anticorpos humanizados, anticorpos de cadeia única, receptores de células T, receptores de células T quiméricos, receptores de células T de cadeia simples, moléculas de MHC de classe I e classe II, bem como imunoglobulinas engenheiradas e moléculas de MHC. Por exemplo, em certas modalidades, os anticorpos rAAV podem ser projetados para distribuir anticorpos caninos ou felinos, por exemplo, tais como anti-IgE, anti-IL31, anti-CD20, anti-NGF, anti-GnRH. Produtos de gene úteis também incluem proteínas regulatórias do complemento, como proteínas regulatórias do complemento, proteína cofator de membrana (MCP), fator de aceleração do decaimento (DAF), CR1, CF2, CD59 e inibidor da esterase C1 (C1-INH).

[00105] Ainda outros produtos de genes úteis incluem qualquer um dos receptores para os hormônios, fatores de crescimento, citocinas, linfocinas, proteínas regulatórias e proteínas do sistema imunológico. A invenção abrange receptores para a regulação do colesterol e/ou modulação lipídica, incluindo o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL), receptor de lipoproteína de alta densidade (HDL), receptor de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e receptores sequestrantes. A invenção também abrange produtos de genes, tais como membros da superfamília de receptores de hormônio esteroide, incluindo receptores de glicocorticoides e receptores de estrogênio, receptores de vitamina D e outros receptores nucleares. Além disso, os produtos de gene úteis incluem fatores de transcrição, como *jun*, *fos*, *max*, *mad*, fator de resposta do soro (SRF), AP-1, AP2, *myb*, MyoD e miogenina, proteínas contendo caixa ETS, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, proteínas de ligação de caixa CCAAT, fator de regulação de interferon (IRF-1),

proteína tumoral de Wilms, proteína de ligação ETS, STAT, proteínas de ligação de caixa GATA, *por exemplo*, GATA-3 e a família forkhead de proteínas de hélice alada.

[00106] Outros produtos de genes úteis incluem carbamoil sintetase I, ornitina transcarbamilase (OTC), arginosuccinato sintetase, arginosuccinato liase (ASL) para o tratamento de deficiência de arginosuccinato liase, arginase, fumarilacetato hidrolase, fenilalanina hidroxilase fetal, alfa-1 antitripsina, alfa-fetoproteína rhesus (AFP) gonadotrofina coriônica rhesus (CG), glicose-6-fosfatase, porfobilinogênio desaminase, cistationa beta-sintase, cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada, albumina, isovaleril-CoA desidrogenase, propionil CoA carboxilase, metil malonil CoA mutase, glutaril CoA desidrogenase, insulina, beta-glucosidase, piruvato carboxilato, fosforilase hepática, fosforilase quinase, glicina descarboxilase, proteína H, proteína T, uma sequência reguladora transmembranar de fibrose cística (CFTR), e um produto do gene da distrofina [*por exemplo*, uma mini- ou micro-distrofina]. Ainda outros produtos de genes úteis incluem enzimas, tais como podem ser úteis na terapia de substituição de enzima, que é útil em uma variedade de condições resultantes da atividade deficiente da enzima. Por exemplo, enzimas que contêm manose-6-fosfato podem ser utilizadas em terapias para doenças de armazenamento lisossômico (*por exemplo*, um gene adequado inclui aquele que codifica β -glucuronidase (GUSB)).

[00107] Em certas modalidades, o rAAV pode ser usado em sistemas de edição de genes, cujo sistema pode envolver um rAAV ou coadministração de múltiplos estoques de rAAV. Por exemplo, o rAAV pode ser projetado para fornecer SpCas9, SaCas9, ARCUS, Cpf1 e outros construtos de edição de genes adequados.

[00108] Ainda outros produtos de genes úteis incluem aqueles usados para o tratamento de hemofilia, incluindo hemofilia B (incluindo

Fator IX) e hemofilia A (incluindo Fator VIII e suas variantes, tais como a cadeia leve e a cadeia pesada do heterodímero e o domínio B-deletado; Patente U.S. 6.200.560 e Patente U.S. 6.221.349). Em algumas modalidades, o minigene compreende primeiros 57 pares de bases da cadeia pesada do Fator VIII que codifica a sequência de sinal de 10 aminoácidos, bem como a sequência de poliadenilação do hormônio de crescimento humano (hGH). Em modalidades alternativas, o minigene compreende ainda os domínios A1 e A2, bem como 5 aminoácidos do terminal N do domínio B e/ou 85 aminoácidos do terminal C do domínio B, bem como os domínios A3, C1 e C2. Em ainda outras modalidades, os ácidos nucleicos que codificam a cadeia pesada e a cadeia leve do Fator VIII são fornecidos em um único minigene separado por 42 ácidos nucleicos que codificam para 14 aminoácidos do domínio B [Patente U.S. 6.200.560].

[00109] Outros produtos de genes úteis incluem polipeptídeos de ocorrência não natural, tais como polipeptídeos quiméricos ou híbridos com uma sequência de aminoácidos de ocorrência não natural contendo inserções, deleções ou substituições de aminoácidos. Por exemplo, imunoglobulinas de cadeia simples podem ser úteis em certos pacientes imunocomprometidos. Outros tipos de sequências de genes de ocorrência não natural incluem moléculas antissentido e ácidos nucleicos catalíticos, como ribozimas, que podem ser usados para reduzir a superexpressão de um alvo.

[00110] A redução e/ou modulação da expressão de um gene é particularmente desejável para o tratamento de condições hiperproliferativas caracterizadas por células hiperproliferativas, como são cânceres e psoríase. Os polipeptídeos alvo incluem aqueles polipeptídeos que são produzidos exclusivamente ou em níveis mais elevados em células hiperproliferativas em comparação com células normais. Os antígenos alvo incluem polipeptídeos codificados por

oncogenes, tais como myb, myc, fyn, e o gene de translocação bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk e EGRF. Além de produtos oncogene como antígenos alvo, polipeptídeos alvo para tratamentos anticâncer e regimes de proteção incluem regiões variáveis de anticorpos feitos por linfomas de células B e regiões variáveis de receptores de células T de linfomas de células T que, em algumas modalidades, também são usados como antígenos alvo para doenças autoimunes. Outros polipeptídeos associados a tumor podem ser usados como polipeptídeos alvo, tais como polipeptídeos que são encontrados em níveis mais elevados em células tumorais, incluindo o polipeptídeo reconhecido pelo anticorpo monoclonal 17-1A e polipeptídeos de ligação a folato.

[00111] Outros polipeptídeos e proteínas terapêuticas adequadas incluem aqueles que podem ser úteis para o tratamento de indivíduos que sofrem de doenças e distúrbios autoimunes, conferindo uma resposta imune protetora de ampla base contra alvos que estão associados à autoimunidade, incluindo receptores celulares e células que produzem anticorpos "auto" direcionados. As doenças autoimunes mediadas por células T incluem artrite reumatoide (AR), esclerose múltipla (MS), síndrome de Sjögren, sarcoidose, diabetes mellitus dependente de insulina (IDDM), tireoidite autoimune, artrite reativa, espondilite anquilosante, esclerodermia, polimiosite, dermatomiosite, psoríase, granulomatose de Wegener, doença de Crohn e colite ulcerosa. Cada uma dessas doenças é caracterizada por receptores de células T (TCRs) que se ligam a antígenos endógenos e iniciam a cascata inflamatória associada a doenças autoimunes.

[00112] Outros genes ilustrativos que podem ser distribuídos via rAAV incluem, sem limitação, glicose-6-fosfatase, associada à doença de armazenamento de glicogênio ou deficiência tipo 1A (GSD1), fosfoenolpiruvato-carboxicinase (PEPCK), associada à deficiência de

PEPCK; quinase dependente de ciclina tipo 5 (CDKL5), também conhecida como serina / treonina quinase 9 (STK9), associada a convulsões e grave comprometimento do neurodesenvolvimento; galactose-1 fosfato uridil transferase, associada à galactosemia; fenilalanina hidroxilase, associada à fenilcetonúria (PKU); alfa-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada, associada à doença da urina do xarope de bordo; fumarilacetoacetato hidrolase, associado à tirosinemia tipo 1; metilmalonil-CoA mutase, associada à acidemia metilmalônica; acil CoA desidrogenase de cadeia média, associada à deficiência de acetil CoA de cadeia média; ornitina transcarbamilase (OTC), associada à deficiência de ornitina transcarbamilase; sintetase de ácido argininosuccínico (ASS1), associada à citrulinemia; deficiência de lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT); acidemia ametilmalônica (MMA); Doença de Niemann-Pick, tipo C1); acidemia propiônica (PA); proteína do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR), associada à hipercolesterolemia familiar (FH); UDP-glucouronosiltransferase, associada à doença de Crigler-Najjar; adenosina desaminase, associada a doença de imunodeficiência combinada grave; hipoxantina guanina fosforibosil transferase, associada à síndrome de Gout e Lesch-Nyan; biotimidase, associada à deficiência de biotimidase; alfa-galactosidase A (α-Gal A) associada à doença de Fabry); ATP7B associado à doença de Wilson; beta-glucocerebrosidase, associada à doença de Gaucher tipo 2 e 3; proteína de membrana de peroxissoma de 70 kDa, associada à síndrome de Zellweger; arilsulfatase A (ARSA) associada à leucodistrofia metacromática, enzima galactocerebrosidase (GALC) associada à doença de Krabbe, alfa-glucosidase (GAA) associada à doença de Pompe; gene da esfingomielinase (SMPD1) associado à doença de Nieman Pick tipo A; argininosuccinato sintase associada à citrulinemia tipo II de início na idade adulta (CTLN2); carbamoil-fosfato sintase 1

(CPS1) associada a distúrbios do ciclo da ureia; proteína do neurônio motor de sobrevivência (SMN), associada à atrofia muscular espinhal; ceramidase associada à lipogranulomatose de Farber; b-hexosaminidase associada à gangliosidose GM2 e doenças de Tay-Sachs e Sandhoff; aspartilglucosaminidase associada à aspartilglucosaminúria; α -fucosidase associada à fucosidose; α -manosidase associada a alfa-manosidose; porfobilinogênio desaminase, associado à porfiria aguda intermitente (AIP); alfa-1 antitripsina para o tratamento da deficiência de alfa-1 antitripsina (enfisema); eritropoietina para o tratamento de anemia devido à talassemia ou insuficiência renal; fator de crescimento endotelial vascular, angiopoietina-1, e fator de crescimento de fibroblasto para o tratamento de doenças isquêmicas; trombosmodulina e inibidor da via do fator de tecido para o tratamento de vasos sanguíneos obstruídos como visto em, por exemplo, aterosclerose, trombose ou embolias; aminoácido aromático descarboxilase (AADC) e tirosina hidroxilase (TH) para o tratamento da doença de Parkinson; o receptor beta adrenérgico, antissintetico para, ou uma forma mutante de fosfolambano, o retículo sarco(enso)plasmático (endo) adenosina trifosfatase-2 (SERCA2), e a adenilil ciclase cardíaca para o tratamento de insuficiência cardíaca congestiva; um gene supressor de tumor, como p53, para o tratamento de vários cânceres; uma citocina, tal como uma das várias interleucinas para o tratamento de doenças inflamatórias e imunitárias e cânceres; distrofina ou minidistrofina e utrofina ou miniutrofina para o tratamento de distrofias musculares; e insulina ou GLP-1 para o tratamento de diabetes.

[00113] Em certas modalidades, o rAAV aqui descrito pode ser usado no tratamento de distúrbios de mucopolissacaridoses (MPS). Tal rAAV pode conter transportar uma sequência de ácido nucleico que codifica α -L-iduronidase (IDUA) para o tratamento de MPS I (síndromes de Hurler, Hurler-Scheie e Scheie); uma sequência de ácido nucleico que

codifica iduronato-2-sulfatase (IDS) para o tratamento de MPS II (síndrome de Hunter); uma sequência de ácido nucleico que codifica sulfamidase (SGSH) para o tratamento de MPSIII A, B, C e D (síndrome de Sanfilippo); uma sequência de ácido nucleico que codifica N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatase (GALNS) para o tratamento de MPS IV A e B (síndrome de Morquio); uma sequência de ácido nucleico que codifica arilsulfatase B (ARSB) para o tratamento de MPS VI (síndrome de Maroteaux-Lamy); uma sequência de ácido nucleico que codifica hialuronidase para o tratamento de MPSI IX (deficiência de hialuronidase) e uma sequência de ácido nucleico que codifica beta-glucuronidase para o tratamento de MPS VII (síndrome de Sly).

Transgenes imunogênicos

[00114] Em algumas modalidades, um vetor rAAV compreendendo um ácido nucleico que codifica um produto de gene associado ao câncer (por exemplo, supressores de tumor) pode ser usado para tratar o câncer, administrando um rAAV que abriga o vetor rAAV a um sujeito com câncer. Em algumas modalidades, um vetor rAAV compreendendo um ácido nucleico que codifica um pequeno ácido nucleico interferente (por exemplo, shRNAs, miRNAs) que inibe a expressão de um produto de gene associado ao câncer (por exemplo, oncogenes) pode ser usado para tratar o câncer, administrando um rAAV que abriga o vetor rAAV a um sujeito com câncer. Em algumas modalidades, um vetor rAAV compreendendo um ácido nucleico que codifica um produto de gene associado ao câncer (ou um RNA funcional que inibe a expressão de um gene associado ao câncer) pode ser usado para fins de pesquisa, por exemplo, para estudar o câncer ou para identificar terapêuticas que tratam o câncer. O que se segue é uma lista não limitativa de genes exemplificativos conhecidos por estarem associados ao desenvolvimento de câncer (por exemplo, oncogenes e supressores de tumor): AARS, ABCB1, ABCC4, ABI2, ABL1, ABL2, ACK1, ACP2,

ACY1, ADSL, AK1, AKR1C2, AKT1, ALB, ANPEP, ANXA5, ANXA7, AP2M1, APC, ARHGAP5, ARHGEF5, ARID4A, ASNS, ATF4, ATM, ATP5B, ATP5O, AXL, BARD1, BAX, BCL2, BHLHB2, BLMH, BRAF, BRCA1, BRCA2, BTK, CANX, CAP1, CAPN1, CAPNS1, CAV1, CBFB, CBLB, CCL2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CCT5, CCYR61, CD24, CD44, CD59, CDC20, CDC25, CDC25A, CDC25B, CDC2L5, CDK10, CDK4, CDK5, CDK9, CDKL1, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2D, CEBPG, CENPC1, CGRRF1, CHAF1A, CIB1, CKMT1, CLK1, CLK2, CLK3, CLNS1A, CLTC, COL1A1, COL6A3, COX6C, COX7A2, CRAT, CRHR1, CSF1R, CSK, CSNK1G2, CTNNA1, CTNNB1, CTPS, CTSC, CTSD, CUL1, CYR61, DCC, DCN, DDX10, DEK, DHCR7, DHRS2, DHX8, DLG3, DVL1, DVL3, E2F1, E2F3, E2F5, EGFR, EGR1, EIF5, EPHA2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC3, ETV1, ETV3, ETV6, F2R, FASTK, FBN1, FBN2, FES, FGFR1, FGR, FKBP8, FN1, FOS, FOSL1, FOSL2, FOXG1A, FOXO1A, FRAP1, FRZB, FTL, FZD2, FZD5, FZD9, G22P1, GAS6, GCN5L2, GDF15, GNA13, GNAS, GNB2, GNB2L1, GPR39, GRB2, GSK3A, GSPT1, GTF2I, HDAC1, HDGF, HMMR, HPRT1, HRB, HSPA4, HSPA5, HSPA8, HSPB1, HSPH1, HYAL1, HYOU1, ICAM1, ID1, ID2, IDUA, IER3, IFITM1, IGF1R, IGF2R, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, IL1B, ILK, ING1, IRF3, ITGA3, ITGA6, ITGB4, JAK1, JARID1A, JUN, JUNB, JUND, K-ALPHA-1, KIT, KITLG, KLK10, KPNA2, KRAS2, KRT18, KRT2A, KRT9, LAMB1, LAMP2, LCK, LCN2, LEP, LITAF, LRPAP1, LTF, LYN, LZTR1, MADH1, MAP2K2, MAP3K8, MAPK12, MAPK13, MAPKAPK3, MAPRE1, MARS, MAS1, MCC, MCM2, MCM4, MDM2, MDM4, MET, MGST1, MICB, MLLT3, MME, MMP1, MMP14, MMP17, MMP2, MNDA, MSH2, MSH6, MT3, MYB, MYBL1, MYBL2, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, MYL9, MYLK, NEO1, NF1, NF2, NFKB1, NFKB2, NFSF7, NID, NINE, NMBR, NME1, NME2, NME3, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH4, NPM1, NQO1, NR1D1, NR2F1, NR2F6, NRAS, NRG1, NSEP1, OSM, PA2G4,

PABPC1, PCNA, PCTK1, PCTK2, PCTK3, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDPK1, PEA15, PFDN4, PFDN5, PGAM1, PHB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG, PIM1, PKM2, PKMYT1, PLK2, PPARD, PPARG, PPIH, PPP1CA, PPP2R5A, PRDX2, PRDX4, PRKAR1A, PRKCBP1, PRNP, PRSS15, PSMA1, PTCH, PTEN, PTGS1, PTMA, PTN, PTPRN, RAB5A, RAC1, RAD50, RAF1, RALBP1, RAP1A, RARA, RARB, RASGRF1, RB1, RBBP4, RBL2, REA, REL, RELA, RELB, RET, RFC2, RGS19, RHOA, RHOB, RHOC, RHOD, RIPK1, RPN2, RPS6 KB1, RRM1, SARS, SELENBP1, SEMA3C, SEMA4D, SEPP1, SERPINH1, SFN, SFPQ, SFRS7, SHB, SHH, SIAH2, SIVA, SIVA TP53, SKI, SKIL, SLC16A1, SLC1A4, SLC20A1, SMO, esfingomielina fosfodiesterase 1 (SMPD1), SNAI2, SND1, SNRPB2, SOCS1, SOCS3, SOD1, SORT1, SPINT2, SPRY2, SRC, SRPX, STAT1, STAT2, STAT3, STAT5B, STC1, TAF1, TBL3, TBRG4, TCF1, TCF7L2, TFAP2C, TFDP1, TFDP2, TGFA, TGFB1, TGFBI, TGFBR2, TGFBR3, THBS1, TIE, TIMP1, TIMP3, TJP1, TK1, TLE1, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF6, TNFSF7, TNK1, TOB1, TP53, TP53BP2, TP5313, TP73, TPBG, TPT1, TRADD, TRAM1, TRRAP, TSG101, TUFM, TXNRD1, TYRO3, UBC, UBE2L6, UCHL1, USP7, VDAC1, VEGF, VHL, VIL2, WEE1, WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT5A, WT1, XRCC1, YES1, YWHAB, YWHAZ, ZAP70, e ZNF9.

[00115] Um vetor rAAV pode compreender como um transgene, um ácido nucleico que codifica uma proteína ou RNA funcional que modula a apoptose. O que se segue é uma lista não limitativa de genes associados à apoptose e ácidos nucleicos que codificam os produtos desses genes e seus homólogos e que codificam pequenos ácidos nucleicos interferentes (por exemplo, shRNAs, miRNAs) que inibem a expressão desses genes e seus homólogos são úteis como transgenes em certas modalidades da invenção: RPS27A, ABL1, AKT1, APAF1, BAD, BAG1, BAG3, BAG4, BAK1, BAX, BCL10, BCL2, BCL2A1,

BCL2L1, BCL2L10, BCL2L11, BCL2L12, BCL2L13, BCL2L2, BCLAF1, BFAR, BID, BIK, NAIP, BIRC2, BIRC3, XIAP, BIRC5, BIRC6, BIRC7, BIRC8, BNIP1, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BOK, BRAF, CARD10, CARD11, NLRC4, CARD14, NOD2, NOD1, CARD6, CARDS, CARDS, CASP1, CASP10, CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CFLAR, CIDEA, CIDEB, CRADD, DAPK1, DAPK2, DFFA, DFFB, FADD, GADD45A, GDNF, HRK, IGF1R, LTA, LTBR, MCL1, NOL3, PYCARD, RIPK1, RIPK2, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF11B, TNFRSF12A, TNFRSF14, TNFRSF19, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF21, TNFRSF25, CD40, FAS, TNFRSF6B, CD27, TNFRSF9, TNFSF10, TNFSF14, TNFSF18, CD40LG, FASLG, CD70, TNFSF8, TNFSF9, TP53, TP53BP2, TP73, TP63, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4 e TRAF5.

[00116] Produtos transgênicos úteis também incluem miRNAs. miRNAs e outros pequenos ácidos nucleicos interferentes regulam a expressão de gene por meio da clivagem/degradação do transcrito do RNA alvo ou repressão translacional do RNA mensageiro alvo (mRNA). Os miRNAs são expressos nativamente, normalmente como produtos finais de RNA não traduzidos de 19-25. Os miRNAs exibem sua atividade por meio de interações específicas de sequência com as regiões 3' não traduzidas (UTR) dos mRNAs alvo. Esses miRNAs expressos endogenamente formam precursores em hairpin que são subsequentemente processados em um duplex de miRNA e, posteriormente, em uma molécula de miRNA de fita simples "madura". Este miRNA maduro guia um complexo multiproteico, miRISC, que identifica o sítio alvo, por exemplo, nas regiões 3' UTR, de mRNAs alvo com base em sua complementaridade com o miRNA maduro.

[00117] A seguinte lista não limitativa de genes de miRNA e seus homólogos são úteis como transgenes ou como alvos para pequenos

ácidos nucleicos interferentes codificados por transgenes (por exemplo, esponjas de miRNA, oligonucleotídeos antissentido, RNAs TuD) em certas modalidades dos métodos: hsa-let-7a, hsa-let-7a*, hsa-let-7b, hsa-let-7b*, hsa-let-7c, hsa-let-7c*, hsa-let-7d, hsa-let-7d*, hsa-let-7e, hsa-let-7e*, hsa-let-7f, hsa-let-7f-1*, hsa-let-7f-2*, hsa-let-7g, hsa-let-7g*, hsa-let-71, hsa-let-71*, hsa-miR-1, hsa-miR-100, hsa-miR-100*, hsa-miR-101, hsa-miR-101*, hsa-miR-103, hsa-miR-105, hsa-miR-105*, hsa-miR-106a, hsa-miR-106a*, hsa-miR-106b, hsa-miR-106b*, hsa-miR-107, hsa-miR-10a, hsa-miR-10a*, hsa-miR-10b, hsa-miR-10b*, hsa-miR-1178, hsa-miR-1179, hsa-miR-1180, hsa-miR-1181, hsa-miR-1182, hsa-miR-1183, hsa-miR-1184, hsa-miR-1185, hsa-miR-1197, hsa-miR-1200, hsa-miR-1201, hsa-miR-1202, hsa-miR-1203, hsa-miR-1204, hsa-miR-1205, hsa-miR-1206, hsa-miR-1207-3p, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-1208, hsa-miR-122, hsa-miR-122*, hsa-miR-1224-3p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-1225-3p, hsa-miR-1225-5p, hsa-miR-1226, hsa-miR-1226*, hsa-miR-1227, hsa-miR-1228, hsa-miR-1228*, hsa-miR-1229, hsa-miR-1231, hsa-miR-1233, hsa-miR-1234, hsa-miR-1236, hsa-miR-1237, hsa-miR-1238, hsa-miR-124, hsa-miR-124*, hsa-miR-1243, hsa-miR-1244, hsa-miR-1245, hsa-miR-1246, hsa-miR-1247, hsa-miR-1248, hsa-miR-1249, hsa-miR-1250, hsa-miR-1251, hsa-miR-1252, hsa-miR-1253, hsa-miR-1254, hsa-miR-1255a, hsa-miR-1255b, hsa-miR-1256, hsa-miR-1257, hsa-miR-1258, hsa-miR-1259, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b, hsa-miR-125b-1*, hsa-miR-125b-2*, hsa-miR-126, hsa-miR-126*, hsa-miR-1260, hsa-miR-1261, hsa-miR-1262, hsa-miR-1263, hsa-miR-1264, hsa-miR-1265, hsa-miR-1266, hsa-miR-1267, hsa-miR-1268, hsa-miR-1269, hsa-miR-1270, hsa-miR-1271, hsa-miR-1272, hsa-miR-1273, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-1274a, hsa-miR-1274b, hsa-miR-1275, hsa-miR-127-5p, hsa-miR-1276, hsa-miR-1277, hsa-miR-1278, hsa-miR-1279, hsa-miR-128, hsa-miR-1280, hsa-miR-1281, hsa-miR-1282, hsa-miR-1283, hsa-miR-

1284, hsa-miR-1285, hsa-miR-1286, hsa-miR-1287, hsa-miR-1288, hsa-miR-1289, hsa-miR-129*, hsa-miR-1290, hsa-miR-1291, hsa-miR-1292, hsa-miR-1293, hsa-miR-129-3p, hsa-miR-1294, hsa-miR-1295, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-1296, hsa-miR-1297, hsa-miR-1298, hsa-miR-1299, hsa-miR-1300, hsa-miR-1301, hsa-miR-1302, hsa-miR-1303, hsa-miR-1304, hsa-miR-1305, hsa-miR-1306, hsa-miR-1307, hsa-miR-1308, hsa-miR-130a, hsa-miR-130a*, hsa-miR-130b, hsa-miR-130b*, hsa-miR-132, hsa-miR-132*, hsa-miR-1321, hsa-miR-1322, hsa-miR-1323, hsa-miR-1324, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-134, hsa-miR-135a, hsa-miR-135a*, hsa-miR-135b, hsa-miR-135b*, hsa-miR-136, hsa-miR-136*, hsa-miR-137, hsa-miR-138, hsa-miR-138-1*, hsa-miR-138-2*, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-141, hsa-miR-141*, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-143*, hsa-miR-144, hsa-miR-144*, hsa-miR-145, hsa-miR-145*, hsa-miR-146a, hsa-miR-146a*, hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-147, hsa-miR-147b, hsa-miR-148a, hsa-miR-148a*, hsa-miR-148b, hsa-miR-148b*, hsa-miR-149, hsa-miR-149*, hsa-miR-150, hsa-miR-150*, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-152, hsa-miR-153, hsa-miR-154, hsa-miR-154*, hsa-miR-155, hsa-miR-155*, hsa-miR-15a, hsa-miR-15a*, hsa-miR-15b, hsa-miR-15b*, hsa-miR-16, hsa-miR-16-1*, hsa-miR-16-2*, hsa-miR-17, hsa-miR-17*, hsa-miR-181a, hsa-miR-181a*, hsa-miR-181a-2*, hsa-miR-181b, hsa-miR-181c, hsa-miR-181c*, hsa-miR-181d, hsa-miR-182, hsa-miR-182*, hsa-miR-1825, hsa-miR-1826, hsa-miR-1827, hsa-miR-183, hsa-miR-183*, hsa-miR-184, hsa-miR-185, hsa-miR-185*, hsa-miR-186, hsa-miR-186*, hsa-miR-187, hsa-miR-187*, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-18a, hsa-miR-18a*, hsa-miR-18b, hsa-miR-18b*, hsa-miR-190, hsa-miR-190b, hsa-miR-191, hsa-miR-191*, hsa-miR-192, hsa-miR-192*, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b, hsa-miR-193b*, hsa-miR-194, hsa-miR-194*, hsa-miR-195, hsa-

miR-195*, hsa-miR-196a, hsa-miR-196a*, hsa-miR-196b, hsa-miR-197, hsa-miR-198, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19a, hsa-miR-19a*, hsa-miR-19b, hsa-miR-19b-1*, hsa-miR-19b-2*, hsa-miR-200a, hsa-miR-200a*, hsa-miR-200b, hsa-miR-200b*, hsa-miR-200c, hsa-miR-200c*, hsa-miR-202, hsa-miR-202*, hsa-miR-203, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-206, hsa-miR-208a, hsa-miR-208b, hsa-miR-20a, hsa-miR-20a*, hsa-miR-20b, hsa-miR-20b*, hsa-miR-21, hsa-miR-21*, hsa-miR-210, hsa-miR-211, hsa-miR-212, hsa-miR-214, hsa-miR-214*, hsa-miR-215, hsa-miR-216a, hsa-miR-216b, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-218-1*, hsa-miR-218-2*, hsa-miR-219-1-3p, hsa-miR-219-2-3p, hsa-miR-219-5p, hsa-miR-22, hsa-miR-22*, hsa-miR-220a, hsa-miR-220b, hsa-miR-220c, hsa-miR-221, hsa-miR-221*, hsa-miR-222, hsa-miR-222*, hsa-miR-223, hsa-miR-223*, hsa-miR-224, hsa-miR-23a, hsa-miR-23a*, hsa-miR-23b, hsa-miR-23b*, hsa-miR-24, hsa-miR-24-1*, hsa-miR-24-2*, hsa-miR-25, hsa-miR-25*, hsa-miR-26a, hsa-miR-26a-1*, hsa-miR-26a-2*, hsa-miR-26b, hsa-miR-26b*, hsa-miR-27a, hsa-miR-27a*, hsa-miR-27b, hsa-miR-27b*, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-296-5p, hsa-miR-297, hsa-miR-298, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-29a, hsa-miR-29a*, hsa-miR-29b, hsa-miR-296-1*, hsa-miR-296-2*, hsa-miR-29c, hsa-miR-29c*, hsa-miR-300, hsa-miR-301a, hsa-miR-301b, hsa-miR-302a, hsa-miR-302a*, hsa-miR-302b, hsa-miR-302b*, hsa-miR-302c, hsa-miR-302c*, hsa-miR-302d, hsa-miR-302d*, hsa-miR-302e, hsa-miR-302f, hsa-miR-30a, hsa-miR-30a*, hsa-miR-30b, hsa-miR-30b*, hsa-miR-30c, hsa-miR-30c-1*, hsa-miR-30c-2*, hsa-miR-30d, hsa-miR-30d*, hsa-miR-30e, hsa-miR-30e*, hsa-miR-31, hsa-miR-31*, hsa-miR-32, hsa-miR-32*, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-320d, hsa-miR-323-3p, hsa-miR-323-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-325, hsa-miR-326, hsa-miR-328, hsa-miR-329, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-330-5p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-

331-5p, hsa-miR-335, hsa-miR-335*, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-337-5p, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-33a, hsa-miR-33a*, hsa-miR-33b, hsa-miR-33b*, hsa-miR-340, hsa-miR-340*, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-345, hsa-miR-346, hsa-miR-34a, hsa-miR-34a*, hsa-miR-34b, hsa-miR-34b*, hsa-miR-34c-3p, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363, hsa-miR-363*, hsa-miR-365, hsa-miR-367, hsa-miR-367*, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-370, hsa-miR-371-3p, hsa-miR-371-5p, hsa-miR-372, hsa-miR-373, hsa-miR-373*, hsa-miR-374a, hsa-miR-374a*, hsa-miR-374b, hsa-miR-374b*, hsa-miR-375, hsa-miR-376a, hsa-miR-376a*, hsa-miR-376b, hsa-miR-376c, hsa-miR-377, hsa-miR-377*, hsa-miR-378, hsa-miR-378*, hsa-miR-379, hsa-miR-379*, hsa-miR-380, hsa-miR-380*, hsa-miR-381, hsa-miR-382, hsa-miR-383, hsa-miR-384, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-411, hsa-miR-411*, hsa-miR-412, hsa-miR-421, hsa-miR-422a, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-424*, hsa-miR-425, hsa-miR-425*, hsa-miR-429, hsa-miR-431, hsa-miR-431*, hsa-miR-432, hsa-miR-432*, hsa-miR-433, hsa-miR-448, hsa-miR-449a, hsa-miR-449b, hsa-miR-450a, hsa-miR-450b-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-451, hsa-miR-452, hsa-miR-452*, hsa-miR-453, hsa-miR-454, hsa-miR-454*, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-487a, hsa-miR-487b, hsa-miR-488, hsa-miR-488*, hsa-miR-489, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-491-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-492, hsa-miR-493, hsa-miR-493*, hsa-miR-494, hsa-miR-495, hsa-miR-496, hsa-miR-497, hsa-miR-497*, hsa-miR-498, hsa-miR-499-3p, hsa-miR-499-5p, hsa-miR-500, hsa-miR-500*, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-503, hsa-miR-504, hsa-miR-505, hsa-miR-505*, hsa-miR-506, hsa-miR-507, hsa-

miR-508-3p, hsa-miR-508-5p, hsa-miR-509-3-5p, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-509-5p, hsa-miR-510, hsa-miR-511, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-513a-3p, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-513b, hsa-miR-513c, hsa-miR-514, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-516a-3p, hsa-miR-516a-5p, hsa-miR-516b, hsa-miR-517*, hsa-miR-517a, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-518a-5p, hsa-miR-518b, hsa-miR-518c, hsa-miR-518c*, hsa-miR-518d-3p, hsa-miR-518d-5p, hsa-miR-518e, hsa-miR-518e*, hsa-miR-518f, hsa-miR-518f*, hsa-miR-519a, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-519d, hsa-miR-519e, hsa-miR-519e*, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-520b, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-520d-3p, hsa-miR-520d-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-520f, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-521, hsa-miR-522, hsa-miR-523, hsa-miR-524-3p, hsa-miR-524-5p, hsa-miR-525-3p, hsa-miR-525-5p, hsa-miR-526b, hsa-miR-526b*, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-539, hsa-miR-541, hsa-miR-541*, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-543, hsa-miR-544, hsa-miR-545, hsa-miR-545*, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-548b-3p, hsa-miR-548b-5p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-548d-3p, hsa-miR-548d-5p, hsa-miR-548e, hsa-miR-548f, hsa-miR-548g, hsa-miR-548h, hsa-miR-548i, hsa-miR-548j, hsa-miR-548k, hsa-miR-548l, hsa-miR-548m, hsa-miR-548n, hsa-miR-548o, hsa-miR-548p, hsa-miR-549, hsa-miR-550, hsa-miR-550*, hsa-miR-551a, hsa-miR-551b, hsa-miR-551b*, hsa-miR-552, hsa-miR-553, hsa-miR-554, hsa-miR-555, hsa-miR-556-3p, hsa-miR-556-5p, hsa-miR-557, hsa-miR-558, hsa-miR-559, hsa-miR-561, hsa-miR-562, hsa-miR-563, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-567, hsa-miR-568, hsa-miR-569, hsa-miR-570, hsa-miR-571, hsa-miR-572, hsa-miR-573, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-575, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-576-5p, hsa-miR-577, hsa-miR-578, hsa-miR-579, hsa-miR-580, hsa-miR-581, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-583, hsa-miR-584,

hsa-miR-585, hsa-miR-586, hsa-miR-587, hsa-miR-588, hsa-miR-589, hsa-miR-589*, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-591, hsa-miR-592, hsa-miR-593, hsa-miR-593*, hsa-miR-595, hsa-miR-596, hsa-miR-597, hsa-miR-598, hsa-miR-599, hsa-miR-600, hsa-miR-601, hsa-miR-602, hsa-miR-603, hsa-miR-604, hsa-miR-605, hsa-miR-606, hsa-miR-607, hsa-miR-608, hsa-miR-609, hsa-miR-610, hsa-miR-611, hsa-miR-612, hsa-miR-613, hsa-miR-614, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-616, hsa-miR-616*, hsa-miR-617, hsa-miR-618, hsa-miR-619, hsa-miR-620, hsa-miR-621, hsa-miR-622, hsa-miR-623, hsa-miR-624, hsa-miR-624*, hsa-miR-625, hsa-miR-625*, hsa-miR-626, hsa-miR-627, hsa-miR-628-3p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-629, hsa-miR-629*, hsa-miR-630, hsa-miR-631, hsa-miR-632, hsa-miR-633, hsa-miR-634, hsa-miR-635, hsa-miR-636, hsa-miR-637, hsa-miR-638, hsa-miR-639, hsa-miR-640, hsa-miR-641, hsa-miR-642, hsa-miR-643, hsa-miR-644, hsa-miR-645, hsa-miR-646, hsa-miR-647, hsa-miR-648, hsa-miR-649, hsa-miR-650, hsa-miR-651, hsa-miR-652, hsa-miR-653, hsa-miR-654-3p, hsa-miR-654-5p, hsa-miR-655, hsa-miR-656, hsa-miR-657, hsa-miR-658, hsa-miR-659, hsa-miR-660, hsa-miR-661, hsa-miR-662, hsa-miR-663, hsa-miR-663b, hsa-miR-664, hsa-miR-664*, hsa-miR-665, hsa-miR-668, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-675, hsa-miR-7, hsa-miR-708, hsa-miR-708*, hsa-miR-7-1*, hsa-miR-7-2*, hsa-miR-720, hsa-miR-744, hsa-miR-744*, hsa-miR-758, hsa-miR-760, hsa-miR-765, hsa-miR-766, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-767-5p, hsa-miR-768-3p, hsa-miR-768-5p, hsa-miR-769-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-802, hsa-miR-873, hsa-miR-874, hsa-miR-875-3p, hsa-miR-875-5p, hsa-miR-876-3p, hsa-miR-876-5p, hsa-miR-877, hsa-miR-877*, hsa-miR-885-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-886-5p, hsa-miR-887, hsa-miR-888, hsa-miR-888*, hsa-miR-889, hsa-miR-890, hsa-miR-891a, hsa-miR-891b, hsa-miR-892a, hsa-miR-892b, hsa-miR-9, hsa-miR-9*, hsa-miR-920, hsa-miR-921, hsa-miR-

922, hsa-miR-923, hsa-miR-924, hsa-miR-92a, hsa-miR-92a-1*, hsa-miR-92a-2*, hsa-miR-92b, hsa-miR-92b*, hsa-miR-93, hsa-miR-93*, hsa-miR-933, hsa-miR-934, hsa-miR-935, hsa-miR-936, hsa-miR-937, hsa-miR-938, hsa-miR-939, hsa-miR-940, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-943, hsa-miR-944, hsa-miR-95, hsa-miR-96, hsa-miR-96*, hsa-miR-98, hsa-miR-99a, hsa-miR-99a*, hsa-miR-99b, e hsa-miR-99b*. Por exemplo, miRNA direcionado à estrutura de leitura aberta 72 do cromossomo 8 (C9orf72) que expressa superóxido dismutase (SOD1), associado com esclerose lateral amiotrófica (ALS) pode ser de interesse.

[00118] Um miRNA inibe a função dos mRNAs que ele direciona e, como resultado, inibe a expressão dos polipeptídeos codificados pelos mRNAs. Assim, o bloqueio (parcial ou total) da atividade do miRNA (por exemplo, silenciamento do miRNA) pode efetivamente induzir, ou restaurar, a expressão de um polipeptídeo cuja expressão é inibida (desreprimir o polipeptídeo). Em uma modalidade, a desrepressão de polipeptídeos codificados por alvos de mRNA de um miRNA é realizada inibindo a atividade de miRNA em células através de qualquer um de uma variedade de métodos. Por exemplo, o bloqueio da atividade de um miRNA pode ser realizado por hibridação com um pequeno ácido nucleico de interferência (por exemplo, oligonucleotídeo antissentido, esponja de miRNA, RNA de Tud) que é complementar ou substancialmente complementar ao miRNA, bloqueando assim a interação do miRNA com seu mRNA alvo. Conforme usado neste documento, um pequeno ácido nucleico interferente que é substancialmente complementar a um miRNA é aquele que é capaz de hibridar com um miRNA e bloquear a atividade do miRNA. Em algumas modalidades, um pequeno ácido nucleico interferente que é substancialmente complementar a um miRNA é um pequeno ácido nucleico interferente que é complementar ao miRNA em tudo, exceto 1,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 bases. Um "inibidor de miRNA" é um agente que bloqueia a função, expressão e/ou processamento de miRNA. Por exemplo, essas moléculas incluem, mas não estão limitadas a antissentido específico de microRNA, esponjas de microRNA, RNAs decoy resistentes (RNAs TuD) e oligonucleotídeos de microRNA (fita dupla, hairpin, oligonucleotídeos curtos) que inibem a interação de miRNA com um complexo Drosha.

[00119] Ainda outros transgenes úteis podem incluir aqueles que codificam imunoglobulinas que conferem imunidade passiva a um patógeno. Uma "molécula de imunoglobulina" é uma proteína que contém as porções imunologicamente ativas de uma cadeia pesada de imunoglobulina e uma cadeia leve de imunoglobulina acoplada covalentemente e capaz de se combinar especificamente com o antígeno. As moléculas de imunoglobulina são de qualquer tipo (*por exemplo*, classe IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), (*por exemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasses. Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" podem ser usados de forma intercambiável neste documento.

[00120] Uma "cadeia pesada de imunoglobulina" é um polipeptídeo que contém pelo menos uma porção do domínio de ligação ao antígeno de uma imunoglobulina e pelo menos uma porção de uma região variável de uma cadeia pesada de imunoglobulina ou pelo menos uma porção de uma região constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Assim, a cadeia pesada derivada de imunoglobulina tem regiões significativas de homologia de sequência de aminoácidos com um membro da superfamília de genes de imunoglobulina. Por exemplo, a cadeia pesada em um fragmento Fab é uma cadeia pesada derivada de imunoglobulina.

[00121] Uma "cadeia leve de imunoglobulina" é um polipeptídeo que contém pelo menos uma porção do domínio de ligação ao antígeno de

uma imunoglobulina e pelo menos uma porção da região variável ou pelo menos uma porção de uma região constante de uma cadeia leve de imunoglobulina. Assim, a cadeia leve derivada de imunoglobulina tem regiões significativas de homologia de aminoácidos com um membro da superfamília de genes de imunoglobulina.

[00122] Uma "imunoadesina" é uma molécula quimérica semelhante a um anticorpo que combina o domínio funcional de uma proteína de ligação, geralmente um receptor, ligando ou molécula de adesão celular, com domínios constantes de imunoglobulina, geralmente incluindo as regiões de dobradiça e Fc.

[00123] Um "fragmento de ligação ao antígeno" (fragmento Fab)" é uma região em um anticorpo que se liga a antígenos. É composta por um domínio constante e um domínio variável de cada uma das cadeias pesada e leve.

[00124] O construto antipatógeno é selecionado com base no agente causador (patógeno) para a doença contra a qual se busca proteção. Esses patógenos podem ser de origem viral, bacteriana ou fúngica e podem ser usados para prevenir a infecção em humanos contra doenças humanas, ou em mamíferos não humanos ou outros animais para prevenir doenças veterinárias.

[00125] O rAAV pode incluir genes que codificam anticorpos e, particularmente, anticorpos neutralizantes contra um patógeno viral. Esses anticorpos antivirais podem incluir anticorpos anti-influenza dirigidos contra um ou mais de Influenza A, Influenza B e Influenza C. Os vírus do tipo A são os patógenos humanos mais virulentos. Os sorotipos de influenza A que têm sido associados a pandemias incluem o H1N1, que causou a gripe espanhola em 1918, e a gripe suína em 2009; H2N2, que causou a gripe asiática em 1957; H3N2, que causou a gripe de Hong Kong em 1968; H5N1, que causou a gripe aviária em 2004; H7N7; H1N2; H9N2; H7N2; H7N3; e H10N7. Outros vírus

patogênicos alvo incluem arenavírus (incluindo funin, machupo e Lassa), filovírus (incluindo Marburg e Ebola), hantavírus, picornoviridae (incluindo rinovírus, ecovírus), coronavírus, paramixovírus, morbilivírus, vírus sincicial respiratório, togavírus, cox vírus, parvovírus B19, parainfluenza, adenovírus, reovírus, varíola (Variola major (Varíola)) e Vaccinia (Cowpox) da família dos poxvírus e varicela-zoster (pseudorabies). As febres hemorrágicas virais são causadas por membros da família dos arenavírus (febre de Lassa) (cuja família também está associada à coriomeningite linfocítica (LCM)), filovírus (vírus do ebola) e hantavírus (puremala). Os membros do picornavírus (uma subfamília de rinovírus) estão associados ao resfriado comum em humanos. A família do coronavírus, que inclui uma série de vírus não humanos, como o vírus da bronquite infecciosa (aves), vírus gastroentérico transmissível porcino (porco), vírus da encefalomyelite hemaglutinatina suína (porco), vírus da peritonite infecciosa felina (gato), coronavírus entérico felino (gato), coronavírus canino (cão). Os coronavírus respiratórios humanos foram supostamente associados ao resfriado comum, hepatite não A, B ou C e síndrome respiratória aguda súbita (SARS). A família do paramixovírus inclui vírus parainfluenza tipo 1, vírus parainfluenza tipo 3, vírus parainfluenza bovino tipo 3, rubulavírus (vírus da caxumba, vírus parainfluenza tipo 2, vírus parainfluenza tipo 4, vírus da doença de Newcastle (galinhas), peste bovina, morbilivírus, que inclui sarampo e cinomose canina e pneumovírus, que inclui o vírus sincicial respiratório (RSV). A família dos parvovírus inclui o parvovírus felino (enterite felina), o vírus da panleucopenia felina, o parvovírus canino e o parvovírus porcino. A família de adenovírus inclui vírus (EX, AD7, ARD, OB) que causam doenças respiratórias. Assim, em certas modalidades, um vetor rAAV como aqui descrito pode ser projetado para expressar um anticorpo antiebola, por exemplo, 2G4, 4G7, 13C6, um anticorpo anti-influenza,

por exemplo, FI6, CR8033 e anticorpo anti-RSV, por exemplo, palivizumabe, motavizumabe.

[00126] Um construto de anticorpo neutralizante contra um patógeno bacteriano também pode ser selecionado para uso na presente invenção. Em uma modalidade, o construto de anticorpo neutralizante é direcionado contra a própria bactéria. Em outra modalidade, o construto de anticorpo neutralizante é direcionado contra uma toxina produzida pela bactéria. Exemplos de patógenos bacterianos transportados pelo ar incluem, *por exemplo*, *Neisseria meningitidis* (meningite), *Klebsiella pneumonia* (pneumonia), *Pseudomonas aeruginosa* (pneumonia), *Pseudomonas pseudomallei* (pneumonia), *Pseudomonas mallei* (pneumonia), *Acinetobacter* (pneumonia), *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella lacunata*, *Alkaligenes*, *Cardiobacterium*, *Haemophilus influenzae* (flu), *Haemophilus parainfluenzae*, *Bordetella pertussis* (tosse convulsa), *Francisella tularensis* (pneumonia/febre), *Legionella pneumonia* (Legionnaires disease), *Chlamydia psittaci* (pneumonia), *Chlamydia pneumoniae* (pneumonia), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose (TB)), *Mycobacterium kansasii* (TB), *Mycobacterium avium* (pneumonia), *Nocardia asteroides* (pneumonia), *Bacillus anthracis* (antraz), *Staphylococcus aureus* (pneumonia), *Streptococcus pyogenes* (escarlatina), *Streptococcus pneumoniae* (pneumonia), *Corynebacteria diphtheria* (difteria), *Mycoplasma pneumoniae* (pneumonia).

[00127] O rAAV pode incluir genes que codificam anticorpos e, particularmente, anticorpos neutralizantes contra um patógeno bacteriano, tal como o agente causador do antraz, uma toxina produzida por *Bacillus anthracis*. Foram descritos anticorpos neutralizantes contra o agente protetor (PA), um dos três peptídeos que formam o toxoide. Os outros dois polipeptídeos consistem em fator letal (LF) e fator de edema (FE). Os anticorpos neutralizantes anti-PA foram descritos como eficazes na imunização passiva contra o antraz. *Ver, por exemplo*,

Patente U.S. 7.442.373; R. Sawada-Hirai et al, J Immune Based Ther Vaccines. 2004; 2: 5. (on-line 2004 May 12). Ainda outros anticorpos neutralizantes da toxina anti-antraz foram descritos e/ou podem ser gerados. Da mesma forma, anticorpos neutralizantes contra outras bactérias e/ou toxinas bacterianas podem ser usados para gerar um construto antipatógeno distribuído por AAV como aqui descrito.

[00128] Os anticorpos contra doenças infecciosas podem ser causados por parasitas ou por fungos, incluindo, *por exemplo, espécies Aspergillus, Absidiacorymbifera, Rhizopus stolonifer, Mucor plumbeus, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis*, espécies *Penicillium, Micropolyspora faeni, Thermoactinomyces vulgaris, Alternaria alternate*, espécies *Cladosporium, Helminthosporium*, e espécies *Stachybotrys*.

[00129] O rAAV pode incluir genes que codificam anticorpos e, particularmente, anticorpos neutralizantes, contra fatores patogênicos de doenças como a doença de Alzheimer (AD), doença de Parkinson (PD), doença de Parkinson associada à GBA (GBA - PD), artrite reumatoide (RA), Síndrome do intestino irritável (IBS), doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), cânceres, tumores, esclerose sistêmica, asma e outras doenças. Tais anticorpos podem ser, sem limitação, por exemplo, alfa-sinucleína, fator de crescimento endotelial antivascular (VEGF) (anti-VEGF), anti-VEGFA, anti-PD-1, anti-PDL1, anti-CTLA-4, anti-TNF-alpha, anti-IL-17, anti-IL-23, anti-IL-21, anti-IL-6, anti-IL-6 receptor, anti-IL-5, anti-IL-7, anti-Factor XII, anti-IL-2, anti-HIV, anti-IgE, receptor-1 do fator de necrose antitumoral (TNFR1), anti-notch 2/3, anti-notch 1, anti-OX40, receptor anti-erb-b2 tirosina quinase 3 (ErbB3), anti-ErbB2, antígeno de maturação de células anti-beta, estimulador de linfócitos anti-B, anti-CD20, anti-HER2, fator estimulador de colônia de macrófagos anti-granulócitos, anti-oncostatina M (OSM), proteína do gene 3 de ativação de anti-linfócitos (LAG3), anti-CCL20, componente

anti-amiloide P sérico (SAP), inibidor anti-prolil hidroxilase, anti-CD38, anti-glicoproteína IIb/IIIa, anti-CD52, anti-CD30, anti-IL-1beta, receptor do fator de crescimento anti-epidérmico, anti-CD25, ligando anti-RANK, proteína C5 do sistema anticomplemento, anti-CD11a, receptor anti-CD3, integrina anti-alfa-4 (α_4), proteína F anti-RSV e anti-integrina $\alpha_4\beta_7$. Ainda outros patógenos e doenças serão aparentes para um versado na técnica. Outros anticorpos adequados podem incluir aqueles úteis para o tratamento da doença de Alzheimer, tais como, por exemplo, anti-beta-amiloide (por exemplo, crenezumabe, solanezumabe, aducanumabe), fibrila anti-beta-amiloide, placas anti-beta-amiloide, anti-tau, um bapineuzamabe, entre outros. Outros anticorpos adequados para o tratamento de uma variedade de indicações incluem aqueles descritos, por exemplo, em PCT/US2016/058968, depositado em 27 de outubro de 2016, publicado como WO 2017/075119A1.

Produção vetorial de rAAV

[00130] Para uso na produção de um vetor viral AAV (*por exemplo*, um AAV recombinante (r)), os cassetes de expressão podem ser transportados em qualquer vetor adequado, *por exemplo*, um plasmídeo, que é distribuído a uma célula hospedeira de empacotamento. Os plasmídeos úteis nesta invenção podem ser engenheirados de modo que sejam adequados para replicação e empacotamento *in vitro* em células procarióticas, células de inseto, células de mamífero, entre outras. As técnicas de transfecção adequadas e as células hospedeiras de empacotamento são conhecidas e/ou podem ser prontamente concebidas por um versado na técnica.

[00131] Os métodos para gerar e isolar AAVs adequados para uso como vetores são conhecidos na técnica. *Ver em geral, por exemplo*, Grieger&Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," *Adv.*

Biochem. Engin/Biotechnol. 99: 119-145; Buning *et al.*, 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," *J. Gene Med.* 10:717-733; e as referências citadas abaixo, cada uma das quais é aqui incorporada por referência na sua totalidade. Para empacotar um transgene em vírions, as ITRs são as únicas componentes de AAV necessárias *in cis* no mesmo construto que a molécula de ácido nucleico que contém os cassetes de expressão. Os genes cap e rep podem ser fornecidos *in trans*.

[00132] Em uma modalidade, os cassetes de expressão descritos neste documento são engenheirados em um elemento genético (*por exemplo*, um plasmídeo de transporte) que transfere as sequências de construto de imunoglobulina transportadas nele para uma célula hospedeira de empacotamento para a produção de um vetor viral. Em uma modalidade, o elemento genético selecionado pode ser distribuído a uma célula de empacotamento de AAV por qualquer método adequado, incluindo transfecção, eletroporação, distribuição de lipossomos, técnicas de fusão de membranas, peletes revestidos com DNA de alta velocidade, infecção viral e fusão de protoplastos. Células de empacotamento de AAV estáveis também podem ser feitas. Alternativamente, os cassetes de expressão podem ser usados para gerar um vetor viral diferente de AAV, ou para a produção de misturas de anticorpos *in vitro*. Os métodos utilizados para fazer tais construtos são conhecidos daqueles versados na manipulação de ácido nucleico e incluem engenharia genética, engenharia recombinante e técnicas sintéticas. *Ver, por exemplo*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

[00133] O termo "intermediário de AAV" ou "intermediário de vetor de AAV" refere-se a um capsídeo de rAAV montado que não possui as sequências genômicas desejadas empacotadas nele. Eles também

podem ser chamados de capsídeo "vazio". Tal capsídeo pode conter nenhuma sequência genômica detectável de um cassete de expressão, ou apenas sequências genômicas parcialmente empacotadas que são insuficientes para atingir a expressão do produto de gene. Esses capsídeos vazios não são funcionais para transferir o gene de interesse para uma célula hospedeira.

[00134] O vírus adenoassociado recombinante (AAV) aqui descrito pode ser gerado usando técnicas conhecidas. *Ver, por exemplo*, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. Tal método envolve a cultura de uma célula hospedeira que contém uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína do capsídeo de AAV; um gene rep funcional; um cassete de expressão composto por, no mínimo, repetições terminais invertidas (ITRs) de AAV e um transgene; e funções auxiliares suficientes para permitir o empacotamento do cassete de expressão na proteína do capsídeo de AAV. Métodos de geração do capsídeo, sequências de codificação, portanto, e métodos para produção de vetores virais de rAAV foram descritos. *Ver, por exemplo*, Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) e US 2013/0045186A1.

[00135] Em uma modalidade, é fornecida uma cultura de células de produção útil para a produção de um AAV recombinante. Tal cultura de células contém um ácido nucleico que expressa a proteína do capsídeo de AAV na célula hospedeira; uma molécula de ácido nucleico adequada para empacotamento no capsídeo de AAV, por exemplo, um genoma de vetor que contém ITRs de AAV e uma sequência de ácido nucleico não AAV que codifica um produto de gene operacionalmente ligado a sequências que dirigem a expressão do produto em uma célula hospedeira; e funções rep de AAV e funções auxiliares de adenovírus suficientes para permitir o empacotamento da molécula de ácido nucleico no capsídeo de AAV recombinante. Em uma modalidade, a

cultura de células é composta por células de mamíferos (por exemplo, células 293 de rim embrionário humano, entre outras) ou células de inseto (por exemplo, baculovírus).

[00136] Opcionalmente, as funções rep são fornecidas por um AAV diferente do AAV que fornece o capsídeo. Por exemplo, o rep pode ser, mas não está limitado a, proteína rep AAV1, proteína rep AAV2, proteína rep AAV3, proteína rep AAV4, proteína rep AAV5, proteína rep AAV6, proteína rep AAV7, proteína rep AAV8; ou rep 78, rep 68, rep 52, rep 40, rep68/78 e rep40/52; ou um fragmento das mesmas; ou outra fonte. Opcionalmente, as sequências rep e cap estão no mesmo elemento genético na cultura de células. Pode haver um espaçador entre a sequência rep e o gene cap. Qualquer uma dessas sequências de capsídeo de AAV ou AAV mutante pode estar sob o controle de sequências de controle regulatórias exógenas que direcionam sua expressão em uma célula hospedeira.

[00137] Em uma modalidade, as células são fabricadas em uma cultura de células adequadas (por exemplo, células HEK 293). Os métodos para fabricar os vetores de terapia genética aqui descritos incluem métodos bem conhecidos na técnica, tais como geração de DNA de plasmídeo utilizado para a produção dos vetores de terapia genética, geração vetorial e purificação vetorial. Em algumas modalidades, o vetor de terapia genética é um vetor AAV e os plasmídeos gerados são um plasmídeo cis de AAV que codifica o genoma de AAV e o gene de interesse, um plasmídeo trans de AAV contendo genes rep e cap de AAV e um plasmídeo auxiliar de adenovírus. O processo de geração vetorial pode incluir etapas do método, como iniciação de cultura celular, passagem de células, semeadura de células, transfecção de células com o DNA de plasmídeo, permuta de meio pós-transfecção para meio livre de soro e colheita de células contendo vetor e meio cultural. As células e os meios de cultura

contendo vetor colhidos são aqui referidos como colheita de células brutas. Em ainda outro sistema, os vetores de terapia genética são introduzidos em células de inseto por infecção com vetores baseados em baculovírus. Para revisões sobre estes sistemas de produção, ver geralmente, por exemplo, Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adenovirus associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20:922-929, o conteúdo de cada um dos quais é aqui incorporado por referência na sua totalidade. Métodos de produção e utilização destes e outros sistemas de produção de AAV são também descritos nas seguintes Patentes U.S., o conteúdo de cada um dos quais é aqui incorporado por referência na sua totalidade: 5.139.941; 5.741.683; 6.057.152; 6.204.059; 6.268.213; 6.491.907; 6.660.514; 6.951.753; 7.094.604; 7.172.893; 7.201.898; 7.229.823; e 7.439.065.

[00138] A colheita de células brutas pode depois ser submetida a etapas do método, tais como concentração da colheita do vetor, diafiltração da colheita do vetor, microfluidização da colheita do vetor, digestão por nuclease da colheita do vetor, filtração do intermediário microfluidizado, purificação bruta por cromatografia, purificação bruta por ultracentrifugação, permuta de tampão por filtração de fluxo tangencial e/ou formulação e filtração para preparar o vetor em massa.

[00139] Uma purificação por cromatografia de afinidade em duas etapas em alta concentração de sal seguida por cromatografia em resina de troca aniônica é usada para purificar o produto de droga do vetor e remover os capsídeos vazios. Esses métodos são descritos em mais detalhes na Publicação de Patente Internacional PCT/US2016/065970, depositado em 9 de dezembro de 2016 e seus documentos prioritários, Pedido de Patente 62/322.071, depositados em 13 de abril de 2016 e 62/226.357, depositado em 1º de dezembro de 2015 e intitulados "Scalable Purification Method for AAV9", que é

incorporado por referência aqui. Métodos de purificação para AAV8, Pedido de Patente Internacional PCT/US2016/065976, depositado em 9 de dezembro de 2016 e seus documentos prioritários nos Pedidos de Patente U.S. 62/322.098, depositado em 13 de abril de 2016 e 62/266.341, depositado em 11 de dezembro de 2015, e rh10, Pedido de Patente Internacional PCT/US16/66013, depositado em 9 de dezembro de 2016 e seus documentos prioritários, Pedido de Patente U.S. 62/322.055, depositado em 13 de abril de 2016 e 62/266.347, intitulado "Scalable Purification Method for AAVrh10", também apresentado em 11 de dezembro de 2015, e para AAV1, Pedido de Patente Internacional PCT/US2016/065974, depositado em 9 de dezembro de 2016 e seus documentos prioritários nos Pedidos de Patente U.S. 62/322.083, depositado em 13 de abril de 2016 e 62/26.351, para "Scalable Purification Method for AAV1", depositado em 11 de dezembro de 2015, são todos aqui incorporados por referência.

[00140] Para calcular o teor de partículas vazias e cheias, os volumes da banda VP3 para uma amostra selecionada (*por exemplo*, em exemplos aqui, uma preparação purificada por gradiente de iodixanol onde # de GC = # de partículas) é representada graficamente contra partículas de GC carregadas. A equação linear resultante ($y = mx + c$) é usada para calcular o número de partículas nos volumes de banda dos picos do artigo de teste. O número de partículas (pt) por 20 μ L carregado é, então, multiplicado por 50 para dar partículas (pt)/mL. Pt/mL dividido por GC/mL dá a razão de partículas para cópias do genoma (pt/GC). Pt/mL-GC/mL dá pt/mL vazio. O pt/mL vazio dividido por pt/mL e x 100 proporciona a porcentagem de partículas vazias.

[00141] Geralmente, os métodos para ensaiar capsídeos vazios e partículas de vetor AAV com genomas empacotados são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Grimm et al., *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128. Para testar o

capsídeo desnaturado, os métodos incluem submeter o estoque de AAV tratado a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, consistindo em qualquer gel capaz de separar as três proteínas do capsídeo, por exemplo, um gradiente de gel contendo Tris-acetato a 3-8% no tampão, depois levar o gel até o material da amostra ser separado, e transferir o gel para as membranas de nylon ou nitrocelulose, de preferência nylon. Os anticorpos anticapsídeo AAV são então utilizados como anticorpos primários que se ligam a proteínas de capsídeo desnaturadas, de preferência um anticorpo monoclonal anticapsídeo AAV, mais preferencialmente o anticorpo monoclonal anti-AAV-2 B1 (Wobus et al., *J. Virol.* (2000) 74:9281-9293). Um anticorpo secundário é, então, usado, um que se liga ao anticorpo primário e contém um meio para detectar ligação com o anticorpo primário, mais preferencialmente, um anticorpo anti-IgG contendo uma molécula de detecção ligada covalentemente a este, mais preferencialmente um anticorpo de ovelha anti-IgG de camundongo ligado covalentemente a peroxidase de rábano. Um método para detectar a ligação é utilizado para determinar semiquantitativamente a ligação entre os anticorpos primário e secundário, de preferência um método de detecção capaz de detectar emissões de isótopos radioativos, radiação eletromagnética ou alterações colorimétricas, mais preferencialmente um kit de detecção de quimiluminescência. Por exemplo, para SDS-PAGE, amostras das frações da coluna podem ser tomadas e aquecidas em tampão de carga de SDS-PAGE contendo agente de redução (*por exemplo*, DTT) e proteínas do capsídeo foram resolvidas em géis de poliacrilamida pré-moldados (*por exemplo*, Novex). A coloração com prata pode ser realizada usando o SilverXpress (Invitrogen, CA) de acordo com as instruções do fabricante ou outro método de coloração adequado, por exemplo, manchas SYPRO de rubi ou coomassie. Numa modalidade, a concentração de genomas vetoriais de AAV (vg) em frações da coluna

pode ser medida por PCR quantitativa em tempo real (Q-PCR). As amostras são diluídas e digeridas com DNase I (ou outra nuclease adequada) para remover o DNA exógeno. Após a inativação da nuclease, as amostras são posteriormente diluídas e amplificadas utilizando iniciadores e uma sonda fluorogênica TaqMan™ específica para a sequência de DNA entre os iniciadores. O número de ciclos necessários para atingir um nível definido de fluorescência (ciclo de limiar, Ct) é medido para cada amostra num Sistema de Detecção de Sequências Applied Biosystems Prism 7700. DNA plasmídico contendo sequências idênticas às contidas no vetor AAV é empregado para gerar uma curva padrão na reação Q-PCR. Os valores do limiar do ciclo (Ct) obtidos a partir das amostras são utilizados para determinar o título do genoma vetorial normalizando-o ao valor Ct da curva padrão do plasmídeo. Ensaios de ponto final baseados na PCR digital também podem ser usados.

[00142] Num aspecto, é utilizado um método de q-PCR otimizado que utiliza uma serina protease de largo espectro, por exemplo, proteinase K (tal como está comercialmente disponível na Qiagen). Mais particularmente, o ensaio de título de genoma qPCR otimizado é semelhante a um ensaio padrão, exceto que após a digestão com DNase I, as amostras são diluídas com tampão de proteinase K e tratadas com proteinase K seguida de inativação por calor. Adequadamente, as amostras são diluídas com tampão de proteinase K numa quantidade igual ao tamanho da amostra. O tampão de proteinase K pode ser concentrado até 2 vezes ou mais alto. Tipicamente, o tratamento com proteinase K é de cerca de 0,2 mg/mL, mas pode variar entre 0,1 mg/mL e cerca de 1 mg/mL. A etapa de tratamento é geralmente conduzida a cerca de 55°C durante cerca de 15 minutos, mas pode ser realizada a uma temperatura mais baixa (por exemplo, cerca de 37°C a cerca de 50°C) durante um período de tempo

mais longo (por exemplo, cerca de 20 minutos a cerca de 30 minutos), ou uma temperatura mais alta (por exemplo, até cerca de 60°C) por um período de tempo mais curto (por exemplo, cerca de 5 a 10 minutos). Similarmente, a inativação do calor geralmente, a cerca de 95°C durante cerca de 15 minutos, mas a temperatura pode ser diminuída (por exemplo, cerca de 70 a cerca de 90°C) e o tempo prolongado (por exemplo, cerca de 20 minutos a cerca de 30 minutos). As amostras são então diluídas (por exemplo, 1000 vezes) e submetidas à análise TaqMan como descrito no ensaio padrão.

[00143] Além disso, ou alternativamente, a PCR digital por gota (ddPCR) pode ser usada. Por exemplo, foram descritos métodos para determinar títulos do genoma de vetores AAV de fita simples e autocomplementares por ddPCR. Ver, por exemplo, M. Lock et al, Hum Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14.

[00144] Em resumo, o método para separar partículas de rAAV com sequências genômicas embaladas de intermediários de AAV deficientes em genoma envolve submeter uma suspensão compreendendo partículas virais AAV recombinantes e intermediários de capsídeo AAV à cromatografia líquida de rápido desempenho, em que as partículas virais de AAV e os intermediários de AAV estão ligados a uma resina de permuta aniônica forte equilibrada a um pH alto e submetidos a um gradiente de sal enquanto monitoram o eluato quanto à absorbância ultravioleta em cerca de 260 e cerca de 280. O pH pode ser ajustado dependendo do AAV selecionado. Ver, por exemplo, WO2017/160360 (AAV9), WO2017/100704 (AAVrh10), WO 2017/100676 (por exemplo, AAV8) e WO 2017/100674 (AAV1)] que são aqui incorporados por referência. Neste método, os capsídeos completos de AAV são coletados a partir de uma fração que é eluída quando a razão de A260/A280 atinge um ponto de inflexão. Em um exemplo, para a etapa

de Cromatografia de Afinidade, o produto diafiltrado pode ser aplicado a uma resina de afinidade Capture Select™ Poros- AAV2/9 (Life Technologies) que captura com eficiência o sorotipo AAV2. Sob essas condições iônicas, uma porcentagem significativa de DNA e proteínas celulares residuais flui através da coluna, enquanto as partículas do AAV são capturadas com eficiência.

Composições e Usos

[00145] São fornecidas aqui composições contendo pelo menos um estoque de rAAV (por exemplo, um estoque de rAAV ou um estoque de rAAV mutante) e um transportador, excipiente e/ou conservante opcional. Um estoque de rAAV refere-se a uma pluralidade de vetores de rAAV que são iguais, por exemplo, tais como nas quantidades descritas abaixo na discussão de concentrações e unidades de dosagem.

[00146] Como usado neste documento, "transportador" inclui todo e qualquer solvente, meio de dispersão, veículos, revestimentos, diluentes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardamento da absorção, tampões, soluções transportadoras, suspensões, coloides e semelhantes. A utilização de tais meios e agentes para substâncias farmacologicamente ativas é bem conhecida na técnica. Ingredientes ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições. A frase "farmacologicamente aceitável" refere-se a entidades e composições moleculares que não produzem uma reação indesejável alérgica ou semelhante quando administradas a um hospedeiro. Os veículos de distribuição, tais como lipossomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas e semelhantes, podem ser utilizados para a introdução das composições da presente invenção em células hospedeiras adequadas. Em particular, os transgenes distribuídos por vetor rAAV pode ser formulado para distribuição ou encapsulado em uma partícula lipídica,

um lipossoma, uma vesícula, uma nanoesfera ou uma nanopartícula ou semelhante.

[00147] Em uma modalidade, uma composição inclui uma formulação final adequada para distribuição a um sujeito, por exemplo, é uma suspensão líquida aquosa tamponada a um pH fisiologicamente compatível e concentração de sal. Opcionalmente, um ou mais tensoativos estão presentes na formulação. Em outra modalidade, a composição pode ser transportada como um concentrado que é diluído para administração a um sujeito. Em outras modalidades, a composição pode ser liofilizada e reconstituída no momento da administração.

[00148] Um tensoativo adequado, ou combinação de tensoativos, pode ser selecionado de tensoativos não iônicos que não sejam tóxicos. Em uma modalidade, um tensoativo copolímero de bloco difuncional que termina em grupos hidroxil primários é selecionado, por exemplo, como Pluronic® F68 [BASF], também conhecido como Poloxamer 188, que tem um pH neutro, tem um peso molecular médio de 8400. Outros tensoativos e outros poloxâmeros podem ser selecionados, ou seja, copolímeros triblocos não iônicos compostos de uma cadeia hidrofóbica central de polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) flanqueada por duas cadeias hidrofílicas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)), SOLUTOL HS 15 (Macrogol-15 Hidroxiestearato), LABRASOL (Glicerídeo polioxi caprílico), éter oleílico de polioxi 10, TWEEN (ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitano), etanol e polietileno glicol. Numa modalidade, a formulação contém um poloxâmero. Estes copolímeros são comumente nomeados com a letra "P" (para poloxâmero) seguidos de três dígitos: os dois primeiros dígitos x 100 dão a massa molecular aproximada do núcleo de polioxipropileno, e o último dígito x 10 indica o percentual de polioxietileno. Em uma modalidade, o Poloxamer 188 é selecionado. O tensoativo pode estar presente numa quantidade até cerca de 0,0005% a cerca de 0,001% da

suspensão.

[00149] Os vetores são administrados em quantidades suficientes para transfectar as células e fornecer níveis suficientes de transferência e expressão de gene para fornecer um benefício terapêutico sem efeitos adversos indevidos, ou com efeitos fisiológicos medicamente aceitáveis, que podem ser determinados por aqueles versados nas técnicas médicas. As vias convencionais e farmaceuticamente aceitáveis de administração incluem, mas não estão limitadas a, distribuição direta a um órgão desejado (*por exemplo*, o fígado (opcionalmente através da artéria hepática), pulmão, coração, olho, rim,), por via de administração oral, inalação, intranasal, intratecal, intratraqueal, intra-arterial, intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intradérmica e outras vias parentais. As vias de administração podem ser combinadas, se desejado.

[00150] As dosagens do vetor viral dependerão principalmente de fatores como a condição a ser tratada, a idade, o peso e a saúde do paciente e, portanto, podem variar entre os pacientes. Por exemplo, uma dosagem humana terapeuticamente eficaz do vetor viral está geralmente na faixa de cerca de 25 a cerca de 1000 microlitros a cerca de 100 mL de solução contendo concentrações de cerca de 1×10^9 a 1×10^{16} genomas de vetor de vírus. A dosagem será ajustada para equilibrar o benefício terapêutico contra quaisquer efeitos colaterais e essas dosagens podem variar dependendo da aplicação terapêutica para a qual o vetor recombinante é empregado. Os níveis de expressão do transgene podem ser monitorados para determinar a frequência de dosagem resultando em vetores virais, preferencialmente vetores AAV contendo o minigene. Opcionalmente, regimes de dosagem semelhantes aos descritos para fins terapêuticos podem ser utilizados para imunização usando as composições da invenção.

[00151] As composições de vírus com defeito de replicação podem

ser formuladas em unidades de dosagem para conter uma quantidade de vírus com defeito de replicação que está na faixa de cerca de $1,0 \times 10^9$ GC a cerca de $1,0 \times 10^{16}$ GC (para tratar um sujeito médio de 70 kg em peso corporal) incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro do intervalo e, de preferência $1,0 \times 10^{12}$ GC a $1,0 \times 10^{14}$ GC para um paciente humano. Em uma modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , ou 9×10^9 GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro do intervalo. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , ou 9×10^{10} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro do intervalo. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , ou 9×10^{11} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro do intervalo. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , ou 9×10^{12} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou frações dentro do intervalo. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , ou 9×10^{13} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou frações dentro do intervalo. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} , ou 9×10^{14} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou frações dentro do intervalo. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} , ou 9×10^{15} GC incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro do

intervalo. Numa modalidade, para a aplicação humana, a dose pode variar de 1×10^{10} a cerca de 1×10^{12} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou frações dentro do intervalo.

[00152] Estas doses acima podem ser administradas numa variedade de volumes de formulação de transportador, excipiente ou tampão, variando de cerca de 25 a cerca de 1000 microlitros, ou volumes maiores incluindo todos os números dentro do intervalo, dependendo do tamanho da área a ser tratada, o título viral usado, a via de administração e o efeito desejado do método. Numa modalidade, o volume de transportador, excipiente ou tampão é pelo menos cerca de 25 μL . Numa modalidade, o volume é de cerca de 50 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 75 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 100 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 125 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 150 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 175 μL . Ainda numa outra modalidade, o volume é de cerca de 200 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 225 μL . Ainda numa outra modalidade, o volume é de cerca de 250 μL . Ainda numa outra modalidade, o volume é de cerca de 275 μL . Ainda numa outra modalidade, o volume é de cerca de 300 μL . Ainda numa outra modalidade, o volume é de cerca de 325 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 350 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 375 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 400 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 450 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 500 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 550 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 600 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 650 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 700 μL . Numa outra modalidade, o volume está entre cerca de 700 e 1000 μL .

[00153] Em certas modalidades, a dose pode estar no intervalo de

cerca de 1×10^9 GC/g de massa cerebral a cerca de 1×10^{12} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose pode estar no intervalo de cerca de 3×10^{10} GC/g de massa cerebral a cerca de 3×10^{11} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose pode estar no intervalo de cerca de 5×10^{10} GC/g de massa cerebral a cerca de $1,85 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral.

[00154] Numa modalidade, os construtos virais podem ser distribuídos em doses de pelo menos cerca de 1×10^9 GCs a cerca de 1×10^{15} GC, ou cerca de 1×10^{11} a 5×10^{13} . Os volumes adequados para distribuição destas doses e concentrações podem ser determinados por um versado na técnica. Por exemplo, volumes de cerca de 1 μ L a 150 mL podem ser selecionados, com os volumes mais altos sendo selecionados para adultos. Tipicamente, para recém-nascidos, um volume adequado é de cerca de 0,5 mL a cerca de 10 mL, para bebês mais velhos, podem ser selecionados cerca de 0,5 mL a cerca de 15 mL. Para crianças pequenas, um volume de cerca de 0,5 mL a cerca de 20 mL pode ser selecionado. Para crianças, volumes de até 30 mL podem ser selecionados. Para pré-adolescentes e adolescentes, volumes de até 50 mL podem ser selecionados. Em ainda outras modalidades, um paciente pode receber uma administração intratecal em um volume de cerca de 5 mL a cerca de 15 mL são selecionados, ou cerca de 7,5 mL a cerca de 10 mL. Outros volumes e dosagens adequados podem ser determinados. A dosagem será ajustada para equilibrar o benefício terapêutico contra quaisquer efeitos colaterais e essas dosagens podem variar dependendo da aplicação terapêutica para a qual o vetor recombinante é empregado.

[00155] Os vetores recombinantes descritos acima podem ser distribuídos às células hospedeiras de acordo com os métodos publicados. O rAAV, de preferência suspenso num transportador fisiologicamente compatível, pode ser administrado a um paciente

mamífero humano ou não humano. Em certas modalidades, para administração a um paciente humano, o rAAV é adequadamente suspenso em uma solução aquosa contendo solução salina, um tensoativo e um sal ou mistura de sais fisiologicamente compatível. Adequadamente, a formulação é ajustada para um pH fisiologicamente aceitável, por exemplo, na faixa de pH 6 a 9, ou pH 6,5 a 7,5, pH 7,0 a 7,7 ou pH 7,2 a 7,8. Como o pH do líquido cefalorraquidiano é de cerca de 7,28 a cerca de 7,32, para distribuição intratecal, um pH dentro dessa faixa pode ser desejado; enquanto que para distribuição intravenosa, um pH de cerca de 6,8 a cerca de 7,2 pode ser desejado. No entanto, outros pHs dentro das faixas mais amplas e esses subintervalos podem ser selecionados para outra via de distribuição.

[00156] Numa outra modalidade, a composição inclui um transportador, diluente, excipiente e/ou adjuvante. Os transportadores adequados podem ser facilmente selecionados por um versado na técnica, tendo em vista a indicação para a qual o vírus de transferência é direcionado. Por exemplo, um transportador adequado inclui solução salina, que pode ser formulada com uma variedade de soluções tampão (*por exemplo*, solução salina tamponada com fosfato). Outros transportadores exemplificativos incluem solução salina estéril, lactose, sacarose, fosfato de cálcio, gelatina, dextrano, ágar, pectina, óleo de amendoim, óleo de gergelim e água. O tampão/transportador deve incluir um componente que evita que o rAAV adira ao tubo de infusão, mas não interfere com a atividade de ligação do rAAV *in vivo*. Um tensoativo adequado, ou combinação de tensoativos, pode ser selecionado entre os tensoativos não iônicos que não são tóxicos. Em uma modalidade, um tensoativo copolímero de bloco difuncional que termina em grupos hidroxil primários é selecionado, por exemplo, como Pluronic® F68 [BASF], também conhecido como Poloxamer 188, que tem um pH neutro, tem um peso molecular médio de 8400. Outros

tensoativos e outros poloxâmeros podem ser selecionados, ou seja, copolímeros triblocos não iônicos compostos de uma cadeia hidrofóbica central de polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) flanqueada por duas cadeias hidrofílicas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)), SOLUTOL HS 15 (Macrogol-15 Hidroxiestearato), LABRASOL (Glicerídeo polioxi caprílico), éter oleílico de polioxi, TWEEN (ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitano), etanol e polietileno glicol. Numa modalidade, a formulação contém um poloxâmero. Estes copolímeros são comumente nomeados com a letra "P" (para poloxâmero) seguidos de três dígitos: os dois primeiros dígitos x 100 dão a massa molecular aproximada do núcleo de polioxipropileno, e o último dígito x 10 indica o percentual de polioxietileno. Em uma modalidade, o Poloxamer 188 é selecionado. O tensoativo pode estar presente numa quantidade até cerca de 0,0005% a cerca de 0,001% da suspensão. Em um exemplo, a formulação pode conter, por exemplo, solução salina tamponada compreendendo um ou mais de cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, dextrose, sulfato de magnésio (por exemplo, sulfato de magnésio $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloreto de potássio, cloreto de cálcio (por exemplo, cloreto de cálcio $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato de sódio dibásico e misturas dos mesmos, em água. Adequadamente, para distribuição intratecal, a osmolaridade está dentro de um intervalo compatível com o líquido cefalorraquidiano (por exemplo, cerca de 275 a cerca de 290); ver, por exemplo, emedicine.medscape.com/article/2093316-overview. Opcionalmente, para distribuição intratecal, um diluente disponível comercialmente pode ser usado como um agente de suspensão ou em combinação com outro agente de suspensão e outros excipientes opcionais. Ver, por exemplo, a solução Elliotts B® [Lukare Medical]. Em outras modalidades, a formulação pode conter um ou mais intensificadores de permeação. Exemplos de intensificadores de permeação adequados podem incluir, por exemplo, manitol, glicocolato

de sódio, taurocolato de sódio, desoxicolato de sódio, salicilato de sódio, caprilato de sódio, caprato de sódio, lauril sulfato de sódio, éter polioxietileno-9-laurel ou EDTA.

[00157] Opcionalmente, as composições da invenção podem conter, além do rAAV e do(s) transportador(es), outros ingredientes farmacêuticos convencionais, tais como conservantes ou estabilizadores químicos. Conservantes exemplificativos adequados incluem clorobutanol, sorbato de potássio, ácido sórbico, dióxido de enxofre, propil galato, parabenos, etil vanilina, glicerina, fenol e paraclorofenol. Estabilizadores químicos adequados incluem gelatina e albumina.

[00158] As composições de acordo com a presente invenção podem compreender um transportador farmacêuticamente aceitável, tal como definido acima. Adequadamente, as composições aqui descritas compreendem uma quantidade eficaz de um ou mais AAV suspensos em um transportador farmacêuticamente adequado e/ou misturados com excipientes adequados concebidos para distribuição ao sujeito por injeção, bomba osmótica, cateter intratecal ou para distribuição por outro dispositivo ou via. Em um exemplo, a composição é formulada para distribuição intratecal.

[00159] Como usado neste documento, os termos "distribuição intratecal" ou "administração intratecal" referem-se a uma via de administração de drogas por injeção no canal medular, mais especificamente no espaço subaracnoide, de modo a atingir o líquido cefalorraquidiano (CSF). A distribuição intratecal pode incluir punção lombar, intraventricular (incluindo intracerebroventricular (ICV)), suboccipital/intracisternal e/ou C 1-2. Por exemplo, o material pode ser introduzido para difusão através do espaço subaracnoide por meio de punção lombar. Em outro exemplo, a injeção pode estar na cisterna magna.

[00160] Como usado neste documento, os termos "distribuição intracisternal" ou "administração intracisternal" se referem a uma via de administração de drogas diretamente no líquido cefalorraquidiano da cisterna magna cerebellomedularis, mais especificamente por meio de uma punção suboccipital ou por injeção direta em cisterna magna ou via tubo permanentemente posicionado.

[00161] Em um aspecto, os vetores fornecidos neste documento podem ser administrados por via intratecal por meio do método e/ou dispositivo. Ver, por exemplo, WO 2017/181113, que é aqui incorporado por referência. Alternativamente, outros dispositivos e métodos podem ser selecionados. O método compreende as etapas de avançar uma agulha espinhal na cisterna magna de um paciente, conectar um comprimento de tubo flexível a um cubo proximal da agulha espinhal e uma porta de saída de uma válvula a uma extremidade proximal do tubo flexível e depois das referidas etapas de avanço e conexão e depois de permitir que o tubo seja autoiniciado com o líquido cefalorraquidiano do paciente, conectar um primeiro recipiente contendo uma quantidade de solução isotônica a uma porta de entrada de descarga da válvula e, posteriormente, conectar um segundo recipiente contendo uma quantidade de uma composição farmacêutica para uma porta de entrada de vetor da válvula. Após conectar o primeiro e o segundo recipientes à válvula, é aberto um caminho para o fluxo de fluido entre a porta de entrada do vetor e a porta de saída da válvula e a composição farmacêutica é injetada no paciente através da agulha espinhal e após a injeção da composição farmacêutica, é aberto um caminho para o fluxo de fluido através da porta de entrada de descarga e da porta de saída da válvula e a solução isotônica é injetada na agulha espinhal para liberar a composição farmacêutica no paciente.

[00162] Este método e este dispositivo podem cada um ser opcionalmente utilizados para distribuição intratecal das composições

aqui fornecidas. Alternativamente, outros métodos e dispositivos podem ser utilizados para essa distribuição intratecal.

[00163] É de notar que o termo "um" ou "uma" se refere a um ou mais. Como tal, os termos "um" (ou "uma"), "um ou mais" e "pelo menos um" são aqui usados indistintamente.

[00164] As palavras "compreendem", "compreende" e "compreendendo" devem ser interpretadas inclusivamente em vez de exclusivamente. As palavras "consiste", "consistir" e suas variantes devem ser interpretadas exclusivamente, e não de forma inclusiva. Embora várias modalidades no relatório descritivo sejam apresentadas utilizando linguagem "compreensiva", sob outras circunstâncias, uma modalidade relacionada também se destina a ser interpretada e descrita usando a linguagem "consistindo em" ou "consistindo essencialmente em".

[00165] Como usado neste documento, o termo "cerca de" significa uma variabilidade de 10% ($\pm 10\%$) da referência dada, salvo indicação em contrário.

[00166] Como usado neste documento, "doença", "distúrbio" e "condição" são usados de forma intercambiável, para indicar um estado anormal em um sujeito.

[00167] Salvo definido em contrário neste pedido, os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado como vulgarmente entendido por um versado na técnica e por referência a textos publicados, que proporcionam aos versados na técnica um guia geral para muitos dos termos utilizados no presente pedido.

[00168] O termo "expressão" é aqui utilizado no seu significado mais amplo e compreende a produção de RNA ou de RNA e proteína. Com relação ao RNA, o termo "expressão" ou "tradução" se refere, em particular, à produção de peptídeos ou proteínas. A expressão pode ser transitória ou estável.

[00169] Como usado neste documento, o termo "título de NAb" mede a quantidade de anticorpo neutralizante (por exemplo, NAB anti-AAV) que neutraliza o efeito fisiológico do seu epítipo alvo (por exemplo, um AAV). Os títulos de NAb anti-AAV podem ser medidos como descrito em, por exemplo, Calcedo, R., et al., Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 2009. 199(3): p. 381-390, que é aqui incorporado por referência.

[00170] Como usado neste documento, um "cassete de expressão" refere-se a uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação, promotor e pode incluir outras sequências regulatórias para esse fim, cujo cassete pode ser distribuído através de um elemento genético (*por exemplo*, um plasmídeo) para uma célula hospedeira de empacotamento e empacotado no capsídeo de um vetor viral (*por exemplo*, uma partícula viral). Tipicamente, tal cassete de expressão para gerar um vetor viral contém a sequência de codificação para o produto de gene aqui descrito flanqueada por sinais de empacotamento do genoma viral e outras sequências de controle de expressão, tais como aquelas aqui descritas.

[00171] A abreviatura "sc" refere-se a autocomplementaridade. "AAV autocomplementar" refere-se a um construto no qual uma região de codificação transportada por uma sequência de ácido nucleico de AAV recombinante foi concebida de modo a formar um modelo de DNA de fita dupla intramolecular. Após a infecção, em vez de esperar pela síntese mediada por células da segunda fita, as duas metades complementares de scAAV irão associar-se para formar uma unidade de DNA de fita dupla (dsADN) que está pronta para replicação e transcrição imediatas. *Ver, por exemplo*, D M McCarty *et al*, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene*

Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254. Os AAVs autocomplementares são descritos, *por exemplo*, em Patentes U.S. 6.596.535; 7.125.717; e 7.456.683, cada um dos quais é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

[00172] Como usado neste documento, o termo "operacionalmente ligado" refere-se a ambas as sequências de controle de expressão que são contíguas com o gene de interesse e sequências de controle de expressão que atuam em trans ou a uma distância para controlar o gene de interesse.

[00173] O termo "heterólogo", quando usado com referência a uma proteína ou um ácido nucleico, indica que a proteína ou o ácido nucleico compreende duas ou mais sequências ou subsequências que não são encontradas na mesma relação entre si na natureza. Por exemplo, o ácido nucleico é tipicamente produzido de forma recombinante, tendo duas ou mais sequências de genes não relacionados dispostos para fazer um novo ácido nucleico funcional. Por exemplo, em uma modalidade, o ácido nucleico tem um promotor de um gene arranjado para dirigir a expressão de uma sequência de codificação de um gene diferente. Assim, com referência à sequência de codificação, o promotor é heterólogo.

[00174] Um "vírus com replicação defeituosa" ou "vetor viral" refere-se a uma partícula viral, sintética ou artificial na qual um cassete de expressão contendo um gene de interesse é empacotado em um capsídeo ou envelope viral, onde qualquer sequência genômica viral também é empacotada dentro do capsídeo ou envelope viral é deficiente na replicação; isto é, eles não podem gerar vírions de progênes, mas retêm a capacidade de infectar células-alvo. Numa modalidade, o genoma do vetor viral não inclui genes que codificam as enzimas necessárias para replicar (o genoma pode ser engenheirado para ser "sem reforço" - contendo apenas o transgene de interesse flanqueado

pelos sinais necessários para amplificação e embalagem do genoma artificial), mas esses genes podem ser fornecidos durante a produção. Por conseguinte, considera-se seguro para uso em terapia genética, uma vez que a replicação e a infecção por vírions da progênie não podem ocorrer exceto na presença da enzima viral necessária para a replicação.

[00175] Em muitos casos, as partículas de rAAV são referidas como resistentes à DNase. No entanto, além desta endonuclease (DNase), outras endo- e exonucleases também podem ser usadas nas etapas de purificação aqui descritas, para remover ácidos nucleicos contaminantes. Tais nucleases podem ser selecionadas para degradar DNA de fita simples e/ou DNA de fita dupla e RNA. Tais etapas podem conter uma única nuclease ou misturas de nucleases direcionadas a diferentes alvos e podem ser endonucleases ou exonucleases.

[00176] O termo "resistente à nuclease" indica que o capsídeo de AAV foi totalmente montado em torno do cassete de expressão que é projetado para entregar um transgene a uma célula hospedeira e protege essas sequências genômicas empacotadas da degradação (digestão) durante as etapas de incubação de nuclease projetadas para remover ácidos nucleicos contaminantes que podem estar presentes no processo de produção.

[00177] O termo "tradução" no contexto da presente invenção refere-se a um processo no ribossomo, em que uma fita de mRNA controla a montagem de uma sequência de aminoácidos para gerar uma proteína ou um peptídeo.

[00178] Conforme usado ao longo deste relatório descritivo e das reivindicações, os termos "compreendendo" e "incluindo" incluem outros componentes, elementos, números inteiros, etapas e semelhantes. Por outro lado, o termo "consistindo" e suas variantes são exclusivos de outros componentes, elementos, inteiros, etapas e semelhantes.

[00179] Conforme descrito acima, o termo "cerca de" quando usado para modificar um valor numérico significa uma variação de $\pm 10\%$, a menos que especificado de outra forma.

[00180] Os exemplos seguintes são apenas ilustrativos e não pretendem limitar a presente invenção.

EXEMPLOS:

[00181] Os exemplos a seguir relatam a extensa desamidação de AAV8 e 7 diversos sorotipos de AAV adicionais, com evidências de apoio de abordagens estruturais, bioquímicas e de espectrometria de massa. A extensão da desamidação em cada local era dependente da idade do vetor e de múltiplos fatores estruturais e de sequência primária 3D, mas era amplamente independente das condições de recuperação e purificação do vetor. Demonstramos o potencial de desamidação para impactar a atividade de transdução do vetor e correlacionar uma perda de ponto de tempo precoce na atividade do vetor com a desamidação espontânea de progresso rápido em várias asparaginas AAV8. Exploramos estratégias mutacionais que estabilizam as amidas da cadeia lateral, melhorando a transdução do vetor e reduzindo a variabilidade molecular lote a lote, que é uma preocupação fundamental na fabricação de produtos biológicos. Este estudo ilustra um aspecto até então desconhecido da heterogeneidade do capsídeo de AAV e destaca sua importância no desenvolvimento desses vetores para terapia genética.

[00182] O Exemplo 1 abaixo fornece a caracterização de modificações pós-tradução no capsídeo do vetor AAV8 por eletroforese em gel uni e bidimensional, espectrometria de massa e modelagem estrutural de novo. Após a identificação de um número de sítios de desamidação putativos na superfície do capsídeo, avaliamos seu impacto na estrutura e função do capsídeo *in vitro* e *in vivo*. O Exemplo 1 estende ainda mais esta análise para AAV9 para determinar se este

fenômeno se aplica a sorotipos diferentes de AAV8, confirmando que a desamidação do capsídeo de AAV não é específica para sorotipos. Os Exemplos 2 e 3 ilustram a desamidação em outros AAVs.

[00183] O Exemplo 4 refere-se a um novo epítipo mapeado no capsídeo AAV9.

EXEMPLO 1: Desamidação de aminoácidos na superfície de capsídeos de vírus adenoassociados

A. Materiais e Métodos

1. Eletroforese em gel 1D e 2D

[00184] Para a análise de eletroforese em gel de poliacrilamida 1D SDS (SDS-PAGE), primeiro desnaturamos os vetores AAV a 80°C por 20 minutos na presença de dodecil sulfato de lítio e agente redutor. Em seguida, os aplicamos em um gel de Bis-Tris 4-12% por 90 minutos a 200 V e corados com azul de Coomassie. Para os dados da FIG. 1A - FIG. 1D, Kendrick Laboratories, Inc. (Madison, WI) realizou a eletroforese em gel 2D. Para experimentos subsequentes, realizamos SDS-PAGE 2D internamente. Para isso, combinamos 3×10^{11} GCs do vetor AAV com marcador de turbonuclease 500U (Accelagen, San Diego, CA) em 150µL solução salina tamponada com fosfato (PBS) com 35mM NaCl e 1mM MgCl₂ e incubamos 37°C por dez minutos. Em seguida, adicionamos nove volumes de etanol absoluto, agitamos as amostras em vórtice e as incubamos a -80°C pelo menos duas horas, seguido de incubação em gelo por cinco minutos e centrifugação em velocidade máxima por 30 minutos a 15°C. Decantamos o sobrenadante e secamos ao ar o pelete, que então ressuspendemos em tampão de ressuspensão #1 [SDS 0,15%, ditioneitol 50 mM (DTT), Tris 10 mM pH 7,5 e 1µL de pH6-9 anfólitos, ThermoFisher ZM0023, adicionado no dia de, em ddH₂O] e incubamos sem perturbações à temperatura ambiente. Após 30 minutos, agitamos os tubos de amostra para misturá-los, adicionamos 1µg marcador de conalbumina de frango (Sigma Aldrich,

St. Louis, MO), e incubamos as amostras em 37°C por 30 minutos, sacudindo para misturar em 15 minutos. As amostras foram então transferidas para 50°C por 15-20 minutos, agitadas em vórtice, incubadas em 95°C por 2,5 minutos e deixou-se esfriar antes de ser centrifugadas à velocidade máxima por um minuto e brevemente agitadas em vórtice. Em seguida, misturamos 10µL de cada amostra com 140µL tampão de ressuspensão # 2 (ureia 9,7 M, CHAPS 2%, azul de bromofenol 0,002% e anfólitos 0,05%, descrito acima, adicionado no dia de, em ddH₂O) e incubamos à temperatura ambiente durante dez minutos. Em seguida, aplicamos as misturas em tiras de gradiente de pH imobilizado (IPG) de pH 6-10 (ThermoFisher Waltham, MA) e as executamos no sistema ZOOM IPGRunner de acordo com as instruções do fabricante. Usamos os seguintes parâmetros de focalização isoeletrica: 100-1.000 V por 120 minutos, 1.000-2.000 V por 120 minutos, 2.000 V por 120 minutos, limites de 0,1 W e 0,05 mA por tira de execução. As tiras de IPG foram então reduzidas e carregadas em um gel de Bis-Tris de 4-12% de poço único e executadas em 1D como descrito acima. Determinamos a migração relativa de VPs de AAV por comparação com proteínas de controle interno turbonuclease (Accelagen, 27kDa) e conalbumina de clara de ovo de frango (Sigma Aldrich, 76kDa, pI 6,0-6,6).

2. Produção vetorial

[00185] O University of Pennsylvania Vector Core produziu vetores AAV recombinantes para eletroforese em gel 1D e 2D e experimentos de espectrometria de massa e os purificou por cloreto de cério ou gradientes de iodixanol como descrito anteriormente. (Lock M, et al. *Hum Gene Ther* 2010; 21(10):1259-71; Gao GP, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(18):11854-9). Produzimos os vetores purificados por afinidade da seguinte forma: cultivamos células HEK293 em dez recipientes hiperestack de 36 camadas (Corning), cotransfectamos com

uma mistura de plasmídeo de genoma de vetor (pAAV-LSP-IVS2.hFIXco-WPRE-bGH), trans plasmídeo contendo genes AAV2 *rep* e AAV8 *cap*, e plasmídeo auxiliar de adenovírus. Usamos PEIpro (PolyPlus) como o reagente de transfecção. Cinco dias após a transfecção, o sobrenadante foi colhido, clarificado através de filtros Sartoguard PES Midicap (Sartorius Stedim) e tratado com benzonase (Millipore), após o qual adicionamos sal para trazê-lo a 0,6M. O material de colheita a granel clarificado foi concentrado dez vezes por filtração de fluxo tangencial (TFF) e, em seguida, diafiltrado contra quatro volumes de tampão de carregamento de coluna de afinidade. Capturamos os vetores em uma coluna de afinidade POROS CaptureSelect (ThermoFisher) e eluímos o pico do vetor em pH baixo diretamente no tampão de neutralização. Diluímos o eluato neutralizado em um tampão de ligação de alto pH e o carregamos em uma coluna de polimento de troca aniônica (Cimultus QA-8; Bia Separations), onde a preparação foi enriquecida para partículas contendo genoma (completas). As partículas do vetor completo foram eluídas com um gradiente de eluição de sal raso e neutralizadas imediatamente. Finalmente, submetemos o vetor a uma segunda rodada de TFF para concentração final e troca de tampão em tampão de formulação (PBS + 0,001% de F-68 plurônico).

[00186] Foram produzidos vetores mutantes para ensaios *in vitro* por transfecção tripla em pequena escala de células HEK293 em placas de seis poços. Misturamos 5,6 µL de uma solução de polietilenimina 1mg/mL em 90µL de meio sem soro com DNA de plasmídeo (0,091µg de plasmídeo cis, 0,91µg de plasmídeo trans, 1,82 µg de plasmídeo deltaF6 Ad-helper, em 90µL de meio sem soro), incubamos em temperatura ambiente por 15 minutos, e adicionamos às células e 0,8 mL adicionais de meio fresco livre de soro. No dia seguinte, substituímos 0,5mL do meio superior por meio sérico completo. Colhemos o vetor três

dias após a transfecção por três ciclos de congelamento/descongelamento seguido por centrifugação para remover os resíduos celulares e colheita do sobrenadante. O plasmídeo cis continha um cassete de transgene que codifica o transgene da luciferase do pirilampo sob o controle do promotor da beta-actina de frango (CB7) com o íntron quimérico Promega e sinal de poliadenilação da beta-globina de coelho (RBG). O plasmídeo trans codificou o gene *cap wtAAV8*; para gerar variantes de *cap AAV8* mutantes, usamos o kit Quikchange Lightning Mutagenesis (Agilent Technologies, Wilmington, DE). O vetor foi titulado conforme descrito anteriormente. (Lock M, et al. *Hum Gene Ther* 2010; 21(10):1259-71).

[00187] Para experimentos de produção de vetor de curso de tempo, geramos vetor por transfecção tripla em média escala de células HEK293 em placas de cultura de tecidos de 15 cm. Por placa, misturamos 36µL de uma solução de polietilenimina 1mg/mL em meio sem soro 2mL com DNA de plasmídeo (0,6µg cis plasmídeo, 5,8µg trans plasmídeo, 11,6µg deltaF6 Ad-auxiliar plasmídeo), incubado em temperatura ambiente por 15 minutos, e adicionamos às células em aproximadamente 60% de confluência em placas renovadas com 14ml de meio sem soro. No dia seguinte, substituímos 8ml do meio superior por meio sérico completo e fresco. Colhemos o vetor coletando todos os meios de comunicação, raspando as células do prato e congelando a -80°C. Recuperamos o vetor bruto da mistura sobrenadante/células aplicando 3 ciclos de congelamento/descongelamento e clarificando o lisado por centrifugação. Purificamos e concentramos o vetor para análise de espectrometria de massa adicionando benzonase, Tris 1M pH 7,5 e NaCl 5M ao lisado clarificado para concentrações finais de Tris 20 mM e NaCl 360 mM. Capturamos vetores em uma coluna de afinidade POROS CaptureSelect de 1 ml e eluímos o pico do vetor em pH baixo diretamente no tampão de neutralização. As frações foram

analizadas por absorvância a 280nm, e a fração mais concentrada foi submetida à análise de espectrometria de massa

[00188] Para experimentos *in vivo*, produzimos vetores conforme descrito anteriormente com um capsídeo wtAAV8 ou com um dos 6 mutantes de desamidação; o cassete do transgene incluiu um promotor CB7, íntron PI, transgene de luciferase de pirilampo e sinal de poliadenilação RBG (Lock M, et al. *Hum Gene Ther* 2010; 21(10):1259-71).

3. Execução/digestão/análise de especificação de massa

[00189] *Materiais:* Adquirimos bicarbonato de amônio, DTT, iodoacetamida (IAM) e água enriquecida com ^{18}O (97,1% de pureza) da Sigma (St. Louis, MO); e acetonitrila, ácido fórmico, ácido trifluoroacético (TFA), cloridrato de guanidina 8 M (GndHCl) e tripsina da Thermo Fischer Scientific (Rockford, IL).

[00190] *Digestão com tripsina:* preparamos soluções de estoque de 1M DTT e 1,0M de iodoacetamida. As proteínas do capsídeo foram desnaturadas e reduzidas a 90°C por dez minutos na presença de 10mM DTT e 2M GndHCl. Permitimos que as amostras esfriassem até a temperatura ambiente e, em seguida, alquilamos com 30 mM IAM em temperatura ambiente por 30 minutos no escuro. Extinguimos a reação de alquilação com a adição de 1 mL de DTT. Adicionamos bicarbonato de amônio 20 mM (pH 7,5-8) à solução de proteína desnaturada em um volume que diluiu a concentração final de GndHCl para 200 mM. Adicionamos solução de tripsina para uma razão de 1:20 de tripsina para proteína e incubamos a 37°C durante a noite. Após a digestão, adicionamos TFA a uma concentração final de 0,5% para extinguir a reação de digestão.

[00191] Para experimentos com ^{18}O -água, a amostra de capsídeo foi primeiro trocada por tampão em 100 mM de bicarbonato de amônio

preparado em 18O-água usando colunas de dessalinização spin Zeba (Thermo Scientific, Rockford, IL). Para garantir a remoção completa da água da amostra, realizamos a troca do tampão duas vezes. Preparamos soluções de estoque de 1M DTT e 1M IAM em 18O-água. Seguimos as mesmas etapas de desnaturação, alquilação e digestão acima com reagentes e tampões 18O-água.

[00192] *Cromatografia líquida espectrometria de massa em tandem:* Realizamos cromatografia online com uma coluna Acclaim PepMap (15 cm de comprimento, 300µm de diâmetro interno) e um sistema Thermo UltiMate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um Q Exactive HF com uma fonte NanoFlex (Thermo Fisher Scientific). Durante a análise online, a temperatura da coluna foi mantida a 35°C. Separamos os peptídeos com gradiente de fase móvel A (água MilliQ com ácido fórmico 0,1%) e fase móvel B (acetonitrila com ácido fórmico 0,1%). Executamos o gradiente de 4% B a 6% B ao longo de 15 minutos, a 10% B por 25 minutos (40 minutos no total) e, em seguida, a 30% B por 46 minutos (86 minutos no total). Carregamos as amostras diretamente na coluna. O tamanho da coluna foi de 75 cm x 15 um ID e foi embalado com meio C18 de 2 microns (Acclaim PepMap). Devido às etapas de carregamento, introdução e lavagem, o tempo total para cada execução de espectrometria de massa em tandem de cromatografia líquida foi de cerca de duas horas.

[00193] Foram adquiridos dados de espectrometria de massa usando um método top-20 dependente de dados no espectrômetro de massa Q Exactive HF, escolhendo dinamicamente os íons precursores ainda não sequenciados mais abundantes das varreduras de pesquisa (200–2000 m/z). Realizamos o sequenciamento por meio de fragmentação de dissociação colisional de alta energia com um valor alvo de íons 1e5 determinado com controle de ganho automático preditivo; realizamos o isolamento dos precursores com uma janela de

4m/z. Adquirimos varreduras de levantamento com uma resolução de 120.000 a 200m/z. Definimos a resolução dos espectros de HCD para 30.000 em m/z200 com um tempo máximo de injeção de íons de 50 ms e uma energia de colisão normalizada de 30. Ajustamos o nível de RF da lente S em 50, o que deu uma transmissão ideal da região m/z ocupada pelos peptídeos de nosso digest. Excluimos íons precursores com estados de carga simples, não atribuídos ou seis e mais altos da seleção de fragmentação.

[00194] *Processamento de dados:* Foi utilizado o software BioPharma Finder 1.0 (Thermo Fisher Scientific) para analisar todos os dados adquiridos. Para o mapeamento de peptídeos, realizamos pesquisas usando um banco de dados de proteína de entrada única FASTA com carbamidometilação definida como uma modificação fixa e oxidação, desamidação e fosforilação definidas como modificações variáveis. Usamos uma precisão de massa de 10 ppm, uma alta especificidade de protease e um nível de confiança de 0,8 para espectros de espectrometria de massa em tandem. A identificação por espectrometria de massa de peptídeos desamidados é relativamente simples, pois a desamidação adiciona à massa da molécula intacta +0,984 Da (a diferença de massa entre os grupos –OH e –NH₂). Determinamos a percentagem de desamidação de um determinado peptídeo dividindo a área de massa do peptídeo desamidado pela soma da área dos peptídeos desamidados e nativos. Considerando o número de sítios de desamidação possíveis, as espécies isobáricas que são desamidadas em diferentes sítios podem comigrar em um único pico. Consequentemente, fragmentos de íons originários de peptídeos com múltiplos sítios de desamidação potenciais podem ser usados para localizar ou diferenciar múltiplos sítios de desamidação. Nestes casos, as intensidades relativas dentro dos padrões de isótopos observados podem ser usadas para determinar especificamente a abundância

relativa dos diferentes isômeros de peptídeo desamidado. Este método presume que a eficiência de fragmentação para todas as espécies isoméricas é a mesma e independente do sítio de desamidação. Esta abordagem permite a definição dos sítios específicos envolvidos na desamidação e as combinações potenciais envolvidas na desamidação.

[00195] *Processamento de dados secundários:* A análise secundária de espectrometria de massa bruta foi realizada na Universidade de Maryland, Condado de Baltimore, usando o seguinte método. O software Peaks Studio v5.3 (Bioinformatics Solutions Inc.) foi usado para todas as análises de espectrometria de massa. O refinamento de dados dos arquivos de dados brutos foi realizado com os seguintes parâmetros: uma tolerância m/z do precursor de ≤ 10 ppm e estado de carga do precursor com um mínimo de 2 e máximo de 4. O sequenciamento *de novo* do espectro de entrada foi realizado usando o algoritmo Peaks com uma tolerância de erro de íon precursor de 10 ppm e tolerâncias de erro de íon de produto de 0,1Da. A enzima de digestão foi definida como tripsina, as modificações variáveis foram oxidação, fosforilação e desamidação, e a modificação fixa foi carbamidometilação de cisteína.

4. Análise estrutural do capsídeo AAV

[00196] Foram obtidas as coordenadas atômicas AAV8, fatores estruturais e modelo de capsídeo associado do Banco de Dados de Proteínas RCSB (PDB ID: 3RA8). Realizamos o refinamento da estrutura e geramos uma densidade de elétrons independente da sequência de aminoácidos primária de AAV8 VP3 para uso em análise estrutural tridimensional (3D) do capsídeo. Realizamos esta análise a fim de observar a densidade de elétrons do ácido isoaspártico no capsídeo AAV8 que não foi enviesado pela sequência primária esperada de AAV8 VP3. Usando a estrutura resultante, modelamos as quatro asparaginas na sequência primária AAV8 VP3 com N+1 glicinas

como ácidos isoaspárticos e, em seguida, refinamos a estrutura do capsídeo AAV8 usando software de Cristalografia e Sistema de NMR (CNS), impondo estritamente as matrizes icosaédricas não cristalográficas usando o protocolo de refinamento padrão (Brunger AT, et al. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1998; 54(Pt 5):905-21). Obtivemos um modelo estrutural de ácido isoaspártico do banco de dados HIC-UP, seguido pela geração de um dicionário molecular em PRODRG para refinamento da estrutura (Kleywegt GJ *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2007; 63(Pt 1):94-100). Em seguida, calculamos o mapa de densidade eletrônica média do capsídeo AAV8 (também em CNS) e o visualizamos usando o software COOT, seguido por pequenos ajustes do modelo resultante para ajustar os resíduos de ácido isoaspártico modelados no mapa de densidade eletrônica (Emsley P and Cowtan K *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004; 60(Pt 12 Pt 1):2126-32). Repetimos este protocolo para modelar adicionalmente N512 na sequência primária AAV9 VP3 com N+1 glicinas (PDB ID: 3UX1). Geramos todas as figuras usando COOT, PyMol e UCSF Chimera (Emsley P and Cowtan K *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004; 60(Pt 12 Pt 1):2126-32; DeLano WL *PyMOL: An Open-Source Molecular Graphics Tool* Vol. 40, 2002:82-92; Pettersen EF, et al. *J Comput Chem* 2004; 25(13):1605-12). Obtivemos uma série de estruturas de proteínas desamidadas previamente identificadas (PDB IDs: 1DY5, 4E7G, 1RTU, 1W9V, 4E7D e 1C9D) para comparação de seu mapa de densidade de elétrons para resíduos de ácido isoaspártico desamidado com nossos resíduos de ácido isoaspártico modelados de AAV8 e AAV9 (Rao FV, et al. *Chem Biol* 2005; 12(1):65-76; Noguchi S, et al. *Biochemistry* 1995; 34(47):15583-91; Esposito L, et al. *J Mol Biol* 2000; 297(3):713-32).

[00197] Foram determinados, fatores de temperatura para resíduos desamidados calculando a média dos fatores de temperatura para cada

átomo de cada resíduo de asparagina relatado nas coordenadas atômicas da estrutura cristalina AAV8 ou AAV9 (PDB ID: 3RA8, 3UX1).

5. Estudos em animais

[00198] O Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade da Pensilvânia aprovou todos os procedimentos com animais. Para avaliar o desempenho do vetor, injetamos camundongos C57BL/6 de oito semanas de idade por via intravenosa por meio de injeção na veia da cauda com 3×10^9 GCs de wtAAV8 ou vetor mutante do capsídeo em um volume de 100 μ L. Todos os camundongos foram sacrificados no dia 14. Para avaliação *in vivo* da expressão da luciferase, camundongos (~20g) foram anestesiados e injetados intraperitonealmente com substrato de luciferina 200 μ L ou 15mg/mL (Perkin Elmer, Waltham, MA). Os camundongos foram fotografados cinco minutos após a administração de luciferina e fotografados através de um IVIS Xenogen *In Vivo* Imaging System. Usamos o software Living Image 3.0 para quantificar o sinal nas regiões de interesse descritas. Fizemos medições nos dias 7 e 14.

6. Avaliação do título do vetor mutante e eficiência de transdução *in vitro*

[00199] Foram determinados, os títulos do vetor por qPCR dos genomas resistentes a DNaseI. Os iniciadores qPCR recozinham com a sequência de poliadenilação do transgene empacotado. Para avaliação *in vitro* da eficiência de transdução do vetor por expressão de luciferase, semeamos $0,9 \times 10^5$ células Huh7/poço em uma placa de 96 poços de parede preta em DMEM completo (10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina). No dia seguinte, removemos o meio e substituímos por 50 μ L de vetor bruto ou purificado diluído em meio completo. Testamos 4 diluições em uma série de diluições de 3 vezes para cada amostra de vetor bruto. Após 48 horas, preparamos a luciferina (Promega, Madison, WI) em meio completo a 0,3 μ g/ μ L e a

adicionamos às células transduzidas em um volume de 50µL. Os resultados foram lidos em um luminômetro Biotek Clarity. Descobrimos que a atividade da luciferase/GC adicionada às células alvo é constante em um amplo intervalo de GCs, mas pode se tornar saturada em MOIs elevados. Assim, inspecionamos os dados da série de diluição (unidades luminescentes vs GC) para linearidade, excluimos o ponto mais alto se a saturação for evidente e calculamos uma Luciferase/GC média para valores na faixa linear de cada ensaio para cada variante. Isso resulta em um valor de eficiência de transdução. Os dados são normalizados para simplificar a comparação, definindo o controle de peso para um valor de 1.

7. Biodistribuição

[00200] Foram extraídos DNA de amostras de fígado usando o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) e, em seguida, analisamos o DNA para o vetor GC por PCR em tempo real, conforme descrito anteriormente com um conjunto de iniciador / sonda projetado contra o sinal de poliadenilação RBG do cassete de transgene (Chen SJ, et al. *Hum Gene Ther Clin Dev* 2013; 24(4):154-60).

Sequências de iniciador para mutantes AAV8		
	Sequência	Descrição
SED ID NO: 38	CGACAACCGGGCAAACcagAATA GCAACTTTGCCTGG	Iniciadores mutagênicos QC para alterar AAV8 N499 para Q
SED ID NO: 39	CCAGGCAAAGTTGCTATTCTGGTT TTGCCCGGTTGTCTG	Iniciadores mutagênicos QC para alterar AAV8 N499 para Q
SED ID NO: 40	GACAACCGGGCAAACgacAATAG CAACTTTGCCTG	Iniciadores mutagênicos QC para alterar AAV8 N499 para D
SED ID NO: 41	CAGGCAAAGTTGCTATTGTCGTTTT GCCCGGTTGTC	Iniciadores mutagênicos QC para alterar AAV8 N499 para D

Sequências de iniciador para mutantes AAV8		
	Sequência	Descrição
SED ID NO: 42	GGAGGCACGGCAcagACGCAGACT CTGGG	Iniciadores mutagênicos qc para alterar AAV8 N459 para Q
SED ID NO: 43	CCCAGAGTCTGCGTCTGTGCCGTG CCTCC	Iniciadores mutagênicos qc para alterar AAV8 N459 para Q
SED ID NO: 44	CAGGAGGCACGGCAgatACGCAGA CTCTGG	Iniciadores mutagênicos qc para alterar AAV8 N459 para D
SED ID NO: 45	CCAGAGTCTGCGTATCTGCCGTGC CTCCTG	Iniciadores mutagênicos qc para alterar AAV8 N459 para D
SED ID NO: 46	ctcctcccgatgtcgcggttgagattgc	AAV8 NA263 F
SED ID NO: 47	gcaaactccaacgcgacatcgaggagg	AAV8 NA263 R
SED ID NO: 48	cccacggcctgactagcggttgagtgtta	AAV8 NA385 F
SED ID NO: 49	Taacactcaacaacgctagtcaggccgtggg	AAV8 NA385 R
SED ID NO: 50	Ggattagccaatgaatttctgcattcagatggtatt ggtcc	AAV8 NA514 F
SED ID NO: 51	Ggaccaaataccatctgaatgaagaaattcatt ggctaattcc	AAV8 NA514 R
SED ID NO: 52	Tttgccaaaaatcaggatcgcggttactgggaaaa aaacg	AAV8 NA540 F
SED ID NO: 53	Cggtttttccagtaacgcgatcctgattttggcaa a	AAV8 NA540 R
SED ID NO: 54	ggaccctcaacgcactcgacaagggg	AAV8 NA57 F
SED ID NO: 55	cccctgtcgagtcggtgaaggggtcc	AAV8 NA57 R
SED ID NO: 56	Tggctcctcccgatgtgctgttgagatttgcttg	AAV8 NS263 F
SED ID NO: 57	Caagcaaactccaacagcacatcggaggag cca	AAV8 NS263 R
SED ID NO: 58	Cccacggcctgactactgttggtgagtgtagg	AAV8 NS385 F
SED ID NO: 59	Cctaactcaacaacagtagtcaggccgtggg	AAV8 NS385 R
SED ID NO: 60	Ttagccaatgaatttctgctattcagatggtattggt cccagcag	AAV8 NS514 F

Sequências de iniciador para mutantes AAV8		
	Sequência	Descrição
SED ID NO: 61	Ctgctgggaccaaataccatctgaatagcagaa attcattggctaa	AAV8 NS514 R
SED ID NO: 62	Ttgtttgccaaaaatcaggatgctgttactgggaa aaaaacgctc	AAV8 NS540 F
SED ID NO: 63	Gagcgttttttcccagtaacagcatcctgattttgg caaaca	AAV8 NS540 R
SED ID NO: 64	Ctccccctgtcgaggctgtgaagggccgag	AAV8 NS57 F
SED ID NO: 65	Ctcggacccttcaacagcctcgacaagggggag	AAV8 NS57 R
SED ID NO: 66	cagcgactcatcaacGACaactggggattccg	Iniciador QC para AAV8 N305D
SED ID NO: 67	ggaggcacggcaGATacgcagactctgg	Iniciador QC para AAV8 N459D
SED ID NO: 68	gacaaccgggcaaacGACaatagcaacttg cctg	Iniciador QC para AAV8 N499D
SED ID NO: 69	ccatctgaatggaagaGATcattggctaatacctg gcatc	Iniciador QC para AAV8 N517D
SED ID NO: 70	cgaagcccaaagccGACcagcaaaagcagg	Iniciador QC para AAV8 N35D
SED ID NO: 71	gtacctgcggtatGACcagccgacgcc	Iniciador QC para AAV8 N94D
SED ID NO: 72	gatgctgagaaccggcGACaactccagtttact tac	Iniciador QC para AAV8 N410D
SED ID NO: 73	cagactctgggcttcagcGATggtgggcctaata caatg	Iniciador QC para AAV8 Q467D
SED ID NO: 74	ccaatcaggcaaagGACtggtgccaggac	Iniciador QC para AAV8 N479D
SED ID NO: 75	cacggacggcGACttccaccgtctc	Iniciador QC para AAV8 N630D
SED ID NO: 76	gatcctgatcaagGACacgcctgtacctgcg	Iniciador QC para AAV8 N653D
SED ID NO: 77	gtacctcggacccttcCAGggactcgacaaggg	Iniciador QC para AAV8 N57Q
SED ID NO: 78	ctacaagcaaattcccCAGgggacatcgggag	Iniciador QC para AAV8

Sequências de iniciador para mutantes AAV8		
	Sequência	Descrição
	gagc	N263Q
SED ID NO: 79	gctacctaacactcaacCAGggtagtcaggccg tgg	Iniciador QC para AAV8 N385Q
SED ID NO: 80	gctgggaccaaataccatctgCAGggaagaaa ttcattggc	Iniciador QC para AAV8 N514Q
SED ID NO: 81	ggagcgtttttcccagtCAGgggatcctgatttt ggc	Iniciador QC para AAV8 N540Q
SED ID NO: 82	Cggaatcccagttgtcgttgatgagtcgctg	Iniciador QC para AAV8 N305D
SED ID NO: 83	ccagagtctgcgtatctgccgtgcctcc	Iniciador QC para AAV8 N459D
SED ID NO: 84	Caggcaaagttgctattgtcgtttgccggtgtc	Iniciador QC para AAV8 N499D
SED ID NO: 85	Gatgccaggattagccaatgaatctctccattcag atgg	Iniciador QC para AAV8 N517D
SED ID NO: 86	cctgctttgtcgtggtcggcttgggcttcg	Iniciador QC para AAV8 N35D
SED ID NO: 87	ggcgtcggcgtggtcataccgcaggtac	Iniciador QC para AAV8 N94D
SED ID NO: 88	Gtaagtaaactggaagttgtcgcgggttctcagca tc	Iniciador QC para AAV8 N410D
SED ID NO: 89	Cattgtattaggcccaccatcgctgaagcccaga gtctg	Iniciador QC para AAV8 Q467D
SED ID NO: 90	gtcctggcagccagtccttgctgattgg	Iniciador QC para AAV8 N479D
SED ID NO: 91	gagacgggtggaagtcgccgtccgtg	Iniciador QC para AAV8 N630D
SED ID NO: 92	Cgcaggtacaggcgtgtccttgatcaggatc	Iniciador QC para AAV8 N653D
SED ID NO: 93	gcagcgactcatcaacGACaactggggattccg gc	iniciador alternativo mais longo para fazer AAV8 N305D por mutagênese qc

Sequências de iniciador para mutantes AAV8		
	Sequência	Descrição
SED ID NO: 94	GCCGGAATCCCCAGTTGTCGTTGA TGAGTCGCTGC	iniciador alternativo mais longo para fazer AAV8 N305D por mutagênese qc
SED ID NO: 95	cagcgactcatcaacGACaactggggattccgg c	iniciador alternativo mais longo para fazer AAV8 N305D por mutagênese qc
SED ID NO: 96	GCCGGAATCCCCAGTTGTCGTTGA TGAGTCGCTG	iniciador alternativo mais longo para fazer AAV8 N305D por mutagênese qc
SED ID NO: 97	gcgactcatcaacGACaactggggattccg	iniciador alternativo mais curto para fazer AAV8 N305D por mutagênese qc
SED ID NO: 98	CGGAATCCCCAGTTGTCGTTGATG AGTCGC	iniciador alternativo mais curto para fazer AAV8 N305D por mutagênese qc
SED ID NO: 99	ctctgggcttcagcGAAGgtgggcctaatac	iniciador QC mutagênico para fazer aav8 Q467E
SED ID NO: 100	GTATTAGGCCACCTTCGCTGAAG CCCAGAG	iniciador QC mutagênico para fazer aav8 Q467E
SED ID NO: 101	cctcggacccttcGACggactcgacaagg	Iniciador QC para AAV8 N57D
SED ID NO: 102	tacaagcaaattctccGACgggacatcgggagg ag	Iniciador QC para AAV8 N263D
SED ID NO: 103	ctacctaactcaacGACggtagtcaggccgt g	Iniciador QC para AAV8 N385D
SED ID NO: 104	ctgggaccaaataccatctgGATggaagaaatt cattggctaadc	Iniciador QC para AAV8 N514D
SED ID NO:	gagcgttttttcccagtGACgggatcctgattttg	Iniciador QC para AAV8

Sequências de iniciador para mutantes AAV8		
	Sequência	Descrição
105	gc	N540D
SED ID NO: 106	cctgtcgagtcgctcgaaggggtccgagg	Iniciador QC para AAV8 N57D
SED ID NO: 107	Ctcctcccgatgtcccgtcggagatttgcttgta	Iniciador QC para AAV8 N263D
SED ID NO: 108	Cacggcctgactaccgtcgttgagtgttaggtag	Iniciador QC para AAV8 N385D
SED ID NO: 109	Gattagccaatgaatttctccatccagatgggtatt gggtcccag	Iniciador QC para AAV8 N514D
SED ID NO: 110	Gccaaaaatcaggatcccgctactgggaaaaa aacgctc	Iniciador QC para AAV8 N540D

B. Resultados

[00201] AAV8 mostra heterogeneidade de carga substancial em suas proteínas do capsídeo

[00202] Para avaliar qualitativamente a presença de modificações pós-tradução no capsídeo do vetor AAV8 que poderiam afetar o desempenho do vetor, analisamos a proteína do capsídeo total AAV8 purificada por gradiente de iodixanol por eletroforese em gel 1D e 2D. Em um gel de SDS redutor de dodecil sulfato de sódio 1D, VP1, VP2 e VP3 resolvidos como bandas únicas nos pesos moleculares apropriados (FIG. 1B) (Rose JA, et al. *J Virol* 1971; 8(5):766-70). Quando avaliada adicionalmente por eletroforese em gel 2D, que separa as proteínas com base na carga (FIG. 1C), cada uma das proteínas do capsídeo adicionalmente resolvida como uma série de pontos distintos com diferentes pontos isoelétricos (pIs) variando de pH 6,3 a > 7,0 dependendo da isoforma de VP (FIG. 1D). Pontos individuais em cada VP foram separados por intervalos distintos de unidades de 0,1 pI, medidos como migração em relação aos padrões de ponto isoelétrico interno da isoforma de anidrase carbônica, sugerindo uma única

mudança de carga de resíduo. A presença dessas isoformas sugere que cada VP tem o potencial de sofrer muitas modificações, fazendo com que migrem de forma diferente sob focalização isoeletrica.

[00203] A desamidação, na qual uma fração de (tipicamente asparagina) grupos amida da cadeia lateral são convertidos em ácido carboxílico (FIG. 1A), é uma fonte comum de heterogeneidade de carga em preparações de proteína. Para determinar se a desamidação poderia ser responsável pela população distinta de isoformas de carga de VP, mutamos dois resíduos de asparagina AAV8 individualmente para aspartato. Essas mutações do capsídeo devem mudar a carga em uma quantidade equivalente à desamidação completa de um único resíduo de asparagina adicional. A análise de gel 2D dos mutantes indica que os pontos principais para VP1, VP2 e VP3 mudaram um local de ponto mais ácido (0,1 unidades de pH) do que os pontos equivalentes no tipo selvagem (wt) AAV8 (FIG. 1E - FIG. 1G). A magnitude dessa mudança é equivalente ao espaçamento observado entre as isoformas de carga VP em peso. Assim, a padronização de gel 2D das proteínas do capsídeo de AAV é consistente com a desamidação de múltiplos sítios.

[00204] A desamidação espontânea ocorre no capsídeo do vetor AAV8

[00205] Para identificar as modificações responsáveis pelo padrão de coloração distinto para cada proteína do capsídeo, analisamos um painel de vetores AAV8 por espectrometria de massa. A cobertura da proteína do capsídeo AAV8 foi em média > 95% da sequência VP1 total (dados não mostrados). Detectamos extensa desamidação de um subconjunto de resíduos de asparagina e glutamina por espectroscopia de massa, que mostrou um aumento de ~ 1 Da na massa observada dos peptídeos individuais em comparação com os valores preditos com base na sequência codificada pelo DNA; observamos este padrão de

desamidação em todas as preparações de vetores AAV8 (FIG. 2A - FIG. 2D).

[00206] Para avaliar a heterogeneidade global de desamidação entre os métodos de purificação comumente usados e para examinar a desamidação nas regiões únicas VP1 e VP2, selecionamos nove lotes de AAV8 produzidos por transfecção tripla em células 293 e purificamos por gradiente de cloreto de cério, gradiente de iodixanol ou cromatografia de afinidade. Os vetores também variaram em relação a promotores e cassetes de transgene. Para determinar se a presença do genoma do vetor teve um impacto na desamidação, também avaliamos uma preparação AAV8 produzida por transfecção tripla em células 293 na ausência de plasmídeo cis (produzindo apenas capsídeos vazios) e purificado por gradiente de iodixanol.

[00207] Um amplo intervalo de desamidação estava presente em resíduos de asparagina e glutamina do capsídeo de AAV8, variando de indetectável a mais de 99% dos aminoácidos individuais sendo desamidados (FIG. 2E). Os níveis mais altos de desamidação (> 75%) ocorreram em resíduos de asparagina onde o resíduo N+1 era glicina (isto é, pares NG) (Tabela 1). Detectamos níveis mais baixos de desamidação (isto é, até 17%) em resíduos de asparagina adicionais onde o N+1 não era glicina. A desamidação média para asparaginas foi amplamente consistente entre as preparações. Também detectamos desamidação nos resíduos de glutamina, mas em uma frequência mais baixa do que nas asparaginas; a maior porcentagem que observamos foi <2% em Q467 (FIG. 7). Esta observação foi inconsistente entre as preparações (dados não mostrados). Observamos as maiores diferenças de preparação para preparação no resíduo N499 (o resíduo N+1 é asparagina), com valores variando de <1% a mais de 50% de desamidação. Independentemente disso, as variações que observamos na desamidação entre as preparações do vetor não parecem estar

relacionadas ao método de purificação, identidade do transgene ou a presença do genoma do vetor, sugerindo que esses fatores não afetam as taxas de desamidação.

Tabela 1: Características dos resíduos desamidados AAV8 de interesse. Asteriscos representam resíduos selecionados para análise posterior.

	resíduo N+1	Topologia estrutural	Motivo estrutural	% Desamidação média	Fator de temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
N35	Q	N/A	N/A	1	N/A
N57	G	N/A	N/A	80	N/A
N94	H	N/A	N/A	7	N/A
N254*	N	Superfície exposta	Não atribuído	9	35
N255*	H	Superfície exposta	Não atribuído	N/A	42
N263	G	Superfície exposta	HVR I	99	51
N305	N	Oculto	Hélice alfa	8	33
N385	G	Superfície exposta	HVR III	88	41
N410	N	Oculto	Não atribuído	3	33
N459	T	Superfície exposta	HVR IV	7	65
N499	N	Superfície exposta	HVR V	17	45
N514*	G	Superfície exposta	HVR V	84	36
N517*	S	Superfície exposta	HVR V	4	40
N540*	G	Oculto	HVR VII	79	40
N630*	F	Oculto	Não atribuído	1	32
N653	T	Superfície exposta	laço HI	1	35

[00208] Em seguida, foi executada uma série de experimentos para determinar se o manuseio da amostra contribuiu para os níveis observados de desamidação em AAV8. Temperatura extrema (70°C por 7 dias) ou pH (pH 2 ou pH 10 por 7 dias) não induziu significativamente

desamidação adicional no capsídeo AAV8 (FIG. 4A e FIG. 4B). Dada essa resistência, raciocinamos que era improvável que a desamidação observada ocorresse apenas na fase de purificação, que foi mais curta e relativamente leve em comparação. Tentamos realizar uma análise de espectrometria de massa em vetor não purificado para determinar a extensão da desamidação antes e depois da purificação, mas não tivemos sucesso. Da mesma forma, os controles de água pesada indicam que o processamento específico para o nosso fluxo de trabalho de espectrometria de massa não contribui com eventos de desamidação adicionais (FIG. 4C).

[00209] Para validar o fluxo de trabalho de espectrometria de massa, foram examinadas duas proteínas recombinantes que foram avaliadas anteriormente para desamidação; nossas descobertas (FIG. 5A e FIG. 5B) concordam com os resultados publicados [Henderson, LE, Henriksson, D e Nyman, PO (1976). Primary structure of human carbonic anhydrase C. *The Journal of biological chemistry* 251: 5457-5463 and Carvalho, RN, Solstad, T, Bjorgo, E, Barroso, JF, and Flatmark, T (2003). Deamidations in recombinant human phenylalanine hydroxylase. Identification of labile asparagine residues and functional characterization of Asn --> Asp mutant forms. *The Journal of biological chemistry* 278: 15142-1515]. Além disso, contratamos uma instituição secundária para avaliar nossos dados brutos do AAV8. Esta análise independente identificou os mesmos sítios como desamidados, com variação mínima na extensão da modificação em cada sítio atribuível a variações de software para software na detecção de pico e cálculo de área (FIG. 6).

[00210] A topologia estrutural, o fator de temperatura e a identidade do aminoácido N+1 contribuem para a frequência de desamidação

[00211] Como a estrutura do AAV8 foi resolvida e publicada (identificador PDB: 2QA0) (Nam HJ, et al. *J Virol* 2011; 85(22):11791-99),

examinamos a seguir a estrutura do capsídeo do AAV8 para evidências de condições favoráveis para desamidação não enzimática e correlacionar a porcentagem de desamidação com características estruturais estabelecidas (Nam HJ, et al. *J Virol* 2007; 81(22):12260-71). Nós nos concentramos nos resíduos de asparagina exclusivamente, pois os fatores que influenciam a desamidação da asparagina são melhor caracterizados na literatura e os eventos de desamidação da asparagina são muito mais comuns do que os eventos de desamidação da glutamina (Robinson, NE e Robinson, AB (2001). Molecular clocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 944-949). Também determinamos o fator de temperatura (ou B) para cada um desses resíduos da estrutura de cristal de AAV8; o fator de temperatura é uma medida do deslocamento de um átomo de sua posição média, com valores mais altos indicando um deslocamento maior, vibração térmica mais alta e, portanto, flexibilidade aumentada (Parthasarathy S and Murphy MR. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 1997; 6:2561-7). A maioria das asparaginas de interesse estavam localizadas em ou perto das HVRs expostas à superfície (Tabela 1), que são estruturalmente favoráveis para desamidação e fornecem um ambiente exposto a solvente (Govindasamy L, et al. *J Virol* 2013; 87(20):11187-99). Descobrimos que os resíduos localizados nessas regiões de alça flexível foram, em média, mais frequentemente desamidados do que os resíduos em regiões menos flexíveis, como fitas beta e hélices alfa. Por exemplo, o resíduo de NG na posição N263 é parte de HVR I, tem um fator de alta temperatura e foi > 98% desamidado em média (FIG. 7A e FIG. 6, Tabela 1). N514, que foi desamidado ~85% do tempo (FIG. 3 e FIG. 6, Tabela 1), também está em uma HVR (HVR V) com uma glicina N+1; no entanto, o fator de temperatura local é relativamente baixo em comparação com o de N263 devido à sua interação com resíduos em outros monômeros VP no eixo triplo. Resíduos +1 menos favoráveis e

fatores de temperatura local mais baixos correlacionados com desamidação mais baixa, mesmo para resíduos HVR. Por exemplo, N517 estava em média apenas 4% desamidado (Tabela 1); este resíduo tem um fator de temperatura equivalente ao N514 altamente desamidado, mas seu resíduo N+1 é uma serina, diminuindo a probabilidade de eventos de desamidação devido ao impedimento estérico. Isso demonstra que uma série de fatores determinam cumulativamente a extensão da desamidação em uma determinada posição do capsídeo, embora a identidade do resíduo +1 seja aparentemente o fator mais influente.

[00212] Para testar o papel do resíduo +1 na desamidação da asparagina, geramos vetores mutantes nos quais os sítios AAV8 NG foram individualmente mutados na posição +1 para alanina ou serina. Os estudos de peptídeos modelo indicam que os peptídeos NG desamidam com meia-vida tão curta quanto 1 dia, enquanto os peptídeos NA ou NS normalmente desamidam 25 ou 16 vezes mais lentamente, respectivamente (Robinson NE e Robinson AB. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(8):4367-72). A análise de espectrometria de massa dos mutantes do vetor confirmou o papel central do sítio +1 na determinação da extensão da desamidação do vetor. Os sítios NG neste conjunto (> 80% de desamidação em peso) mostraram estabilização seletiva da asparagina adjacente quando o sítio +1 foi alterado para alanina (<5% de desamidação) ou serina (14% de desamidação) (Tabela 2).

Tabela 2: Extensão da desamidação (%) em cinco sítios AAV8 NG em wt e seis mutantes de sítio +1

posição/variante	WT (média)	G58S	G58A	G264A	G386S	G386A	G515A
N57	81,8	8,4	1,9	89,7	89,7	91,6	93,6
N263	99,3	98,2	98,9	4,8	100,0	94,5	97,2
N385	89,1	96,3	94,8	97,1	13,5	2,5	97,0

posição variante	WT (média)	G58S	G58A	G264A	G386S	G386A	G515A
N514	85,2	100,0	98,0	98,8	100,0	100,0	2,2
N540	84,5	95,0	92,6	97,9	96,9	86,1	89,5

[00213] Resíduos que foram pelo menos parcialmente ocultos e não prontamente expostos ao solvente e/ou foram localizados em regiões de baixa flexibilidade local no capsídeo AAV8 intacta e totalmente montada teve uma frequência mais baixa de desamidação em comparação com aqueles localizados em um ambiente mais favorável (Tabela 1). Apesar disso, alguns dos resíduos em condições desfavoráveis foram desamidados. Por exemplo, o N630 está pelo menos parcialmente oculto, mas ainda tinha um grau detectável de desamidação. Para este resíduo, a presença de fenilalanina como o resíduo N+1 sugere que esta região poderia ser um novo sítio de clivagem autoproteolítica não enzimática dentro da proteína AAV8 VP3. A modelagem estrutural de AAV8 VP3 confirma eventos de desamidação

[00214] Para fornecer evidências diretas de desamidação no contexto de um capsídeo montado, avaliamos a estrutura cristalina de AAV8 (Nam HJ, et al. *J Virol* 2011; 85(22):11791-9). A resolução da estrutura cristalina disponível (isto é, 2,7Å) deste sorotipo não é alta o suficiente para identificar os átomos terminais nos grupos R e, portanto, é insuficiente para distinguir diretamente entre asparagina, resíduos de ácido aspártico e isoaspártico. Outros aspectos da estrutura do isômero do ácido aspártico que se forma sob essas condições nos deram a oportunidade de determinar a desamidação da estrutura de 2,7Å. Esta análise foi baseada em duas suposições: 1) O produto predominante da desamidação espontânea de uma asparagina é isoaspártico em vez de ácido aspártico, que é gerado em uma razão de 3:1 (Geiger T e Clarke S. *J Biol Chem* 1987; 262(2):785-94) e 2) uma asparagina ou ácido

aspártico pode ser diferenciado de um ácido isoaspártico porque o mapa de densidade eletrônica correspondente ao grupo R do ácido isoaspártico é menor em comprimento. Este grupo R mais curto é criado quando o carbono beta do grupo R do ácido isoaspártico é perdido quando incorporado na cadeia principal da estrutura da proteína do capsídeo AAV8 VP3 após a resolução do intermediário succinimidil durante a reação de desamidação.

[00215] Primeiro refinou-se a própria estrutura de AAV8, gerando uma densidade de elétrons de capsídeo de AAV8 que não foi influenciada pela sequência conhecida de AAV8 VP3. Em seguida, examinamos a estrutura de cristal AAV8 refinada para evidências de desamidação com base na presença de um grupo R mais curto associado ao ácido isoaspártico (FIG. 3A - FIG. 3E). O mapa de densidade de elétrons confirmou um grupo R mais curto para os resíduos de glicina N+1 altamente desamidados nas posições 263 (FIG. 3C), 385 (não mostrado), 514 (FIG. 3D) e 540 (FIG. 3E) quando comparado com a asparagina em 410 que não teve desamidação detectada por espectrometria de massa (FIG. 3B). A desamidação indicada pelo mapa de densidade de elétrons é, portanto, consistente com os dados gerados por espectrometria de massa nesses sítios com > 75% de desamidação. Os modelos de ácido isoaspártico resultantes foram comparáveis aos resíduos de ácido isoaspártico observados nas estruturas cristalinas de outras proteínas desamidadas conhecidas, apoiando a validade de nossa análise de AAV8 (Rao FV, et al. *Chem Biol.* 2005; 12(1):65-76; Noguchi S, et al. *Biochemistry* 1995; 34(47):15583-91; Esposito L, et al. *J Mol Biol* 2000; 297(3):713-32). Esta análise estrutural serve como uma confirmação independente dos fenômenos de desamidação observados ao analisar o capsídeo AAV8 via espectrometria de massa.

[00216] A desamidação do capsídeo de AAV não é específica do

sorotipo

[00217] Foram investigados, os sorotipos além do AAV8 para evidências de desamidação do capsídeo. Examinamos as preparações do vetor AAV9 usando eletroforese em gel 2D (FIG. 11A) e espectrometria de massa (FIG. 11B), incluindo controles para potenciais efeitos de processamento do vetor (FIG. 11D - FIG. 11F). O padrão e a extensão da desamidação de AAV9 foram semelhantes aos de AAV8. Todos os quatro sítios AAV9 NG foram > 85% desamidados; 13 sítios não NG foram desamidados em menor grau, com alguns sítios mostrando alta variabilidade lote a lote em % de desamidação. Em seguida, aplicamos nosso fluxo de trabalho de análise estrutural e reajustamos os dados cristalográficos AAV9 existentes (FIG. 11C, Tabela 3). Tal como acontece com AAV8, o ácido isoaspártico se encaixa melhor na densidade de elétrons de vários sítios NG na estrutura cristalina AAV9. Estendemos nossa análise de gel 2D (dados não mostrados) e espectrometria de massa (resumida na Tabela 4) para cinco sorotipos evolutivamente diversos adicionais (rh32.33, AAV7, AAV5, AAV4, AAV3B e AAV1). Todos os capsídeos examinados contêm um padrão e extensão semelhantes de desamidação, indicando que esta modificação é difundida em vetores AAV clinicamente relevantes e é determinada por sequência primária subjacente e fatores estruturais semelhantes.

Tabela 3. Características dos resíduos desamidados de AAV9 de interesse. Os resíduos de asparagina conservados com resíduos N+1 homólogos (em comparação com AAV8) são indicados em <i>itálico</i> (determinado pelo alinhamento das sequências de aminoácidos de comprimento total de AAV8 e AAV9 VP1).					
	resíduo N+1	Topologia estrutural	Motivo estrutural	% Desamidação média	Fator de temperatura (Å ²)
N57	G	N/A	N/A	97	N/A
N94	H	N/A	N/A	5	N/A
N253	N	Superfície exposta	Não atribuído	9	41
N254	H	Superfície exposta	Não atribuído	2	50

N270	D	Superfície exposta	HVR I	11	65
N304	N	Oculto	Hélice alfa	23	35
N329	G	Superfície exposta	HVR II	94	89
N409	N	Oculto	Não atribuído	9	36
N452	G	Superfície exposta	HVR IV	98	64
N477	Y	Oculto	Não atribuído	2	33
N512	G	Superfície exposta	HVR V	89	48
N515	S	Superfície exposta	HVR V	3	47
N651	T	Oculto	laço HI	1	38
N663	K	Superfície exposta	laço HI	4	49
N668	S	Superfície exposta	laço HI	13	52
N704	Y	Superfície exposta	HVR IX	5	68
N709	N	Superfície exposta	HVR IX	5	55

Tabela 4. Extensão da desamidação observada para diversos sorotipos						
sorotipo	preparações de vetores analisadas	% média de cobertura de sequência por MS	# de NGs	% de desamidação média de NG	# de sítios não NG observados desamidados	% de desamidação não NG média
AAV1	3	91,4	4	95,6	19	12,9
AAV3B	1	89,8	4	97,0	9	9,4
AAV4	3	84,7	4	96,2	15	15,3
AAV5	1	88,7	3	88,7	11	15,3
AAV7	1	90,9	4	92,1	9	13
AAV8	21	93,4	5	90,5	37	7,4
AAV9	7	90,2	4	95,5	26	5,3
rh32.33	1	100	3	97,4	14	16,2

Os eventos de desamidação podem afetar a montagem do capsídeo e a eficiência da transdução

[00218] Uma abordagem para testar o impacto funcional da desamidação é substituir asparagina por aspartato por mutação genética. Geramos um vetor mutante de aspartato que codifica um repórter de luciferase para cada asparagina AAV8 desamidada por transfecção tripla em pequena escala de células 293 e titulamos os

vetores por qPCR de cópias de genoma resistentes a DNaseI (FIG. 8A). As mutações raramente afetaram a montagem do capsídeo em relação ao wtAAV8, e os efeitos foram limitados a sítios não NG, principalmente ocultos com baixa desamidação geral no vetor wt. Em seguida, avaliamos o painel de mutação para a eficiência de transdução *in vitro* de células Huh7 derivadas de fígado humano (FIG. 8B). Vários mutantes mostraram eficiência de transdução prejudicada, com as posições N57, N94, N263, N305, Q467, N479 e N653 exibindo perda de transdução > 10 vezes. Observamos um número semelhante de sítios sensíveis para AAV9 (FIG. 11G e FIG. 11H). Como tipicamente apenas uma fração de resíduos em uma determinada posição é desamidada endogenamente, esta abordagem tem o potencial de superestimar a perda funcional para proteínas, como capsídeos, onde a unidade funcional é um conjunto homomérico; a modificação endógena em um sítio do capsídeo pode ser compensada por uma subunidade vizinha com um resíduo intacto. No entanto, concluímos que o método poderia ajudar a priorizar resíduos desamidados para monitoramento futuro durante a fabricação ou estabilização mutacional. Dados funcionais de populações de vetores de desamidação endógena serão necessários para colocar esses dados de mutagênese de perda de função no contexto adequado. A perda de atividade vetorial ao longo do tempo está correlacionada com a desamidação progressiva

[00219] Dada a meia-vida aparentemente curta da desamidação NG, concluímos que as amostras de vetores com idade diferente de 1 dia poderiam mostrar perfis de desamidação distintos, proporcionando assim uma oportunidade de correlacionar a desamidação endógena ao funcionamento. Nosso protocolo de preparação de vetor em grande escala exige a transfecção tripla de células 293, seguida por 5 dias de incubação para produção de vetor e 1-2 dias para purificação de vetor. Para aproximar este processo, preparamos transfecções triplas em

escala média (placas de cultura de células de 10 x 15 cm cada) de células 293 com AAV8 wt. Coletamos o vetor (placas de cultura de células de 2 x 15 cm/dia) em intervalos de 1 dia por 5 dias, preservando os pontos de tempo até o final do período de 5 dias por vetor de congelamento a -80C. Em seguida, avaliamos o título do vetor bruto e a eficiência de transdução *in vitro*, conforme descrito acima. Como esperado, o número de cópias do genoma resistentes a DNaseI montadas aumentou ao longo do tempo (FIG. 9A). Em seguida, processamos rapidamente o vetor bruto para pontos temporais iniciais (dia 1 e 2) e tardios (dia 5) por purificação de afinidade e medimos a eficiência de transdução *in vitro* de células huh7. A eficiência de transdução relativa do vetor caiu progressivamente ao longo do tempo (FIG. 9B). Em termos de expressão do transgene por GC adicionado às células alvo, o vetor do dia 5 foi apenas 40% tão eficiente quanto o material do dia 1. Esta queda de atividade também foi observada para o material bruto, indicando uma mudança na composição molecular antes da purificação (FIG.). Observamos uma tendência semelhante na perda de atividade para AAV9 ao longo de 5 dias, com redução de aproximadamente 40% na potência do vetor (FIG. 11I - FIG. 11K).

[00220] Em seguida, mediu-se a desamidação das amostras do curso do tempo por espectrometria de massa. A desamidação do sítio NG progrediu substancialmente ao longo de cada intervalo, com uma média de 25% de desamidação no dia 1 e > 60% dos sítios convertidos no dia 5 (FIG. 9C). A desamidação do sítio não NG geralmente progrediu ao longo de 5 dias, embora em níveis muito mais baixos e com menos consistência entre os dias 2 e 5 (FIG. 9D). Os dados correlacionam a desamidação endógena do vetor a um decaimento de ponto de tempo precoce em atividade específica e destacam uma oportunidade potencial para capturar o vetor mais ativo encurtando o ciclo de produção ou encontrando mutações do capsídeo que

estabilizam as asparaginas.

[00221] Notou-se que o material usado para análise de espectrometria de massa na FIG. 2A - FIG. 2E foi de pelo menos 7 dias após a transfecção, devido a 2 dias adicionais para purificação. A maior desamidação do sítio NG nessas amostras (> 80%) indica que a desamidação provavelmente continua após o período de expressão e durante os processos de recuperação e purificação aproximadamente nas mesmas taxas até que os sítios NG sejam completamente desamidados ou a amostra do vetor seja congelada. Assim, a desamidação é amplamente determinada pela idade do vetor e não é um processo exclusivo ou causado pelo processo de recuperação e purificação. Os valores de desamidação muito mais baixos no material do dia 1 vs o material do dia 5 (ambos purificados por afinidade) sublinham este ponto.

Estabilizar asparaginas NG pode melhorar o desempenho do vetor

[00222] Dada a correlação entre a desamidação NG do vetor e a perda de eficiência de transdução, concluímos que a estabilização das amidas NG por mutagênese no sítio +1 pode melhorar a função do vetor. Produzimos vetor em pequena escala para mutantes do sítio AAV8 NG em que cada resíduo +1 foi convertido individualmente em alanina ou serina. Mutantes +1 únicos foram bem tolerados em termos de montagem de vetor (FIG. 10A) e eficiência de transdução (FIG. 10B). Substituições de G386, localizadas perto de uma "zona morta" previamente definida na superfície do capsídeo (Aydemir F, et al. *J Virol* July 2016; 90(16):7196-204), eram defeituosas para transdução in vitro. A perda de função para mutantes G386 pode indicar uma preferência por uma asparagina desamidada em N385. Alternativamente, o volume adicional da cadeia lateral na posição +1 pode ter um impacto negativo na função que é independente da estabilização do grupo amida. Nenhum mutante de sítio único melhorou significativamente a

transdução *in vitro*, apesar da dramática estabilização de suas asparaginas vizinhas (Tabela 2). Como as atividades de transdução *in vitro* e *in vivo* podem ser discordantes, testamos um subconjunto dos mutantes de sítio único +1 para a transdução hepática em camundongos C57BL/6. Realizamos injeção intravenosa na veia da cauda (n = 3 a 5) e examinamos a expressão da luciferase por imageamento semanal durante 2 semanas (FIG. 10C). Os dados de transdução *in vivo* e *in vitro* estavam de acordo com os erros associados de cada ensaio (ou seja, dentro do intervalo de erro). As substituições de G386 foram defeituosas para a transdução, enquanto as mutações do sítio +1 em outras posições foram amplamente toleradas, transduzindo o fígado em níveis equivalentes, mas não excedendo wtAAV8.

[00223] Como a estabilização da amida em qualquer sítio NG pode ser necessária, mas não suficiente para a restauração funcional, avaliamos a seguir as variantes do vetor com combinações de substituições de alanina no sítio +1. Nós recombinaamos todos os 3 sítios AAV8 NG para os quais a alanina +1 era altamente funcional (N263, N514 e N540). Algumas combinações, incluindo o mutante triplo G264A/G515A/G541A, montaram mal e eram disfuncionais para transdução. No entanto, ambas as combinações de pares envolvendo N263 (G246A/G515A e G264A/G541A) melhoraram a eficiência de transdução *in vitro* 2,0- e 2,6- vezes sobre wtAAV8, respectivamente) sem perda de título (FIG. 10D). Como essas mutações introduzem pelo menos duas alterações (estabilização de N-amida e substituição de cadeia lateral de resíduo +1), esses dados não ligam de forma conclusiva a desamidação de NG à perda funcional. No entanto, os dados são consistentes com o modelo estabelecido no estudo de curso de tempo, no qual a desamidação do sítio NG pode impactar a eficiência de transdução *in vitro*.

[00224] Substituições funcionais de asparagina melhoram a reprodutibilidade lote a lote na fabricação de vetores

[00225] Outro aspecto potencialmente problemático dos perfis de desamidação de vetor que relatamos é a alta variabilidade de lote a lote na desamidação em algumas posições. Para wtAAV8, esta variabilidade é mais pronunciada para N459 (desamidação observada variando de 0% a 31%) e N499 (desamidação observada variando de 0% a 53%). A variabilidade nas modificações pós-traducionais é normalmente evitada *de facto* durante o desenvolvimento de produtos biológicos, seja evitando clones que exibem essa variabilidade, monitorando e controlando cuidadosamente as cepas e condições de produção, ou por engenharia de proteína do candidato afetado.

[00226] Como não se foi capaz de determinar os fatores de produção ou processamento que contribuem para a variabilidade de desamidação de N459 e N499 (FIG. 2E), buscamos substituições de aminoácidos funcionais nessas posições. Avaliamos primeiro as preparações de vetor em pequena escala para substituições conservativas de glutamina em cada posição individualmente. Ambos N459Q e N499Q foram montados de forma eficiente no vetor e eram equivalentes à referência wtAAV8 para eficiência de transdução *in vitro* (FIG. 7A). Em seguida, produzimos os mutantes em grande escala e realizamos espectrometria de massa. Consistente com nossas observações de desamidação de glutamina extremamente rara, observamos estabilização seletiva e completa das amidas de glutamina nas posições 459 ou 499 nesses mutantes (dados não mostrados). Avaliamos esses lotes mutantes *in vivo* como acima para a transdução do fígado após injeção na veia da cauda em camundongos C57BL/6 (FIG. 7B e FIG. 7C). O lote do vetor wtAAV8 usado como um controle nesta experiência foi desamidado 16,8% em N499, mas nenhuma desamidação foi detectada em N459 (dados não mostrados). A transdução do fígado no dia 14 para ambos

os mutantes foi equivalente a wtAAV8. Estes dados demonstram o potencial para uma abordagem de engenharia de proteínas para abordar a variabilidade molecular associada à desamidação em vetores AAV fabricados.

C. Discussão

[00227] Identificou-se e avaliou-se a desamidação não enzimática de resíduos de asparagina e glutamina no capsídeo AAV8 independentemente por eletroforese em gel 2D, espectrometria de massa, modelagem de proteína *de novo* e estudos funcionais *in vitro* e *in vivo*. Foi demonstrado que a desamidação ocorre em uma ampla variedade de proteínas e tem impacto significativo na atividade de produtos biológicos, incluindo terapêuticas baseadas em anticorpos (Nebija D et al. *Int J Mol Sci* 2014; 15(4):6399-411) e vacinas baseadas em peptídeos (Verma A et al. *Clin Vaccine Immunol.* 2016; 23(5):396-402). Outras proteínas virais, como a proteína VP6 do rotavírus, foram mostradas por espectrometria de massa como sofrendo eventos de desamidação (Emslie KR et al. *Funct Integr Genomics* 2000; 1(1):12-24).

[00228] O contexto em que essas desamidações ocorreram em AAV8 sugere que elas são o resultado de eventos não enzimáticos espontâneos. Os resíduos de asparagina são conhecidos por serem mais extensivamente desamidados do que os resíduos de glutamina; o aminoácido a jusante da asparagina influencia substancialmente a taxa de desamidação com um N+1 de glicina (isto é, NG) sendo o mais eficientemente desamidado. Observamos a confirmação notável do papel do aminoácido N+1 na desamidação de capsídeos de AAV em que cada NG presente em VP1 foi desamidado em níveis > 75%, enquanto a desamidação nunca foi consistentemente > 20% em qualquer uma das outras asparaginas ou glutaminas no capsídeo. Praticamente todos os motivos NG nos capsídeos AAV8 e AAV9 (ou

seja, 7/9) também estavam presentes na superfície do capsídeo contido nas regiões HVR que estão associadas a altas taxas de flexibilidade conformacional e vibração térmica. Isso é consistente com relatórios anteriores de motivos NG de outras proteínas que estão localizadas em regiões onde a flexibilidade pode ser necessária para a função adequada da proteína e não em estruturas mais ordenadas, como hélices alfa ou folhas beta (Yan BX and Sun YQ *J Biol Chem* 1997; 272(6):3190-4). A preferência de motivos NG em HVRs expostos à superfície aumenta ainda mais a taxa de desamidação, proporcionando acessibilidade ao solvente e flexibilidade conformacional, facilitando assim a formação do intermediário succinimidil. Como previsto, ambientes menos favoráveis levam a taxas de desamidação muito mais baixas.

[00229] Uma questão importante em relação à biologia do AAV e seu uso como vetor são as consequências funcionais dessas desamidações. A mutagênese do DNA do capsídeo para converter uma asparagina em ácido aspártico permite uma avaliação dos capsídeos nos quais todos os aminoácidos em um determinado sítio são representados como ácidos aspárticos. No entanto, não existe uma estratégia fácil para usar a mutagênese para prevenir desamidações além da mutação potencial do resíduo N+1, que é confundido pelas consequências diretas da mutação do segundo sítio. Estudamos um número limitado de variantes nas quais o resíduo de asparagina foi convertido em ácido aspártico por mutagênese. A análise funcional incluiu a montagem do capsídeo e a transdução *in vitro* e *in vivo*. Os efeitos mais substanciais da mutagênese na função do vetor foram aqueles envolvendo asparaginas que foram desamidadas incompletamente no início do estudo e não foram expostas à superfície. O que foi surpreendente, entretanto, foi que a mutagênese da asparagina altamente desamidada em 514 em um ácido aspártico teve

algum efeito na função. Este resultado sugere que a presença de quantidades residuais da amida correspondente pode influenciar a função. Isso pode ser devido em parte à presença de interações de ligações de hidrogênio entre N514 e D531 de outro monômero VP3 relacionado a três vezes (identificado na estrutura de cristal wtAAV8) que são perdidas após a conversão deste resíduo em ácido aspártico após desamidação.

[00230] Uma melhor compreensão dos fatores que influenciam a extensão da desamidação em vetores AAV é importante ao avaliar o impacto dessas desamidações no desenvolvimento de novas terapêuticas. A incubação de vetores sob condições extremas, conhecida por acelerar marcadamente a cinética de desamidação, teve pouco efeito. Juntamente com nossos estudos de incorporação de isótopos, este resultado sugere que a desamidação ocorre durante a montagem do capsídeo e não é um artefato de processamento de vetor ou análise de espectrometria de massa. É improvável que desamidações em sítios NG tenham um impacto significativo no desempenho do vetor, uma vez que a reação foi virtualmente completa em todas as amostras que avaliamos. No entanto, nossos estudos funcionais iniciais sugerem que quantidades residuais de asparaginas não desamidadas podem contribuir para a função. Estamos mais preocupados com os sítios onde a desamidação foi menos completa, o que na maioria dos casos também foi associado à variação de amostra para amostra. Um exemplo é a asparagina na posição 499 que apresentou desamidação variando de 0% a 53% com média de 17%. É possível que diferenças sutis nas condições de produção do vetor contribuam para essa heterogeneidade. A notável semelhança na desamidação em AAV8 e AAV9 sugere que esta é uma propriedade de toda esta família de vírus.

[00231] Em resumo, foi descoberta heterogeneidade substancial na

estrutura de aminoácidos primária das proteínas do capsídeo AAV8 e AAV9. Esses estudos têm um impacto potencial no desenvolvimento de AAV como vetores de várias maneiras. Em primeiro lugar, as sequências de aminoácidos reais das proteínas VP não são as previstas pelas sequências de DNA correspondentes. Em segundo lugar, aspectos do método de produção podem levar a variações na desamidação e mudanças correspondentes na função do vetor. Até que tenhamos um controle sobre os fatores que influenciam as taxas de desamidação em sítios não NG e uma melhor compreensão de suas consequências funcionais, pode ser necessário incluir a desamidação na caracterização de vetores de AAV de grau clínico. A eletroforese em gel 2D pode fornecer uma avaliação geral da desamidação líquida, embora a espectrometria de massa seja necessária para avaliar a desamidação em resíduos específicos.

EXEMPLO 2: MUTANTE TRIPLO DE DESAMIDAÇÃO AAV8 (CLADE E)

[00232] Um capsídeo mutante triplo AAV8 foi usado para gerar um vetor rAAV. A sequência de aminoácidos prevista para a proteína VP1 deste capsídeo é fornecida na SEQ ID NO: 9 aqui e uma sequência de ácido nucleico que codifica o capsídeo é fornecida na SEQ ID NO: 8. Ver, também, o pedido PCT PCT/US17/27392, publicado como WO 2017/180854.

[00233] Os vetores mutantes AAV8Triple foram avaliados quanto à desamidação como descrito no Exemplo 1 para AAV8. Resíduos altamente desamidados são vistos em N57, N384, N498, N513, N539. A desamidação de 10% a 40% é observada em N94, N254, N255, N304, N409, N516.

Modificação de mutante triplo AAV8 SEQ ID NO: 9	WL1938S	WL1938S
Enzima	Tripsina	Quimotripsina
% de cobertura	91,6	88,3
N57+Desamidação	93,1	91,9
N94+Desamidação	10,4	10,8
~N254+Desamidação	14,7	14,4
~N255+Desamidação	11,9	12,0
N304+Desamidação	32,7	32,1
N384+Desamidação	94,6	93,9
N409+Desamidação	22,8	22,3
N478+Desamidação	2,5	2,5
~N498+Desamidação	54,1	52,7
N513+Desamidação	93,8	93,0
N516+Desamidação	29,6	29,6
N539+Desamidação	87,4	88,4
N629+Desamidação	2,5	2,4
N652+Desamidação	1,1	1,1
S149+Fosforilação	43,9	41,7
S153+Fosforilação	62,9	61,4
M212+Oxidação	94,1	95,9
M404+Oxidação	11,1	10,7
M436+Oxidação	15,5	15,8
M472+Oxidação	2,5	2,6
W479+Oxidação	1,9	1,9
W504+Oxidação	1,0	1,0
M525+Oxidação	42,6	44,3
M636+Oxidação	11,4	11,7
W696+Oxidação	0,4	0,4

Exemplo 3: Estudos de desamidação adicionais

[00234] Os vetores ilustrativos foram avaliados quanto à desamidação conforme descrito no Exemplo 1 para AAV8 e AAV9. AAV1 se encaixa no Clade A, AAV7 se encaixa no Clade D, enquanto AAV3B, AAV5, AAVrh32/33 e AAV4 estão fora de qualquer um dos clades AF.

A. Desamidação de AAV1

Os vetores AAV1 foram avaliados quanto à desamidação conforme descrito no Exemplo 1 para AAV8 e AAV9. Os resultados mostram que os vetores contêm quatro aminoácidos altamente desamidados (N57, N383, N512 e N718), com base na numeração da sequência primária do AAV1 VP1 reproduzido na SEQ ID NO: 1.

Modificação de AAV1								
Enzima		Tripsina	Tripsina	Tripsi na	Tripsi na	Tripsi na	Tripsi na	Tripsi na
% de cobertura	N+1	97,6	84,2	92,4	87,4	90,4	85,2	88,9
N35+Desamidação	Q	9,5						
~N57+Desamidação	G	100,0	100,0	100,0	92,0	89,3	86,1	85,5
~N94+Desamidação	H				2,3	3,7	4,9	2,2
N113+Desamidação	L		5,6					
~N214+Desamidação	N				0,9	0,4	1,0	0,7
~N223+Desamidação	A	21,4		25,9				
N227+Desamidação	W	4,9		3,1				
~N253+Desamidação	H		29,7					
Q259+Desamidação	I	24,6		14,2				
~N269+Desamidação	D			21,6			5,2	
~N271+Desamidação	H	27,7						
N286+Desamidação	R	5,4		5,2				
~N302+Desamidação	NNN	43,7	48,6	18,8	12,4	28,7	16,3	11,9
~N303+Desamidação	NNN		50,8	19,3				
~N383+Desamidação	G	88,5	86,9	82,5	82,1	84,6	83,4	92,3
~N408+Desamidação	N	58,2	43,2	40,5	30,1	25,7	28,3	22,8
~N451+Desamidação	Q	20,5						

Modificação de AAV1								
Enzima		Tripsina	Tripsina	Tripsi na	Tripsi na	Tripsi na	Tripsi na	Tripsi na
~Q452+Desamidação	S	1,7						
N477+Desamidação	W	4,4	3,1	39,7	1,2	1,3	1,1	1,8
~N496+Desamidação	NNN	1,1		69,9				
N512+Desamidação	G	93,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	97,3
N651+Desamidação	T	2,0	2,1	1,6	0,6			
N691+Desamidação	S			57,1				
~N704+Desamidação	Y		9,4					
N718+Desamidação	G	98,7	98,1	98,2	89,5	91,9	92,3	87,4

B. Desamidação de AAV3B

[00235] Os vetores AAV3B foram avaliados quanto à desamidação conforme descrito no Exemplo 1 para AAV8 e AAV9. Níveis elevados de desamidação são observados em quatro resíduos de asparagina, N57, N382, N512 e N718, com referência à numeração de AAV3B. Estes números são baseados no AAV3B VP1 reproduzido em SEQ ID NO: 2.

Modificação de AAV3B							
Enzima		Tripsina	Tripsina	Tripsina	Tripsina	Tripsina	Tripsina
% de cobertura	N+1	89,8	83,3	89,8	88,3	92,6	86,4
~N57+Desamidação	G	94,6	89,4	91,6	89,9	88,9	88,2
~N94+Desamidação	H		7,6	7,9	5,9	5,9	5,4
~N214+Desamidação	N					1,3	
~N223+Desamidação	S	12,1			3,4		
N227+Desamidação	W	1,6					
~N253+Desamidação	N	6,8			2,6		
~N268+Desamidação	D		1,4	3,6	5,9	2,4	
~N270+Desamidação	H			5,7	0,6	3,3	2,8
~Q259+Desamidação	I	1,5					
~N302+Desamidação	NNN	23,8	18,4	11,7	19,8	20,9	9,5
~N382+Desamidação	G	96,2	87,6	84,4	100,0	85,9	83,0
~Q465+Desamidação	A		0,8				
N477+Desamidação	W	1,2				1,3	1,5
~N512+Desamidação	G	97,2	100,0	91,5	88,2	92,9	93,2

Modificação de AAV3B							
Enzima		Tripsina	Tripsina	Tripsina	Tripsina	Tripsina	Tripsina
~N582+Desamidação	N	11,5				3,6	6,4
~Q599+Desamidação	G	2,3					1,0
N691+Desamidação	S	13,5			1,4		
N718+Desamidação	G	100,0	98,9	97,8	90,8	89,5	97,3

C. Desamidação de AAV5

[00236] Os vetores AAV5 foram avaliados quanto à desamidação conforme descrito no Exemplo 1 para AAV8 e AAV9. Níveis elevados de desamidação são observados nos resíduos N56, N347, N347 e N509. A desamidação em cerca de 1% a cerca de 35% é observada para a posição: N34, N112, N213, N243, N292, N325, N400, Q421, N442, N459 e N691. Estes números são baseados no AAV5 VP1 reproduzido em SEQ ID NO: 3.

Modificação de AAV5							
Enzima		Tripsina	Tripsina	Tripsina	Tripsina	Tripsina	Tripsina
% de cobertura	N+1	88,7	89,2	81,4	88,8	91,7	82,9
N34+Desamidação	Q	7,6					
N56+Desamidação	G	99,9	87,3	84,9	88,3	82,8	87,9
~N79+Desamidação	E				0,3		
~N93+Desamidação	H		6,3	5,8	5,5	7,7	2,9
N112+Desamidação	L	2,3					
~N213+Desamidação	A	16,5					
~N243+Desamidação	N	32,8				24,8	
~N259+Desamidação	A					2,7	
~N292+Desamidação	N	27,6				27,0	
N325+Desamidação	N	9,9					
N347+Desamidação	G	81,1	94,2	91,7	87,2	88,1	85,7
~N400+Desamidação	N	5,4	3,3	2,4	4,8	3,3	3,3
~Q421+Desamidação	N	7,0					
~N442+Desamidação	N	24,1					
~N459+Desamidação	T	12,5					
~N509+Desamidação	G	85,1	92,6	89,9	98,0	92,0	94,0
~N572+Desamidação	N		0,9	4,1	2,5	0,1	2,3
~N691+Desamidação	N	23,1		13,3	4,2	0,4	0,5

D. Desamidação de AAV7

[00237] Os vetores AAV7 foram avaliados quanto à desamidação conforme descrito no Exemplo 1 para AAV8 e AAV9. Altos níveis de desamidação são observados em N41, N57, N384 e N514. Desamidação a taxas de 1% a 25% são observadas em N66, N224, N228, N304, N499, N517, N705 e N736. Estes números são baseados no AAV7 VP1 reproduzido em SEQ ID NO: 4.

Modificação de AAV7	WL1839S
Enzima	Tripsina
% de cobertura	90,9
N41+Desamidação	95,2
~N57+Desamidação	93,9
N66+Desamidação	17,5
~N224+Desamidação	12,8
N228+Desamidação	1,8
~N304+Desamidação	26,3
~N384+Desamidação	88,1
N479+Desamidação	0,3
~N499+Desamidação	20,2
N514+Desamidação	91,1
~N517+Desamidação	11,9
N705+Desamidação	10,3
N736+Desamidação	16,0

E. Desamidação de AAVrh32.33

[00238] Os vetores AAVrh32.33 foram avaliados quanto à desamidação conforme descrito no Exemplo 1 para AAV8 e AAV9. Níveis elevados de desamidação são observados nas posições N57, N264, N292, N318. Desamidação entre 1 a 45% é observada nas posições N14, N113, Q210, N247, Q310, N383, N400, N470, N510 e N701. Estes números são baseados no rh32.33 AAV VP1 reproduzido

em SEQ ID NO: 5.

Modificação de AAVrh32.33	WL1408S
Enzima	Tripsina
% de cobertura	100
N14+Desamidação	3,0
N57+Desamidação	100,0
N113+Desamidação	1,1
Q210+Desamidação	14,8
N247+Desamidação	31,1
~N264+Desamidação	100,0
~N292+Desamidação	50,2
Q310+Desamidação	5,4
~ N318+Desamidação	92,2
N383+Desamidação	2,1
~N400+Desamidação	39,7
~Q449+Desamidação	2,9
N470+Desamidação	2,6
N498+Desamidação	0,6
~N510+Desamidação	27,3
~N701+Desamidação	6,2
N731+Desamidação	40,2

F. Desamidação de AAV4

[00239] AAV4 foi avaliado conforme descrito anteriormente. Altos níveis de desamidação foram observados nas posições 56 e 264. Outras posições com altos níveis de desamidação podem incluir as posições 318 e 546.

Modificação de AAV4	CS1227L	CS1227L	CS1227L
Enzima	Tripsina	Quimotripsina	Combinado*
% de cobertura	84,3	85,1	
~Q35+Desamidação		0,3	0,3
~N56+Desamidação	97,2	96,9	97,0
N112+Desamidação	11,6	9,8	10,7
~N247+Desamidação	28,3	29,4	28,9
~N264+Desamidação	97,0	97,3	97,1
~N292+Desamidação	27,5	Faltando ²	27,5
N318+Desamidação	Faltando ¹	97,0	97,0
N358+Desamidação	Faltando ¹	2,1	2,1
~N375+Desamidação	Faltando ¹	12,4	12,4
~N401+Desamidação	34,9	29,5	32,2
N464+Desamidação	34,6	32,2	33,4
~N467+Desamidação	7,2	8,7	7,9
N471+Desamidação	5,9	7,7	6,8
~Q481+Desamidação	3,7		3,7
Q489+Desamidação	1,4	0,8	1,1
N535+Desamidação	38,2	Faltando ²	38,2
~N546+Desamidação	Faltando ¹	93,6	93,6
~N585+Desamidação	Faltando ¹	23,9	23,9
Q606+Desamidação		0,8	0,8

¹Não coberto por tripsina

² Não coberto por quimotripsina

*Se resíduo observado em ambas as preparações, a média foi tomada. Se o resíduo estava em uma preparação, apenas essa preparação foi usada.

[00240] As preparações de tripsina e quimotripsina são relatadas separadamente. No entanto, certos resíduos são perdidos pela tripsina ou quimotripsina com base na sequência e peptídeos obtidos. Onde o resíduo é observado em ambas as preparações, a desamidação é

consistente, então a média não deve ser muito diferente.

EXEMPLO 4: Mapeamento de um epítopo de neutralização específico do vírus 9 adenoassociado

[00241] Neste estudo, procuramos identificar epítomos neutralizantes em AAV9, que ainda não foram avaliados por esta abordagem de mapeamento de epítomos. É importante ressaltar que AAV9 está sendo administrado por via intravenosa na clínica para uma série de indicações cardíacas, musculoesqueléticas e do sistema nervoso central (Bish LT, et al. *Hum Gene Ther.* 2008; 19(12):1359-68; Foust KD, et al. *Nature Biotechnology.* 2009; 27(1):59-65; Kornegay JN, et al. *Molecular Therapy.* 2010; 18(8):1501-8), mais notavelmente para atrofia muscular espinhal (Mendell JR, et al. *N Engl J Med.* 2017; 377(18):1713-22). Aqui, relatamos o complexo AAV-Ab de mais alta resolução reconstruído até agora: uma estrutura de 4,2Å de AAV9 em complexo com o potente NAb PAV9.1. Através do uso de troca de sorotipo, substituição de alanina e mutações pontuais adicionais, validamos o epítopo de PAV9.1 e demonstramos a capacidade dos mutantes resultantes de interferir significativamente com a ligação e neutralização de PAV9.1. No entanto, este impacto na capacidade de ligação e neutralização de PAV9.1 foi significativamente reduzido ou não foi observado quando testamos mutantes contra um painel de amostras policlonais de uma variedade de fontes. Este resultado sugere que embora este epítopo possa desempenhar um papel na neutralização da transdução de AAV em algumas circunstâncias, a mutação direcionada de uma maior amplitude de epítomos neutralizantes será necessária para projetar um novo capsídeo capaz de escapar do repertório de NAb's responsáveis por bloquear a transdução de AAV.

A. Materiais e Métodos

1. Geração de hibridoma

[00242] Os camundongos Balb/c receberam até cinco imunizações

do vetor AAV9. Colhemos e fundimos os esplenócitos. ProMab Biotechnologies, Inc. (Richmond, CA) gerou os sobrenadantes clonais de acordo com o protocolo de desenvolvimento de hibridoma de anticorpo monoclonal de camundongo padrão da empresa. Trinta sobrenadantes foram submetidos à triagem para reatividade de AAV9 por ELISA e para sua capacidade de neutralizar AAV9 por ensaio de NAb. Obtivemos mAb PAV9.1 purificado após triagem a uma concentração de 3 mg/mL.

2. ELISA de capsídeo de AAV

[00243] As microplacas de alta ligação de poliestireno Corning foram revestidas com 1×10^9 GC/poço de AAV diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e mantidas durante a noite a 4°C. Após descartar a solução de revestimento, bloqueamos as placas com albumina de soro bovino (BSA) a 3% em PBS por 2 horas em temperatura ambiente seguido de uma lavagem tripla de 300 µL de PBS + Tween a 0,05%. Em seguida, incubamos o sobrenadante do hibridoma, mAb purificado, soro ou plasma (diluído em BSA a 0,75% em PBS) a 37°C por 1 hora, seguido por uma lavagem tripla de 300 µL de PBS + Tween a 0,05%. Em seguida, detectamos amostras de camundongos usando 1:10.000 IgG HRP de cabra anticamundongo (diluído em 0,75% de BSA em PBS; cat. 31430; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a 37°C por 1 hora seguido por uma lavagem tripla de 300 µL de PBS + Tween a 0,05%. As amostras de primatas humanos e não humanos foram então detectadas usando 1:10.000 (diluído em PBS) de biotina-SP de cabra anti-igG humana (cat. 109-065-098, Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA) à temperatura ambiente durante 1 hora, seguida por uma lavagem tripla de 300 µL de PBS + 0,05% de Tween e 1:30.000 (diluído em PBS) de estreptavidina não conjugada (cat. 016-000-084, Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA) à temperatura ambiente durante 1 hora (seguida de lavagem

3x com 300 µL de PBS + Tween a 0,05%). Desenvolvemos todos os ELISAs com tetrametilbenzidina.

3. Ensaios de anticorpos neutralizantes

[00244] Foram realizados ensaios NAb conforme descrito anteriormente (Calcedo R, et al. *J Infect Dis.* 2009; 199(3):381-90) com algumas modificações. Usamos células HEK293 semeadas a uma densidade de 1e5 células/poço em placas revestidas com poli-lisina, de fundo transparente e de parede preta (cat. 08-774-256, Fisher Scientific Company, Hampton, NH). Usando uma multiplicidade de infecção de 90 wtAd5/célula, utilizamos uma solução de trabalho de 4e10GC/mL AAV9.Vetor CMV.LacZ para atingir uma concentração final de 2e9GC/poço. Medimos a bioluminescência com o SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), seguindo o protocolo do fabricante. Para qualquer amostra, definimos o título de NAb como a última diluição na qual a transdução de AAV foi reduzida em > 50% na presença da amostra em comparação com a transdução de WT.AAV na presença do controle ingênuo. Realizamos experimentos de transdução HEK293 conforme descrito acima, mas retivemos os soros neutralizantes.

4. Geração de Fab e complexação de AAV-Fab

[00245] O Fab PAV9.1 (0,211 mg/mL) foi gerado usando um kit de preparação Pierce Fab (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, complexamos o Fab PAV9.1 com o vetor AAV9 a uma razão de 600 Fab: 1 capsídeo AAV9 (ou 10 Fab: 1 sítio de ligação potencial) à temperatura ambiente por 30 minutos.

5. Preparação de amostra Cryo-EM, aquisição de dados e reconstrução complexa

[00246] *Preparação da amostra:* Aplicamos 3µL de complexo PAV9.1-AAV9 a uma grade de carbono holey recém-lavada e com

descarga luminosa. Após secar por 3 a 4 segundos com papel de filtro Whatman #1 a 22°C e 95% de umidade relativa, congelamos rapidamente a grade em etano líquido usando um Vitrobot Mark IV (FEI). Em seguida, aplicamos um único blot de 3 a 4 segundos com papel de filtro Whatman a 22°C em 95% de umidade relativa. Após o congelamento, as grades foram armazenadas em nitrogênio líquido. Em seguida, transferimos as grades para um microscópio eletrônico FEI Talos Arctica operando a 200kV e equipado com uma câmera de detecção direta de elétrons Gatan K2 Summit (Gatan, Pleasanton, EUA).

[00247] *Aquisição de dados:* Os dados foram adquiridos por meio do software SerialEM (Mastronarde DN. *J Struct Biol.* 2005; 152(1):36-51). As imagens foram capturadas com uma ampliação nominal de 22.000x (correspondendo a um tamanho de pixel calibrado de 0,944 Å) e uma taxa de dose de 2,21 elétrons/Ångstrom quadrado/s com uma faixa de desfoque de 1,0-2,0 µm (Rohou A. e Grigorieff N. *Struct Biol.* 2015; 192(2):216-21). Para cada exposição, gravamos uma pilha de filmes fracionada por dose de 60 quadros no modo de super-resolução por um total de 12 segundos. Os frames do filme foram alinhados usando o programa "alignframes" dentro do pacote de software IMOD (Kremer JR, et al. *J Struct Biol.* 1996; 116(1):71-6).

[00248] *Coleta e processamento de dados:* Extraímos manualmente todas as imagens de partículas de cada uma das micrografias e as processamos usando o programa e2boxer disponível no pacote EMAN2 (Tang G, et al. *J Struct Biol.* 2007; 157(1):38-46). As partículas em caixa foram então transferidas para o programa AUTO3DEM para crioreconstrução, levando ao modelo inicial de baixa resolução (30Å) com base em 150 imagens de partículas (Yan X, et al. *J Struct Biol.* 2007; 157 (1): 73-82). O programa adotou um procedimento de geração de modelo aleatório, e aplicamos estritamente 60 eixos de simetria não

cristalográfica. Este mapa de modelo reconstruído de baixa resolução foi útil para determinar a origem da partícula, conduzindo uma orientação completa e refinando a função de transferência de contraste de todas as imagens usando AUTO3DEM. Para melhorar a qualidade do mapa reconstruído, aplicamos uma correção do fator de temperatura e visualizamos o mapa nos programas gráficos Coot e Chimera (Pettersen EF, et al. *J Comput Chem.* 2004; 25(13):1605-12; Emsley P and Cowtan K. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004; 60(Pt 12 Pt 1):2126-32). Usamos um mapa corrigido para fator de temperatura 150 para encaixe e interpretação do modelo. Extraímos um total de 3.022 partículas em caixa de 1.100 micrografias para gerar um mapa reconstruído com resolução de 4,2Å com uma correlação de camada de Fourier de 0,15. Um banco de dados VIPER foi usado para gerar o modelo AAV9-60mer ao aplicar eixos de simetria icosaédrica estrita ($T = 1$) (Carrillo-Tripp M, et al. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(Database issue):D436-42). Usando a função FIT no programa Chimera, encaixamos a cópia 60-mer do capsídeo AAV9 no mapa de densidade de elétrons crio-reconstruído. Isso produziu um coeficiente de correlação de 0,9. Visualizamos e ajustamos o modelo encaixado em Coot e Chimera para precisão. O ABodyBuilder foi usado para gerar o modelo de anticorpo, que foi então encaixado e manualmente ajustado na densidade crio-reconstruída usando Chimera (Leem J, et al. *MAbs.* 2016; 8(7):1259-1268). O modelo foi então visualizado para interpretação de AAV9 e regiões de ligação de anticorpos. Produzimos todas as figuras usando os programas Chimera e PyMOL. O programa RIVEM foi usado para criar uma representação bidimensional do roteiro (DeLano WL. *PyMOL: An Open-Source Molecular Graphics Tool.* 2002; Vol. 40:82-92). Usamos o programa RIVEM para criar uma representação bidimensional do roteiro (Xiao C e Rossmann MG. *J Struct Biol.* 2007. 158(2):182-7).

6. Construção de trans-plasmídeo mutante AAV9-PAV9.1

[00249] Foi usado um construto trans-plasmídeo interno pAAV2/9 (AAV2 rep/AAV9 cap) para mutagênese do capsídeo de AAV9. Todos os mutantes de capsídeo foram construídos usando um kit Quikchange Lightning Mutagenesis (Agilent, Santa Clara, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

7. Produção vetorial

[00250] Foram usados os vetores mutantes AAV9.CMV.LacZ.bGH e AAV9 via transfecção tripla em células HEK293 seguida por purificação de gradiente de iodixanol como descrito anteriormente (Lock M, et al. *Hum Gene Ther.* 2010; 21(10):1259-71). A University of Pennsylvania Vector Core tituló os vetores usando PCR quantitativa (qPCR) contra o bGH polyA, conforme descrito anteriormente (Lock M, et al. *Hum Gene Ther.* 2010; 21(10):1259-71).

8. Determinação de EC50 de mAb PAV9.1 e soro/plasma policlonal.

[00251] Foi realizado ELISA de captura de capsídeo com vetor mutante AAV9.WT ou AAV9 conforme descrito acima. Calculamos os valores de EC50 usando GraphPad Prism. Resumidamente, transformamos o log da concentração de mAb PAV9.1 em mg/mL e representamos no eixo x. Definimos a concentração de IgG no plasma de camundongo como 5mg/mL (Mink JG. Níveis de imunoglobulina sérica e heterogeneidade de imunoglobulina no camundongo. *Diss. Erasmus MC.* 1980) e em primatas não humanos e soro humano como 10 mg/mL (Gonzalez-Quintela A, et al. *Clinical and Experimental Immunology.* 2008; 151(1):42-50). A concentração de plasma/soro (em µg/mL) foi transformada em logaritmo e representada no eixo x. Definimos a absorbância máxima alcançada com cada mutante, normalizamos a absorbância para 100% e a plotamos no eixo y. Em

seguida, geramos uma curva de dose-resposta (ligação do anticorpo) usando a função "log (agonista) vs. resposta normalizada - inclinação variável" do GraphPad Prism. Finalmente, calculamos o EC50 para o mAb PAV9.1, soro policlonal ou plasma policlonal.

9. Estudos em animais

[00252] O protocolo animal foi aprovado e conduzido de acordo com os padrões do Comitê de Uso e Cuidado Institucional de Animais da Universidade da Pensilvânia. Camundongos C57BL/6 machos (n = 3) receberam injeções intravenosas na veia da cauda de 1×10^{11} GC/AAV9 de camundongo. Vetores mutantes CMV.LacZ.bGH ou AAV9 com o mesmo cassete de transgene. Os animais foram sacrificados 14 dias após receberem o vetor. Os órgãos de cada animal foram divididos e congelados rapidamente em gelo seco para biodistribuição ou incorporados no composto de temperatura de corte ideal e congelados para seccionamento e coloração subsequentes para atividade β -gal.

10. Análise de biodistribuição

[00253] Foi extraído DNA de tecidos de interesse usando um kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha). Analisamos os tecidos para GCs vetoriais por qPCR contra o sinal de poliadenilação bGH conforme descrito anteriormente (Chen SJ, et al. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2013; 24(4):154-60).

11. Coloração de atividade β -gal

[00254] As seções congeladas foram fixadas com glutaraldeído a 0,5% em PBS por 10 minutos a 4°C e posteriormente coradas para atividade β -gal. Após a lavagem em PBS, incubamos as seções em 1 mg/ml X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo) em 20 mM de ferrocianeto de potássio, 20 mM de ferricianeto de potássio, 2 mM de $MgCl_2$ em PBS (pH ~ 7,3) e tecidos mantidos durante a noite a 37°C. Após contracoloração das seções com Nuclear Fast Red (Vector Laboratories), foram desidratadas com etanol e xileno, seguido de

lamínula.

B. Resultados

1. O NAb PAV9.1 é potente e específico para AAV9

[00255] O primeiro objetivo foi identificar um novo e potente NAb anti-AAV9 para mapeamento de epítomos. Rastreamos um painel de 30 clones de hibridoma quanto à reatividade de AAV por um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) contra uma série de sorotipos e para neutralização de AAV9 por um ensaio de NAb. Selecionamos o anticorpo monoclonal PAV9.1 deste painel devido à sua especificidade para AAV9 (FIG. 12A). PAV9.1 reconheceu apenas o capsídeo intacto por ELISA (FIG. 12A) e não reconheceu AAV por Western blot (dados não mostrados), sugerindo que PAV9.1 identifica um epítopo conformacional na superfície do capsídeo. Isto está em contraste com os clones restantes, que mais amplamente ligaram o painel de AAVs incluídos na triagem e também reconheceram AAV por Western blot (dados não mostrados). Num ensaio de NAb, o mAb PAV9.1 purificado mostrou um título de NAb eficaz de 1: 163.840, indicando que este novo anticorpo anti-AAV9 é um neutralizador potente de AAV9. Novamente, isso foi em contraste com os outros clones rastreados pelo ensaio NAb, nenhum dos quais foi capaz de neutralizar a transdução de AAV.

2. Crio-reconstrução de AAV9 em complexo com PAV9.1

[00256] Após complexação de AAV9 com fragmentos de ligação ao antígeno PAV9.1 (Fab), capturamos 1.100 imagens, encaixotamos 3.022 partículas e geramos uma reconstrução de 4,2Å do complexo usando AUTO3DEM. Observamos a densidade de Fab se estendendo a partir do eixo triplo compreendido por HVRs IV, V e VIII, e decorando a face interna das saliências de três vezes com a densidade de elétrons Fab centrada perpendicularmente (FIG. 13A e FIG. 13B). Esta região era composta principalmente de resíduos carregados, que favorecem

fortes interações eletrostáticas entre monômeros VP relacionados com três vezes, bem como com receptores e mAbs. Uma única molécula Fab foi ligada e estendida através de duas das três saliências em cada eixo de três vezes, bloqueando a ligação de moléculas Fab adicionais nesses sítios devido ao impedimento estérico (FIG. 13C). A região das regiões determinantes complementares de PAV9.1 Fab (CDRs) em contato com as saliências de três vezes tinha uma densidade média de níveis de 2,5 sigma, que é comparável às densidades relatadas para outras reconstruções AAV-Fab. Observamos uma densidade da região constante do Fab de PAV9.1 em níveis de aproximadamente 0,8 sigma, ou aproximadamente um terço da densidade observada para a região de contato dos CDRs de PAV9.1, correspondendo a uma única ocupação de Fab por eixo triplo. As CDRs PAV9.1 Fab interagiram diretamente com os resíduos 496-NNN-498 (HVR V) e 588-QAQAQT-593 (HVR VIII) (FIG. 13C e FIG. 13D). PAV9.1 ligando-se adicionalmente aos resíduos G455 e Q456 (HVR IV), T494, Q495 e E500 (HVR V), e N583, H584, S586 e A587 (HVR VIII), que não participam de interações eletrostáticas com PAV9.1, mas pode fornecer estabilidade estrutural a esta região do capsídeo após a ligação de Fab (Tabela 3). As CDRs da cadeia pesada interagiram com o HVR V, enquanto as CDRs da cadeia leve interagiram com o HVR VIII do mesmo monômero VP3 (FIG. 13C).

Tabela 3: Resíduos de epítipo Fab PAV9.1

Resíduos de contato	
HVR	Posição
V	496-NNN-498
VII	588-QAQAQT-593
Resíduos Ocluídos	
HVR	Posição
IV	G455, Q456

V	T494, Q495, E500
VIII	N583, H584, S586, A587

[00257] Com base na pegada PAV9.1 (FIG. 13D, Tabela 3), selecionamos dois conjuntos de cinco resíduos para mutagênese focada para validação de epítipo e design de mutante de escape: 586-SAQAQ-590 e 494-TQNNN-498. Escolhemos os resíduos 586-SAQAQ-590 porque este sítio contém um alto grau de diversidade de sequência (FIG. 12B). O motivo selecionado contém resíduos identificados pela reconstrução por estarem interagindo diretamente com PAV9.1, bem como resíduos identificados como ocluídos, permitindo a interrogação da junção entre os resíduos ligados e ocluídos. Estes resíduos também foram implicados na neutralização de epítipos para AAV1, AAV2 e AAV8, permitindo a comparação dos resíduos do epítipo AAV9 com aqueles publicados anteriormente (Tseng YS e Agbandje-McKenna M. *Front Immunol.* 2014; 5:9). Finalmente, restringir a mutagênese do HVR VIII a esses cinco resíduos aumentou a probabilidade de que o capsídeo toleraria mutações maiores, pois esse motivo tem interações mais limitadas com regiões que contribuem para a integridade estrutural do capsídeo. Apesar de PAV9.1 ser específico para AAV9, o motivo HVR V 496-NNN-498 identificado como interagindo com PAV9.1 é altamente conservado entre os sorotipos (FIG. 12B). No entanto, o trabalho de exibição de fago não publicado (dados não mostrados) sugeriu o envolvimento de um motivo rico em asparagina no epítipo de PAV9.1; assim, selecionamos este motivo para mutagênese. Também adicionamos os resíduos 494-TQ-495 para interrogar novamente a junção entre os resíduos ligados e ocluídos e porque eles foram previamente implicados nas interações AAV-Ab (Tseng YS and Agbandje-McKenna M. *Front Immunol.* 2014; 5:9).

3. Mutações baseadas em epítipo reduzem

marcadamente a ligação AAV9-PAV9.1

[00258] Primeiro, foram gerados mutantes de troca de sorotipo 586-SAQAQ-590 usando mutagênese dirigida ao sítio. Com base no conhecimento de que PAV9.1 reconhece especificamente AAV9 e que a sequência de aminoácidos e a conformação estrutural neste sítio variam amplamente entre os sorotipos de AAV, escolhemos trocas completas com os resíduos correspondentes de sorotipos representativos do Clade B (AAV2), Clade C (AAV3B) e Clade D/E (AAV8/rh10) (Tabela 4).

Tabela 4: Estratégia de mutagênese de resíduos de epítipo PAV9.1 HVR VIII

Vetor	Sorotipo	Clade	586	587	588	589	590
AAV9.WT	AAV9	F	S	A	Q	A	Q
AAV9.AAQAA	Tipo AAV9	N/A	A	A	Q	A	A
AAV9.QQNAA	AAV8/rh10	D/E	Q	Q	N	A	A
AAV9.SSNTA	AAV3B	C	S	S	N	T	A
AAV9.RGNRQ	AAV2	B	R	G	N	R	Q
AAV9.RGHRE	Tipo AAV2	N/A	R	G	H	R	E

[00259] Ao fazer isso, esperávamos maximizar a probabilidade de uma montagem eficiente do capsídeo e, ao mesmo tempo, maximizar a variação natural neste local. Geramos dois mutantes adicionais, AAV9.AAQAA (mais convergente do que AAV9.QQNAA) e AAV9.RGHRE (mais divergente do que AAV9.RGNRQ), para determinar (1) a mutação mínima necessária para interromper as interações PAV9.1 e (2) a interrupção máxima que poderíamos introduzir. AAV9.AAQAA, AAV9.QQNAA, e AAV9.SSNTA produziram vetores de título equivalente a AAV9.WT; no entanto, títulos de AAV9.RGNRQ e AAV9.RGHRE foram reduzidos duas a três vezes em relação ao AAV9.WT (dados não mostrados). Determinamos a ligação do mAb PAV9.1 a cada capsídeo mutante em comparação com

AAV9.WT por ELISA de captura (FIG. 14A). O EC50, ou a concentração de mAb PAV9.1 necessária para atingir a metade da ligação máxima, de PAV9.1 para cada mutante de troca foi acentuadamente aumentada (indicativo de ligação reduzida do capsídeo) em relação ao EC50 para AAV9.WT. Este resultado validou os resultados do mapeamento de epítomos, indicando que os resíduos 586-SAQAQ-590 estão envolvidos nas interações AAV9-PAV9.1. Os aumentos de EC50 variaram de 45 vezes (AAV9.AAQAA) a quase 300 vezes (AAV9.RGHRE) (Tabela 5); o aumento em EC50 se correlacionou diretamente com o grau de divergência de sequência de AAV9 neste local. A única exceção foi AAV9.RGNRQ, que compartilha Q590 com AAV9, contribuindo potencialmente para uma ligação PAV9.1 mais forte do que a esperada pela análise de sequência.

Tabela 5: Sumário das características do mutante do capsídeo AAV9 após avaliação *in vitro*

	REDUÇÃO EM VEZES TÍTULO NA _b	AUMENTO EM VEZES EC50	TRANSDUÇÃO WT POR CENTO
WT	1	1	100
AAQAA	16	45	27
QQNAA	128	124	53
SSNTA	512	264	58
RGNRQ	8	96	233
RGHRE	2048	294	60
TQAAA	16	15	50
SAQAN	16	40	76
SAQAA	4	20	54

[00260] Como as mutações S586A e Q590A em AAV9.AAQAA foram suficientes para interromper a ligação de PAV9.1 de AAV9, em seguida determinamos a alteração mínima necessária para induzir essa interrupção. Introduzimos uma mutação pontual em uma dessas

posições por substituição de alanina ou uma substituição mais conservadora (S-> T ou Q-> N). Mutações para alanina ou treonina em S586 não reduziram significativamente a ligação de PAV9.1, enquanto uma única mutação para alanina ou asparagina em Q590 foi suficiente para interromper o reconhecimento do capsídeo por PAV9.1 (FIG. 14C). Este resultado indica que a posição 590 é crítica para o reconhecimento PAV9.1 do capsídeo AAV9.

[00261] Em seguida, foi interrogado o motivo 494-TQNNN-498 de HVR V para sua inclusão no epítipo PAV9.1 usando a mesma estratégia mutagênica: conjuntos mutagênicos de resíduos em aminoácidos evolutivamente conservados ou apenas alanina. Como o 496-NNN-498 é conservado em todos os sorotipos testados, usamos apenas a substituição de alanina para este segmento de resíduos; para 494-TQ-495, sofremos mutação para AA, bem como GQ e TD, a fim de representar a diversidade que ocorre naturalmente neste local. Apesar da especificidade de PAV9.1 para AAV9 e da diversidade neste local, AAV9.GQNNN, AAV9.TDNNN e AAV9.AANNN não aumentou o EC50 de PAV9.1 para AAV (FIG. 14B). Isso confirma a conclusão do mapa de crio-reconstrução de que o local 494-TQ-495 não participa do epítipo PAV9.1. No entanto, a mutação AV9.TQAAA aumentou o PAV9.1 EC50 15 vezes, indicando que, apesar do fato de que 496-NNN-498 é um motivo conservado, ele ainda desempenha um papel importante na ligação específica de AAV9 de PAV9.1. Finalmente, geramos mutantes de combinação de HVR V e mutações mínimas de HVR VIII (AAV9.TQAAA/SAQAN, AAV9.TQAAA/SAQAA); os valores de EC50 de PAV9.1 para estes mutantes de combinação mostram que os efeitos da alteração dos motivos no epítipo PAV9.1 são aditivos (FIG. 14D e FIG. 14E).

4. Mutações baseadas em epítipos modulam a transdução de AAV9

[00262] Para avaliar a capacidade dos novos mutantes de AAV9 para evitar NAb, mantendo as propriedades de AAV9.WT, primeiro avaliamos a transdução *in vitro* e *in vivo*. A maioria das mutações resultando em uma redução na ligação de PAV9.1 também reduziu a eficiência de transdução em células HEK293, com a notável exceção de AAV9.RGNRQ, que melhorou a transdução do vetor em 2,3 vezes (FIG. 15A). Esta melhoria pode ter sido devido à introdução de R586 e R589 (R585 e R588 pela numeração AAV2 VP1), dois resíduos responsáveis pelo reconhecimento da heparina por AAV2, que tem um desempenho significativamente melhor do que AAV9 *in vitro* na maioria das linhagens celulares provavelmente devido à inclusão destes motivos de ligação à heparina (Ellis BL, et al. *Virology*. 2013; 10(1):74) provavelmente devido à inclusão desses motivos de ligação à heparina. No entanto, AAV9.RGHRE, que compartilha R586 e R589 com AAV9.RGNRQ, não exibiu eficiência de transdução semelhante a AAV2, sugerindo o envolvimento de outros fatores. AAV9.AAQAA demonstrou a maior redução na eficiência de transdução, indicando que S586 e/ou Q590 são resíduos essenciais para a transdução de AAV9 *in vitro*.

5. Mutações baseadas em epítomos eliminam a neutralização de PAV9.1

[00263] Em seguida, foram examinados os efeitos das mutações no título neutralizante de PAV9.1. Mutante AAV9.AANNN, que não afeta a ligação de PAV9.1, não afetou o título de neutralização (FIG. 15B e FIG. 15I). No entanto, todos os vetores mutantes que aumentaram o PAV9.1 EC50 reduziram o título neutralizante efetivo de PAV9.1. AAV9.RGHRE, que aumentou mais dramaticamente a EC50 em quase 300 vezes, reduziu o título de NAb de PAV9.1 em pelo menos 2.048 vezes (de 1:163.840 a <1:80, a diluição mais baixa testada) (FIG. 15C - FIG. 15K). Vetores mutantes que aumentaram o EC50 de forma mais modesta, como AAV9.SAQAN, reduziram o título de NAb eficaz de PAV9.1 em

um grau menor (FIG. 15L). No geral, observamos uma forte correlação entre a redução na ligação de PAV9.1 medida por EC50 e a redução no título de NAb eficaz (FIG. 16). Uma exceção notável foi novamente AAV9.RGNRQ, que reduziu o título de NAb em apenas oito vezes (a segunda redução mais baixa), apesar de ser o quarto mutante mais eficaz na redução da ligação de PAV9.1.

6. O epítipo PAV9.1 é importante para o tropismo hepático AAV9

[00264] Para avaliar a viabilidade desses mutantes como vetores de terapia genética semelhantes a AAV9, injetamos camundongos C57BL/6 por via intravenosa com cópias do genoma 1e11 (GC)/camundongo de AAV9.WT.CMV.LacZ ou os vetores mutantes AAV9 que reduziram a atividade de PAV9.1 (n = 3 por grupo). A biodistribuição das amostras de tecido do dia 14 indicou uma redução na transdução do fígado para todos os mutantes. AAV9.QQNAA teve desempenho mais semelhante ao AAV9.WT com 17 vezes menos GC/μg DNA, enquanto AAV9.RGHRE transduziu o fígado de forma menos eficiente com 1.110 vezes menos GC/μg de DNA (FIG. 17A). No entanto, em outros órgãos, como coração e cérebro, a maioria dos mutantes é mantida perto de AAV9. Níveis de transdução de WT, com exceção dos mutantes semelhantes a AAV2, AAV9.RGNRQ e AAV9.RGHRE. Embora essas diferenças nos GCs do tecido não tenham sido estatisticamente significativas, as tendências observadas sugerem que esses resíduos são importantes para o tropismo do fígado AAV9, mas desempenham um papel menor na transdução de outros tecidos, já que a maioria dos mutantes exibiu um fenótipo de "des-direcionamento do fígado". Esses resultados refletiram-se ainda na expressão da beta-galactosidase (β-gal) no fígado e no coração; a atividade β-gal do fígado foi maior nos animais que receberam AAV9.WT, enquanto a atividade β-gal do coração foi semelhante entre

AAV9.WT e a maioria dos mutantes (com exceção dos mutantes do tipo AAV2) (FIG. 17B e FIG. 17C).

[00265] Foram repetidos esses experimentos com uma dose dez vezes maior (1×10^{12} GC/camundongo) para um subconjunto representativo de vetores mutantes AAV9. Embora as diferenças de transdução não tenham alcançado significância com esta dose, as tendências de tropismo do tecido foram consistentes com aquelas observadas na dose mais baixa, particularmente para amostras de coração e músculo (FIG. 17D). Novamente, esses resultados foram refletidos na atividade β -gal em seções histológicas de fígado, coração e músculo (FIG. 17E - FIG. 17G).

7. Mutações baseadas em epítomos em AAV9 não afetam significativamente a ligação ou neutralização por plasma policlonal ou soro

[00266] Em seguida, foi avaliada a capacidade dos vetores mutantes baseados no epítopo PAV9.1 para evitar a ligação e a neutralização por plasma ou soro policlonal. Primeiro utilizamos plasma de camundongos C57BL/6 previamente injetados por via intravenosa com AAV9.WT ($7,5 \times 10^8$ ou $7,5 \times 10^9$ GC/camundongo, $n = 6$ por grupo). Determinamos a diluição de plasma necessária para atingir metade da ligação máxima. A ligação do plasma de camundongos de baixa dose a vetores mutantes era quase indistinguível da ligação a AAV9.WT (FIG. 18A - FIG. 18C). Em contraste, observamos diferenças significativas na EC₅₀ do plasma de camundongos de alta dose para um subconjunto de mutantes, mais notavelmente AAV9.RGNRQ, em relação ao EC₅₀ para AAV9.WT (FIG. 18B - FIG. 18D). Apesar de um aumento médio de duas vezes no EC₅₀ de plasma de camundongo de alta dose para AAV9.RGNRQ, não observamos uma redução do título de NAb efetivo do plasma neste mutante (dados não mostrados).

[00267] Para determinar se esta tendência no aumento de EC₅₀ era

verdadeira para amostras de primatas não humanos, obtivemos soros de um painel de seis macacos que receberam o vetor AAV9 ou um novo vetor intimamente relacionado ao AAV9 com a mesma sequência VP3 (diferença de 2 aminoácidos na região VP1 não estrutural). Confirmamos que os macacos tinham títulos de NAb contra AAV9 de $<1:5$ (definido como negativo para NAb) antes da administração. Embora tenhamos observado alguma variação nos EC50s do soro de cada animal para vetores mutantes quando comparados aos EC50 para AAV9.WT, nenhuma tendência clara de aumento ou diminuição da ligação emergiu com base na identidade do mutante (FIG. 19A e FIG. 19C). Ao testar soros de macacos com títulos de NAb pré-existentes contra AAV9 (atribuídos a uma infecção anterior de AAV), observamos pouca ou nenhuma variação na EC50 dos soros para o painel de mutantes de AAV9 (FIG. 19B e FIG. 19D). Isto estava em total contraste com as variações observadas no EC50 de soros injetados, sugerindo diferenças fundamentais entre o repertório de epítomos anti-AAV relevante do soro gerado em resposta à infecção por AAV e administração do vetor AAV. Além disso, o aumento em EC50 de soros de primatas não humanos injetados para AAV9.RGNRQ não diminuiu o título de NAb eficaz dos soros para AAV9.RGNRQ (dados não mostrados).

[00268] Finalmente, foram avaliadas amostras de soro positivas para NAb de quatro doadores humanos normais para ligação a AAV9. Vetores WT e mutantes. Como foi o caso para as amostras de soro de primata não humano não injetadas e positivas para NAb, todas as quatro amostras de doadores humanos normais positivas para NAb demonstraram variação mínima em EC50 para vetores mutantes AAV9 versus WT (FIG. 20A - FIG. 20B). Como esperado, a falta de alterações em EC50 para os vetores mutantes se traduziu em uma falta de redução no título de NAb dos soros para vetores mutantes AAV9 (dados não

mostrados).

C. Discussão

[00269] Aqui, relatou-se a crio-reconstrução de AAV9 em complexo com o mAb PAV9.1 altamente potente e específico. O epítipo determinado para PAV9.1 se sobrepõe amplamente às regiões epitópicas de outros NAbs de AAV isolados de hibridomas de camundongo, nomeadamente ADK8 (AAV8; 586-LQQQNT-591), E4E (AAV1; 492-TKTDNNN-498), 5H7 (AAV1; 496 -NNNS-499, 588-STDPATGD-595) e C37 (AAV2; 492-SADNNNS-498, 585-RGNRQ-589) (Gurda BL, et al. *J Virol.* 2012; 86(15):7739-51; Gurda BL, et al. *J Virol.* 2013; 87(16):9111-24; Tseng YS, et al. *J Virol.* 2015; 89(3):1794-1808). Assim, apesar do grande grau de sequência e variações estruturais entre os sorotipos em HVR V e VIII, esta descoberta sugere que as protrusões de três vezes podem ser um sítio significativo de neutralização de AAV9 como é para outros sorotipos. Descobertas anteriores sobre o repertório de NAbs dirigidos contra outros capsídeos de AAV podem, portanto, ser aplicáveis a AAV9. Embora os vários epítopos neutralizantes mapeados mostrem sobreposição, os ângulos de ligação e as orientações dos NAbs variam significativamente. Quando ligado a AAV9, PAV9.1 se estende até o centro do eixo triplo de simetria, limitando estericamente a ocupação a 20 partículas Fab; em contraste, os mAbs aumentados contra outros sorótipos se ligam na parte superior ou se voltam para fora do eixo triplo, permitindo uma maior ocupação. Estudos identificaram HVR V e VIII como regiões antigênicas compartilhadas entre os sorotipos, incluindo AAV2 (em complexo com C37B, 11Å), AAV8 (em complexo com ADK8, 18,7Å) e AAV1 (em complexo com 5H7, 23Å), que carrega a maior semelhança com a pegada de ligação de PAV9.1 para AAV9 (Gurda BL, et al. *J Virol.* 2012; 86(15):7739-51; Gurda BL, et al. *J Virol.* 2013; 87(16):9111-24; Tseng YS, et al. *J Virol.* 2015; 89(3):1794-1808). Portanto, a estrutura

relatada aqui é semelhante às estruturas de baixa resolução relatadas anteriormente para outros sorotipos de AAV.

[00270] As trocas de sorotipo HVR VIII conferiram vários graus de ligação e evasão de neutralização aos seus vetores mutantes correspondentes. A troca desta região com o motivo RGHRE baseado em AAV2, o mutante mais divergente da sequência WT.AAV9, eliminou a neutralização PAV9.1 em todas as diluições testadas. Assim, a engenharia de apenas cinco aminoácidos no capsídeo pode evitar um Nab monoclonal. Na verdade, a mudança mínima necessária para reduzir significativamente a atividade de PAV9.1 foi uma única substituição de aminoácido, mesmo com um aminoácido conservado levando à ablação da ligação e da neutralização. Mutações no motivo NNN em HVR V reduziram a capacidade de PAV9.1 de se ligar e neutralizar AAV9, apesar de ter alta conservação entre os sorotipos, indicando que também é parte integrante do epítipo PAV9.1.

[00271] Foi observada uma forte correlação entre uma redução na ligação de PAV9.1 a um determinado mutante AAV9 e sua capacidade de bloquear a transdução desse mutante *in vitro*, sugerindo que a força relativa de um NAb para AAV está correlacionada com a capacidade neutralizante do NAb. No entanto, dados de nosso laboratório e de outros sugerem que o título de anticorpo de ligação contra AAV nem sempre é um bom preditor do título de NAb de um indivíduo, pois alguns indivíduos têm títulos de ligação moderados contra AAV, mas são negativos para NAb (Falese L, et al. *Gene Ther.* 2017; 24(12):768-78; Huttner NA, et al. *Gene Ther.* 2003;10(26):2139-47) (dados não publicados). Apesar dessas descobertas, os critérios de exclusão de alguns ensaios clínicos incluem não apenas o título de NAb, mas também o título de ligação (George LA, et al. *Blood.* 2017; 130(Suppl 1):604; Mendell JR, et al. *N Engl J Med.* 2017; 377(18):1713-22). Portanto, os estudos de mapeamento de epítopos são críticos para

identificar as características dos epítomos de ligação e determinar se eles compartilham quaisquer semelhanças com os epítomos neutralizantes. Motivos compartilhados sugeririam que a força de ligação, ao invés de interações com resíduos específicos, desempenha um grande papel na neutralização de AAV, permitindo assim que os pesquisadores se concentrem simplesmente na redução da ligação de NAb. Motivos díspares, no entanto, sugerem que a neutralização é mais uma função da localização da ligação do que da força da ligação e indicam que os pesquisadores devem se concentrar na ablação da ligação do NAb a essas regiões únicas.

[00272] Embora as mutações nos vetores AAV9 reduzam drasticamente a ligação e a neutralização por um anticorpo monoclonal PAV9.1 purificado, essas mutações não evitam significativamente a ligação ou neutralização por anticorpos policlonais de soro ou plasma de camundongos, macacos ou doadores humanos que foram previamente expostos a AAV. Mais notavelmente, o plasma de camundongos que receberam a dose intravenosa mais alta do vetor AAV9 ligou-se ao mutante RGNRQ cerca de duas vezes menos eficientemente do que o vetor WT.AAV9; esta alteração foi muito mais modesta do que a redução de 50 vezes observada com o mAb PAV9.1. Embora as mutações QQNAA, SSNTA e RGHRE tenham um impacto maior na ligação e neutralização de PAV9.1 do que a mutação RGNRQ, o plasma policlonal se ligou a esses mutantes da mesma maneira que WT.AAV9. Este resultado sugere que, embora o motivo 586-SAQAQ-590 seja um epítopo neutralizante potente e as mutações nesta região podem bloquear a atividade de PAV9.1, a atividade *in vitro* contra um mAb não prevê a atividade contra anticorpos policlonais. Talvez surpreendentemente, o mutante RGNRQ bloqueou com eficiência a ligação de anticorpos AAV9 usando as saliências de três vezes. Este resultado mostra claramente que nem todas as mutações se comportam

da mesma forma contra respostas policlonais e que um repertório maior de anticorpos utiliza esta região para ligação.

[00273] Apesar da redução na ligação policlonal, o vetor mutante RGNRQ não evitou a resposta de NAb policlonal gerada por esses camundongos em resposta à administração do vetor. Como esperado, os mutantes que não reduziram a ligação ao plasma policlonal também não escaparam da neutralização. Dado que o aumento de quase 100 vezes no EC50 de PAV9.1 para RGNRQ em relação a WT.AAV9 resultou em apenas uma diminuição de oito vezes no título de neutralização de PAV9.1, não foi surpreendente que um aumento de duas vezes no EC50 de plasma policlonal para RGNRQ não reduziu o título neutralizante. Embora os estudos mostrem que a maioria dos epítomos AAV mapeados se encontram no eixo triplo e que HVR VIII está implicado nos epítomos mapeados para a maioria dos NAbs específicos do sorotipo, ficamos surpresos ao descobrir que nenhuma das mutações testadas nesta região afetou dramaticamente a atividade policlonal (deve-se notar que os epítomos mapeados podem não ser representativos do repertório completo, já que o número total de epítomos mapeados é pequeno e a triagem exata e métodos de seleção para alguns estudos são desconhecidos).

[00274] Tse e colegas recentemente usaram uma abordagem de biblioteca para combinar os epítomos de três NAbs diferentes identificados contra AAV1 e gerar um novo capsídeo baseado em AAV1, com mais de 20 alterações de aminoácidos do AAV1 parental. Este capsídeo poderia escapar não apenas de NAbs monoclonais anti-AAV1, mas também de amostras policlonais de camundongos injetados com vetor de AAV e primatas não humanos, além de amostras policlonais de doadores humanos normais expostos a AAV (Tse LV, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114(24), E4812-21). Isso sugere que os epítomos neutralizantes podem se sobrepor após a exposição do vetor e a

infecção viral, mas esse repertório é sutilmente diverso. Em outras palavras, o número total de resíduos que requerem modificação para conferir a evasão de ligação e neutralização a AAV é mais extenso do que se pensava anteriormente. Os novos capsídeos de engenharia que podem abordar ambos os cenários podem exigir abordagens combinatórias e de alto rendimento.

[00275] Este estudo explorou se os vetores projetados para evitar uma resposta a NAb pré-existente de uma infecção AAV anterior também funcionariam em um ambiente de re-administração. As amostras policlonais para as quais os vetores mutantes AAV9 baseados em PAV9.1 demonstraram evasão mínima foram adquiridas de fontes que receberam o vetor AAV e não de fontes que foram previamente infectadas com AAV. Enquanto as amostras injetadas demonstraram curvas de ligação modestamente variáveis para o painel de mutantes AAV9, as curvas de ligação geradas por fontes virgens de vetor, mas expostas a vírus, eram semelhantes às curvas de WT.AAV9. Essas discrepâncias destacam as diferenças fundamentais entre o repertório de anticorpos AAV gerado em resposta à administração do vetor ou infecção.

[00276] Historicamente, os sujeitos ingênuos injetados com o vetor AAV geram uma resposta NAb que é específica para o vetor administrado ou limitada a sorotipos intimamente relacionados (Flotte TR, et al. *Hum Gene Ther.* 2011; 22 (10): 1239-47) (dados não publicados). A maioria dos estudos com macacos e ensaios clínicos de terapia genética mostraram resultados semelhantes (Greig JA, et al. *Vaccine.* 2016; 34(50):6323-29; Greig JA, et al. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2017; 28 (1): 39-50) (dados não publicados). Em total contraste, os sujeitos com anticorpos pré-existent para um sorotipo AAV são quase sempre soropositivos e têm NAbs contra a maioria dos outros sorotipos, mesmo aqueles que são remotamente relacionados (Calcedo R e

Wilson JM. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2016; 27(2):79-82; Flotte TR, et al. *Hum Gene Ther*. 2011; 22(10):1239-47; Harrington EA, et al. *Hum Gene Ther*. 2016; 27(5):345-53) (dados não publicados). Até à data, todos os novos mAbs AAV mapeados são específicos para um sorotipo individual e apresentam reação cruzada apenas com sorotipos intimamente relacionados (por exemplo, ligação de 5H7 a AAV1 e AAV6); nenhum mAbs AAV neutralizante isolado anteriormente recapitula as respostas mais amplas comumente vistas após a infecção AAV (Gurda BL, et al. *J Virol*. 2013; 87(16):9111-24). Portanto, estudos adicionais são necessários para identificar os motivos que compreendem epítomos amplamente neutralizantes relevantes para a imunidade pré-existente, determinar se os epítomos se sobrepõem aos epítomos específicos do sorotipo e avaliar como os motivos de sobreposição conferem um fenótipo amplamente neutralizante aos NAbs.

[00277] A magnitude de uma resposta ao NAb varia amplamente entre os métodos de exposição; raramente um indivíduo com imunidade natural tem um título de NAb superior a 1:80 (humanos) ou 1:320 (macacos); em contraste, títulos de NAb > 1:1.000 podem ser facilmente alcançados em resposta à distribuição de uma dose modesta de vetor (Greig JA, et al. *Vaccine*. 2016; 34(50):6323-29; Greig JA, et al. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2017; 28(1):39-50; Greig JA, et al. *PLoS One*. 2014; 9(11):e112268). Neste estudo, os camundongos que receberam a dose de vetor mais alta resultando nos títulos de NAb mais altos tiveram variações mensuráveis na ligação do vetor mutante; isso sugere que a força de uma resposta NAb impacta a eficiência mutante. Frequentemente, os estudos visam reduzir o título de NAb de um indivíduo abaixo do limiar que interfere na transferência de genes (1:10 para administração intravenosa) (Chicoine LG, et al. *Mol Ther*. 2014; 22(2):338-47; Wang L, et al. *Hum Gene Ther*. 2011; 22(11):1389-1401).

Os capsídeos mutantes engenheirados com base em um único epítipo neutralizante que apenas confere evasão a soros de alto título não aumentaria significativamente o número de indivíduos elegíveis para receber terapia genética de AAV, pois os títulos mais baixos ainda estão acima do limiar no qual a transdução é apreciavelmente inibida.

[00278] A mutação mínima necessária para reduzir a ligação de PAV9.1 em Q590 em HVR VIII conferiu um fenótipo de des-direcionamento de fígado aos mutantes resultantes, mesmo após uma substituição conservadora de aminoácidos por asparagina. Mutações na porção HVR V do epítipo também reduziram a transdução do fígado. Esses resultados estão de acordo com observações anteriores de que esses resíduos em HVR V e VIII desempenham papéis integrais na transdução do fígado, bem como relatórios anteriores de epítopos AAV neutralizantes mapeados que mostram sobreposição com regiões essenciais para a transferência de genes (Adachi K, et al. *Nature Communications*. 2014; 5: 3075; Tseng TS, et al. *J Virol*. 2015; 89(3):1794-808). Isso sugere que seria difícil projetar um mutante que pode escapar de NABs, mantendo o perfil de transdução parental. Para algumas indicações no coração e músculos, onde a transdução do fígado pode ser menos consequente, essa modificação no tropismo pode ser aceitável. Notavelmente, a maioria dos mutantes manteve os níveis de transdução de WT.AAV9 em órgãos periféricos em ambas as doses.

[00279] Enquanto o mutante RGNRQ demonstrou modificações de ligação modestas na presença de anticorpos policlonais, ele exibiu um perfil de transdução semelhante ao AAV2: transdução insuficiente não apenas do fígado, mas de todos os órgãos periféricos. Tomados em conjunto, esses dados indicam a importância de integrar o conhecimento sobre um epítipo neutralizante mapeado com as informações disponíveis sobre os domínios funcionais de AAV. Gerar

um capsídeo que pode escapar dos NAbs não é suficiente, pois o capsídeo só é útil se ainda puder realizar sua função primária de transdução do tecido alvo. Estudos recentes usaram esta estratégia para incorporar múltiplos epítopos de AAV1 para gerar vetores baseados em AAV1 que podem escapar de NAbs, mantendo perfis de transdução semelhantes a AAV1 (Tse LV, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114(24), E4812-21).

[00280] Em resumo, este estudo fornece informações críticas sobre o projeto de vetores baseados em AAV9, capazes de escapar das respostas imunes humorais. Estudos futuros são necessários para entender melhor a complexidade da resposta do NAb aos vetores AAV9 para informar o projeto dos capsídeos de próxima geração.

(Listagem Sequencial de Texto Livre)

[00281] As seguintes informações são fornecidas para sequências que contêm texto livre sob o identificador numérico <223>.

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto livre sob <223>
9	<223> Construto sintético
20	<223> AAV mutante 8G264AG515A
21	<223> Construto sintético
22	<223> AAV mutante 8G264AG541A
23	<223> Construto sintético
24	<223> AAV mutante 8G515AG541A
25	<223> Construto sintético
26	<223> AAV mutante 8G264AG515AG541A
27	<223> Construto sintético
28	<223> AAV mutante 9G330AG453A
29	<223> Construto sintético
30	<223> AAV mutante 9G330AG513A
31	<223> Construto sintético
32	<223> AAV mutante 9G453AG513A
33	<223> Construto sintético
34	<223> AAV mutante 9G330AG453AG513A

SEQ ID NO: (contendo texto livre)	Texto livre sob <223>
35	<223> Construto sintético
38 - 110	<223> sequência de iniciador
113	<223> capsídeo AAVhu68 vp1 de origem Homo Sapiens
114	<223> Construto sintético
115	<223> AAV8 G264A/G541A/N499Q
116	<223> AAV8 G264A/G541A/N459Q
117	<223> AAV8 G264A/G541A/N305Q/N459Q
118	<223> AAV8 G264A/G541A/N305Q/N499Q
119	<223> AAV8 G264A/G541A/N459Q/N499Q
120	<223> AAV8 G264A/G541A/ N305Q/N459Q/N499Q

[00282] Todos os documentos citados neste relatório descritivo são incorporados aqui por referência. Os Pedidos de Patente Provisório U.S. 62/722.388 e 62/722.382, ambos depositados em 24 de agosto de 2018, os Pedidos de Patente Provisório U.S. 62/703.670 e 62/703.673, ambos depositados em 26 de julho de 2018, os Pedidos de Patente Provisório U.S. 62/677.471 e 62/677.474, ambos depositados em 29 de maio de 2018, o Pedido de Patente Provisório U.S. 62/667.585, depositado em 29 de maio de 2018, e o Pedido de Patente Provisório U.S. 62/635.964, depositado em 27 de fevereiro de 2018 são aqui incorporados por referência. O Pedido de Patente Provisório U.S. 63/667.881, depositado em 7 de maio de 2018, o Pedido de Patente Provisório U.S. 62/667.888, depositado em 7 de maio de 2018, o Pedido de Patente Provisório U.S. 62/667.587, depositado em 6 de maio de 2018, o Pedido de Patente Provisório U.S. 62/663.797, depositado em 27 de abril de 2018, o Pedido de Patente Provisório U.S. 62/663.788, depositado em 27 de abril de 2018, o Pedido de Patente Provisório U.S. 62/635.968, depositado em 27 de fevereiro de 2018 são incorporados por referência. As SEQ ID NO que são aqui referidas e que aparecem na listagem de sequências anexada são incorporadas por referência. Embora a

invenção tenha sido descrita com referência a modalidades particulares, será apreciado que modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito da invenção. Tais modificações pretendem ser abrangidas pelo escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma população mista de vírus adenoassociados recombinantes (rAAV), cada um dos referidos rAAV compreendendo:

(a) um capsídeo de AAV compreendendo cerca de 60 proteínas de capsídeo vp1, proteínas vp2 e proteínas vp3, em que as proteínas vp1, vp2 e vp3 são:

uma população heterogênea de proteínas vp1 que são produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos AAV vp1 selecionada,

uma população heterogênea de proteínas vp2 que são produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos AAV vp2 selecionada,

uma população heterogênea de proteínas vp3 que são produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos AAV vp3 selecionada,

em que: as proteínas vp1, vp2 e vp3 contêm subpopulações com modificações de aminoácidos compreendendo pelo menos duas asparaginas altamente desamidadas (N) em pares asparagina-glicina no capsídeo de AAV e opcionalmente compreendendo ainda subpopulações compreendendo outros aminoácidos desamidados, em que a desamidação resulta em uma alteração de aminoácido, desde que o rAAV não seja AAVhu68; e

(b) um genoma de vetor no capsídeo de AAV, o genoma de vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo sequências de repetição terminal invertida de AAV e uma sequência de ácido nucleico não AAV que codifica um produto operacionalmente ligado a sequências que direcionam a expressão do produto em uma célula hospedeira.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizada pelo fato de que as asparaginas desamidadas são desamidadas em ácido aspártico, ácido isoaspártico, um par interconvertido de ácido aspártico/ácido isoaspártico ou combinações dos mesmos.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o capsídeo compreende ainda glutamina(s) desamidada(s) que são desamidadas em ácido (α)-glutâmico, ácido γ -glutâmico, um par de interconversão ácido (α)-glutâmico/ácido γ -glutâmico ou combinações dos mesmos.

4. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o capsídeo compreende quatro a cinco asparaginas altamente desamidadas que estão em pares asparagina - glicina.

5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o capsídeo compreende 65% a 100% de asparagina desamidada na posição 57, em relação à numeração de AAV8 ou AAV9, conforme determinado usando espectrometria de massa.

6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) rAAV com um capsídeo de AAV8, a referida composição compreendendo ainda uma subpopulação em que pelo menos 70% a 100% do N no capsídeo são desamidados nas posições: N57, N263, N385, N514 e/ou N540 de SEQ ID NO: 6 (AAV8 vp1 codificado], com base na numeração do AAV8 vp1, com o M inicial;

(b) rAAV com um capsídeo de AAV9, compreendendo ainda uma subpopulação em que pelo menos 65% a 100% do N no capsídeo são desamidados nas posições: N57, N329, N452 e/ou N512, com base na numeração do SEQ ID NO: 7 (codificado AAV9 vp1), com o M inicial;

(c) rAAV com um capsídeo AAVrh10 (AAVrh10),

compreendendo ainda uma subpopulação de vp1, vp2 e/ou vp3 que são pelo menos 70% a 100% N desamidados no par N-G em uma ou mais das posições N263, N385 e/ou N514, com base na numeração da SEQ ID NO: 112 (AAVrh10 vp1 codificado), com o M inicial, ou

(d) rAAV com um capsídeo AAVhu37 (AAVhu37), compreendendo ainda uma subpopulação de vp1, vp2 e/ou vp3 que são pelo menos 70% a 100% N desamidados no par N-G em uma ou mais das posições N263, N385 e/ou N514, com base na numeração de SEQ ID NO: 36 (AAVhu37 vp1 codificado), com o M inicial.

7. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a composição compreende:

(a) rAAV com um capsídeo AAV1 compreendendo uma subpopulação de vp1, vp2 e/ou vp3 que são pelo menos 70% a 100% N desamidados no par N-G em uma ou mais das posições: N57, N383, N512, N718, com base na numeração da SEQ ID NO: 1, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial;

(b) rAAV com um capsídeo AAV3B compreendendo uma subpopulação de vp1, vp2 e/ou vp3 que são pelo menos 70% a 100% N desamidados no par N-G em uma ou mais das posições: N57, N382, N512, N718, com referência à numeração de SEQ ID NO: 2, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial;

(c) rAAV com um capsídeo de AAV5 compreendendo uma subpopulação de vp1, vp2 e/ou vp3 que são pelo menos 70% a 100% N desamidados no par N-G em uma ou mais das posições: N56, N347, N347, N509, com referência à numeração de SEQ ID NO: 3, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial;

(d) rAAV com um capsídeo AAV7 compreendendo uma subpopulação de vp1, vp2 e/ou vp3 que são pelo menos 70% a 100% N desamidados no par N-G em uma ou mais das posições: N41, N57,

N384,N514, com referência à numeração de SEQ ID NO: 4, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial;

(e) rAAV com um capsídeo AAVrh32.33 compreendendo uma subpopulação de vp1, vp2 e/ou vp3 que são pelo menos 70% a 100% N desamidados no par N-G em uma ou mais das posições: N57, N264, N292, N318, com referência à numeração de SEQ ID NO: 5, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial; ou

(f) vetores rAAV4 compreendendo uma subpopulação de vp1, vp2 e/ou vp3 que são pelo menos 70% a 100% N desamidados no par N-G em uma ou mais das posições: N56, N264, N318, N546, com referência à numeração da SEQ ID NO: 111, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial.

8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o capsídeo compreende 80% a 100% de asparagina desamidada na posição 57, em relação à numeração de AAV8 ou AAV9.

9. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que todas ou uma subpopulação das proteínas vp1 e/ou proteínas vp3 de AAV têm um truncamento de cerca de 1 a cerca de 5 aminoácidos em seu N-terminal.

10. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que todas ou uma subpopulação das proteínas vp1 e/ou vp3 de AAV tem um truncamento de cerca de 1 a cerca de 5 aminoácidos em seu C-terminal.

11. Método para reduzir a desamidação de um capsídeo de AAV, caracterizado pelo fato de que compreende produzir um capsídeo de AAV a partir de uma sequência de ácido nucleico contendo códons vp de AAV modificados, a sequência de ácido nucleico compreendendo códons de glicina independentemente modificados em

um a três dos pares asparagina - glicina em relação a uma sequência AAV vp1 de referência, de modo que o códon modificado codifica um aminoácido diferente de glicina.

12. Método para reduzir a desamidação de um capsídeo de AAV, caracterizado pelo fato de que compreende produzir um capsídeo de AAV a partir de uma sequência de ácido nucleico contendo códons vp de AAV modificados, a sequência de ácido nucleico compreendendo códons de asparagina independentemente modificados de pelo menos um par asparagina - glicina em relação a uma sequência AAV vp1 de referência, de modo que o códon modificado codifica um aminoácido diferente de asparagina.

13. Método para aumentar o título, a potência ou a transdução de um AAV recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende produzir um capsídeo de AAV a partir de uma sequência de ácido nucleico contendo pelo menos um códon vp de AAV modificado para alterar a asparagina ou glicina de pelo menos um par de asparagina - glicina no capsídeo para um aminoácido diferente.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizado pelo fato de que o referido códon modificado está na região v2 e/ou vp3.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizado pelo fato de que o par asparagina-glicina na região única de vp1 é retido no rAAV modificado.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, caracterizado pelo fato de que um sítio de desamidação é modificado em um local diferente de:

(a) N57, N263, N385, N514 e/ou N540 da SEQ ID NO: 6 (AAV8 vp1 codificado), com base na numeração do AAV8 vp1, com o M inicial, para um capsídeo AAV8;

(b) N57, N329, N452 e/ou N512, com base na numeração da

SEQ ID NO: 7 (AAV9 vp1 codificado), com o M inicial, para um capsídeo AAV9;

(c) N57, N263, N385 e/ou N514, com base na numeração da SEQ ID NO: 112 (AAVrh10 vp1 codificado), com o M inicial, para um capsídeo AAVrh10, ou

(d) N57, N263, N385 e/ou N514, com base na numeração da SEQ ID NO: 36 (AAVhu37 vp1 codificado), com o M inicial, para um capsídeo AAVhu37.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o sítio de desamidação modificado é selecionado de um sítio na Tabela F, Tabela G ou Tabela H.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, caracterizado pelo fato de que um sítio de desamidação é modificado em um local diferente de:

(a) N57, N383, N512 e/ou N718, com base na numeração de SEQ ID NO: 1, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo de AAV1;

(b) N57, N382, N512 e/ou N718, com referência à numeração de SEQ ID NO: 2, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo AAV3B;

(c) N56, N347, N347 e/ou N509, com referência à numeração da SEQ ID NO: 3, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo AAV5;

(d) N41, N57, N384 e/ou N514, com referência à numeração de SEQ ID NO: 4, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo AAV7;

(e) N57, N264, N292 e/ou N318, com referência à numeração da SEQ ID NO: 5, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo AAVrh32.33; ou

(f) N56, N264, N318 e/ou N546, com referência à numeração da SEQ ID NO: 111, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo de AAV4.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o sítio de desamidação modificado é selecionado a partir de um sítio na Tabela A, Tabela B, Tabela C, Tabela D, Tabela E, Tabela F, Tabela G ou Tabela H.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 19, caracterizado pelo fato de que cada códon modificado codifica um aminoácido diferente.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 19, caracterizado pelo fato de que dois ou mais códons modificados codificam o mesmo aminoácido.

22. rAAV mutante, caracterizado pelo fato de que compreende um capsídeo de AAV com desamidação reduzida em comparação com um capsídeo de AAV não modificado, que é produzido usando o método como definido em qualquer uma das reivindicações 11 a 21.

23. rAAV mutante, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que possui um capsídeo de AAV mutante com proteínas do capsídeo com uma ou mais das seguintes substituições, com base na numeração de VP1:

(a) AAV8 G264A/G541A (SEQ ID NO: 23);

(b) AAV8 G264A/G541A/N499Q (SEQ ID NO: 115);

(c) AAV8 G264A/G541A/N459Q (SEQ ID NO: 116);

(d) AAV8 G264A/G541A/N305Q/N459Q (SEQ ID NO: 117);

(e) AAV8 G264A/G541A/N305Q/N499Q (SEQ ID NO: 118);

(f) AAV8 G264A/G541A/N459Q/N499Q (SEQ ID NO: 119);

(g) AAV8 G264A/G541A/ N305Q/N459Q/N499Q (SEQ ID NO: 120);

- (h) AAV8 G264A/G515A (SEQ ID NO: 21);
- (i) AAV8G515A/G541A (SEQ ID NO: 25);
- (j) AAV8 G264A/G515A/G541A (SEQ ID NO: 27);
- (k) AAV9 G330/G453A (SEQ ID NO: 29);
- (l) AAV9G330A/G513A (SEQ ID NO: 31);
- (m) AAV9G453A/G513A (SEQ ID NO 33), e/ou
- (n) G330/G453A/G513A (SEQ ID NO: 35).

24. rAAV mutante, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que possui um capsídeo de AAV mutante com proteínas do capsídeo com uma ou mais das seguintes substituições, com base na numeração de AAV8 VP1: N263A, N514A, ou AAVN540A.

25. rAAV mutante, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que possui um capsídeo de AAV mutante com proteínas de capsídeo, em que os pares NG de tipo selvagem nas seguintes posições são retidos: N57, N94, N263, N305, G386, Q467, N479 e/ou N653.

26. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma população de rAAV tendo título, potência ou transdução aumentados, a referida composição compreende rAAV tendo capsídeos que são modificados para ter desamidação total diminuída em comparação com um rAAV com um padrão de desamidação com um padrão de desamidação de capsídeo de acordo com qualquer um da Tabela A (AAV1), Tabela B (AAV3B), Tabela C (AAV5), Tabela D (AAV7), Tabela E (AAVrh32.33), Tabela F (AAV8), Tabela G (AAV9) ou Tabela H (AAVhu37), desde que o rAAV não seja AAVhu68.

27. Composição, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que o rAAV tem um sítio de desamidação modificado em um local diferente de:

- (a) N57, N263, N385, N514 e/ou N540 da SEQ ID NO: 6

(AAV8 vp1 codificado), com base na numeração do AAV8 vp1, com o M inicial, para um capsídeo AAV8;

(b) N57, N329, N452 e/ou N512, com base na numeração da SEQ ID NO: 7 (AAV9 vp1 codificado), com o M inicial, para um capsídeo AAV9;

(c) N57, N263, N385 e/ou N514, com base na numeração da SEQ ID NO: 112 (AAVrh10 vp1 codificado), com o M inicial, para um capsídeo AAVrh10, ou

(d) N57, N263, N385 e/ou N514, com base na numeração da SEQ ID NO: 36 (AAVhu37 vp1 codificado), com o M inicial, para um capsídeo AAVhu37.

28. Composição, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que o rAAV tem um sítio de desamidação de sequência de aminoácido modificado em um local diferente de:

(a) N57, N383, N512 e/ou N718, com base na numeração de SEQ ID NO: 1, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo de AAV1;

(b) N57, N382, N512 e/ou N718, com referência à numeração de SEQ ID NO: 2, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo AAV3B;

(c) N56, N347, N347 e/ou N509, com referência à numeração da SEQ ID NO: 3, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo AAV5;

(d) N41, N57, N384 e/ou N514, com referência à numeração de SEQ ID NO: 4, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo AAV7;

(e) N57, N264, N292 e/ou N318, com referência à numeração da SEQ ID NO: 5, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo AAVrh32.33; ou

(f) N56, N264, N318 e/ou N546, com referência à numeração da SEQ ID NO: 111, com base na numeração da sequência de aminoácidos vp1 predita com o M inicial, para um capsídeo de AAV4.

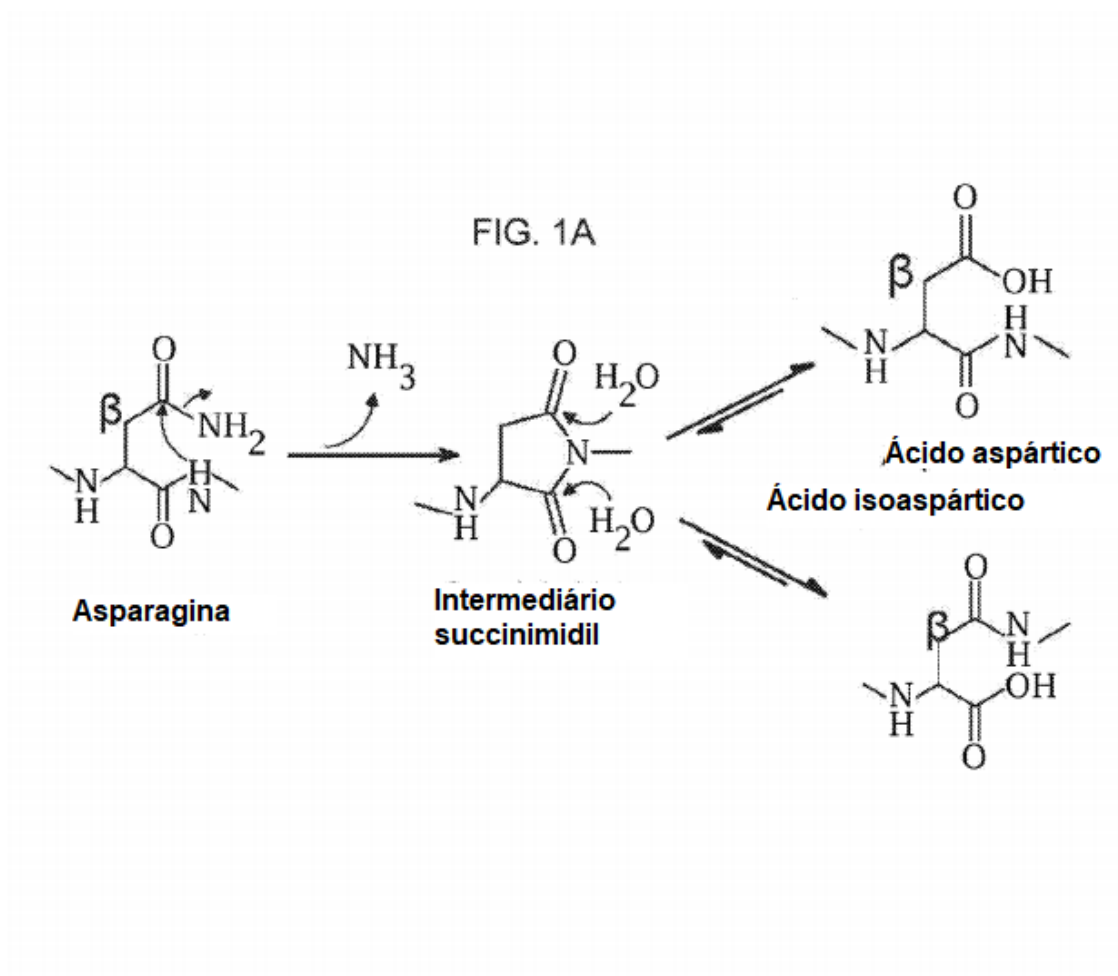


FIG. 1B

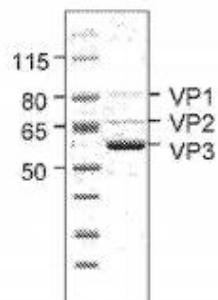


FIG. 1C

Local	pI	Local	pI
1	7.30	11	5.70
2	7.11	12	5.63
3	6.97	13	5.54
4	6.75	14	5.46
5	6.61	15	5.37
6	6.45	16	5.27
7	6.27	17	5.20
8	6.11	18	5.14
9	6.01	19	5.08
10	5.88	20	4.99

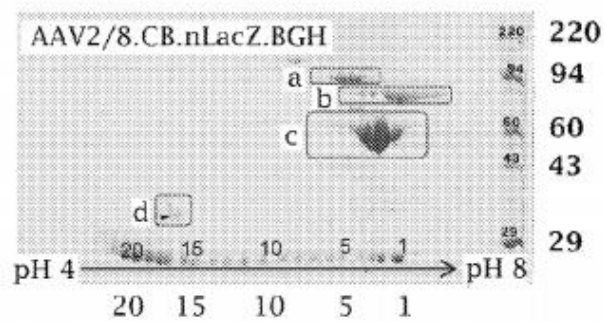
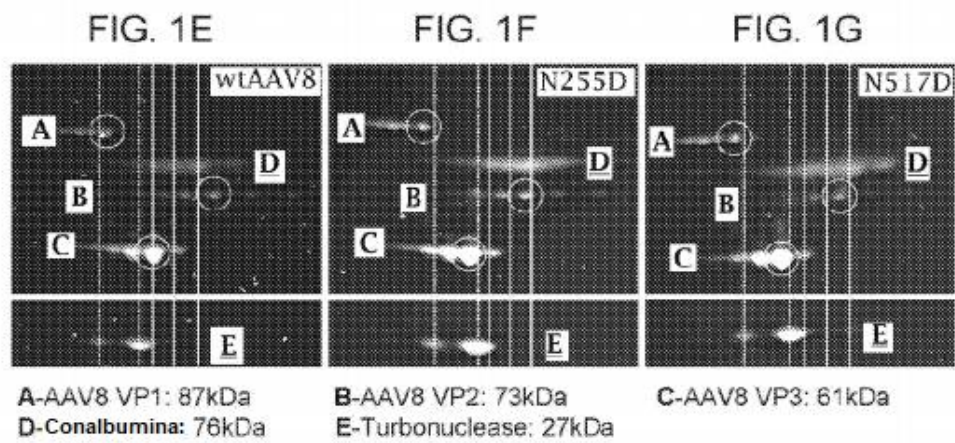


FIG. 1D



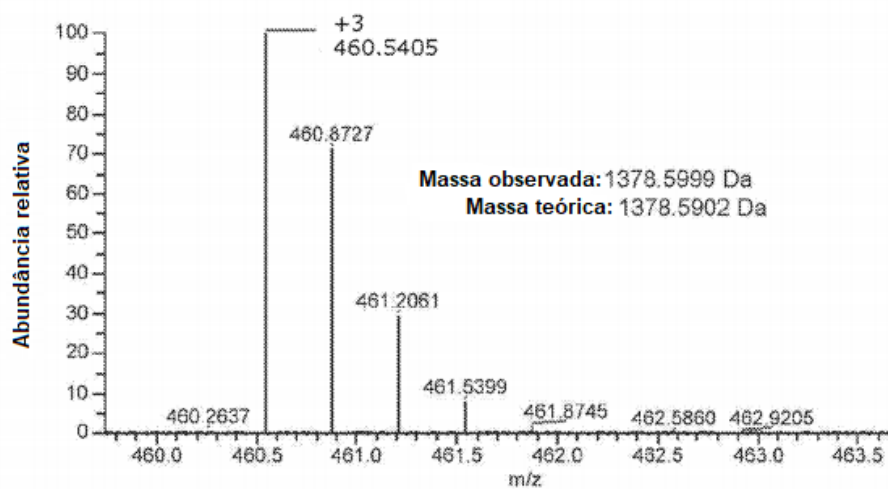


FIG. 2B

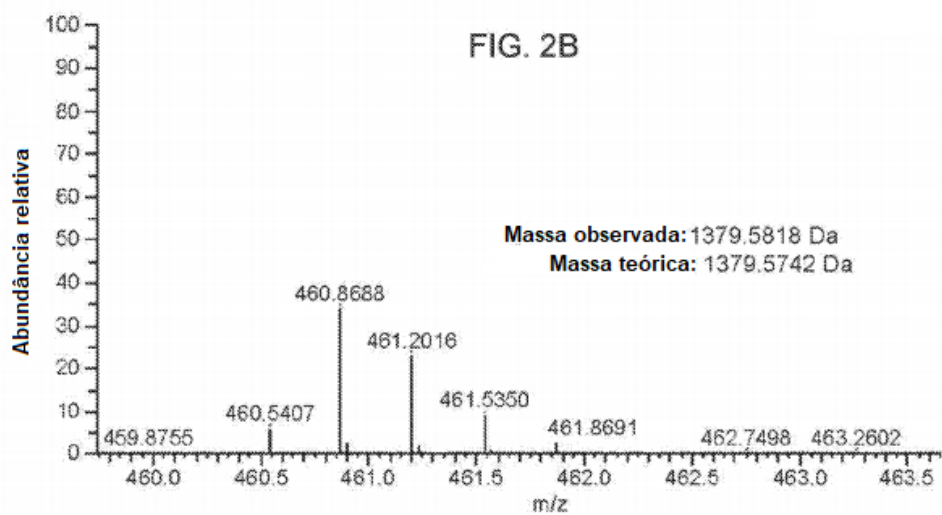
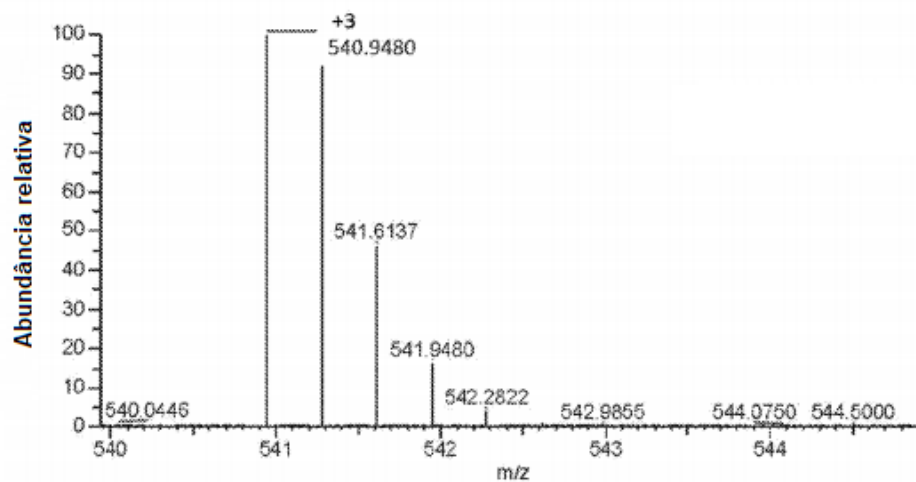
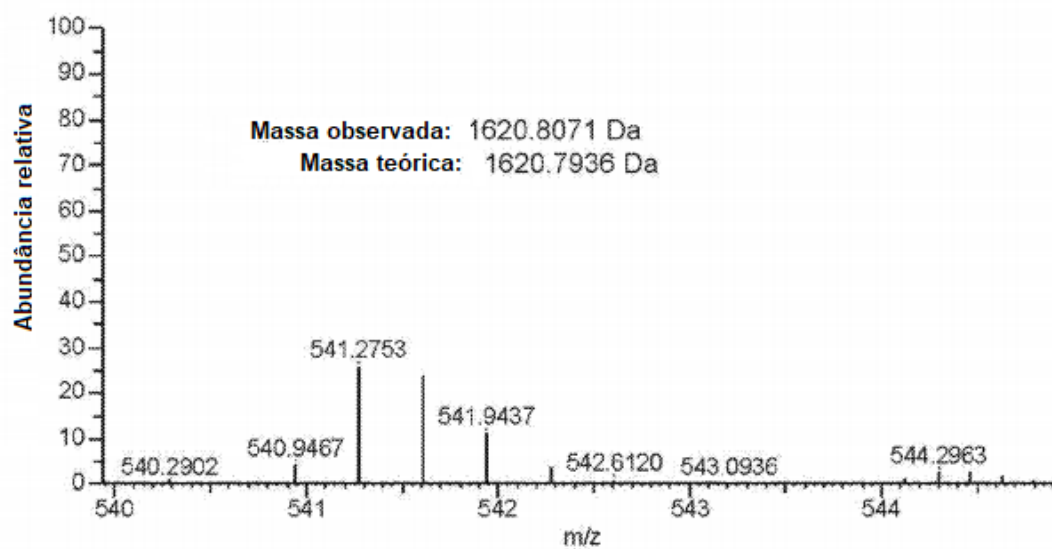


FIG. 2C



Massa observada: 1619.8213 Da
Massa teórica: 1619.8096 Da

FIG. 2D



Massa observada: 1620.8071 Da
Massa teórica: 1620.7936 Da

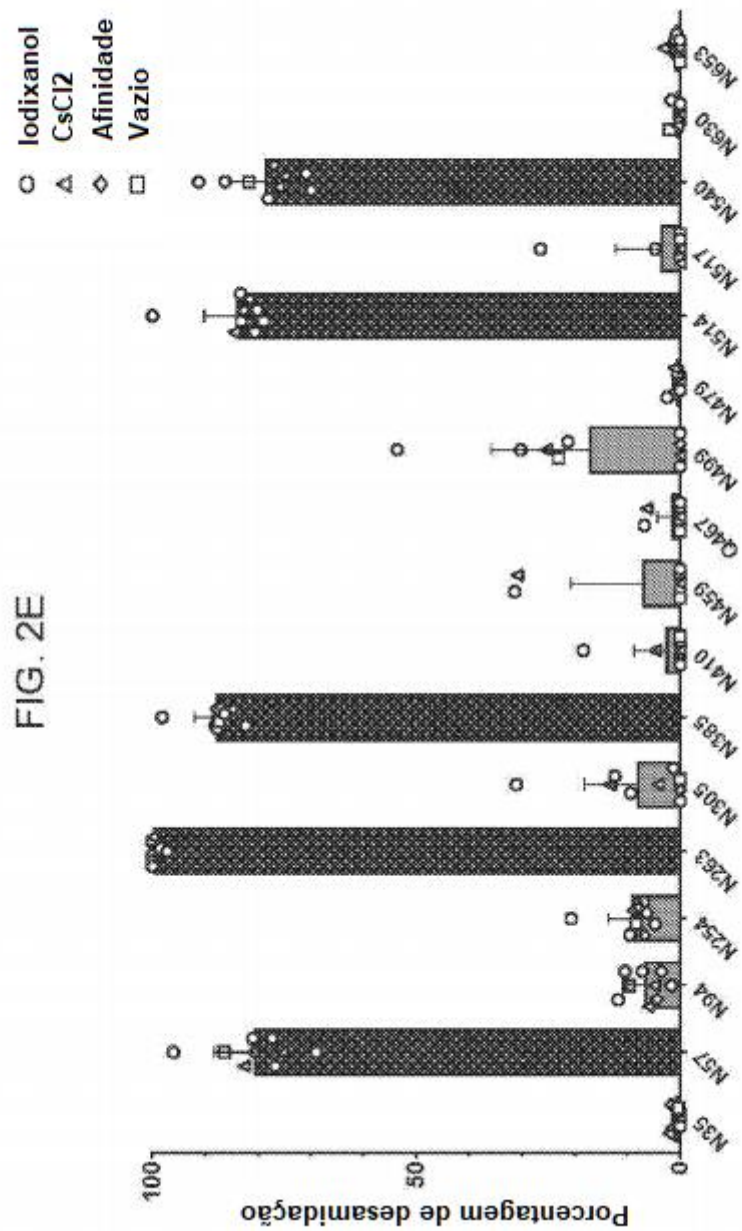


FIG. 3A

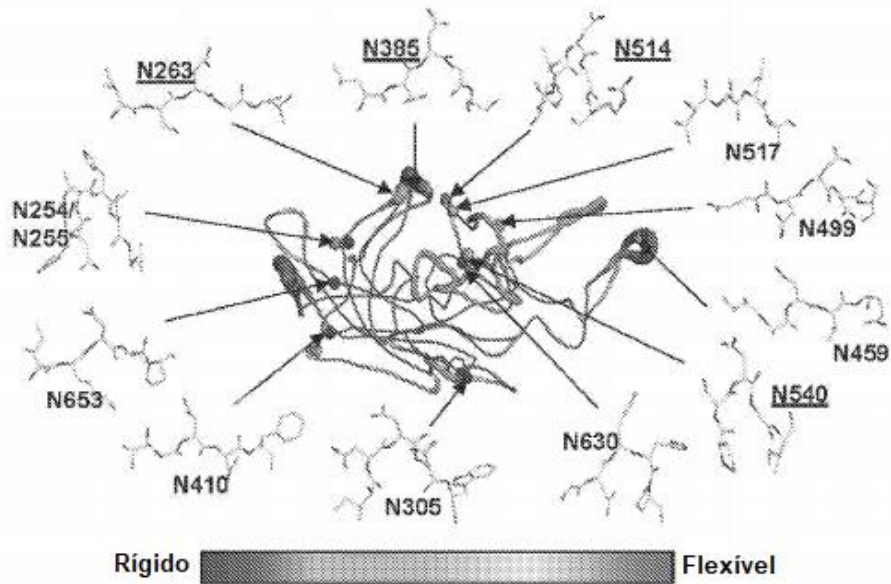


FIG. 3B

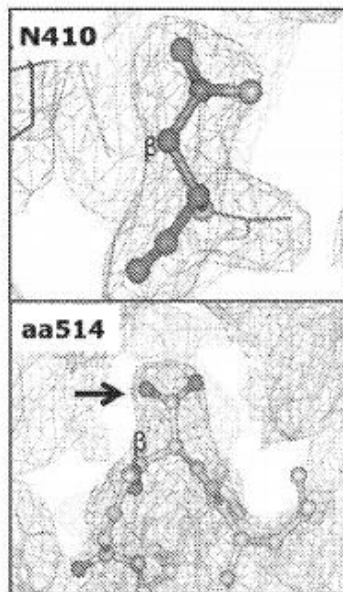


FIG. 3C

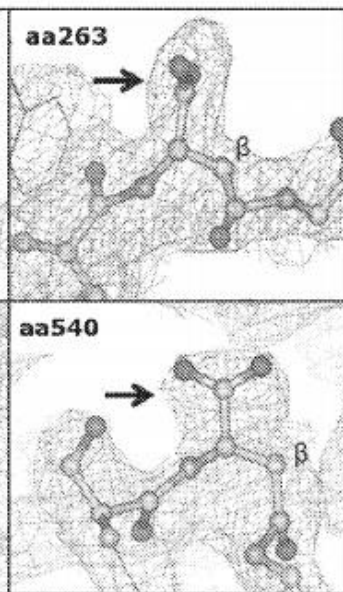


FIG. 3D



FIG. 3E



FIG. 4A

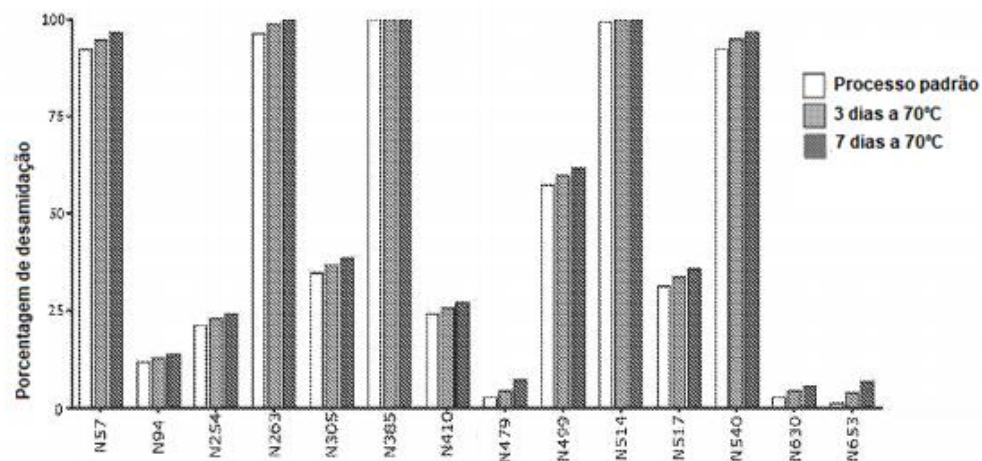


FIG. 4B

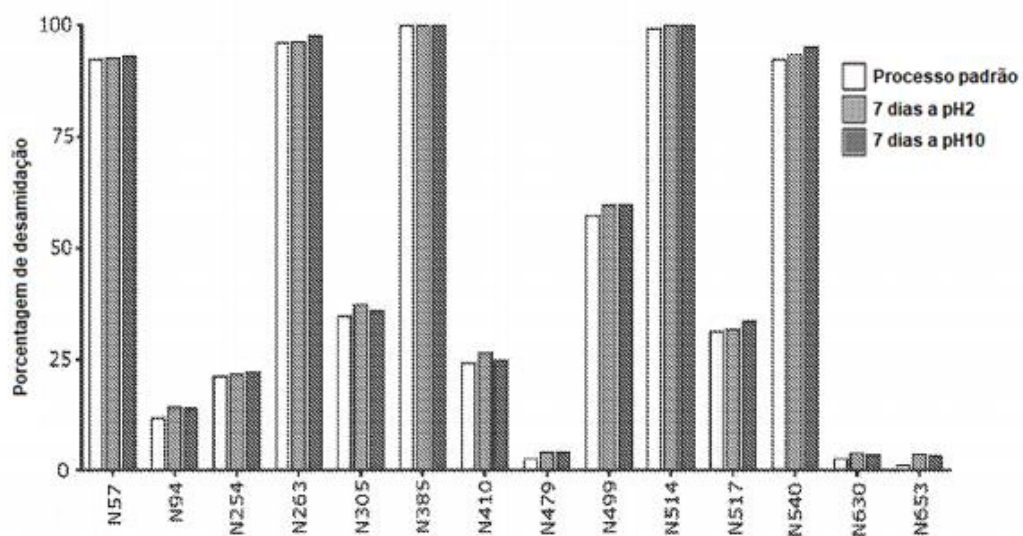


FIG. 4C

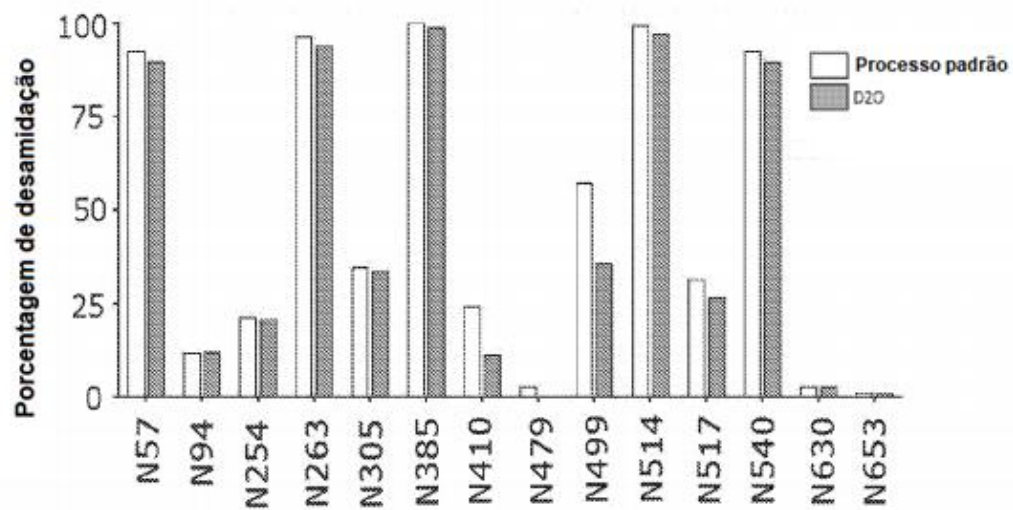


FIG. 4D

Tempo a 70°C (d)	0	7	
sem SDS			WB.81
+ SDS			

Tempo a 70°C (d)	0	7	
sem SDS			WB:AAV8
+ SDS			

FIG. 5A

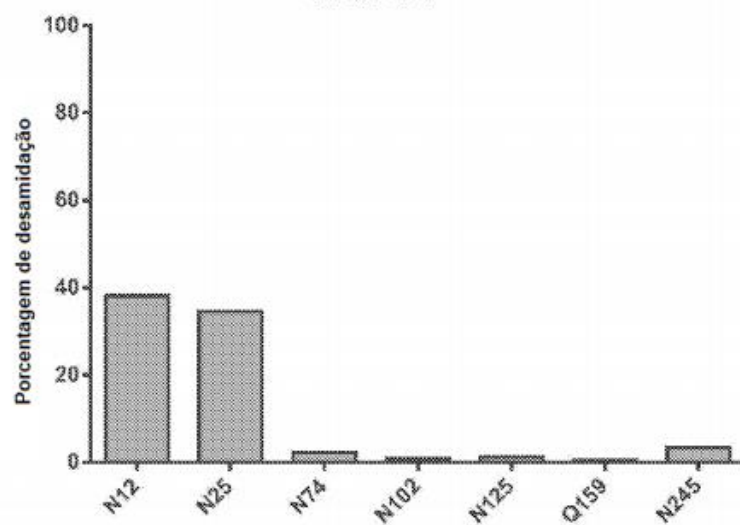
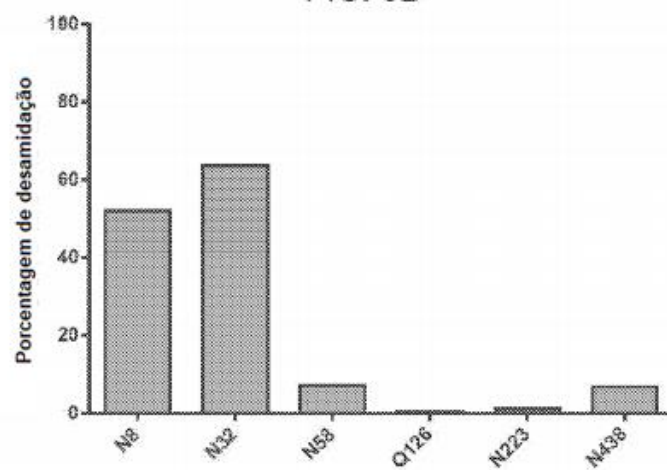


FIG. 5B



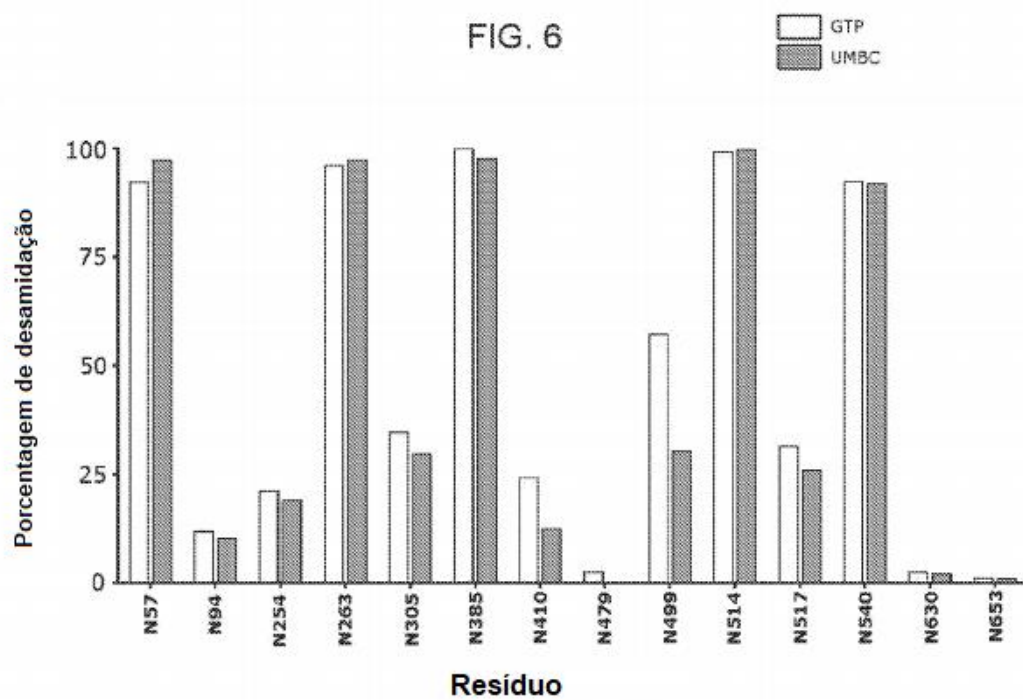


FIG. 7B

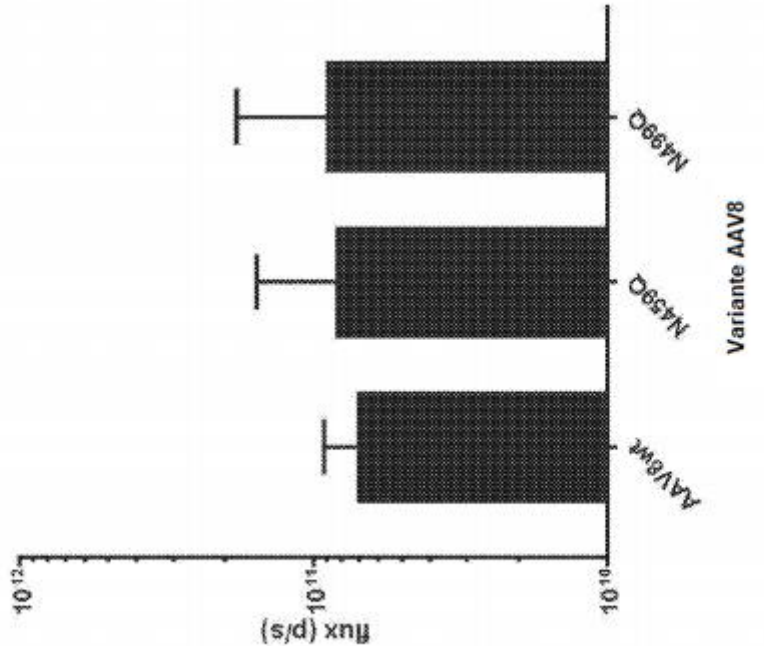
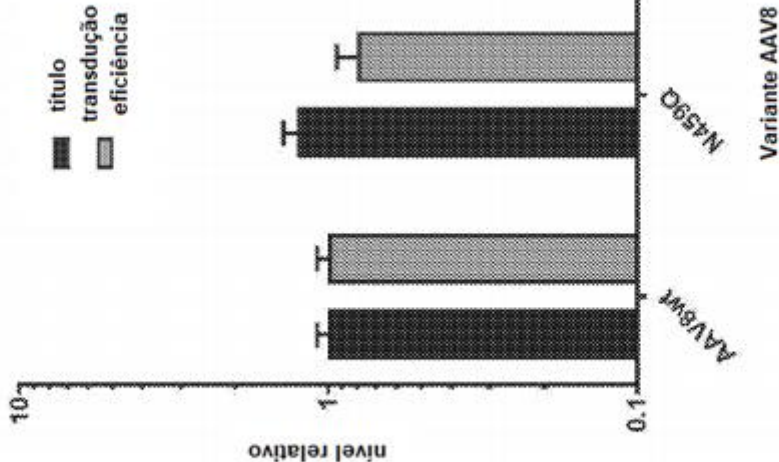


FIG. 7A



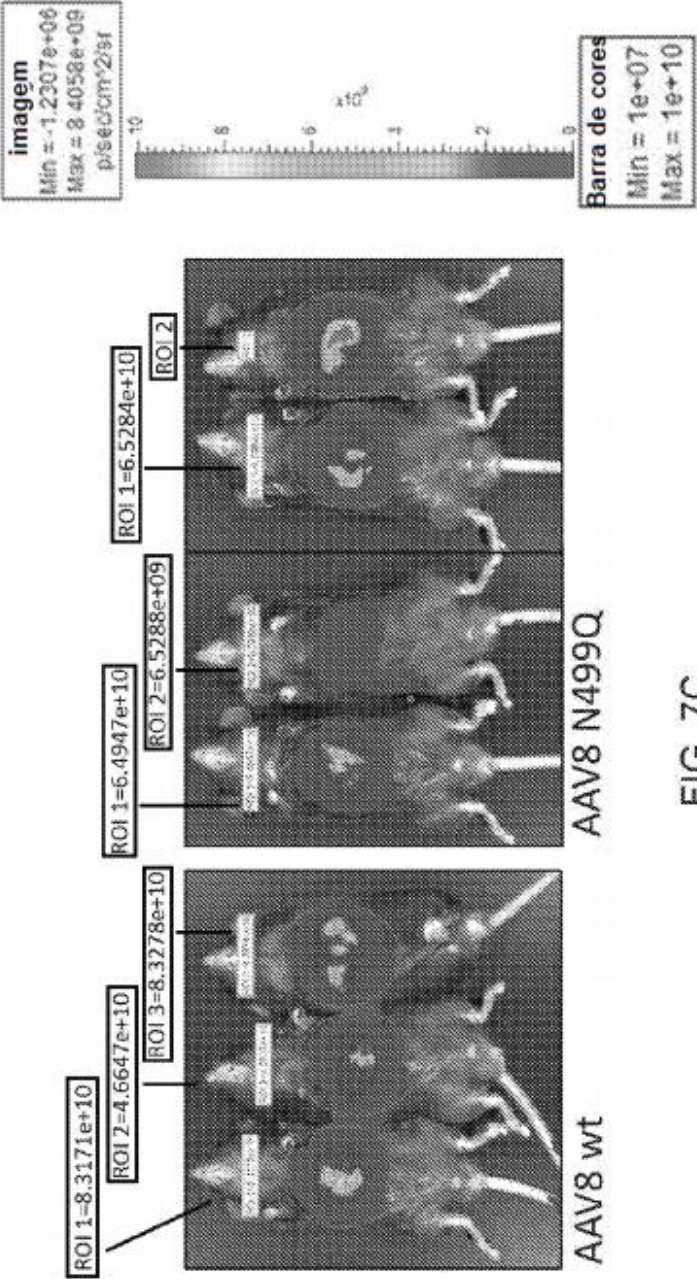


FIG. 7C

FIG. 8A

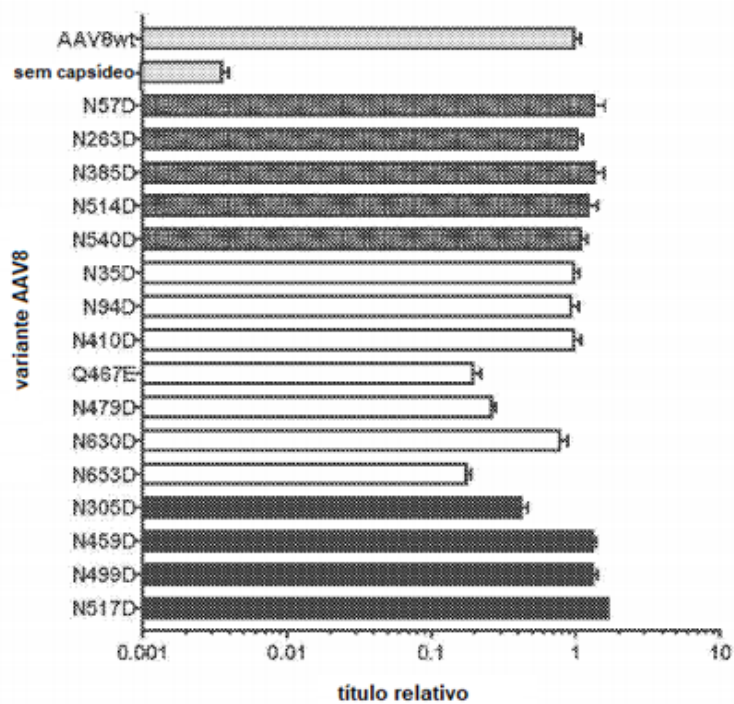


FIG. 8B

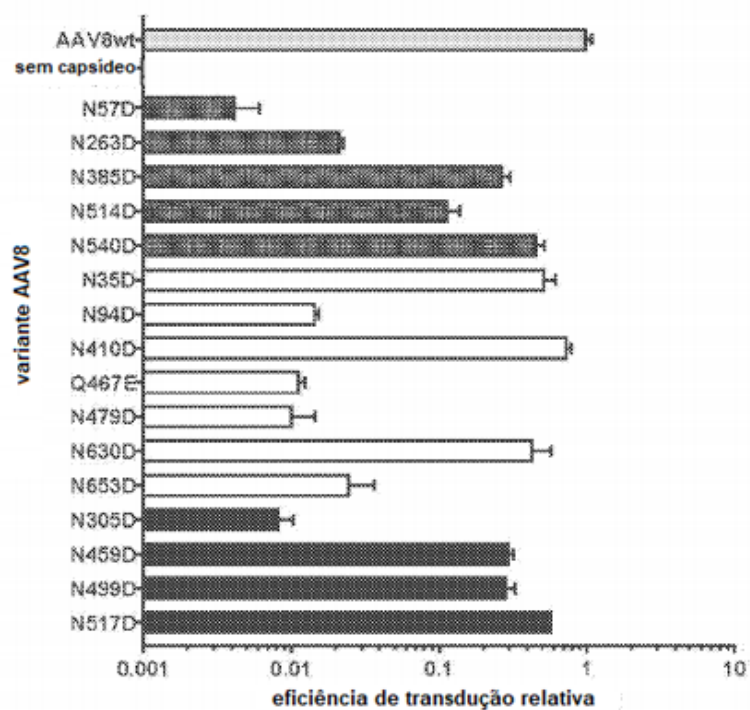


FIG. 9A

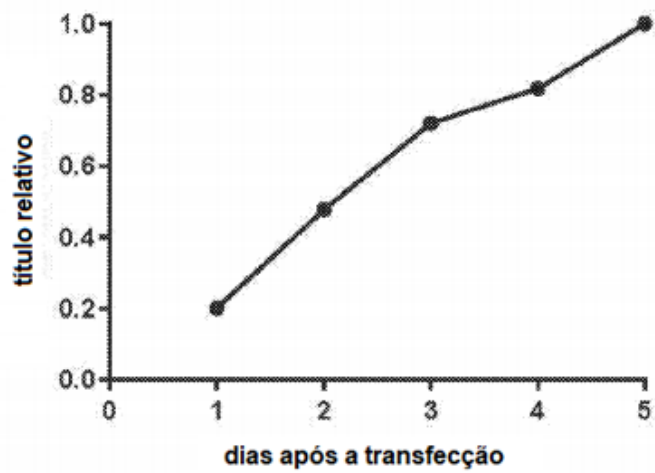


FIG. 9B

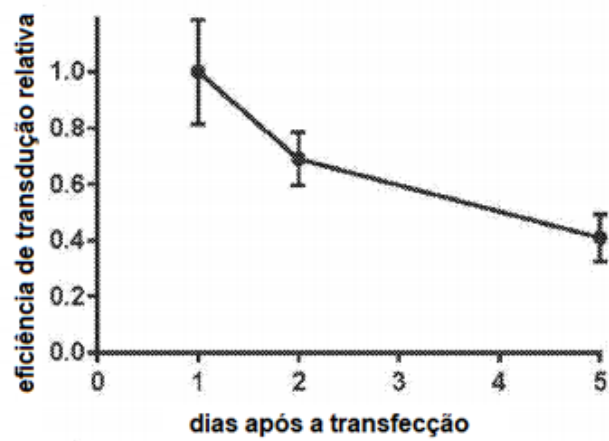


FIG. 9C

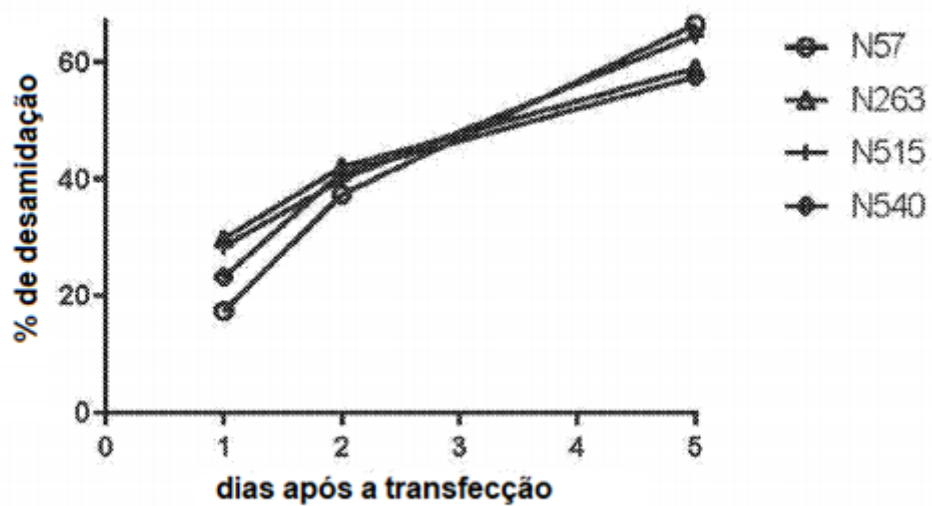
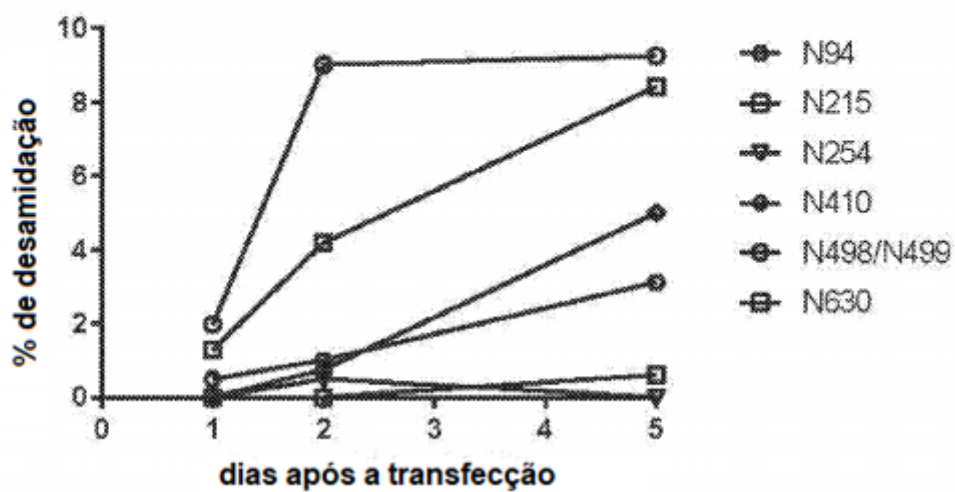
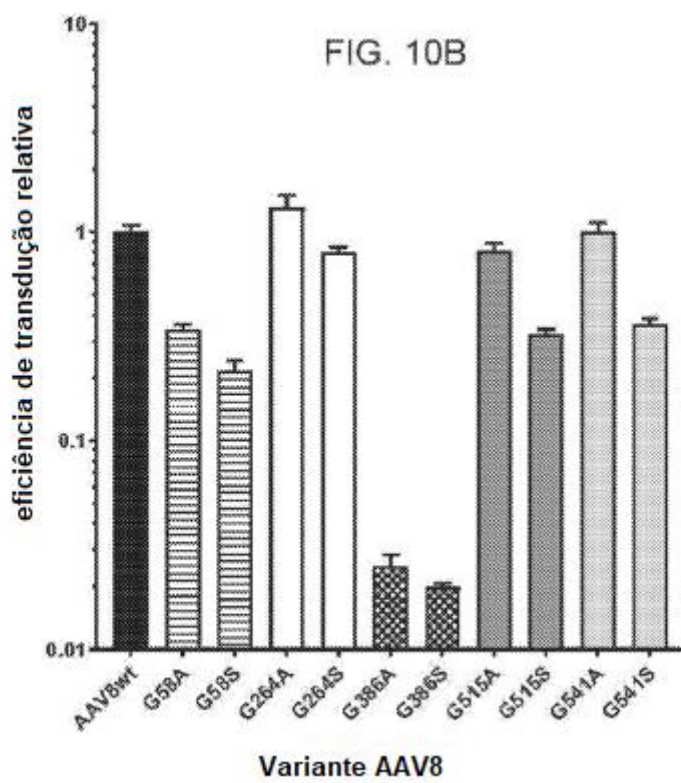
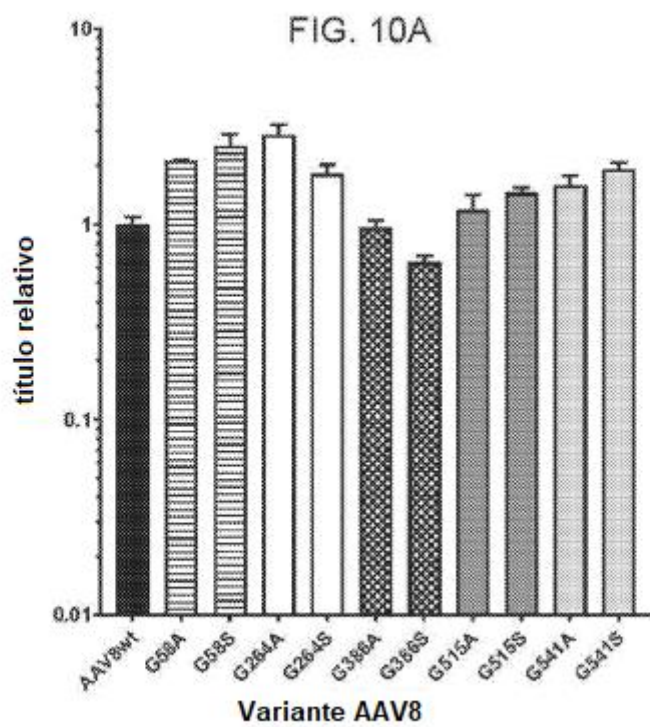


FIG. 9D





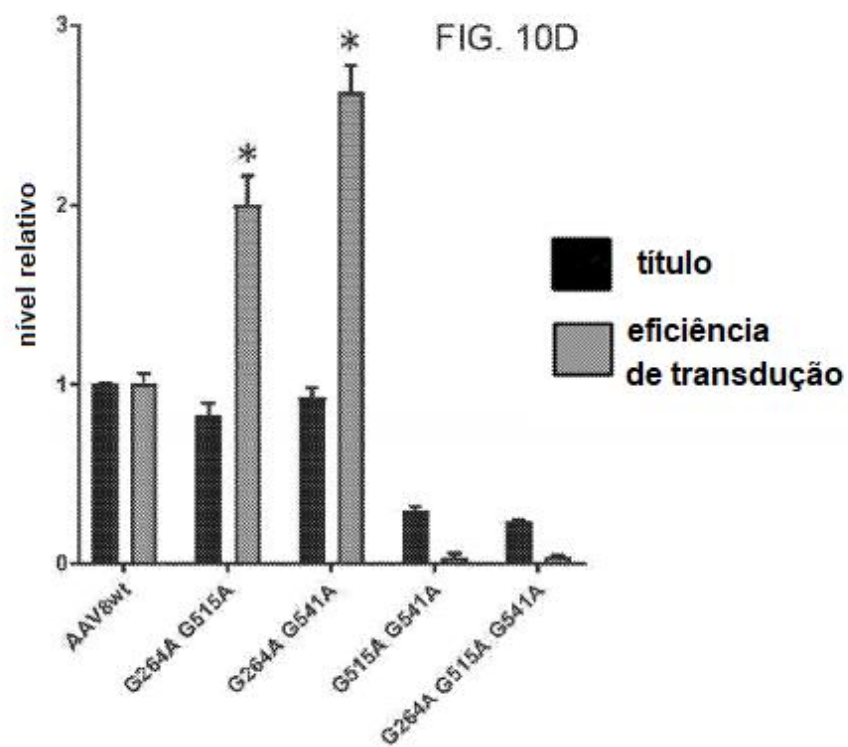
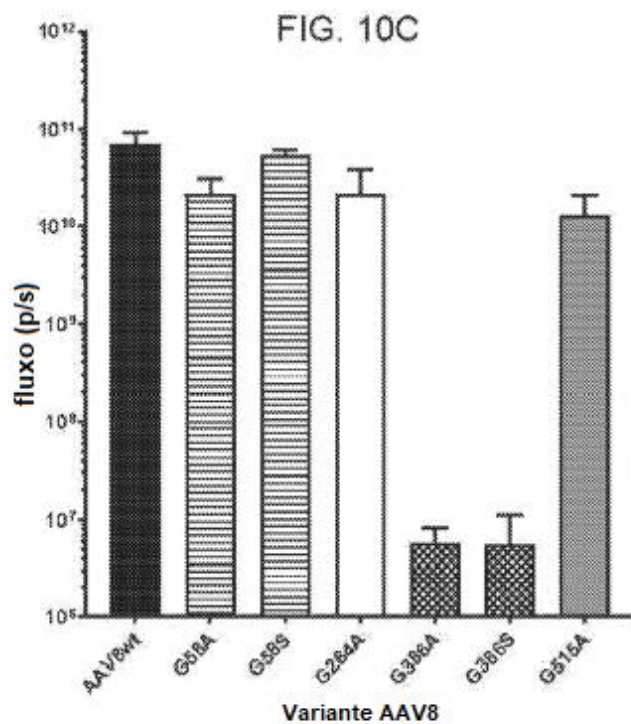


FIG. 11 A

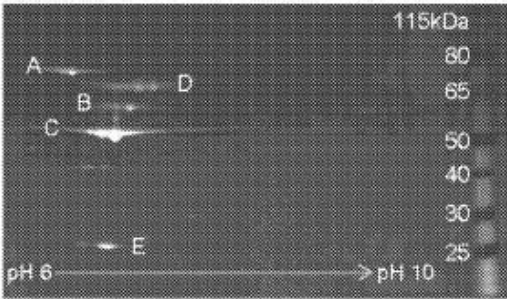


FIG. 11C

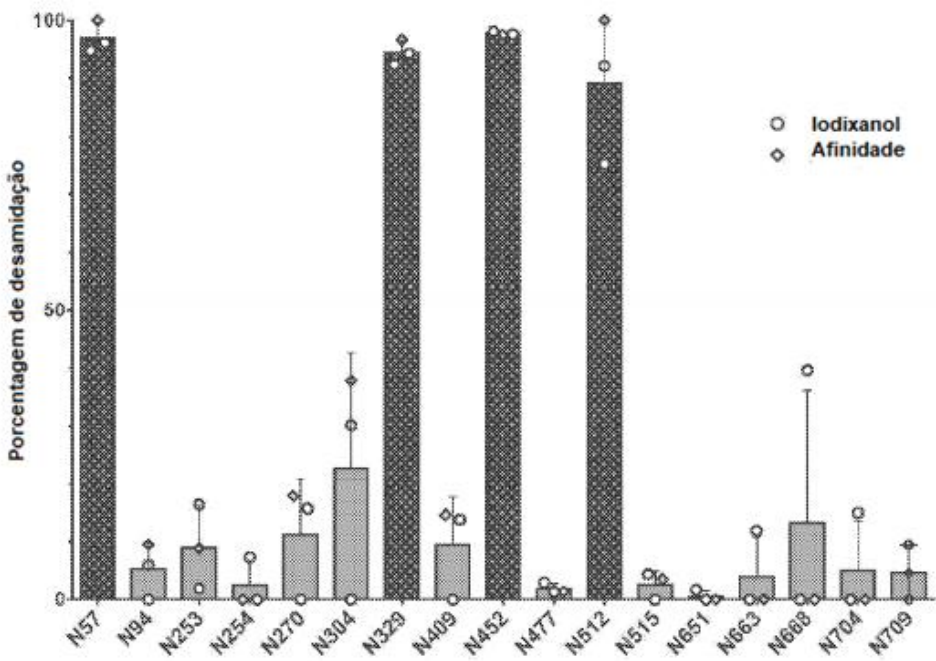
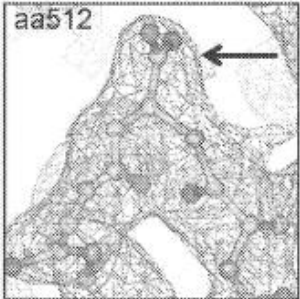
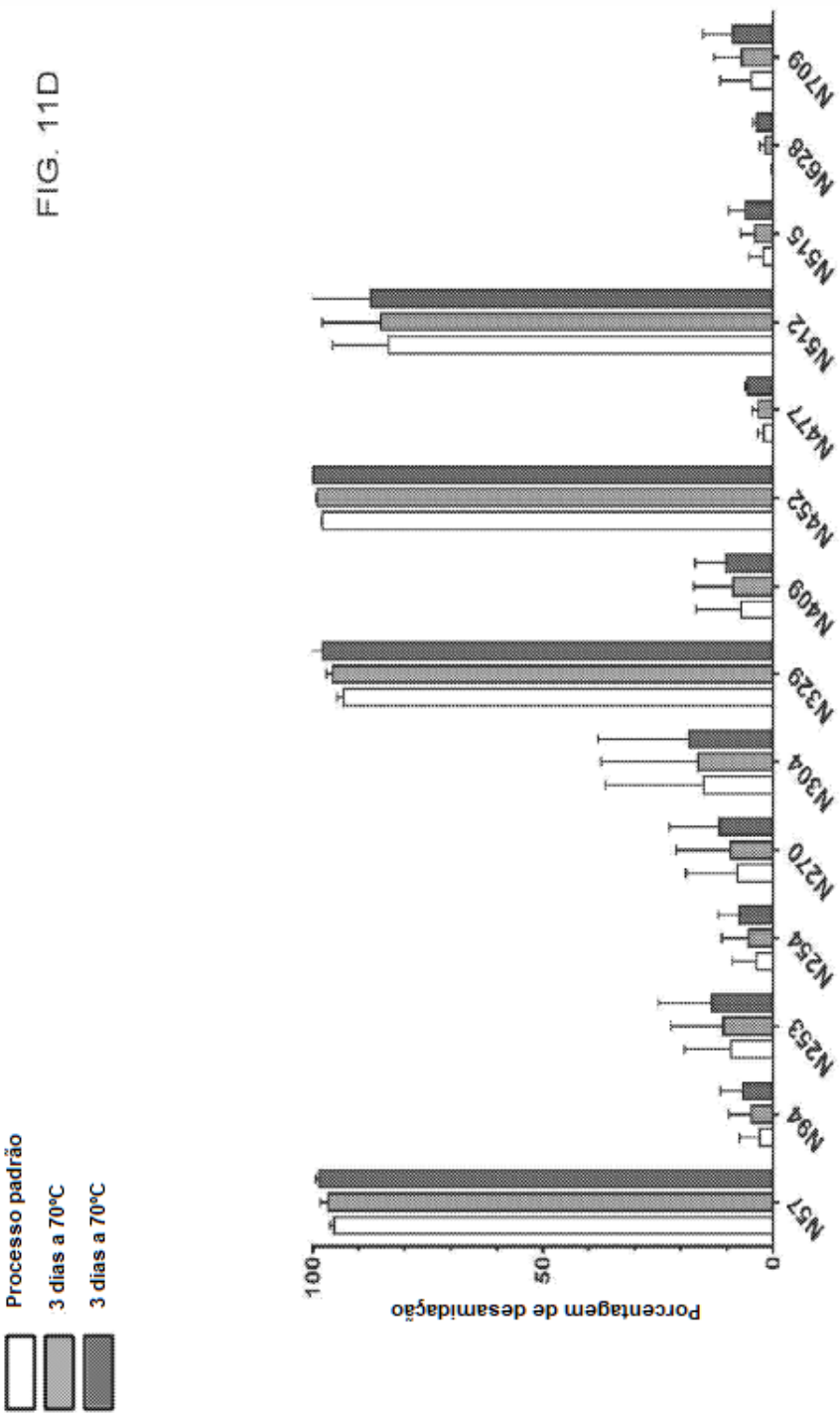


FIG. 11B



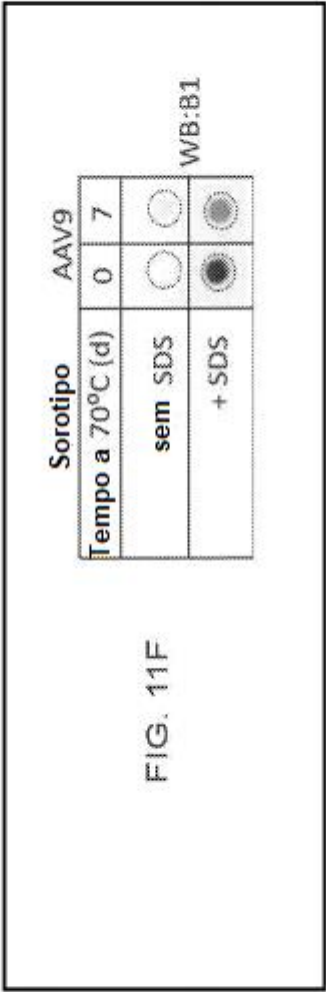
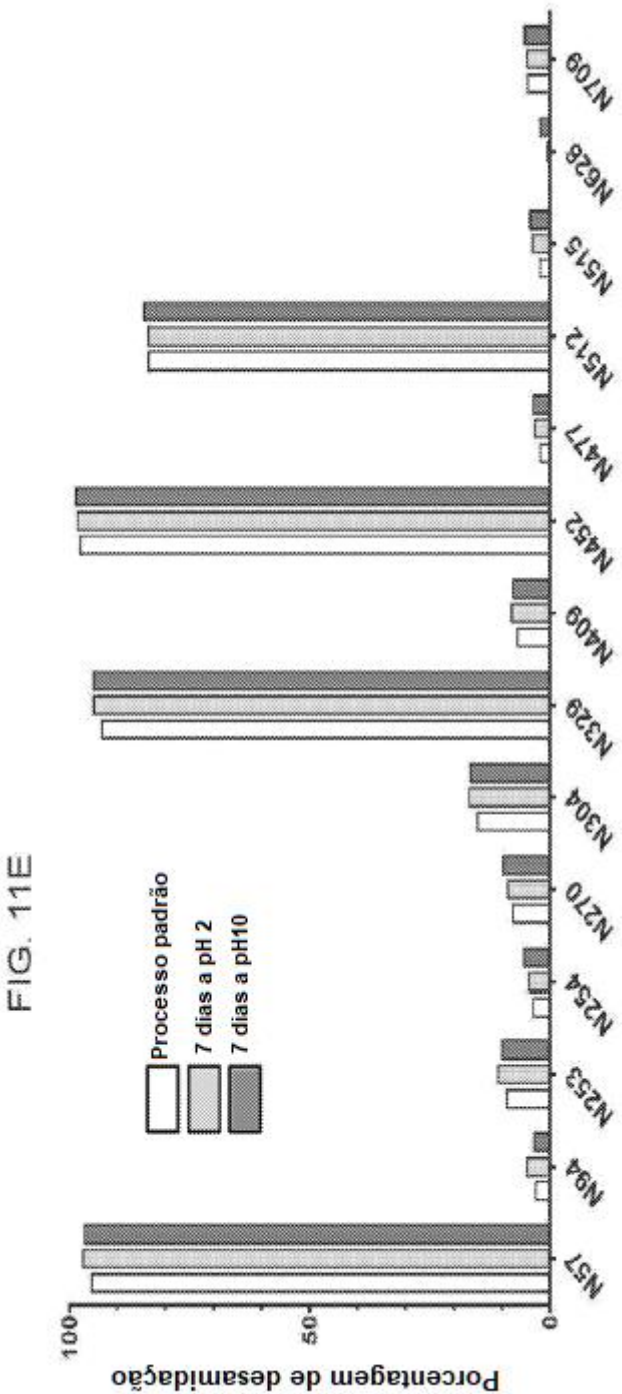


FIG. 11G

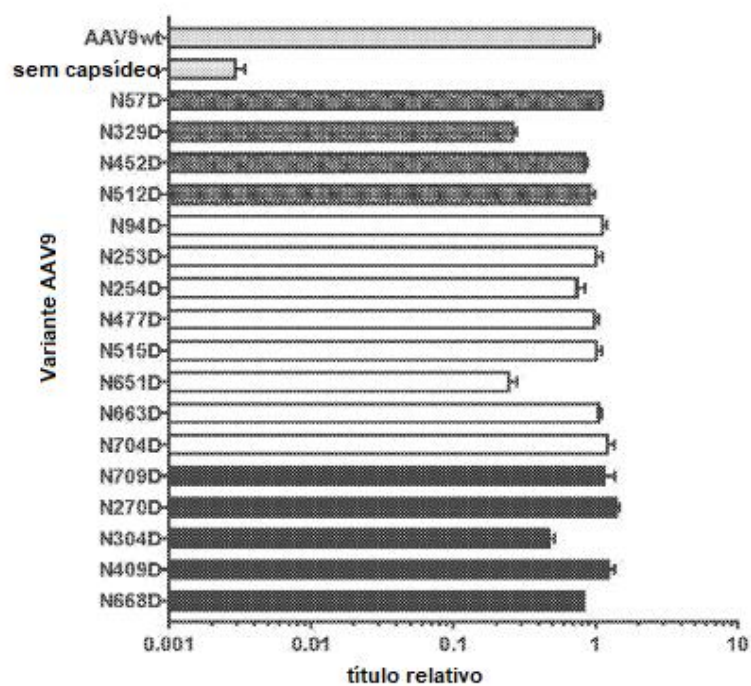


FIG. 11H

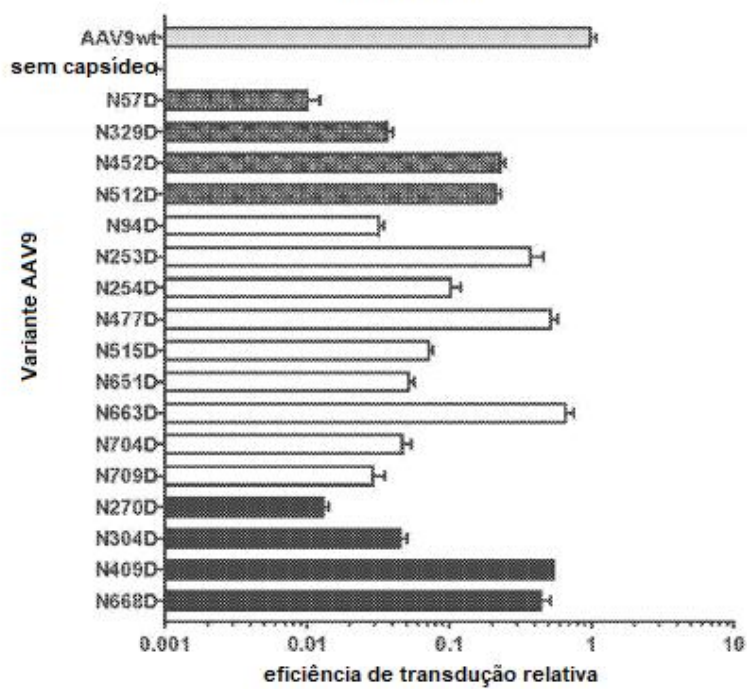


FIG. 11I

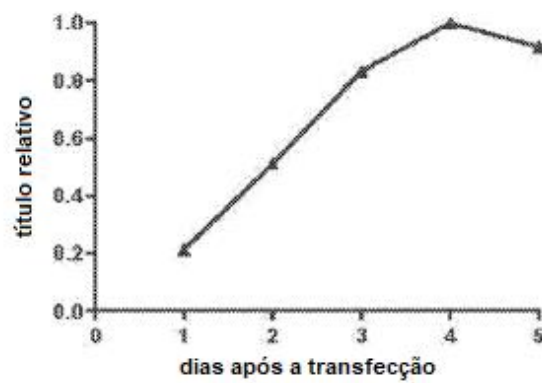


FIG. 11J

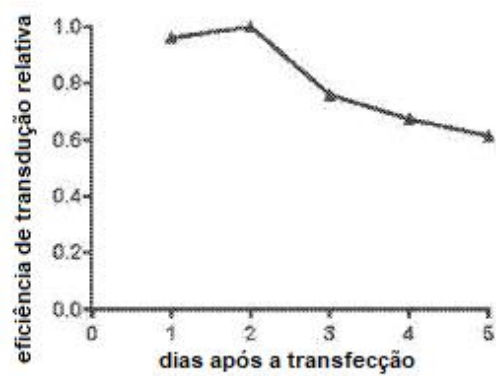


FIG. 11K

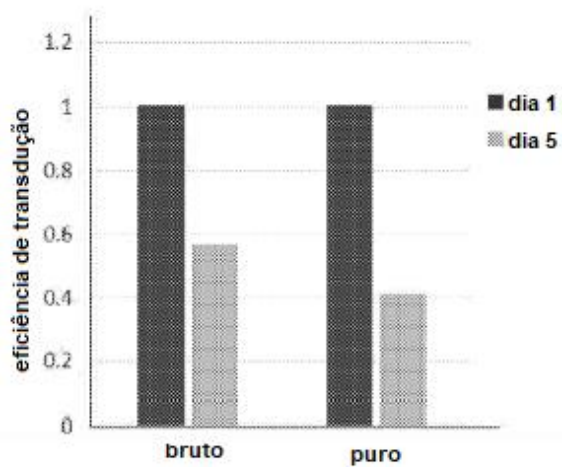


FIG. 12A

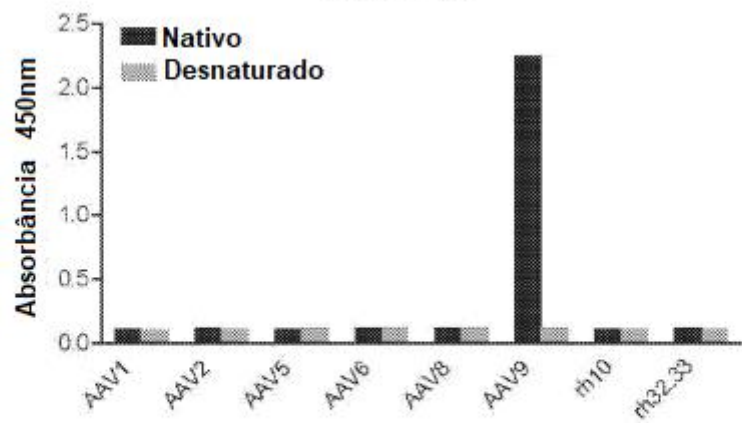
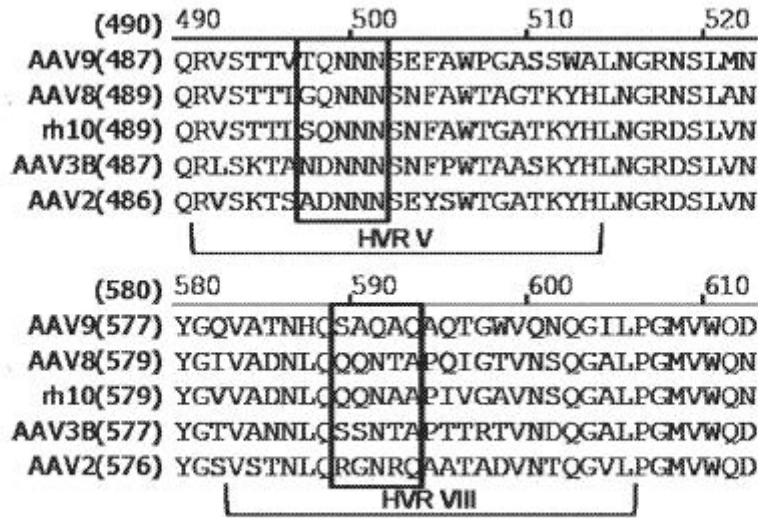


FIG. 12B



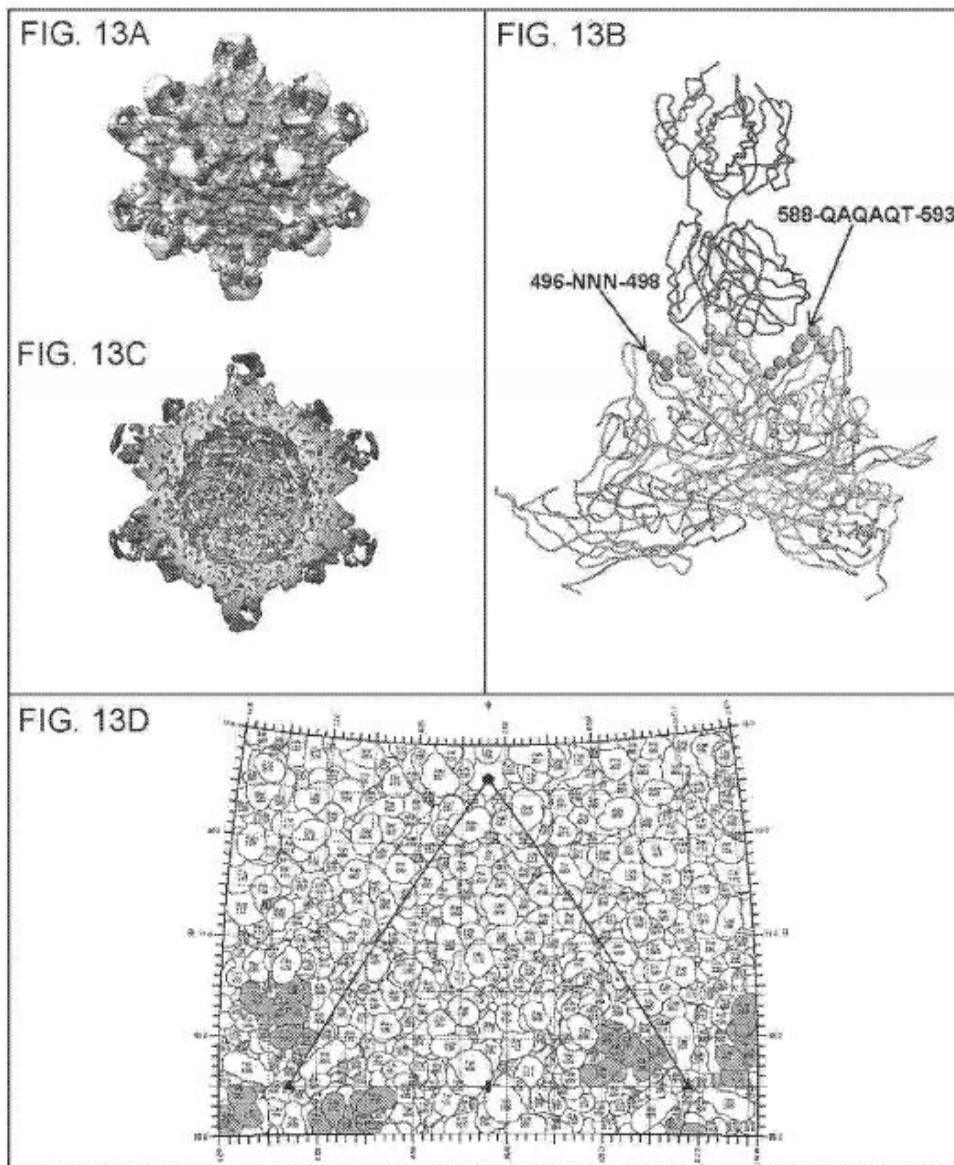


FIG. 14A

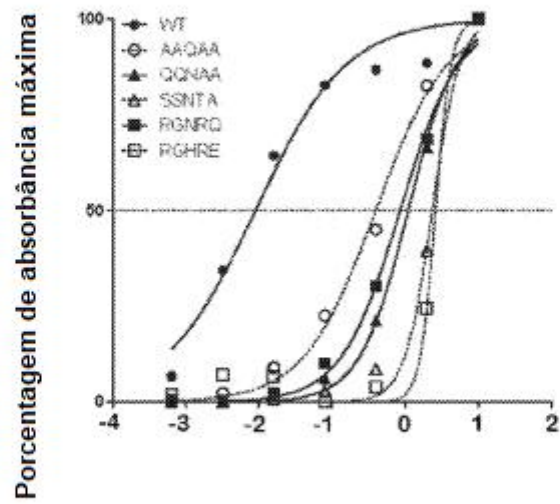


FIG. 14B

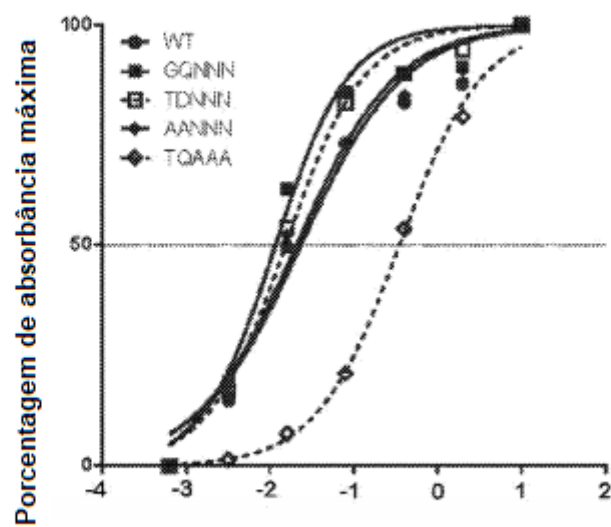


FIG. 14C

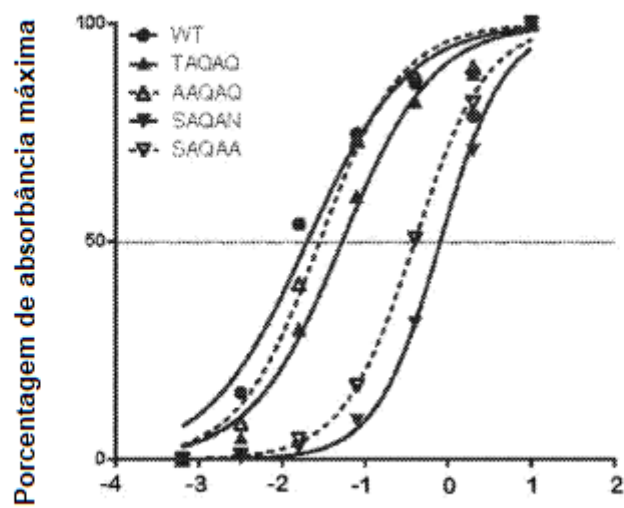


FIG. 14D

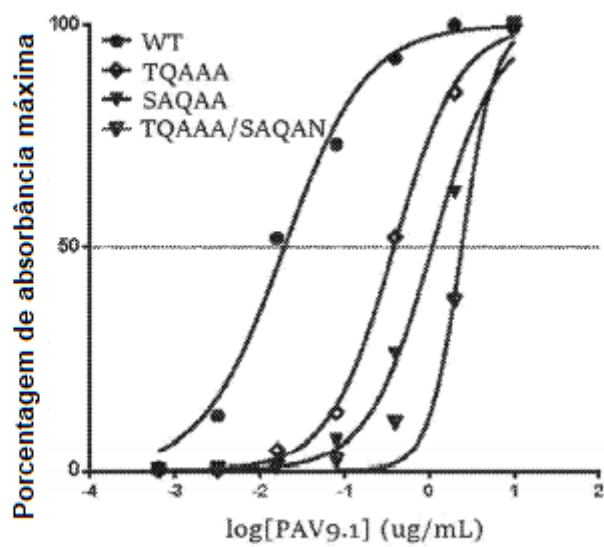


FIG. 14E

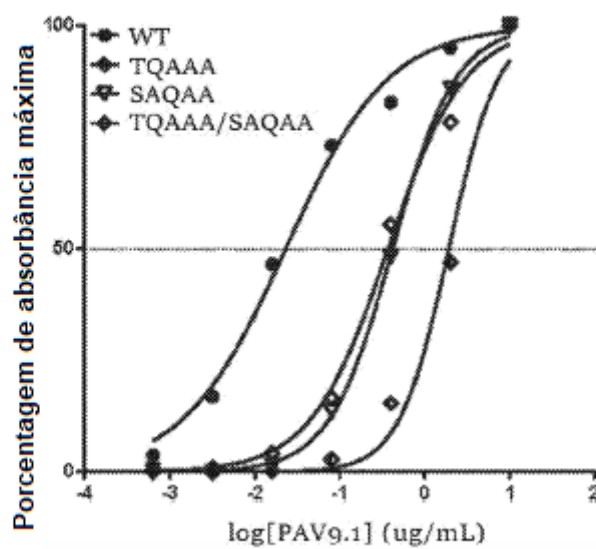


FIG. 15A

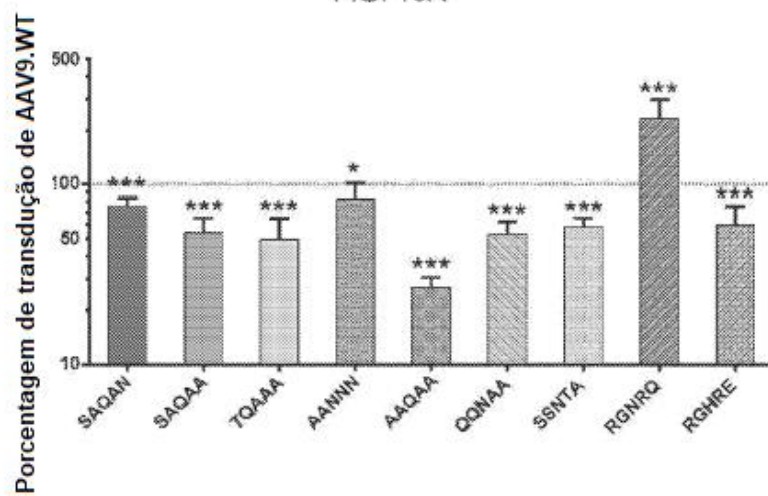


FIG. 15B

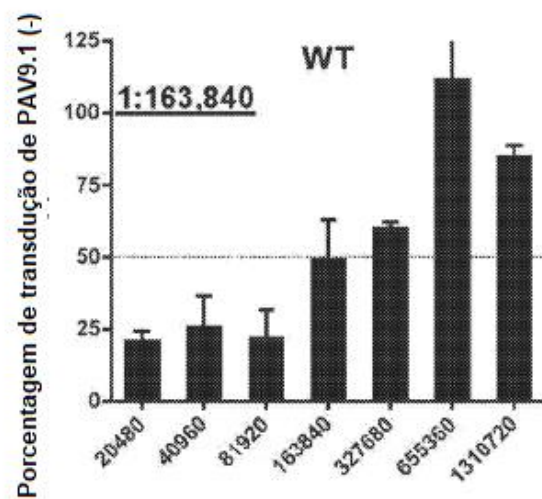


FIG. 15C

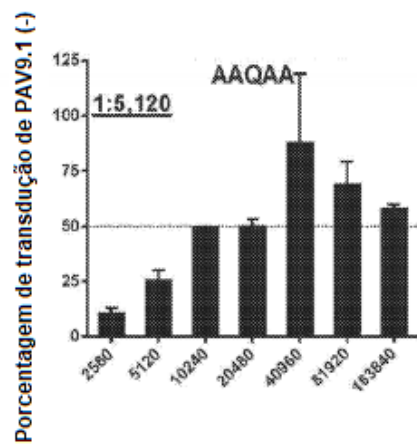


FIG. 15D

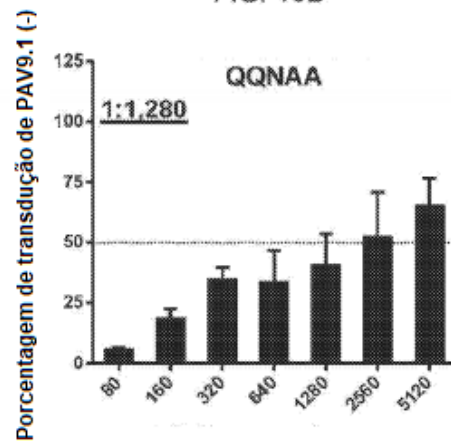


FIG. 15E

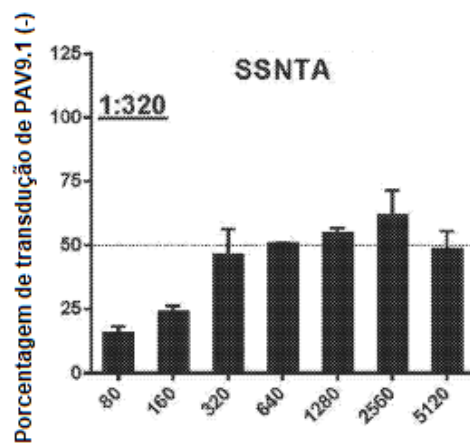


FIG. 15F

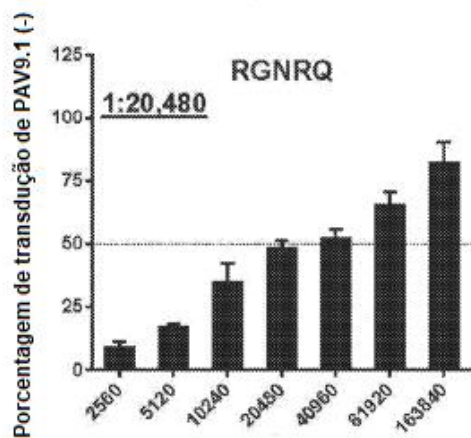


FIG. 15G

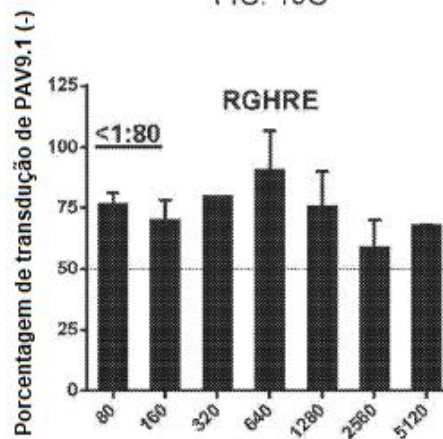
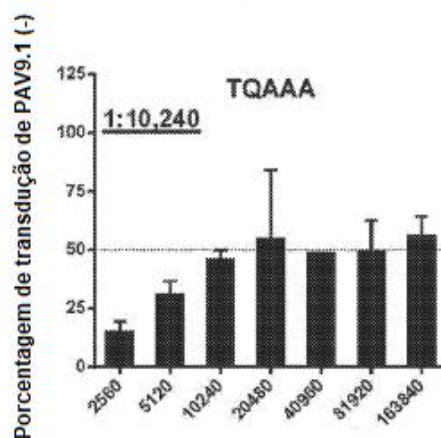


FIG. 15H



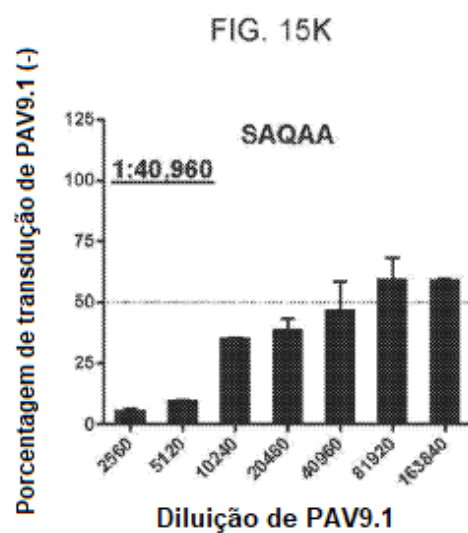
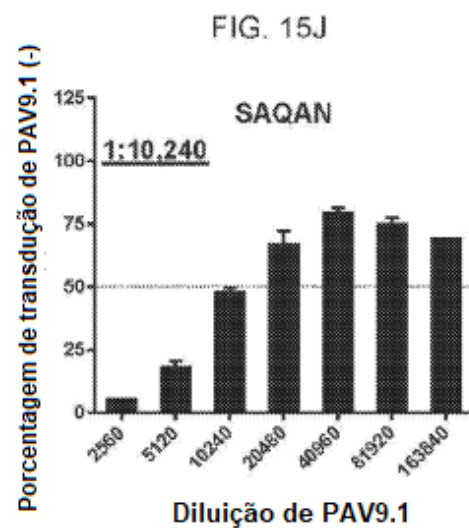
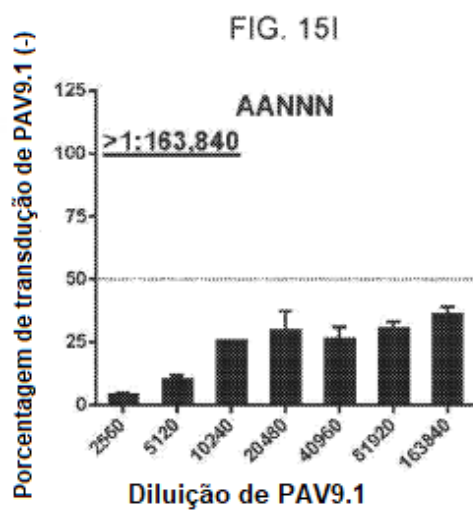
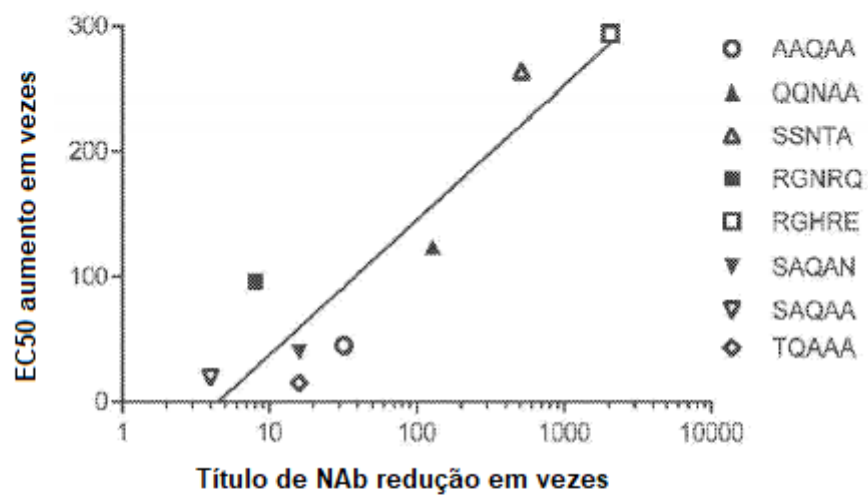


FIG. 16



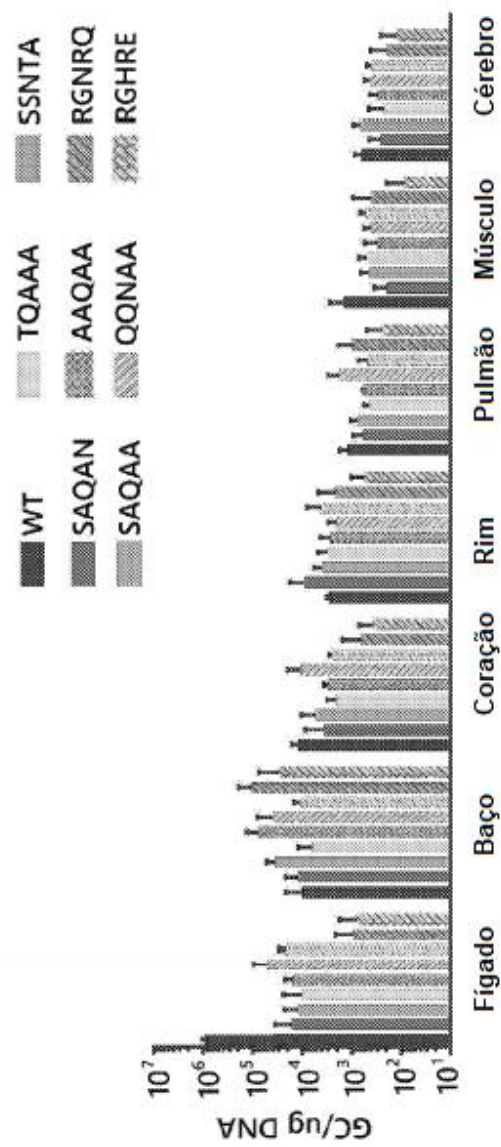
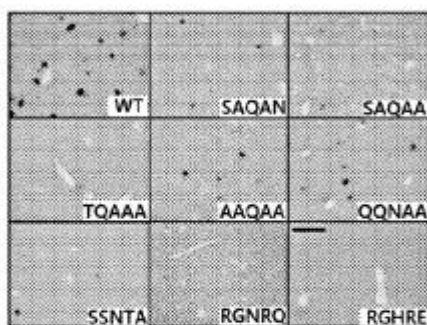
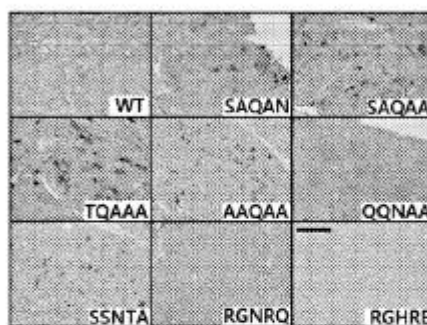


FIG. 17A

Fígado**FIG. 17B****Coração****FIG. 17C**

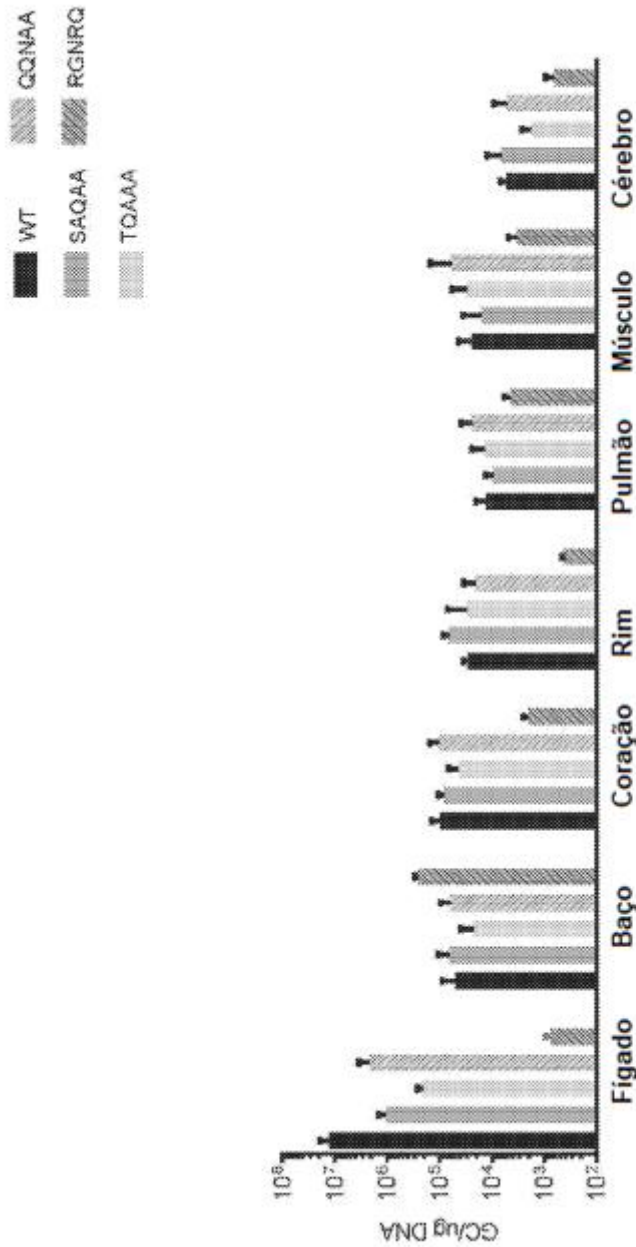


FIG. 17D

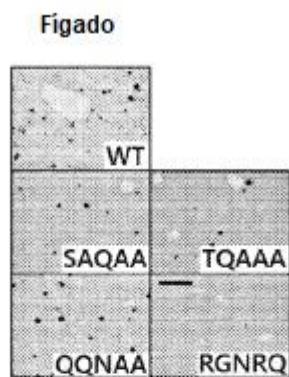


FIG. 17E

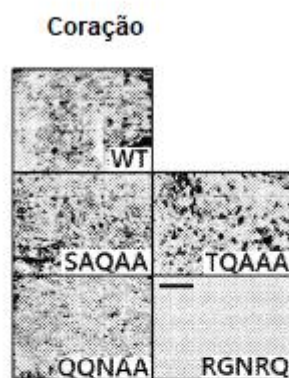


FIG. 17F

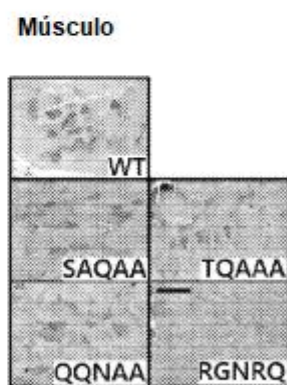
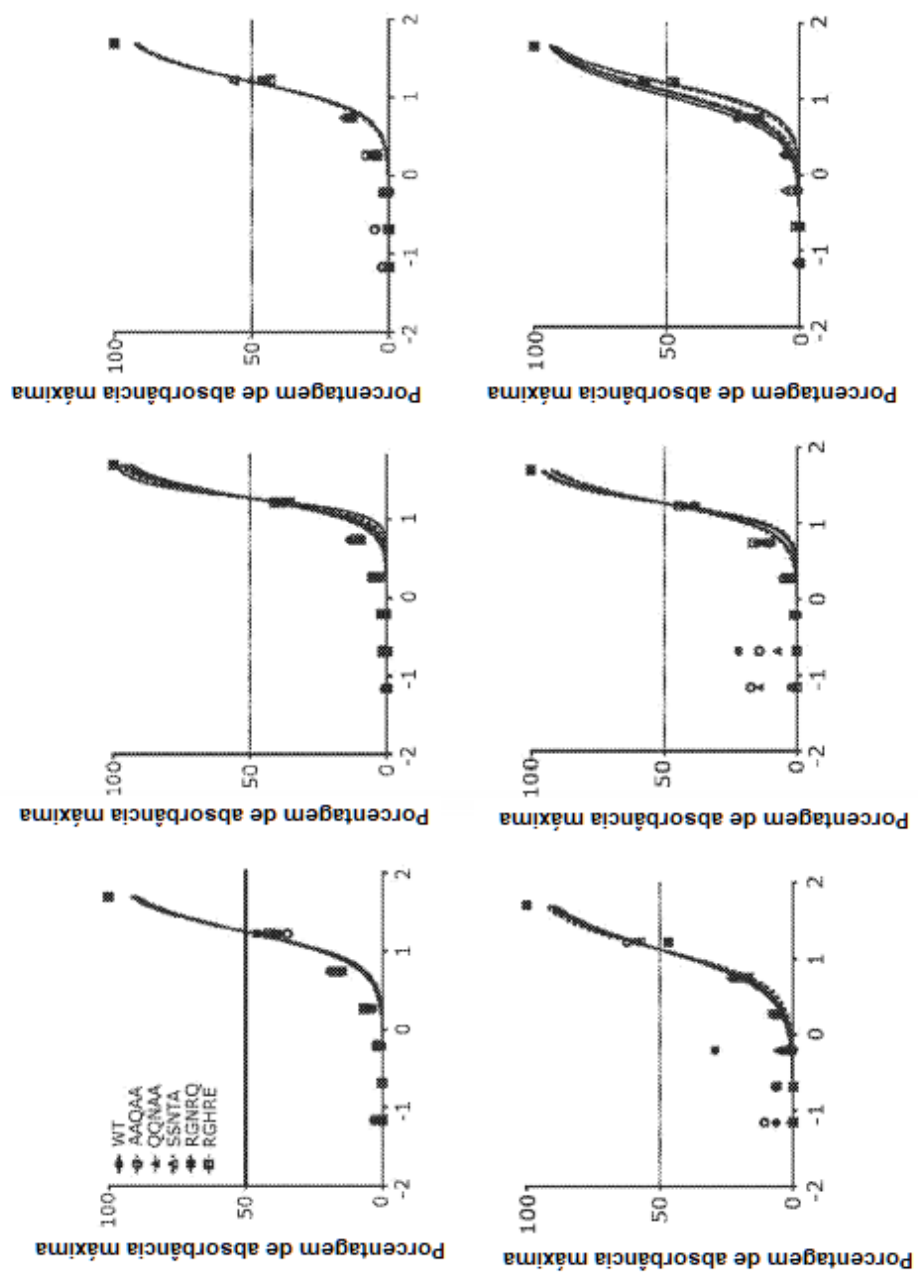
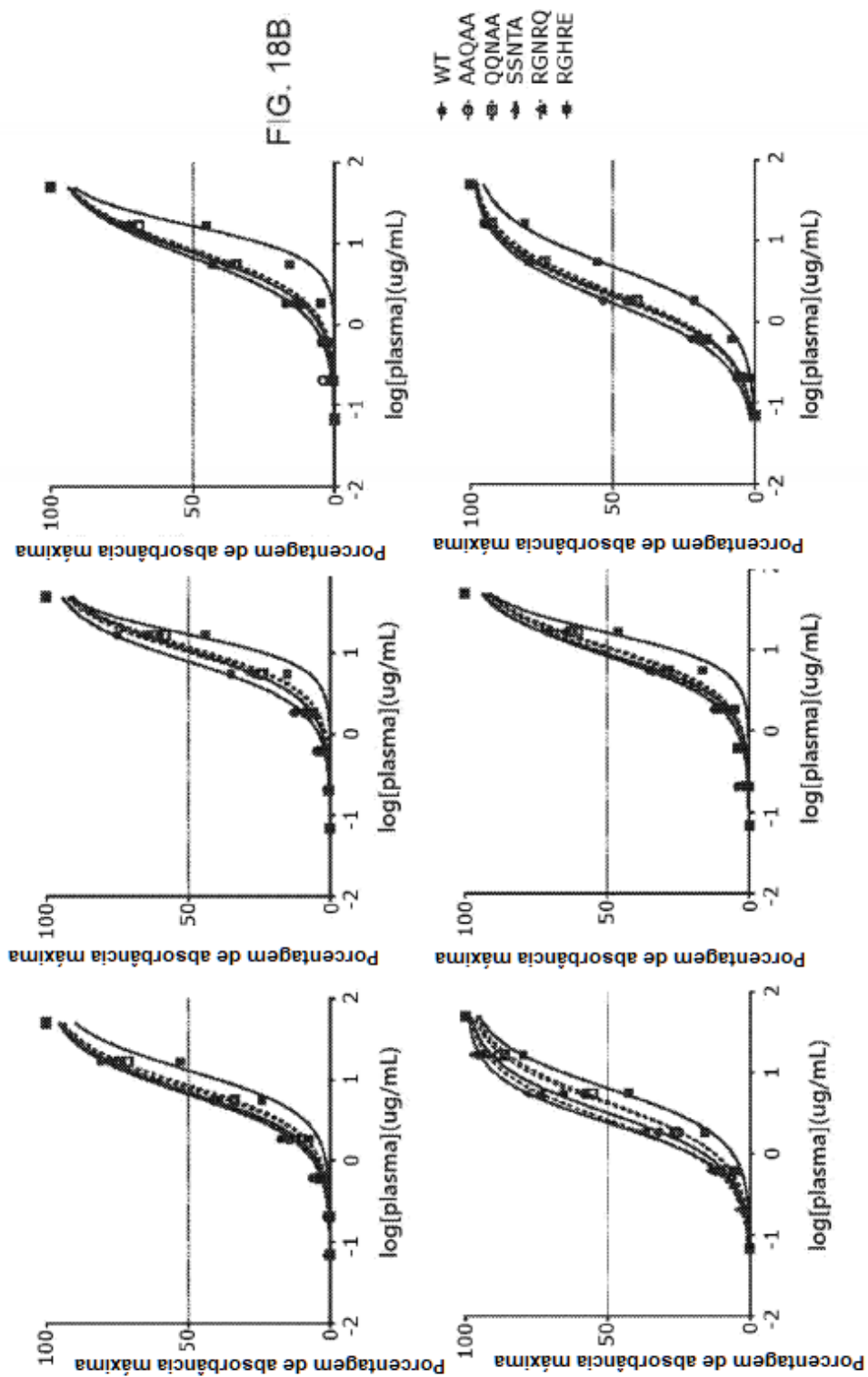


FIG. 17G

FIG. 18A





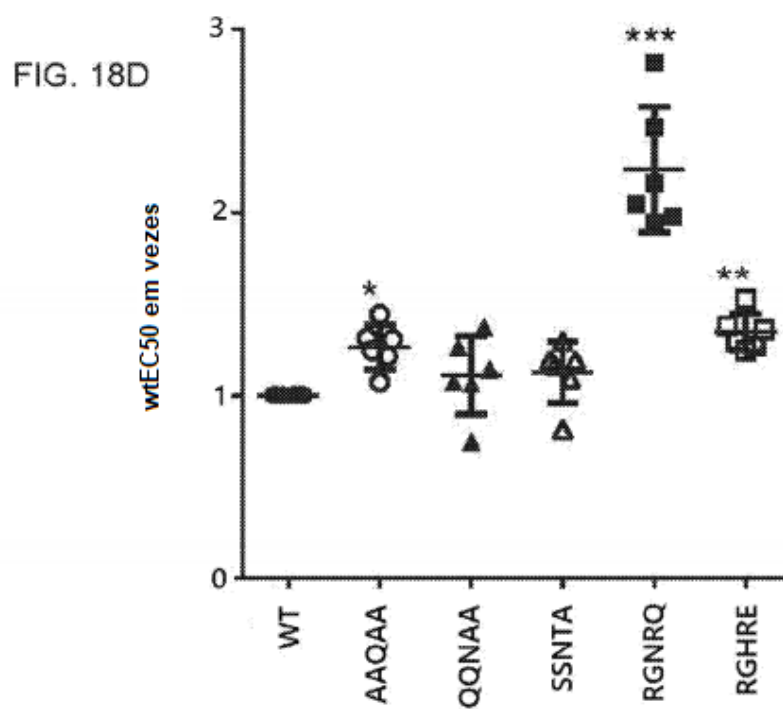
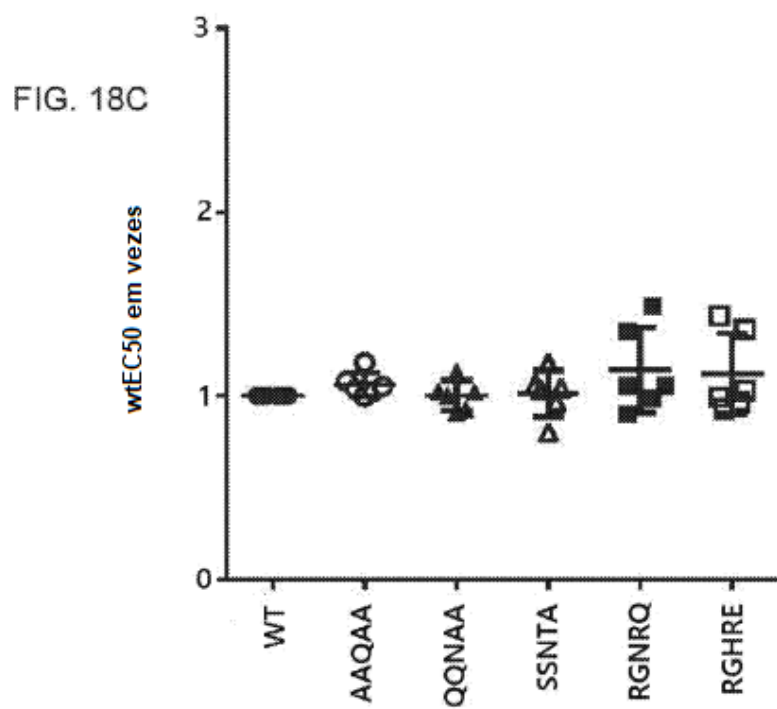
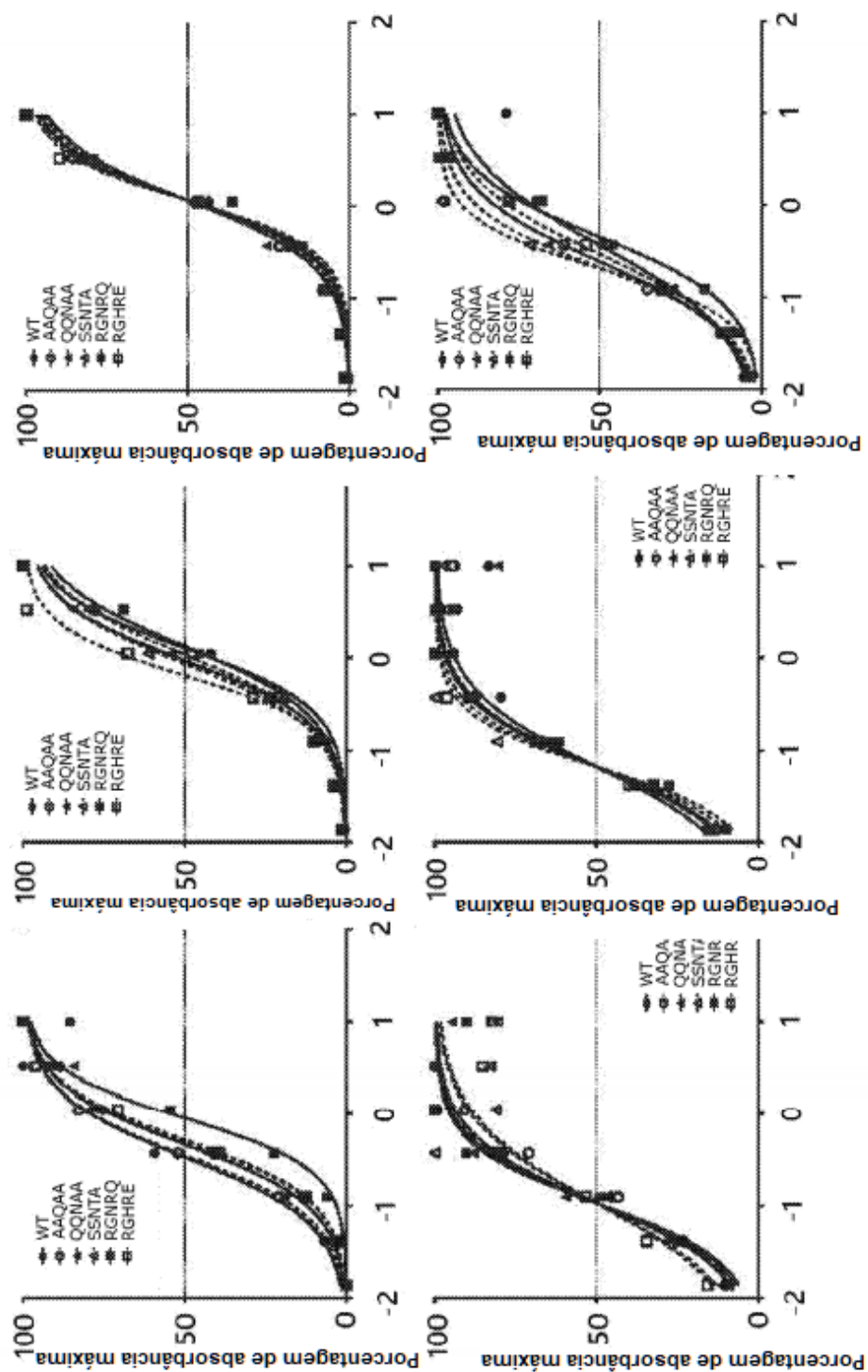
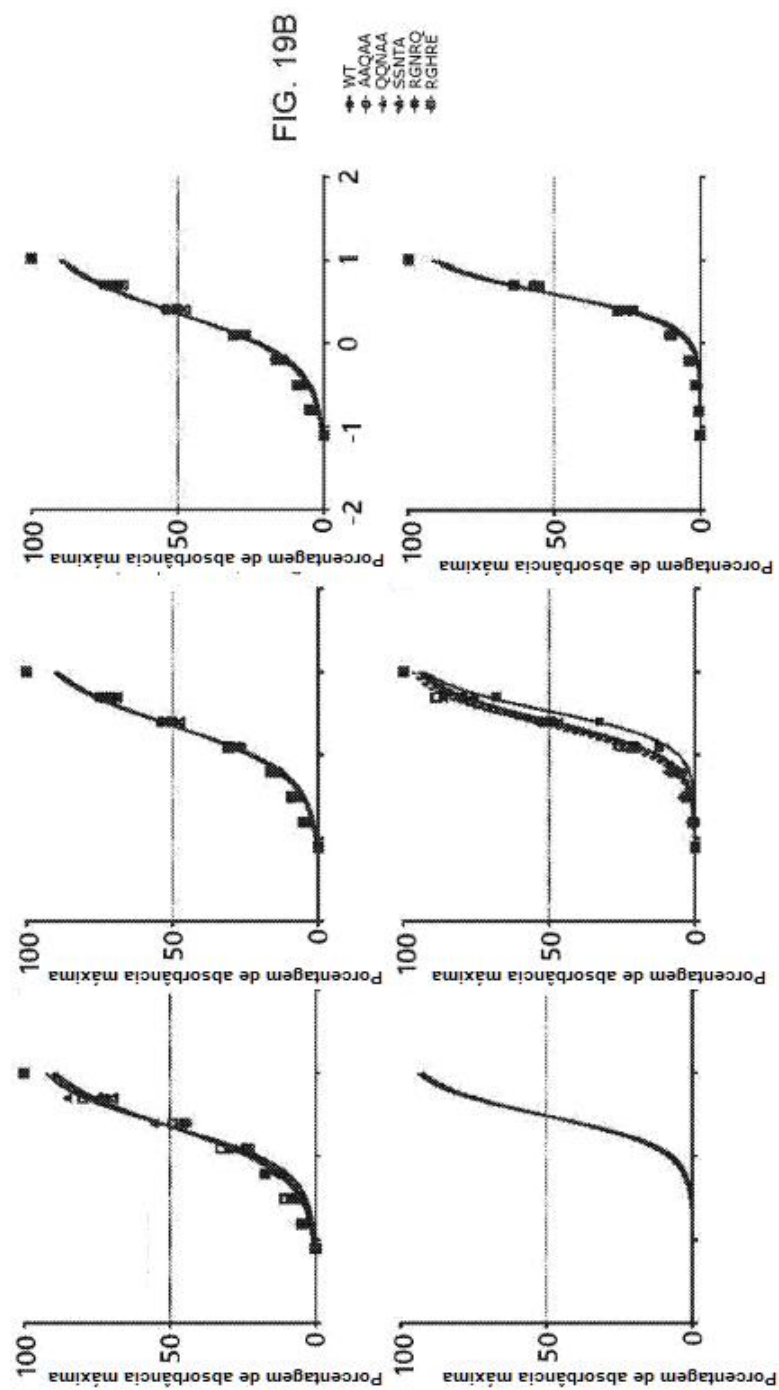


FIG. 19A





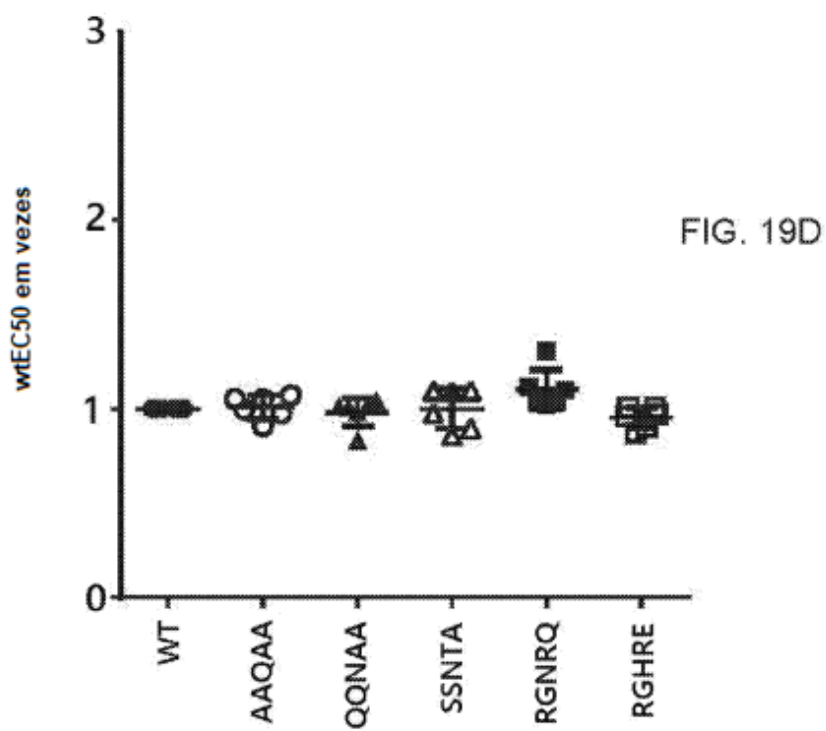
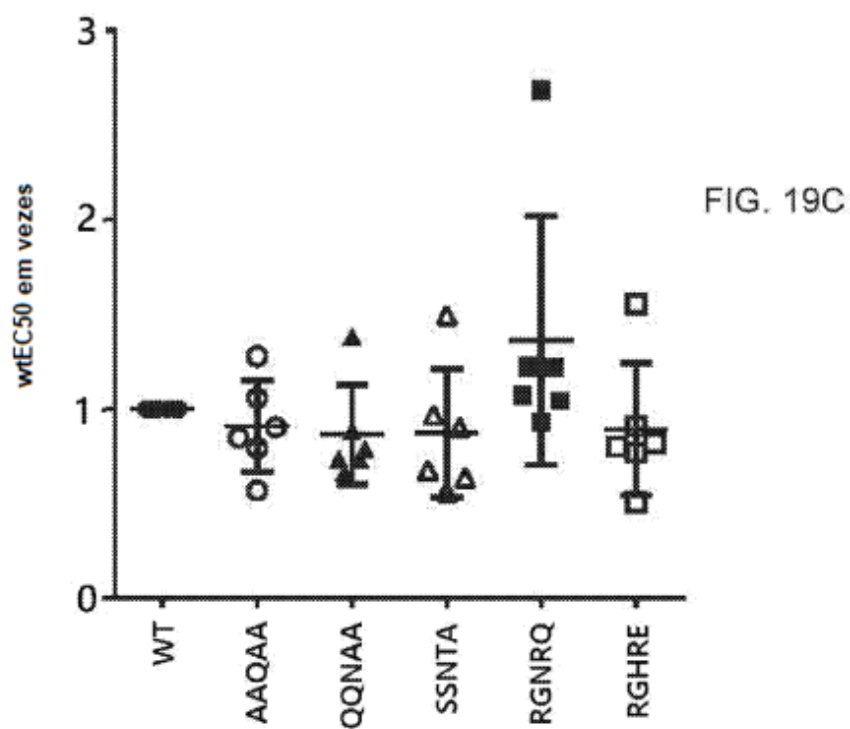


FIG. 20A

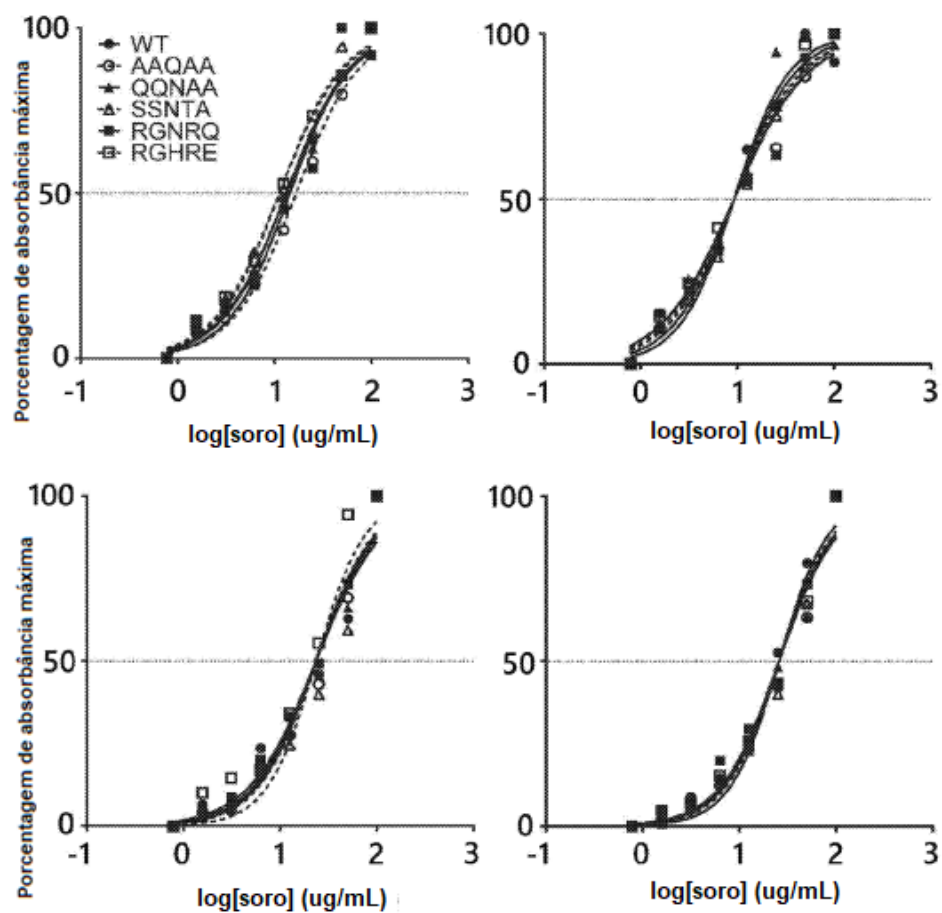
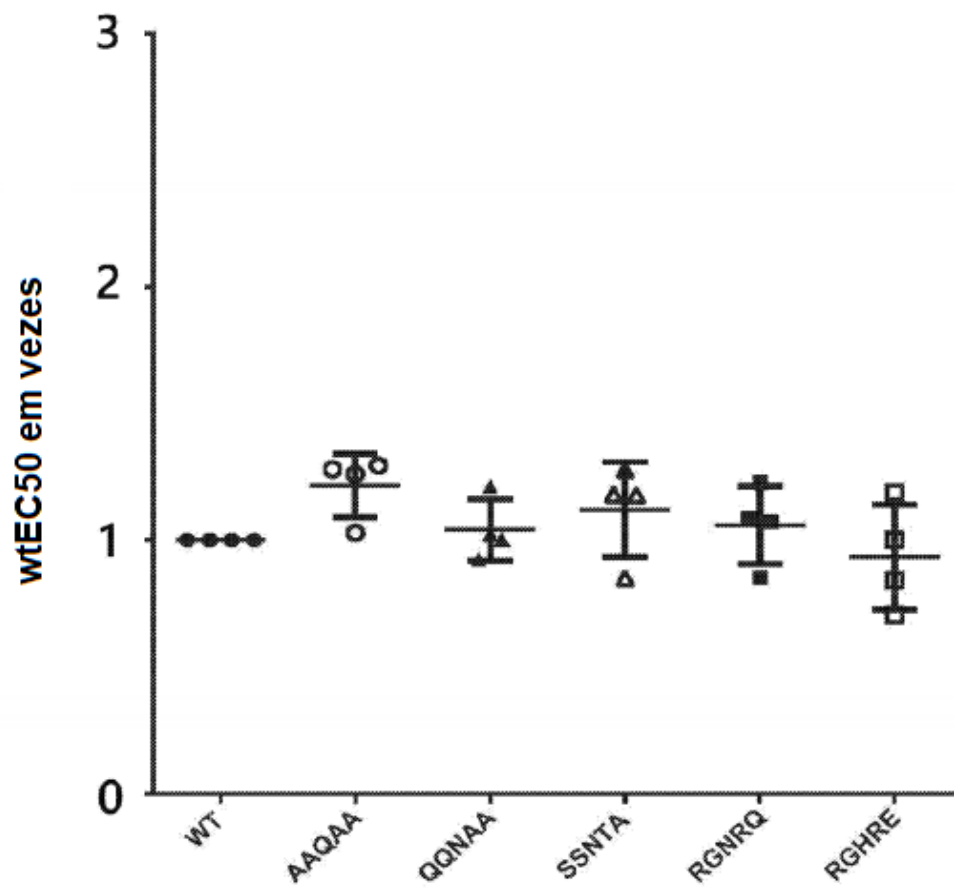
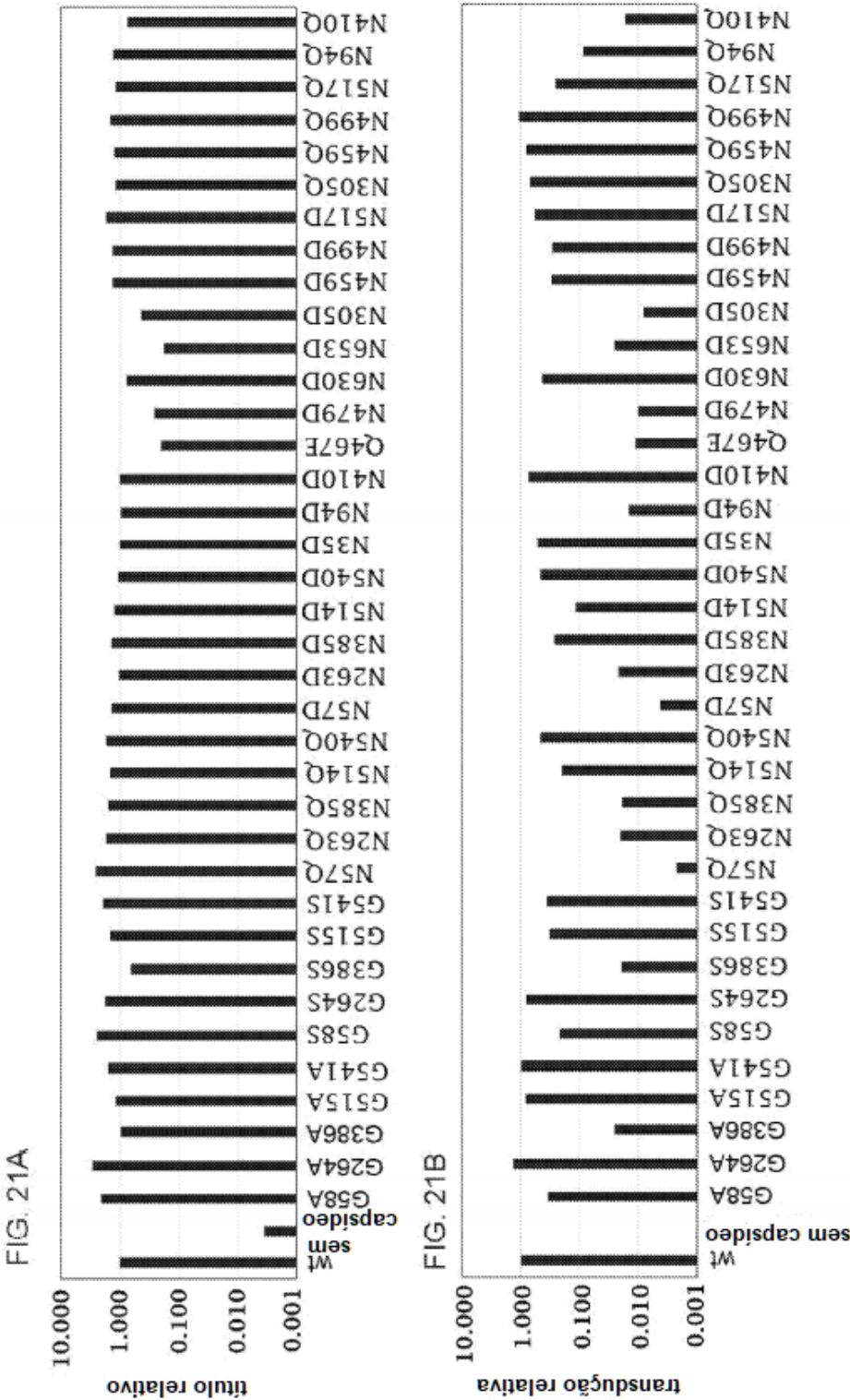


FIG. 20B



Título in vitro de AAV8 e dados de transdução de experimentos em escala de placa de 6 poços



Título in vitro de AAV9 e dados de transdução de experimentos em escala de placa de 6 poços

FIG. 22A

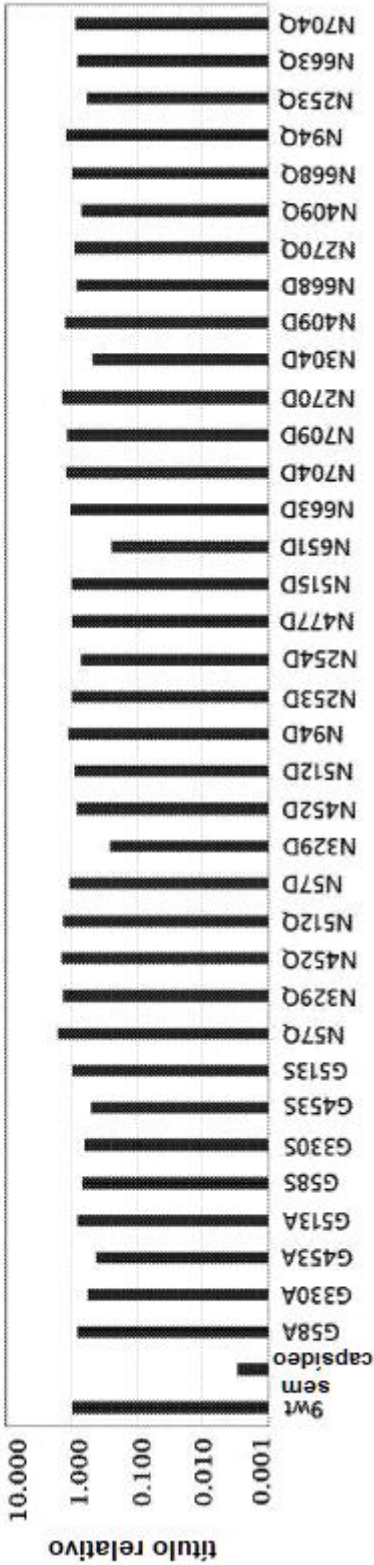
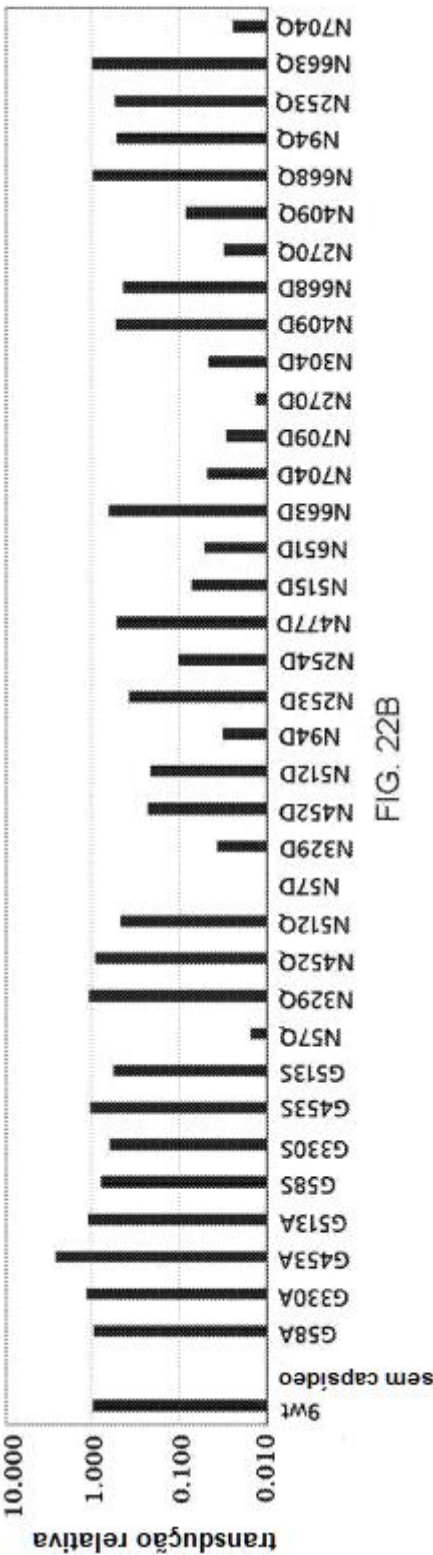


FIG. 22B



Dados de transdução in vivo de AAV8 e AAV9:
expressão de fígado em camundongos, dia 14,
imageamento de luciferase

FIG 23B

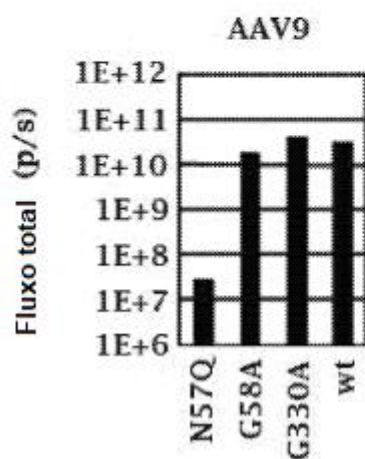
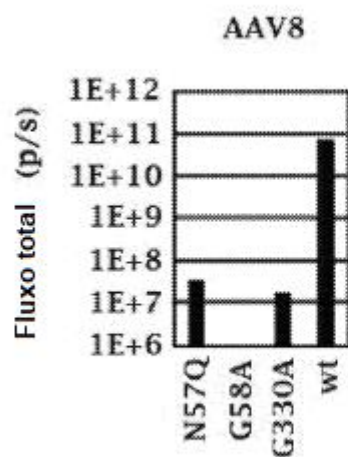
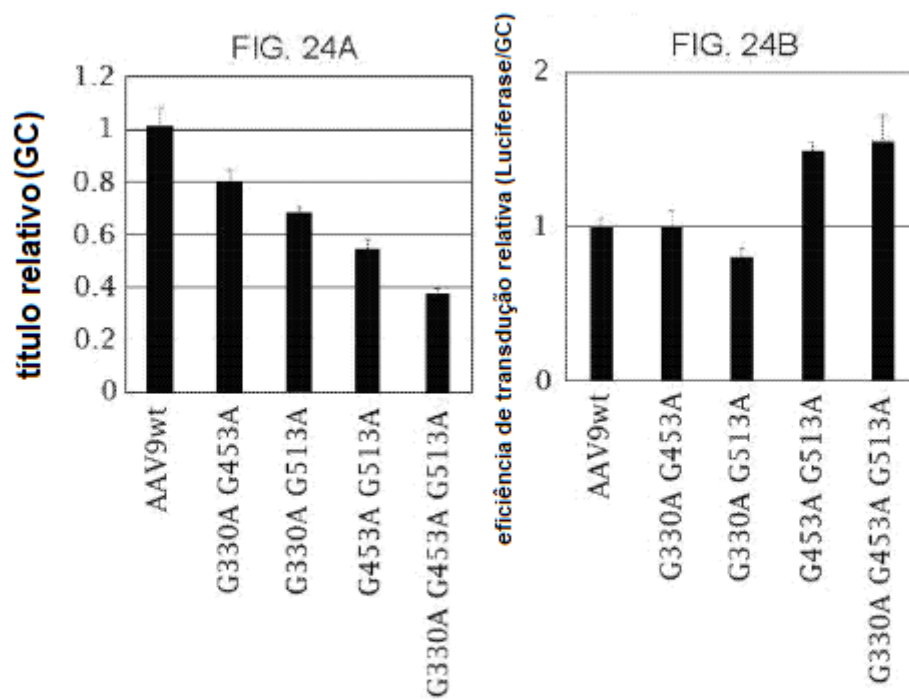


FIG 23A



Mutantes de combinação de AAV9 G para A

RESUMO**"VETORES DE VÍRUS ADENOASSOCIADOS (AAV), VETORES DE AAV TENDO DESAMIDAÇÃO DE CAPSÍDEOS REDUZIDA E USOS DOS MESMOS".**

A presente invenção refere-se a um vetor de vírus adenoassociado recombinante (rAAV) compreendendo um capsídeo de AAV tendo uma população heterogênea de proteínas vp1, uma população heterogênea de proteína vp2 e uma população heterogênea de proteínas vp3. O capsídeo contém aminoácidos modificados em comparação com a sequência de aminoácidos VP1 codificada, o capsídeo contendo resíduos de asparagina altamente desamidados no par asparagina-glicina, e compreendendo ainda vários outros resíduos de asparagina menos desamidada e opcionalmente glutamina. Métodos de redução da desamidação no capsídeo de AAV de um rAAV são fornecidos.

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 EMENDAS - 09-2020 -
- Data de Geração do Código: 30/09/2020
- Hora de Geração do Código: 15:52:05
- Código de Controle:
 - Campo 1: C58140DF3C93EDBC
 - Campo 2: 66FC4D137CDCA79A