



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

(21) BR 112019013245-7 A2



(22) Data do Depósito: 29/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 11/02/2020

(54) Título: TERAPIA GÊNICA PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE WILSON

(51) Int. Cl.: A61K 48/00; C07K 14/755; C12N 15/86.

(30) Prioridade Unionista: 20/03/2017 US 62/473,656; 30/12/2016 US 62/440,659.

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

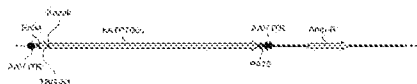
(72) Inventor(es): JAMES M. WILSON; JENNY AGNES SIDRANE; LAKSHMANAN GOVINDASAMY.

(86) Pedido PCT: PCT US2017068919 de 29/12/2017

(87) Publicação PCT: WO 2018/126116 de 05/07/2018

(85) Data da Fase Nacional: 26/06/2019

(57) Resumo: Composições e regimes úteis no tratamento da Doença de Wilson são fornecidos. As composições incluem vírus adenoassociados recombinantes (rAAV) com um potenciador de transtirretina e promotor da expressão dirigida de uma hidroxilase de fenilalanina humana ATP7B.



## **"TERAPIA GÊNICA PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE WILSON".**

### **INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA DO MATERIAL APRESENTADO EM FORMATO ELETRÔNICO**

[001] A Requerente incorpora por referência o material de Listagem de Sequências depositado em formato eletrônico. Este arquivo é denominado "UPN-16-7940PCT\_ST25.txt".

#### **1. INTRODUÇÃO**

[002] O pedido refere-se a modalidades úteis para uma terapia gênica para o tratamento da doença de Wilson.

#### **2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[003] O pedido refere-se a modalidades úteis para uma terapia gênica para o tratamento da doença de Wilson. A doença de Wilson é um distúrbio genético autossômico recessivo do armazenamento de cobre, devido a mutações no gene ATPase 2 (ATP7B) transportador de cobre no cromossomo 13. O cobre acumula-se em tecidos, manifestando-se como sintomas neurológicos ou psiquiátricos e doença hepática tipicamente observados entre as idades de 12 e 23 anos. Ao longo do tempo, sem tratamentos adequados, altos níveis de cobre podem causar danos aos órgãos com risco de vida.

[004] As abordagens atuais de tratamento da doença de Wilson são a terapia oral diária com agentes quelantes (penicilamina [Cuprimine] e cloridrato de trientina [Syprine]), zinco (para bloquear a absorção de cobre pelos enterócitos) e tetratiomolibdato (TM), um quelante de cobre que forma complexos com albumina na circulação, o que exige que o indivíduo afetado tome remédios para toda a vida. Além disso, esses tratamentos podem causar efeitos colaterais - tais como lúpus induzido por drogas, miastenia, piora paradoxal - e não restauram o metabolismo normal do cobre. O transplante de fígado é curativo para a doença de Wilson, mas os receptores de transplante são obrigados a

manter um regime de imunossupressão constante para evitar a rejeição.

### 3. SUMÁRIO

[005] As modalidades descritas neste documento referem-se a um vetor de terapia gênica de AAV para transportar ATPase 2 transportadora de cobre humana (ATP7B) normal a um sujeito com uma tal necessidade, após administração intravenosa (IV) do vetor resultando correção clinicamente significativa da Doença de Wilson ("WD") a longo prazo, talvez 10 anos ou mais. A dose do vetor destina-se a administrar os níveis sanguíneos de ATP7B para reduzir os níveis de cobre circulante em cerca de 25% ou mais. Em uma modalidade, o nível de cobre circulante é avaliado por meio da excreção de cobre na urina. Em outra modalidade, o nível de cobre circulante no plasma é avaliado.

[006] Em um aspecto, este pedido fornece o uso de um vírus adenoassociado deficiente para replicação (AAV) para fornecer um gene de ATPase 2 transportadora de cobre humana (ATP7B) para células de fígado de pacientes (humanos) diagnosticados com WD. O vetor AAV recombinante (rAAV) usado para entregar o gene hATP7B ("rAAV.hATP7B") deve ter um tropismo para o fígado (por exemplo, um rAAV portador de um capsídeo AAV8), e o transgene hATP7B deve ser controlado por elementos de controle de expressão específicos ao fígado. Em uma modalidade, os elementos de controle de expressão incluem um ou mais dentre os seguintes: um potenciador; um promotor; um íntron; um WPRE; e um sinal polyA. Tais elementos são adicionalmente descritos neste documento. Devido ao tamanho da sequência de codificação do hATP7B, a seleção de elementos de controle que permitem a expressão efetiva é importante. Se a expressão do transgene não for suficiente, a dosagem do vetor necessária para a correção do defeito será muito alta para ser prática. Assim, tal como descrito neste documento, a seleção do promotor, potenciador e polyA

é importante.

[007] Em uma modalidade, a sequência de codificação de hATP7B é apresentada na SEQ ID NO: 1. Em uma modalidade, a sequência da proteína ATP7B é apresentada na SEQ ID NO: 2. A sequência de codificação para o hATP7B é, em uma modalidade, otimizada por códons para expressão em humanos. Tal sequência pode partilhar menos do que 80% de identidade com a sequência de codificação do hATP7B nativo (SEQ ID NO: 3). Em uma modalidade, a sequência de codificação de hATP7B é aquela apresentada na SEQ ID NO: 1.

[008] Em outro aspecto, é fornecida neste documento uma suspensão aquosa adequada para administração a um paciente WD que inclui o rAAV descrito neste documento. Em algumas modalidades, a suspensão inclui um líquido de suspensão aquosa e cerca de  $1 \times 10^{12}$  a cerca de  $1 \times 10^{14}$  cópias do genoma (GC) do rAAV/mL. A suspensão é, em uma modalidade, adequada para injeção intravenosa. Em outra modalidade, a suspensão inclui ainda um tensoativo, conservante e/ou tampão dissolvido no líquido de suspensão aquosa.

[009] Em outra modalidade, é proporcionado neste documento um método para tratar um paciente com WD com um rAAV, como descrito neste documento. Em uma modalidade, cerca de  $1 \times 10^{11}$  a cerca de  $3 \times 10^{13}$  cópias do genoma (GC) do rAAV/kg de peso corporal do doente são entregues ao paciente em uma suspensão aquosa.

### 3. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0010] A FIG. 1 é uma representação esquemática do vetor AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco.PA75.

[0011] As FIGURAS 2A-2B demonstram que os níveis de cobre na urina e séricos aumentam com o tempo em camundongos *Atp7b* KO. Níveis de cobre (A) na urina e (B) séricos em camundongos *Atp7b* KO ao longo do tempo (preto). Crias de uma mesma ninhada heterozigotos (Het) serviram como controle (cinza). Amostras foram coletadas

semanalmente no estudo de história natural e espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente foi realizada para avaliar o nível de cobre.

[0012] As FIGURAS 3A-3C demonstram níveis de cobre na urina, níveis de cobre séricos e escore de doença hepática em camundongos Atp7b KO. Níveis de cobre (A) na urina e (B) séricos foram avaliados por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente em camundongos (Het) e Atp7b KO heterozigotos machos e fêmeas ao longo do tempo (KO). (C) Camundongos Atp7b KO foram necropsiados aos 2, 3, 4, 5, 9, 10 e 12 meses de idade. O fígado foi coletado, corado com H&E e avaliado histologicamente de acordo com o sistema de pontuação 1-5. Valores expressos como média  $\pm$  SEM.

[0013] A FIG. 4 demonstra a coloração de Timm em camundongos Atp7b KO. Resultado representativo da coloração de Timm para cobre no fígado de um camundongo Atp7b KO de 2 meses de idade com número de identificação 1345. Depósitos pretos indicam coloração positiva para o cobre. Um camundongo selvagem de 3,7 meses de idade com o número de identificação 307 serviu como controle negativo.

[0014] A FIG. 5 demonstra que a doença hepática se desenvolve ao longo do tempo em camundongos Atp7b KO. Camundongos Atp7b KO foram necropsiados aos 2, 3, 4, 5, 9, 10 e 12 meses de idade e o fígado foi coletado para avaliar a doença hepática. As colorações de H&E, Sirius Red e Timm foram realizadas para avaliação histopatológica de lesões hepáticas, incluindo fibrose e acúmulo de cobre. \*, área de regeneração no fígado de um camundongo Atp7b KO de 12 meses de idade. WT, seção de um camundongo do tipo selvagem como um controle negativo para o acúmulo de cobre, como visto pela coloração de Timm.

[0015] As FIGURAS 6A-6C demonstram valores de química sérica em camundongos Atp7b KO de 8 meses de idade. Níveis de (A) ALT,

(B) AST, e (C) bilirrubina total em camundongos Atp7b KO (KO) com 8 meses de idade e em camundongos heterozigotos (Het).

[0016] A FIG. 7 demonstra doença hepática em camundongos Atp7b KO com 8 meses de idade. Os camundongos Atp7b KO e heterozigotos (Het) foram necropsiados aos 8 meses de idade. O fígado foi coletado, corado com H&E e avaliado histologicamente de acordo com o sistema de pontuação 1-5. Valores expressos como média  $\pm$  SEM.

[0017] As FIGURAS 8A e 8B demonstram fibrose do fígado e acumulação de cobre em camundongos Atp7b KO com 8 meses de idade. Os camundongos Atp7b KO (KO) e heterozigotos (Het) foram necropsiados aos 8 meses de idade. O fígado foi coletado, corado com Sirius Red e Timm para avaliação de fibrose e acúmulo de cobre, respectivamente. A avaliação histopatológica das lesões hepáticas, incluindo (A) fibrose e (B) acúmulo de cobre, foi realizada de acordo com o sistema de pontuação 1-5. Valores expressos como média  $\pm$  SEM.

[0018] A FIG. 9 demonstra níveis de cobre no fígado nos camundongos Atp7b KO com 8 meses de idade os camundongos Atp7b KO (KO) e heterozigóticos (Het) foram necropsiados aos 8 meses de idade. O fígado foi coletado e os níveis de cobre no fígado foram avaliados por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente. Valores expressos como média  $\pm$  SEM.

[0019] As FIGURAS 10A-10C demonstram que a terapia gênica com AAV8 pode restaurar o metabolismo normal de cobre do fígado em camundongos Atp7b KO. Camundongos machos Atp7b KO foram injetados *i.v.* com  $10^{11}$  GC/camundongo e  $10^{10}$  GC/camundongo de AAV8.TTR.hATP7Bco, e camundongos fêmeas Atp7b KO foram injetadas *i.v.* com  $10^{11}$ ,  $10^{10}$  e  $10^9$  GC/camundongo do mesmo vetor. Os níveis séricos de cobre em (A) machos e (B) fêmeas foram avaliados por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente e

comparados com os níveis de cobre sérico de camundongos heterozigotos (het) e Atp7b KO de mesma idade. Os camundongos foram necropsiados aos 9 meses de idade e o fígado foi coletado. (C) Os níveis de cobre no fígado também foram avaliados por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente e comparados com camundongos heterozigotos (het) e Atp7b KO não injetados pareados por idade. Valores expressos como média  $\pm$  SEM. ns, não significativo; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

[0020] A FIG. 11 demonstra que a terapia gênica com AAV8 em alta dose previne o desenvolvimento de doença hepática em camundongos Atp7b KO. Camundongos Atp7b KO machos foram injetados *i.v.* com  $10^{11}$  GC/camundongo e  $10^{10}$  GC/camundongo de AAV8.TTR.hATP7Bco e camundongos fêmeas Atp7b KO foram injetadas *i.v.* com  $10^{11}$ ,  $10^{10}$  e  $10^9$  GC/camundongo do mesmo vetor. Os camundongos foram necropsiados aos 9 meses de idade e o fígado foi coletado para avaliar a doença hepática. A coloração de H&E, Sirius Red e Timm foi realizada para avaliar lesões histopatológicas do fígado, incluindo fibrose e acúmulo de cobre. Imagens de camundongos Atp7b KO não injetados pareados por idade são incluídas para comparação (também apresentadas na Figura 2). WT, seção de um camundongo do tipo selvagem (WT) como um controle negativo para o acúmulo de cobre, como visto pela coloração de Timm. KO, seção de um camundongo Atp7b KO de dois meses de idade como um controle positivo para o acúmulo de cobre, como visto pela coloração de Timm.

[0021] As FIGURAS 12A-12C demonstram a quantificação da prevenção da doença do fígado após terapia gênica com AAV8 em alta dose em camundongos Atp7b KO. Camundongos machos Atp7b KO foram injetados *i.v.* com  $10^{11}$  GC/camundongo e  $10^{10}$  GC/camundongo de AAV8.TTR.hATP7Bco e camundongos fêmeas Atp7b KO foram injetadas *i.v.* com  $10^{11}$ ,  $10^{10}$  e  $10^9$  GC/camundongo do mesmo vetor. Os

camundongos foram necropsiados aos 9 meses de idade e o fígado foi coletado para avaliação histológica. (A) As seções do fígado foram coradas com H&E e avaliadas histologicamente de acordo com o sistema de pontuação 1-5. (B) As seções do fígado foram coradas com Sirius Red e avaliadas quanto à fibrose de acordo com o sistema de pontuação 1-3 e (C) a coloração de Timm foi realizada nas seções do fígado para avaliação da acumulação de cobre de acordo com o sistema de pontuação 1-5. Valores expressos como média  $\pm$  SEM foram comparados com camundongos (Het) e Atp7b KO heterozigotos não injetados pareados por idade, ns, não significativos; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

[0022] As FIGURAS 13A-13C demonstram níveis de química sérica em camundongos Atp7b KO após terapia gênica com AAV8. Camundongos machos Atp7b KO foram injetados *i.v.* com  $10^{11}$  GC/camundongo e  $10^{10}$  GC/camundongo de AAV8.TTR.hATP7Bco e camundongos fêmeas Atp7b KO foram injetadas *i.v.* com  $10^{11}$ ,  $10^{10}$  e  $10^9$  GC/camundongo do mesmo vetor. Níveis de (A) ALT, (B) AST e (C) bilirrubina total foram avaliados no soro.

[0023] A FIG. 14 demonstra a detecção de ceruloplasmina por Western blot. Western blot detectando formas de ceruloplasmina ligadas a cobre (Holo, banda inferior) e não ligadas a cobre (Apo, banda superior) em camundongos Atp7b KO injetados *i.v.* com  $10^{10}$  ou  $10^{11}$  GC por camundongo de AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75. Amostras de sangue foram coletadas no dia 21 após a administração. Marcadores de proteína foram fornecidos na faixa central para comparação. Crias da mesma ninhada de Atp7b KO e heterozigotos (het) sem injeções de vetor serviram como controles (1318, het de 6 meses de idade; 1313, Atp7b KO de 6 meses de idade; 388, Atp7b KO).

[0024] As FIGURAS 15A-15B demonstram níveis de cobre no soro em camundongos Atp7b KO, fêmeas e machos, administrados com

vetor AAV8. Os camundongos Atp7b KO foram administrados *i.v.* com  $3 \times 10^{12}$ /kg de vetores AAV8 para expressão de hATP7Bco com diferentes combinações de potenciador/promotor (círculos, EnTTR.TTR, AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75; quadrados, En34.TBG-S1, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco.PA75; triângulos em pé, En34.TTR, AAV8.En34.TTR.hATP7Bco.PA75; triângulos invertidos, ABPS.TBG-S1, AAV8.ABPS.TBG-S1.hATP7Bco.PA75; diamantes, En34.mTTR, AAV8.En34.mTTR.hATP7Bco.PA75). Camundongos Atp7b e heterozigotos (Het) não injetados serviram como controles. Os níveis de cobre no soro foram avaliados por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente em camundongos Atp7b KO (A) fêmeas e (B) machos. Valores expressos como média  $\pm$  SEM.

[0025] As FIGURAS 16A-16C demonstram as químicas séricas em camundongos Atp7b KO administrados com vetor AAV8, fêmeas e machos. Os camundongos Atp7b KO fêmea e macho foram administrados *i.v.* com  $3 \times 10^{12}$ /kg de vetores AAV8 para expressão de hATP7Bco com diferentes combinações de potenciador/promotor (EnTTR.TTR, AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75; En34.TBG-S1, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco.PA75; En34TTR, AAV8.En34.TTR.hATP7Bco.PA75; ABPS.TBG-S1, AAV8.ABPS.TBG-S1.hATP7Bco.PA75; En34.mTTR, AAV8.En34.mTTR.hATP7Bco.PA75). Os camundongos Atp7b KO administrados com controle de veículo (PBS) serviram como controles. Os níveis de (A) ALT, (B) AST e (C) bilirrubina total foram avaliados no soro. Valores expressos como média  $\pm$  SEM.

[0026] A FIG. 17 demonstra a expressão de ATP7Bco no fígado determinada por Western blot. Os camundongos Atp7b KO fêmea e macho foram administrados *i.v.* com  $3 \times 10^{12}$ /kg de vetores AAV8 para expressão de hATP7Bco com diferentes combinações de potenciador/promotor (EnTTR.TTR,

AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75; En34.TBG-S1, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco.PA75; En34.TTR, AAV8.En34.TTR.hATP7Bco.PA75; ABPS.TBG-S1, AAV8.ABPS.TBG-S1.hATP7Bco.PA75; En34.mTTR, AAV8.En34.mTTR.hATP7Bco.PA75) e sacrificados aos 6 meses de idade. O Western blot que detecta ATP7B em camundongos Atp7b KO foi quantificado por densitometria de banda. Valores expressos como média  $\pm$  SEM.

[0027] A FIG. 18 demonstra doença hepática em camundongos Atp7b KO, fêmeas e machos, administrados com vetor AAV8. Os camundongos Atp7b KO fêmea e macho foram administrados *i.v.* com  $3 \times 10^{12}$ /kg de vetores AAV8 para expressão de hATP7Bco com diferentes combinações de potenciador/promotor (EnTTR.TTR, AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75; En34.TBG-S1, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco.PA75; En34.TTR, AAV8.En34.TTR.hATP7Bco.PA75; ABPS.TBG-S1, AAV8.ABPS.TBG-S1.hATP7Bco.PA75; En34.mTTR, AAV8.En34.mTTR.hATP7Bco.PA75) e sacrificados aos 6 meses de idade. Os camundongos Atp7b KO administrados com controle de veículo (PBS) serviram como controles. As seções do fígado foram coradas com H&E e avaliadas histologicamente de acordo com o sistema de pontuação 1-5. Valores expressos como média  $\pm$  SEM.

[0028] As FIGURAS 19A-19B demonstram fibrose do fígado e acumulação de cobre em camundongos Atp7b KO, fêmeas e machos, administrados com vetor AAV8. Os camundongos Atp7b KO fêmea e macho foram administrados *i.v.* com  $3 \times 10^{12}$  GC/kg de vetores AAV8 para expressão de hATP7Bco com diferentes combinações de potenciador/promotor (EnTTR.TTR, AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75; En34.TBG-S1, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco.PA75; En34.TTR, AAV8.En34.TTR.hATP7Bco.PA75; ABPS.TBG-S1, AAV8.ABPS.TBG-S1.hATP7Bco.PA75; En34.mTTR, AAV8.En34.mTTR.hATP7Bco.PA75) e sacrificados aos 6 meses de

idade. Os camundongos Atp7b KO administrados com controle de veículo (PBS) serviram como controles. (A) As seções do fígado foram coradas com Sirius Red e avaliadas quanto à fibrose de acordo com o sistema de pontuação 1-3 e (B) a coloração de Timm foi realizada nas seções do fígado para avaliação da acumulação de cobre de acordo com o sistema de pontuação 1-5. Valores expressos como média  $\pm$  SEM foram comparados com camundongos (Het) e Atp7b KO (KO) heterozigotos não injetados pareados por idade.

[0029] A FIG. 20 demonstra níveis de cobre no fígado em camundongos Atp7b KO, fêmea e macho, administrado com o vetor AAV8. Os camundongos Atp7b KO fêmea e macho foram administrados *i.v.* com  $3 \times 10^{12}$ /kg de vetores AAV8 para expressão de hATP7Bco com diferentes combinações de potenciador/promotor (EnTTR.TTR, AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75; En34.TBG-S1, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco.PA75; En34TTR, AAV8.En34.TTR.hATP7Bco.PA75; ABPS.TBG-S1, AAV8.ABPS.TBG-S1.hATP7Bco.PA75; En34.mTTR, AAV8.En34.mTTR.hATP7Bco.PA75) e sacrificados aos 6 meses de idade. Os camundongos Atp7b KO administrados com controle de veículo (PBS) serviram como controles. Os níveis de cobre no fígado foram avaliados por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente e comparados com camundongos heterozigotos (het) e Atp7b KO não conjugados com idade igual. Valores expressos como média  $\pm$  SEM.

[0030] A FIG. 21 demonstra a detecção de ceruloplasmina por transferência de Western em camundongos Atp7b KO administrados com vetor AAV8 macho. Western blot detectando formas de ceruloplasmina ligadas ao cobre (Holo, banda inferior) e não ligadas ao cobre (Apo, banda superior) em camundongos Atp7b KO machos foram administradas *i.v.* com  $3 \times 10^{12}$  GC/kg de vetores AAV8 para expressão de hATP7Bco com diferentes potenciadores combinações de promotor

(1, AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75; 2, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco.PA75; 3, AAV8.En34.TTR.hATP7Bco.PA75; 4, AAV8.ABPS.TBG-S1.hATP7Bco.PA75). Amostras de sangue foram coletadas no dia 21 após a administração. Marcadores de proteína foram fornecidos na faixa central para comparação. Os pares de ninhadas Atp7b KO, heterozigotos (het) e selvagens (WT) sem injeções de vetor serviram como controles (1313, Atp7b KO de 6 meses; 1318, het de 6 meses; 1345, Atp7b KO de 2 meses; 1945, WT).

[0031] A FIG. 22 demonstra níveis de cobre no soro em camundongos Atp7b KO de vetor ATP7B truncado com AAV8 macho. Camundongos machos Atp7b KO foram administrados *i.v.* com  $3 \times 10^{12}$  GC/kg de vetores AAV8 para expressão de diferentes versões truncadas de hATP7Bco (MBDIDel, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDIDel.PA75; MBD2Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBD2Del.PA75; MBD3Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBD3Del.PA75; MBDI-2Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-2Del.PA75; MBDI-4Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-4Del.PA75; MBDI-5Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-5Del.PA75; TBG-MBDI-4Del, AAV8.TBG.hATP7BcoMBDI-4Del.PA75; TBG-MBDI-5Del, AAV8.TBG.hATP7BcoMBDI-5Del.PA75). Os níveis de cobre no soro foram avaliados por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente e comparados com horas extras de camundongos heterozigotos (Het) e Atp7b KO (KO). Valores expressos como média  $\pm$  SEM.

[0032] As FIGURAS 23A-23C demonstram as químicas do soro em camundongos Atp7b KO de vetor ATP7B truncado com AAV8 macho. Camundongos machos Atp7b KO foram administrados *i.v.* com  $3 \times 10^{12}$  GC/kg de vetores AAV8 para expressão de diferentes versões truncadas de hATP7Bco (MBDIDel, AAV8.En34.TBG-

S1.hATP7BcoMBDIDel.PA75; MBD2Del, AAV8.En34.TBG-  
 S1.hATP7BcoMBD2Del.PA75; MBD3Del, AAV8.En34.TBG-  
 S1.hATP7BcoMBD3Del.PA75; MBDI-2Del, AAV8.En34.TBG-  
 S1.hATP7BcoMBDI-2Del.PA75; MBDI-4Del, AAV8.En34.TBG-  
 S1.hATP7BcoMBDI-4Del.PA75; MBD1-5Del, AAV8.En34.TBG-  
 S1.hATP7BcoMBDI-5Del.PA75; TBG-MBDI-4Del,  
 AAV8.TBG.hATP7BcoMBDI-4Del.PA75; TBG-MBDI-5Del,  
 AAV8.TBG.hATP7BcoMBDI-5Del.PA75). Os camundongos foram necropsiados aos 6 meses de idade e (A) ALT, (B) AST e (C) os níveis de bilirrubina total foram avaliados no soro. Valores expressos como média  $\pm$  SEM.

[0033] A FIG. 24 demonstra a expressão de ATP7Bco no fígado determinada por transferência de Western em vetor ATP7B truncado com AAV8 macho, administrado com camundongos Atp7b KO. Camundongos machos Atp7b KO foram administrados *i.v.* com  $3 \times 10^{12}$  GC/kg de vetores AAV8 para expressão de diferentes versões truncadas de hATP7Bco (MBDIDel, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDIDel.PA75; MBD2Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBD2Del.PA75; MBD3Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBD3Del.PA75; MBDI-2Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-2Del.PA75; MBDI-4Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-4Del.PA75; MBD1-5Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-5Del.PA75; TBG-MBDI-4Del, AAV8.TBG.hATP7BcoMBDI-4Del.PA75; TBG-MBDI-5Del, AAV8.TBG.hATP7BcoMBDI-5Del.PA75). Os camundongos foram necropsiados aos 6 meses de idade. O Western blot que detecta ATP7B em camundongos Atp7b KO foi quantificado por densitometria de banda. Valores expressos como média  $\pm$  SEM.

[0034] A FIG. 25 demonstra doença hepática em vetor ATP7B truncado com AAV8 macho, administrado aos camundongos Atp7b KO.

Camundongos machos Atp7b KO foram administrados *i.v.* com  $3 \times 10^{12}$  GC/kg de vetores AAV8 para expressão de diferentes versões truncadas de hATP7Bco (MBDIDel, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDIDel.PA75; MBD2Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBD2Del.PA75; MBD3Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBD3Del.PA75; MBDI-2Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-2Del.PA75; MBDI-4Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-4Del.PA75; MBD1-5Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-5Del.PA75; TBG-MBDI-4Del, AAV8.TBG.hATP7BcoMBDI-4Del.PA75; TBG-MBDI-5Del, AAV8.TBG.hATP7BcoMBDI-5Del.PA75). Os camundongos foram necropsiados aos 6 meses de idade. Os camundongos Atp7b KO (PBS) de controle de veículo serviram como controles. As seções do fígado foram coradas com H&E e avaliadas histologicamente de acordo com o sistema de pontuação 1-5. Valores expressos como média  $\pm$  SEM.

[0035] As FIGURAS 26A-26B demonstram fibrose do fígado e acumulação de cobre no vetor ATP7B truncado com AAV8 macho, administrado com camundongos Atp7b KO. Camundongos machos Atp7b KO foram administrados *i.v.* com  $3 \times 10^{12}$  GC/kg de vetores AAV8 para expressão de diferentes versões truncadas de hATP7Bco (MBDIDel, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDIDel.PA75; MBD2Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBD2Del.PA75; MBD3Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBD3Del.PA75; MBDI-2Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-2Del.PA75; MBDI-4Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-4Del.PA75; MBD1-5Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-5Del.PA75; TBG-MBDI-4Del, AAV8.TBG.hATP7BcoMBDI-4Del.PA75; TBG-MBDI-5Del, AAV8.TBG.hATP7BcoMBDI-5Del.PA75). Os camundongos foram necropsiados aos 6 meses de idade. Os camundongos Atp7b KO (PBS) de controle de veículo serviram como controles. (A) As seções do fígado

foram coradas com Sirius Red e avaliadas quanto à fibrose de acordo com o sistema de pontuação 1-3 e (B) a coloração de Timm foi realizada nas seções do fígado para avaliação da acumulação de cobre de acordo com o sistema de pontuação 1-5. Valores expressos como média  $\pm$  SEM foram comparados com camundongos (Het) e Atp7b KO (KO) heterozigotos não injetados pareados por idade.

[0036] A FIG. 27 demonstra níveis de cobre no fígado em camundongos Atp7b KO de vetor ATP7B truncado com AAV8 macho. Camundongos machos Atp7b KO foram administrados *i.v.* com  $3 \times 10^{12}$  GC/kg de vetores AAV8 para expressão de diferentes versões truncadas de hATP7Bco (MBD1Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBD1Del.PA75; MBD2Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBD2Del.PA75; MBD3Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBD3Del.PA75; MBDI-2Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-2Del.PA75; MBDI-4Del, AAV8.En34.TBG-S1hATP7BcoMBDI-4Del.PA75; MBDI-5Del, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7BcoMBDI-5Del.PA75; TBG-MBDI-4Del, AAV8.TBG.hATP7BcoMBDI-4Del.PA75; TBG-MBDI-5Del, AAV8.TBG.hATP7BcoMBDI-5Del.PA75). Os camundongos foram necropsiados aos 6 meses de idade.

[0037] Os camundongos Atp7b KO (PBS) de controle de veículo serviram como controles. Os níveis de cobre no fígado foram avaliados por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente e comparados com camundongos heterozigotos (het) e Atp7b KO não conjugados com idade igual. Valores expressos como média  $\pm$  SEM foram comparados com camundongos (Het) e Atp7b KO (KO) heterozigotos não injetados pareados por idade.

#### 4. DESCRIÇÃO DETALHADA

[0038] As modalidades descritas no pedido referem-se à utilização de um vírus adenoassociado deficiente na replicação (AAV) para

administrar um gene ATPase 2 transportador de cobre humano (ATP7B) a células do fígado de pacientes (sujeitos humanos) diagnosticados com Doença de Wilson (WD). O vetor AAV recombinante (rAAV) usado para entregar o gene hATP7B ("rAAV.hATP7B") deve ter um tropismo para o fígado (por exemplo, um rAAV portador de um capsídeo AAV8), e o transgene hATP7B deve ser controlado por expressão específica do fígado elementos de controle. Em uma modalidade, os elementos de controle de expressão incluem um ou mais dos seguintes: um potenciador; um promotor; um íntron; um WPRE; e um sinal polyA. Tais elementos são adicionalmente descritos neste documento.

[0039] Como utilizado neste documento, "capsídeo de AAV8" refere-se a capsídeo de AAV8 possuindo a sequência de aminoácidos de GenBank, acessório: YP\_077180.1, SEQ ID NO: 16, que é incorporado neste documento por referência. É permitida alguma variação desta sequência codificada, que pode incluir sequências com cerca de 99% de identidade com a sequência de aminoácidos referenciada em YP\_077180.1 e WO 2003/052051 (que é incorporada neste documento por referência) (isto é, menos de 1% de variação da sequência referenciada). Métodos para gerar capsídeos, e, portanto, sequências de codificação, e métodos para a produção de vetores virais de rAAV foram descritos. Ver, por exemplo, Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081- 6086 (2003) e US 2015/0315612.

[0040] Como utilizado neste documento, o termo "título de NAb" mede a quantidade de anticorpos neutralizantes (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 conforme descrito em, por exemplo, Calcedo, R., et al., Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. Journal of Infectious Diseases, 2009. 199(3): p. 381-390, que é incorporado a este documento por referência.

[0041] Os termos "porcentagem (%) identidade", "identidade de sequência", "porcentagem de identidade de sequência" ou "porcentagem idêntica" no contexto de sequências de aminoácidos referem-se aos resíduos nas duas sequências que são os mesmos quando alinhados para correspondência. A identidade percentual pode ser prontamente determinada para sequências de aminoácidos ao longo de todo o comprimento de uma proteína, polipeptídeo, cerca de 32 aminoácidos, cerca de 330 aminoácidos, ou um seu fragmento peptídico ou os sequenciadores codificadores da sequência de ácido nucleico correspondente. Um fragmento de aminoácido adequado pode ter pelo menos cerca de 8 aminoácidos de comprimento e pode ter até cerca de 700 aminoácidos. Geralmente, quando se refere a "identidade", "homologia" ou "semelhança" entre duas sequências diferentes, "identidade", "homologia" ou "semelhança" é determinada em referência a sequências "alinhadas". Sequências "alinhadas" ou "alinhamentos" referem-se a sequências de múltiplos ácidos nucleicos ou sequências de proteínas (aminoácidos), frequentemente contendo correções para bases ou aminoácidos ausentes ou adicionais em comparação com uma sequência de referência. Os alinhamentos são realizados usando qualquer um dos vários Programas de Alinhamento de Sequência Múltipla disponíveis publicamente ou comercialmente. Programas de alinhamento de sequências estão disponíveis para sequências de aminoácidos, por exemplo, os programas Clustal Omega, Clustal X, MAP, PIMA, MSA, BLOCKMAKER, MEME e Match Box. Geralmente, qualquer um destes programas é utilizado nas configurações padrão, embora um especialista na técnica possa alterar estas configurações conforme necessário. Alternativamente, um versado na técnica pode utilizar outro algoritmo ou programa de computador que forneça pelo menos o nível de identidade ou alinhamento como aquele fornecido pelos algoritmos e programas referenciados. Veja, por exemplo, JD

Thomson et al, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

[0042] Tal como utilizado neste documento, o termo "operacionalmente ligado" refere-se às sequências de controle de expressão que são contíguas ao gene de interesse e as sequências de controle de expressão que atuam em trans ou a uma distância para controlar o gene de interesse.

[0043] 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 empacotada dentro do capsídeo viral ou envelope são deficientes em replicação; ou seja, eles não podem gerar vírions de progênie, mas retêm a capacidade de infectar células-alvo. Em uma modalidade, o genoma do vetor viral não inclui os genes de codificação das enzimas necessários para replicar (o genoma pode ser projetado para ser "sem soro" - contendo apenas o transgene de interesse flanqueado pelos sinais necessários para amplificação e empacotamento do genoma artificial), mas esses genes podem ser fornecidos durante a produção. Por conseguinte, considera-se seguro para utilização em terapia genética, uma vez que a replicação e a infecção por virions de progênie não podem ocorrer, exceto na presença da enzima viral necessária para a replicação.

[0044] É de notar que o termo "um" ou "uma" se refere a um ou mais. Desse modo, os termos "um" (ou "uma"), "um ou mais" e "pelo menos um" são utilizados neste documento de forma intercambiável.

[0045] As palavras "compreendem", "compreende" e "compreendendo" devem ser interpretadas inclusivamente em vez de exclusivamente. As palavras "consistir", "consistindo" e suas variantes devem ser interpretadas exclusivamente, e não de forma inclusiva.

Embora várias modalidades na especificação sejam apresentadas utilizando o termo "compreendendo", em outras circunstâncias uma modalidade relacionada também deve ser interpretada e descrita utilizando "consistindo em" ou "consistindo essencialmente em".

[0046] Como utilizado neste documento, o termo "cerca de" significa uma variabilidade de 10% a partir da referência dada, a menos que especificado de outro modo.

[0047] Salvo definido em contrário nesta especificação, os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado que aquele entendido na técnica e por referência a textos publicados que proporcionem àqueles versados na técnica uma orientação geral para vários dos termos usados no presente pedido.

#### 5.1 Vetores de terapia gênica

[0048] Em um aspecto, um vetor de vírus adenoassociado recombinante (rAAV) transportador do gene ATP7B humano é proporcionado para utilização em terapia genética. O vetor rAAV.hATP7B deve ter um tropismo para o fígado (por exemplo, um rAAV transportador de uma capsídeo AAV8) e o transgene hATP7B deve ser controlado por elementos de controle de expressão específicos do fígado. O vetor é formulado em um tampão/transportador adequado para infusão em sujeitos humanos. O tampão/transportador deve incluir um componente que impede que o rAAV cole na tubagem de infusão, mas não interfira com a atividade de ligação ao rAAV *in vivo*.

##### 5.1.1. O vetor rAAV.hATP7B

###### 5.1.1.1. A sequência do hATP7B

[0049] A Doença de Wilson é um erro hereditário do metabolismo causado predominantemente por mutações no gene ATP7B, que codifica uma ATPase do tipo P que transporta cobre. O ATP7B é responsável pelo transporte de cobre das proteínas chaperonas intracelulares para a via secretória, tanto para excreção na bile como

para incorporação na apo ceruloplasmina para a síntese da ceruloplasmina funcional. O desenvolvimento da doença de Wilson é devido ao acúmulo de cobre nos tecidos afetados. Ver, EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease, EASL Journal of Hepatology, 2012, 56(671-85), que é incorporado neste documento por referência.

[0050] A característica clínica da doença de Wilson é o anel de Kayser-Fleischer, que está presente em 95% dos pacientes com sintomas neurológicos e um pouco mais da metade daqueles sem sintomas neurológicos. Os sinais neurológicos são variáveis, mais frequentemente tremor, ataxia e distonia. Qualquer tipo de doença hepática pode ser encontrado em pacientes com doença de Wilson. A doença hepática clinicamente evidente pode preceder as manifestações neurológicas em até 10 anos e a maioria dos pacientes com sintomas neurológicos apresenta algum grau de doença hepática na apresentação. A apresentação de sintomas de doença hepática pode ser altamente variável, variando de assintomática, com apenas anormalidades bioquímicas, a cirrose evidente com todas as suas complicações. A doença de Wilson também pode se apresentar como insuficiência hepática aguda, às vezes associada à anemia hemolítica negativa ao Coombs e à insuficiência renal aguda. A tabela 1 a seguir fornece um índice de prognóstico na WD. (Ver, EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease, EASL Journal of Hepatology, 2012, 56(671-85), que é incorporado neste documento por referência.)

	1*	2*	3 *	4*
Bilirrubina sérica (pmol/L)	100-150	151-200	201-300	>300
AST (U/L)	100-150	151-300	301-400	> 400
INR	1,3-1,6	1,7-1,9	2,0-2,4	> 2,4
WBC [10 <sup>9</sup> /EU]	6,8-8,3	8,4-10,3	10,4 15,3	> 15,3
Albumina [g/l]	34-44	25 - 33%	21-24	<21

\*= pontos de pontuação, limite superior do normal para AST = 20 IU/ml (no King's

College). Uma pontuação > 11 está associado à alta probabilidade de morte sem transplante hepático.

[0051] O ATP7B possui oito domínios transmembranares que formam um caminho através das membranas celulares para a translocação de cobre; e um terminal N grande com seis domínios de ligação ao metal (MBDs), cada um compreendendo aproximadamente 70 aminoácidos e o motivo de ligação ao metal altamente conservado GMxCxxC (em que x qualquer aminoácido). Outros domínios incluem o motivo intramembranar de CPC que é necessário para a translocação de cobre através da membrana, o domínio N contendo o local de ligação ao ATP, o domínio P contendo o resíduo de ácido aspártico conservado e o domínio A compreendendo o domínio da fosfatase. Várias mutações no gene hATP7B e/ou proteína resultante são conhecidas que estão presentes em alguns ou todos os pacientes com Doença de Wilson. Uma lista completa das mutações conhecidas que contribuem para o WB pode ser encontrada em <http://uniprot.org/imiprot/P35670>, que é incorporado por referência neste documento. Além disso, além da sequência canônica (também chamada de isoforma a, que é a mais longa isoforma; NCBI Reference Sequence: NP\_000044.2), quatro isoformas adicionais são conhecidas: NCBI Reference Sequences NP\_001005918.1, NP\_001230111.1, NP\_001317507.1, NP\_001317508.1, cada um dos quais é incorporado neste documento por referência. As composições e métodos descritos neste documento podem ser utilizados para tratar sujeitos possuindo qualquer proteína ATP7B variante que cause doença.

[0052] Em uma modalidade, o gene de hATP7B codifica a proteína hATP7B apresentada na SEQ ID NO: 2. Assim, em uma modalidade, o transgene de hATP7B pode incluir, mas não está limitado à sequência proporcionada pela SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3 que são fornecidas na Listagem de Sequências anexa, que é incorporada neste documento por referência. A SEQ ID NO: 3 proporciona o cDNA para o ATP7B

humano nativo. A SEQ ID NO: 1 proporciona um cDNA manipulado para o ATP7B humano, que foi codificado para expressão em humanos (por vezes referido neste documento como hATP7Bco). É para ser entendido que a referência a hATP7B neste documento pode, em algumas modalidades, referir-se à sequência nativa ou de códon otimizada de hATP7B, ou a qualquer uma das variantes descritas neste documento. Alternativa ou adicionalmente, programas de computador baseados na Internet ou disponíveis comercialmente, bem como empresas baseadas em serviços podem ser utilizados para retrotraduzir as sequências de aminoácidos para sequências de codificação de ácido nucleico, incluindo tanto RNA como/ou cDNA. Ver, por exemplo, backtranseq by EMBOSS, [www.ebi.ac.uk/Tools/st/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/); Gene Infinity ([www.geneinfinity.org/sms-/sms\\_backtranslation.html](http://www.geneinfinity.org/sms-/sms_backtranslation.html)); ExPasy ([www.expasy.org/tools/](http://www.expasy.org/tools/)). Pretende-se que todos os ácidos nucleicos que codificam as sequências polipeptídicas de hATP7B descritas estejam englobadas, incluindo sequências de ácido nucleico que foram otimizadas para expressão no sujeito alvo desejado (por exemplo, por otimização de códons).

[0053] A sequência de codificação nativa de ATP7B é superior a 4,3 kb (SEQ ID NO: 3; número de acesso Genbank XM\_005266430), resultando em uma proteína de 1465 aminoácidos (SEQ ID NO: 2). Devido ao tamanho grande de ATP7B e à capacidade de empacotamento de vetores virais, incluindo o vetor AAV, em algumas modalidades, é desejável que a sequência de codificação de ATP7B seja encurtada. Foi demonstrado que a deleção dos primeiros 5 MBD mostrou um nível de fosforilação catalítica da proteína resultante consistente com o tipo selvagem. Ver, Huster e Lutsenko, J. Biological Chem, Junho de 2003, que é incorporado por referência neste documento. Assim, em uma modalidade, a sequência de codificação ATP7B é encurtada pela eliminação de um ou mais MDB. Em uma

modalidade, a sequência de codificação de ATP7B tem o MBD1-2 eliminado (por exemplo, como mostrado na SEQ ID NO: 17 e nt 403 a nt 4368 da SEQ ID NO: 35). Em outra modalidade, a sequência de codificação ATP7B tem MBD1-3 eliminado. Em outra modalidade, a sequência codificadora de ATP7B tem MBD 1-4 eliminado (por exemplo, como mostrado em SEQ ID NO: 18 e nt 403 a nt 3762 da SEQ ID NO: 34 e nt 1059 a nt 4418 da SEQ ID NO: 29). Em outra modalidade, a sequência codificadora de ATP7B tem MBD1-5 eliminado (por exemplo, como apresentado na SEQ ID NO: 19, nt 403 a nt 3369 da SEQ ID NO: 33 e nt 1059 a nt 4025 da SEQ ID NO: 28). Em outra modalidade, a sequência de codificação de ATP7B tem MBD1 eliminado (por exemplo, como mostrado na SEQ ID NO: 20 e nt 403 para nt 4686 da SEQ ID NO: 32). Em outra modalidade, a sequência de codificação de ATP7B tem MBD2 eliminado (por exemplo, como mostrado na SEQ ID NO: 21 e na nt 403 a 4617 da SEQ ID NO: 31). Em outra modalidade, a sequência codificadora de ATP7B tem MBD3 eliminado (por exemplo, como mostrado em SEQ ID NO: 22 e nt 403 a nt 4719 de SEQ ID NO: 30). Em outra modalidade, a sequência de codificação de ATP7B tem MBD1-4 e 6 eliminadas (por exemplo, como descrito por Cater et al., *Biochem J.* 2004 Jun 15; 380 (Pt 3): 805-813, que é incorporado por referência neste documento). Veja também Gourdon et al, *Biol Chem.* 2012 Apr;393(4):205-16; Lutsenko, S., et al. (2007). "Function and regulation of human copper-transporting ATPases." *Physiological reviews* 87(3): 1011-1046; Safaei, R., et al. (2013). "The role of metal binding and phosphorylation domains in the regulation of cisplatin-induced trafficking of ATP7B." *Metallomics* 5(8): 964-972; e a Publicação de Patente US 2015/0045284, cada uma das quais é incorporada neste documento por referência.

[0054] Em uma modalidade, a sequência de ácido nucleico codificando hATP7B partilha pelo menos 95% de identidade com a

sequência codificadora de hATP7B nativa de SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 1, ou qualquer uma das variantes mostradas em SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, ou SEQ ID NO: 22. Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico codificando hATP7B partilha pelo menos 90, 85, 80, 75, 70 ou 65% de identidade com a sequência codificadora de hATP7B nativa de SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 1, ou qualquer uma das variantes apresentadas em SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, ou SEQ ID NO: 22. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucleico codificando hATP7B partilha cerca de 79% de identidade com a sequência codificante de hATP7B nativa de SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 1, ou qualquer uma das variantes apresentadas em SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 ou SEQ ID NO: 22. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica o hATP7B é a SEQ ID NO: 1. Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica o hATP7B é SEQ ID NO: 17. Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica o hATP7B é a SEQ ID NO: 18. Em uma outra modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica o hATP7B é a SEQ ID NO: 19. Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica o hATP7B é SEQ ID NO: 20. Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica o hATP7B é SEQ ID NO: 21. Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico que codifica o hATP7B é SEQ ID NO: 22.

[0055] As regiões de codificação otimizadas por códon podem ser projetadas por vários métodos diferentes. 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). Uma abordagem de otimização de códons é descrita, por exemplo, na Publicação Internacional de Patente No. WO 2015/012924, que é

incorporado neste documento por referência. Ver também, por exemplo, a publicação de patente US 2014/0032186 e a publicação de patente US 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 codificadora otimizada por códons que codifica o polipeptídeo.

[0056] Estão disponíveis várias opções para efetuar as alterações reais aos códons ou para sintetizar as regiões de codificação otimizadas por códons concebidas como descrito neste documento. Tais modificações ou síntese podem ser realizadas utilizando manipulações biológicas moleculares padrão e de rotina bem conhecidas dos versados na técnica. Em uma abordagem, uma série de pares oligonucleotídeos complementares de 80-90 nucleotídeos cada um em comprimento e abrangendo o comprimento da sequência desejada são sintetizados através de métodos padrão. Estes pares de oligonucleotídeos são sintetizados de tal modo que após o emparelhamento, formam fragmentos de cadeia dupla de 80-90 pares de bases, contendo extremidades coesivas, por exemplo, cada oligonucleotídeo no par é sintetizado para se estender 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais bases para além da região que é complementar ao outro oligonucleotídeo no par. As extremidades de cadeia simples de cada par de oligonucleotídeos são concebidas para emparelhar com a extremidade de cadeia simples de outro par de oligonucleotídeos. Os pares de oligonucleotídeos são autorizados a emparelhar, e aproximadamente cinco a seis destes fragmentos de cadeia dupla são então permitidos emparelharem juntos através das extremidades coesivas de cadeia simples, e depois são ligados e clonados em um

vetor de clonagem bacteriano padrão, por exemplo, O vetor TOPO® é disponibilizado pela Thermo Fisher Scientific Inc. O construto é então sequenciado por métodos padrão. Vários destes construtos consistindo de 5 a 6 fragmentos de fragmentos de 80 a 90 pares de bases ligados entre si, isto é, fragmentos de cerca de 500 pares de bases, são preparados de tal modo que toda a sequência desejada é representada em uma série de construtos plasmáticos. As inserções destes plasmídeos são então cortadas com enzimas de restrição apropriadas e ligadas em conjunto para formar o construto final. O construto final é então clonado em um vetor de clonagem bacteriana padrão e sequenciada. Métodos adicionais seriam imediatamente evidentes para o versado na técnica. Além disso, a síntese genética está prontamente disponível comercialmente.

[0057] O objetivo das terapias descritas neste documento proporcionaria a enzima ATP7B funcional, resultando em uma redução dos níveis séricos de cobre de 25% ou mais. Em uma modalidade, a excreção urinária de cobre de 3-8 pmol ou menos por 24 horas é desejável.

[0058] Os objetivos primários/secundários das terapias descritas neste documento incluem, sem limitação:

[0059] • Normalização do cobre ligado a não-ceruloplasmina sérico (NCC) (<150 microg/L)

[0060] • Normalização da aminotransferase sérica (bioquímica do fígado, ALT/AST)

[0061] • Normalização de Cu urinário (<40 µg/24 horas (0,6 micromol/24 horas) ULN)

[0062] • Normalização da ceruloplasmina sérica (> 200mg/L) [pode ser inconsistente]

[0063] • Melhoria da escala Clinician Global Impression (CGI) [1: severidade & 2: melhoria global]

[0064] • Incidência de EAs

Exploratória:

[0065] •  $^{65}\text{Cu}$ , um isótopo não radioativo para cobre que pode ser detectado por espectrometria de massa

[0066] • Melhoria do QI, funções neurocognitivas e psiquiátricas (Escala de Avaliação da Doença de Unified Wilson (UWDRS) e Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI)); e

[0067] • PROs (EQ5D, MMAS-8, TSQM)

[0068] Em uma modalidade, o "sujeito" ou "paciente" é um sujeito mamífero tendo WD como descrito acima. Pretende-se que um paciente que tenha WD de alguma gravidade seja o sujeito pretendido.

#### 5.1.1.2 O vetor rAAV

[0069] Como o ATP7B é expresso nativamente no fígado, é desejável usar um AAV que mostre tropismo para o fígado. Em uma modalidade, o AAV que fornece o capsídeo é AAV8. Em outra modalidade, o AAV que fornece o capsídeo é AAVrh.10. Ainda em outra modalidade, o AAV que fornece o capsídeo é um EAV Clade E. Tal AAV inclui rh.2; rh.10; rh. 25; bb.1, bb.2, pi.1, pi.2, pi.3, rh.38, rh.40, rh.43, rh.49, rh.50, rh.51, rh.52, rh.53, rh.57, rh.58, rh.61, rh.64, hu.6, hu.17, hu.37, hu.39 hu.40, hu.41, hu.42, hu.66 e hu.67. Este clade inclui ainda rh modificado. 2; rh modificado. 58; e modificado rh.64. Ver, WO 2005/033321, que é incorporado neste documento por referência. Entretanto, qualquer um dentre uma quantidade de vetores de rAAV com tropismo para o fígado pode ser usado.

[0070] Em uma modalidade específica descrita nos Exemplos, *infra*, o vetor de terapia gênica é um vetor AAV8 que expressa um transgene de hATP7B sob o controle de um promotor de globulina de ligação a tiroxina (TBG-S1) referido como AAV8.En34.TBG- SI.hATP7Bco.PA75. O componente externo do vetor AAV é um capsídeo icosaédrico de sorotipo 8,  $T = 1$ , consistindo de 60 cópias de três proteínas virais de

AAV, VP1, VP2 e VP3, na proporção de 1: 1: 10. O capsídeo contém um genoma de vetor rAAV de DNA de fita simples.

[0071] Em uma modalidade, o genoma de rAAV.hATP7B contém um transgene de hATP7B flanqueado por duas repetições terminais invertidas de AAV (ITRs). Em uma modalidade, o transgene de hATP7B inclui um ou mais de um potenciador, promotor, uma sequência de codificação de hATP7B e sinal de polyAdenilação (polyA). Estas sequências de controle estão "operacionalmente ligadas" às sequências do gene hATP7B. A cassete de expressão contendo estas sequências pode ser manipulada em um plasmídeo que é utilizado para a produção de um vetor viral.

[0072] As ITRs são os elementos genéticos responsáveis pela replicação e empacotamento do genoma durante a produção vetorial e são os únicos elementos *cis* virais requeridos para gerar o rAAV. As sequências mínimas requeridas para empacotar a cassete de expressão em uma partícula viral AAV são as ITR 5' e 3' de AAV, que podem ser da mesma origem AAV que o capsídeo, ou de origem AAV diferente (para produzir um pseudotipo AAV). Em uma modalidade, são utilizadas as sequências ITR do AAV2, ou a sua versão deletada (AITR). No entanto, pode ser selecionado um AAV de outras fontes adequadas. Quando a fonte das ITRs for de AAV2 e a capsídeo de AAV for de outra fonte de AAV, o vetor resultante pode ser denominado pseudotipado. Tipicamente, um cassete de expressão para um vetor AAV compreende uma ITR 5' de AAV, as sequências de codificação de hATP7B e quaisquer sequências reguladoras, e uma ITR AAV 3'. No entanto, outras configurações desses elementos podem ser adequadas. Uma versão abreviada da ITR 5', denominada AITR, foi descrita, em que o local da resolução terminal (tsr) e a sequência D são excluídos. Em outras modalidades, são utilizadas ITRs 5' e 3' completas. Em uma modalidade, a ITR 5' é a mostrada na SEQ ID NO: 14. Em uma

modalidade, a ITR 3' é a mostrada na SEQ ID NO: 15.

[0073] Em uma modalidade, as sequências de controle da expressão incluem um ou mais potenciadores. Em uma modalidade, o potenciador En34 está incluído (potenciador do núcleo de 34 bp da região de controle hepática de apolipoproteína humana), que é apresentado na SEQ ID NO: 4. Em outra modalidade, o EnTTR (sequência potenciadora de 100 bp da transtirretina) está incluído. Tal sequência é mostrada na SEQ ID NO: 5. Ver, Wu et al, Molecular Therapy, 16 (2): 280-289, fev. 2008, que é incorporado neste documento por referência. Ainda em outra modalidade, o potenciador precursor al-microgloguhn/bikumn está incluído. Ainda em outra modalidade, o ABPS (versão abreviada do potenciador distal de 100 bp do potenciador precursor de al-microglogulina/biculina [ABP] a 42 bp) está incluído. Tal sequência é mostrada na SEQ ID NO: 6. Ainda em outra modalidade, o potenciador da ApoE é incluído. Tal sequência é mostrada na SEQ ID NO: 7. Em outra modalidade, mais de um potenciador está presente. Tal combinação pode incluir mais de uma cópia de qualquer um dos potenciadores descritos neste documento e/ou mais de um tipo de potenciador.

[0074] A expressão da sequência de codificação do hATP7B é conduzida a partir de um promotor específico do fígado. Devido ao tamanho do transgene ATP7B, o uso de promotor de tamanho relativamente pequeno é desejável. Um plasmídeo e vetor ilustrativo descrito neste documento utiliza o promotor de globulina de ligação a tiroxina modificada (TBG-S1) (SEQ ID NO: 8). Em outra modalidade, o promotor de TBG é utilizado. A sequência do promotor de TBG é mostrada na SEQ ID NO: 9. Alternativamente, podem ser utilizados outros promotores específicos do fígado, tais como o promotor da transtirretina (promotor TTR), como mostrado na SEQ ID NO: 11, ou um promotor modificado da transtirretina (promotor mTTR), como mostrado

no nt 21 a nt 190 da SEQ ID NO: 11. Outro promotor adequado é o alfa 1 antitripsina (Al AT), ou uma versão modificada do mesmo (cuja sequência é mostrada na SEQ ID NO: 10. Várias combinações de promotor e potenciador são discutidas nos exemplos abaixo.

[0075] Outros promotores adequados incluem albumina humana (Miyatake et al., J. Virol., 71: 5124-32 (1997)), humAlb; o promotor específico do fígado (LSP) e o promotor nuclear do vírus da hepatite B (Sandig et al., Gene Ther., 3: 1002-9 (1996). Veja, por exemplo, o banco de dados do promotor de genes específicos do fígado, Cold Spring Harbor, <http://rulai.schl.edu/LSPDr>, que é incorporado por referência.

[0076] Embora menos desejados, outros promotores, tais como promotores virais, promotores constitutivos, promotores reguláveis [ver, por exemplo, WO 2011/126808 e WO 2013/04943], ou um promotor responsivo a estímulos fisiológicos podem ser utilizados nos vetores descritos neste documento.

[0077] Para além de um promotor, um cassete de expressão e/ou um vetor podem conter outras iniciações de transcrição adequadas, terminação, sequências potenciadoras e sinais de processamento de RNA eficientes. Tais sequências incluem sinais de junção e poliAdenilação (polyA); elementos reguladores que aumentam a expressão (por exemplo, WPRE); sequências que estabilizam o mRNA citoplasmático; sequências que aumentam a eficiência da tradução (isto é, sequência de consenso de Kozak); sequências que aumentam a estabilidade proteica; e quando desejado, sequências que aumentam a secreção do produto codificado. Em uma modalidade, uma sequência KOZAK está incluída. Em uma modalidade, um sinal de polyAdenilação (polyA) é incluído para mediar a terminação de transcritos de mRNA de hATP7B. Um sinal polyA útil neste documento é um polyA artificial que tem cerca de 75 bp de tamanho (PA75) mostrado na SEQ ID NO: 13. Exemplos de outras sequências polyA adequadas incluem, por

exemplo, a hormona de crescimento bovina (SEQ ID NO: 12), SV40, beta-globina de coelho e TK polyA, entre outros.

[0078] Em uma modalidade, as sequências reguladoras são selecionadas de tal modo que o genoma do vetor rAAV total tenha cerca de 3,0 a cerca de 5,5 quilobases de tamanho. Em uma modalidade, é desejável que o genoma do vetor de rAAV se aproxime do tamanho do genoma de AAV nativo. Assim, em uma modalidade, as sequências reguladoras são selecionadas de tal modo que o genoma total do vetor VAAr tem cerca de 4,7 kb de tamanho. Em outra modalidade, o genoma total do vetor de rAAV tem menos de 5,2 kb de tamanho. Em uma outra modalidade, o genoma total do vetor de rAAV tem cerca de 5,1 kb ou cerca de 5,0 kb de tamanho. O tamanho do genoma do vetor pode ser manipulado com base no tamanho das sequências reguladoras, incluindo o promotor, potenciador, íntron, poli A, etc. Ver, Wu et al, Mol Ther, Jan 2010 18(1): 80-6, que é incorporado neste documento por referência.

[0079] Em uma modalidade, o genoma do vetor VAAr compreende nt1 a nt5134 da SEQ ID NO: 23, nt1 a nt 5056 da SEQ ID NO: 24, nt1 a nt 5064 da SEQ ID NO: 25, nt 1 a nt 5068 da SEQ ID NO: 26, nt 1 a nt 5048 da SEQ ID NO: 27, nt 1 a nt 4284 da SEQ ID NO: 28, nt 1 a nt 4677 da SEQ ID NO: 29, nt 1 a nt 4978 da SEQ ID NO: 30, nt 1 a nt 4876 da SEQ ID NO: 31, nt 1 a nt 4945 da SEQ ID NO: 32, nt 1 a nt 3628 da SEQ ID NO: 33, nt 1 a nt 4021 da SEQ ID NO: 34, ou nt 1 a nt 4627 da SEQ ID NO: 35.

[0080] Os plasmídeos de produção exemplares para gerar os rAAV são mostrados na SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 SEQ ID N 30, SEQ ID N 31, SEQ ID N 32, SEQ ID N 33, SEQ ID N 34 e SEQ ID N 35.

#### 5.1.2. Composições

[0081] Em uma modalidade, o vírus rAAV.hATP7B é proporcionado em uma composição farmacêutica que compreende um veículo, excipiente, diluente ou tampão aquoso. Em uma modalidade, o tampão é PBS. Em uma modalidade específica, a formulação rAAV.hATP7B é uma suspensão contendo uma quantidade eficaz de vetor rAAV.hATP7B suspenso em uma solução aquosa contendo 0,001% de Pluronic F-68 em TMN200 (cloreto de sódio 200 mM, cloreto de magnésio 1 mM, Tris 20 mM, pH 8,0). No entanto, várias soluções adequadas são conhecidas incluindo aquelas que incluem um ou mais de: solução salina tamponante, um tensoativo e um sal fisiologicamente compatível ou mistura de sais ajustados a uma força iônica equivalente a cerca de 100 mM de cloreto de sódio (NaCl) a cerca de 250 mM cloreto de sódio ou um sal fisiologicamente compatível ajustado a uma concentração iônica equivalente.

[0082] Por exemplo, uma suspensão como fornecida neste documento pode conter tanto NaCl como KCl. O pH pode estar no intervalo de 6,5 a 8,5 ou 7 a 8,5 ou 7,5 a 8. Um tensoativo adequado, ou combinação de tensoativos, pode ser selecionado entre Poloxâmeros, ou seja, copolímeros tribloco não iônicos compostos de uma cadeia hidrofóbica central de polioxipropileno (óxido de polipropileno)) flanqueado por duas cadeias hidrofílicas de polioxietileno (óxido de polietileno)), SOLUTOL HS 15 (Hidroxiestearato de Macrogol-15), LABRASOL (glicerídeo de polioxi caprílico), éter de polioxi-10 oleico, TWEEN (ésteres de ácido graxo de polioxietileno e sorbitano), etanol e polietilenoglicol. Em uma modalidade, a formulação contém um poloxâmero. Esses copolímeros geralmente são nomeados com a letra "P" (de poloxâmero) seguidos de três dígitos: os dois primeiros dígitos x 100 dão a massa molecular aproximada do núcleo de polioxipropileno e o último dígito x 10 indica o percentual de polioxietileno. Em uma modalidade, o Poloxamer 188 é selecionado. O tensoativo pode estar

presente em uma quantidade de cerca de 0,0005% até cerca de 0,001% da suspensão. Em outra modalidade, o vetor suspenso em uma solução aquosa contendo 180 mM de cloreto de sódio, 10 mM de fosfato de sódio, 0,001% de Poloxamer 188, pH 7,3.

[0083] Em uma modalidade, a formulação é adequada para utilização em sujeitos humanos e é administrada por via intravenosa. Em uma modalidade, a formulação é administrada através de uma veia periférica por injeção em bolus. Em uma modalidade, a formulação é administrada através de uma veia periférica por infusão durante cerca de 10 minutos ( $\pm$  5 minutos). Em uma modalidade, a formulação é administrada através de uma veia periférica por infusão durante cerca de 20 minutos ( $\pm$  5 minutos). Em uma modalidade, a formulação é administrada através de uma veia periférica por infusão durante cerca de 30 minutos ( $\pm$  5 minutos). Em uma modalidade, a formulação é administrada através de uma veia periférica por infusão durante cerca de 60 minutos ( $\pm$  5 minutos). Em uma modalidade, a formulação é administrada através de uma veia periférica por infusão durante cerca de 90 minutos ( $\pm$  10 minutos). No entanto, esse tempo pode ser ajustado conforme necessário ou desejado. Qualquer método ou via adequados podem ser utilizados para administrar uma composição contendo AAV como descrito neste documento e, opcionalmente, para co-administrar outras drogas ou terapias ativas em conjunto com a entrega mediada por AAV de hATP7B descrita neste documento. As vias de administração incluem, por exemplo, as vias sistêmica, oral, inalatória, intranasal, intratraqueal, intra-arterial, intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intradérmica e outras vias parentais de administração.

[0084] Em uma modalidade, a formulação pode conter, por exemplo, a cerca  $1,0 \times 10^{11}$  cópias do genoma por quilograma de peso corporal do doente (GC/kg) para cerca de  $1 \times 10^{14}$  GC/kg, a cerca de 5

$\times 10^{11}$  cópias do genoma por quilograma de peso corporal do doente (GC/kg) para cerca de  $3 \times 10^{13}$  GC/kg, ou cerca de  $1 \times 10^{12}$  para cerca de  $1 \times 10^{14}$  GC/kg, como medido por oqPCR por PCR digital de gotas (ddPCR) como descrito em, por exemplo, M. Lock et al, Hum Gene Ther Methods. abril de 2014;25(2):115-25. doi: 10,1089/hgtb.2013,131. Epub: 14 de fevereiro de 2014, incorporado a este documento por referência. Em uma modalidade, a formulação rAAV.hATP7B é uma suspensão contendo pelo menos células de genoma  $1 \times 10^{13}$ (GC)/mL, ou superior, medida por oqPCR ou PCR de gotículas digitais (ddPCR) como descrito em, por exemplo, M. Lock et al, supra.

[0085] A fim de assegurar que os capsídeos vazios sejam removidos da dose de AAV hATP7B que é administrado a pacientes, capsídeos vazios são separados das partículas de vetor durante o processo de purificação do vetor, por exemplo, usando o método discutido neste documento. Em uma modalidade, as partículas de vetor contendo genomas empacotados são purificadas a partir de capsídeos vazios utilizando o processo descrito no documento WO 2017/100676 e intitulado "Scalable Purification Method for AAV8", que é incorporado neste documento por referência. Resumidamente, é descrito um esquema de purificação de duas etapas que captura e isola seletivamente as partículas do vetor de rAAV contendo genoma a partir do sobrenadante concentrado, clarificado, de uma cultura de células de produção de rAAV. O processo utiliza um método de captura por afinidade realizado a uma concentração elevada de sal seguida por um método de resina de permuta aniônica realizado a pH elevado para proporcionar partículas de vetor de rAAV que está substancialmente isenta de intermediários de rAAV. Podem ser utilizados métodos de purificação semelhantes para vetores com outros capsídeos.

[0086] Embora qualquer processo de fabricação convencional possa ser utilizado, o processo descrito neste documento (e no

documento WO 2017/100676) produz preparações de vetor em que entre 50 e 70% das partículas têm um genoma de vetor, isto é, 50 a 70% de partículas completas. Assim, para uma dose exemplificativa  $1,6 \times 10^{12}$  GC/kg, e a dose total de partícula estará entre as partículas  $2,3 \times 10^{12}$  e  $3 \times 10^{12}$ . Em outra modalidade, a dose proposta é um meio log mais elevado, ou  $5 \times 10^{12}$  GC/kg, e a dose total de partículas estará entre as partículas  $7,6 \times 10^{12}$  e  $1,1 \times 10^{13}$ . Em uma modalidade, a formulação é caracterizada por um estoque de rAAV com uma relação de "vazio" a "cheio" de 1 ou menos, de preferência inferior a 0,75, mais preferencialmente, 0,5, de preferência inferior a 0,3.

[0087] Um estoque ou preparação de partículas rAAV8 (genomas empacotados) é "substancialmente livre" de capsídeos vazios AAV (e outros intermediários) quando as partículas rAAV8 no estoque são pelo menos cerca de 75% a cerca de 100%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, ou pelo menos 99% do rAAV8 no estoque e "capsídeos vazios" são inferiores a cerca de 1%, inferiores a cerca de 5%, inferiores a cerca de 10%, inferior a cerca de 15% do rAAV8 no estoque ou preparação.

[0088] Geralmente, os métodos para avaliar os capsídeos vazios e as partículas do vetor de AAV com genomas empacotados são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Grimm et al., *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003) 7: 122-128. Para testar o capsídeo desnaturado, os métodos incluem submeter o estoque de AAV tratado a uma eletroforese de gel de SDS-poli Acrilamida, consistindo em qualquer gel capaz de separar as três proteínas de capsídeo, por exemplo, um gradiente de gel contendo tris-acetato a 3-8% no tampão, depois executar o gel até o material da amostra ser separado e transferir o gel para as membranas de nylon ou nitrocelulose, de preferência náilon. Os anticorpos do capsídeo anti-AAV são então utilizados como anticorpos primários que se ligam a

proteínas de capsídeo desnaturadas, de preferência um anticorpo monoclonal anticapsídeo de AAV, mais preferencialmente o anticorpo monoclonal anti-AAV-2 B1 (Wobus et al. J. Virol. (2000) 74:9281-9293). Então, um anticorpo secundário é utilizado, um que se liga ao anticorpo primário e contém um meio para detectar a ligação ao anticorpo primário, mais preferencialmente um anticorpo anti-IgG contendo uma molécula de detecção ligada covalentemente a este, mais preferencialmente um anticorpo de IgG anticamundongo de ovelha ligado covalentemente à peroxidase de rábano silvestre. 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 a SDS-PAGE, amostras de frações de coluna podem ser tomadas e aquecidas em tampão de carga de SDS-PAGE contendo um agente redutor (*por exemplo*, DTT) e as proteínas do capsídeo foram resolvidas em géis de poli acilamida pré-moldados (*por exemplo*, Novex). Coloração de prata pode ser realizada usando SilverXpress (Invitrogen, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Em uma modalidade, a concentração de genomas de vetores de AAV (vg) em frações de coluna pode ser medida por PCR quantitativa em tempo real (Q-PCR). As amostras são diluídas e digeridas com DNase I (ou outra nuclease adequada) para remover o DNA exógeno. Após a desativação da nuclease, as amostras são posteriormente diluídas e amplificadas utilizando iniciadores e uma sonda Anorogênica TaqMan™ específica para a sequência de DNA entre os iniciadores. O número de ciclos necessários para atingir um nível definido de fluorescência (ciclo limite, Ct) é medido para cada amostra em um Sistema de Detecção de Sequências Applied

Biosystems Prism 7700. Um DNA plasmídico contendo sequências idênticas às contidas no vetor AAV é empregado para gerar uma curva padrão na reação Q-PCR. Os valores do limiar do ciclo (Ct) obtidos das amostras são utilizados para determinar o título do genoma vetorial normalizando-o ao valor Ct da curva padrão do plasmídeo. Ensaio de ponto final baseados na PCR digital também podem ser usados.

[0089] Em um aspecto, utiliza-se um método de q-PCR otimizado é proporcionado neste documento que utiliza uma serina protease de amplo espectro, por exemplo, a proteinase K (tal como disponibilizado comercialmente pela Qiagen). Mais particularmente, o ensaio de título de genoma qPCR otimizado é semelhante a um ensaio-padrão, exceto pelo fato de que após a digestão com DNase I as amostras são diluídas com tampão de proteinase K e tratadas com proteinase K seguida de desativação térmica. Adequadamente, as amostras são diluídas com tampão de proteinase K em uma quantidade igual ao tamanho da amostra. O tampão de proteinase K pode ser concentrado 2 vezes ou mais. Em geral, o tratamento com proteinase K é de cerca de 0,2 mg/mL, mas pode variar entre 0,1 mg/mL e cerca de 1 mg/mL. A etapa de tratamento geralmente é conduzida a cerca de 55°C durante cerca de 15 minutos, mas pode ser realizada a uma temperatura mais baixa (por exemplo, cerca de 37°C a cerca de 50°C) durante um período de tempo mais longo (por exemplo, cerca de 20 minutos a cerca de 30 minutos) ou a uma temperatura mais alta (por exemplo, até cerca de 60°C) por um período de tempo mais curto (por exemplo, por cerca de 5 a 10 minutos). De modo semelhante, a desativação se dá geralmente a cerca de 95°C durante cerca de 15 minutos, mas a temperatura pode ser diminuída (por exemplo, cerca de 70°C a cerca de 90°C) e o tempo prolongado (por exemplo, de cerca de 20 minutos a cerca de 30 minutos). As amostras são então diluídas (por exemplo, 1000 vezes) e submetidas a uma análise TaqMan, conforme descrito no ensaio

padrão.

[0090] Além disso, ou alternativamente, a PCR digital gota a gota (ddPCR) pode ser usada. Por exemplo, foram descritos métodos para determinar títulos de genoma de vetores de AAV autocomplementares e de fita simples por ddPCR. Ver, por exemplo, M. Lock et al, *Hum Gene Therapy Methods*, Hum Gene Ther Methods. 2014 abr; 25 (2): 115-25. doi: 10.1089/lgtb. 2.013.131. Pub. eletrônica, 14 de fevereiro de 2014.

## 5.2 População de Pacientes

[0091] Como discutido acima, um sujeito que possui WD de qualquer gravidade é o destinatário pretendido das composições e métodos descritos neste documento.

[0092] Os indivíduos podem ter permissão para continuar seu tratamento-padrão (por exemplo, dieta com baixo teor de cobre; tratamento com agentes quelantes, como D-penicilamina e trientina). Outros agentes incluem dimercaptosuccinato de sódio, ácido dimercaptosuccínico, zinco e tetratiomolibdato antes e concomitantemente com o tratamento de terapia genética a critério do seu médico assistente. Em alternativa, o médico pode preferir parar as terapias padrão antes de administrar o tratamento de terapia genética e, opcionalmente, retomar os tratamentos padrão de tratamento como coterapia após a administração da terapia genética.

[0093] Os pontos finais desejáveis do regime de terapia genética forneceriam a enzima ATP7B funcional, resultando em uma redução dos níveis séricos de cobre de 25% ou mais. Em uma modalidade, a excreção urinária de cobre de 3-8 pmol ou menos por 24 horas é desejável.

[0094] Muitos testes podem ser usados para investigar pacientes que podem ter a doença de Wilson, incluindo cobre ligado a não ceruloplasmina (NCC; também chamado de "cobre livre" ou índice de cobre), cobre urinário de 24 horas, cobre hepático e testes de mutação

genética. Métodos para medição de níveis de cobre são conhecidos na técnica, por exemplo, como descrito por McMillin et al, Am J Clin Pathol. 2009; 131 (2): 160-165, que é incorporado neste documento por referência. Em uma modalidade, os pacientes atingem níveis desejados de ATP7B em circulação após o tratamento com rAAV.hATP7B, sozinhos e/ou combinados com o uso de tratamentos adjuvantes.

### 5.3. Dosagem & Via de Administração

[0095] Em uma modalidade, o vector rAAV.hATP7B é administrado como uma dose única por paciente. Em uma modalidade, o sujeito recebe a dose eficaz mínima (MED) (conforme determinado pelo estudo pré-clínico descrito nos Exemplos deste documento). Como utilizado neste documento, MED refere-se à dose de rAAV.hATP7B necessária para fornecer a enzima ATP7B funcional, resultando em uma redução dos níveis de cobre no soro de 25% ou mais.

[0096] Como é convencional, o título do vetor é determinado com base no conteúdo de DNA da preparação do vetor. Em uma modalidade, a PCR quantitativa ou PCR quantitativa otimizada, como descrito nos Exemplos, é utilizada para determinar o conteúdo de DNA das preparações de vetores rAAV.hATP7B. Em uma modalidade, a PCR de partículas digitais, como descrito acima, é utilizada para determinar o conteúdo de DNA das preparações de vetores rAAV.hATP7B. Em uma modalidade, a dosagem é a cerca de  $1 \times 10^{11}$  cópias de genoma (GC)/kg do peso corporal para cerca de  $1 \times 10^{13}$  GC/kg inclusive de pontos de extremidade. Em uma modalidade, a dosagem é de  $5 \times 10^{11}$  GC/kg. Em outra modalidade, a dosagem é  $5 \times 10^{12}$  GC/kg. Nas modalidades específicas, a dose de rAAV.hATP7B administrada a um paciente é de pelo menos  $5 \times 10^{11}$  GC/kg,  $1 \times 10^{12}$  GC/kg,  $1,5 \times 10^{12}$  GC/kg,  $2,0 \times 10^{12}$  GC/kg,  $2,5 \times 10^{12}$  GC/kg,  $3,0 \times 10^{12}$  GC/kg,  $3,5 \times 10^{12}$  GC/kg,  $4,0 \times 10^{12}$  GC/kg,  $4,5 \times 10^{12}$  GC/kg,  $5,0 \times 10^{12}$  GC/kg,  $5,5 \times 10^{12}$  GC/kg,  $6,0 \times 10^{12}$  GC/kg,  $6,5 \times 10^{12}$  GC/kg,  $7,0 \times 10^{12}$  GC/kg, ou  $7,5 \times 10^{12}$  GC/kg. Além

disso, as composições de vírus com replicação defeituosa podem ser formuladas em unidades de dosagem para conter uma quantidade de vírus defeituoso na replicação que se encontra no intervalo de cerca de  $1,0 \times 10^9$  GC a cerca de  $1,0 \times 10^{15}$  GC. Como utilizado neste documento, o termo "dosagem" pode referir-se à dosagem total administrada ao sujeito no decurso do tratamento, ou à quantidade administrada em uma única (de múltiplas) administração.

[0097] Em algumas modalidades, rAAV.hATP7B é administrado em combinação com uma ou mais terapias para o tratamento de WD, tais como uma dieta com baixo conteúdo de cobre ou administração de D-penicilamina, trientina, dimercaptossuccinato de sódio, ácido dimercaptossuccínico, zinco e/ou tetratiomolibdato.

#### 5.4. Medindo Objetivos Clínicos

[0098] As medidas de eficácia do tratamento podem ser medidas pela expressão e atividade do transgene, conforme determinado pela atividade ATP7B e/ou cobre não ligado a ceruloplasmina (NCC; também chamado de "cobre livre" ou índice de cobre), cobre urinário de 24 h ou níveis de cobre hepático. Uma avaliação adicional da eficácia pode ser determinada pela avaliação clínica da tolerância alimentar ao cobre.

[0099] Como usado neste documento, o vetor rAAV.hATP7B deste documento "substitui funcionalmente" ou "suplementa funcionalmente" o ATP7B defeituoso do paciente com ATP7B ativo quando o paciente expressa um nível suficiente de ATP7B para alcançar a atividade de ATP7B resultando uma redução de 25% ou maior na não ceruloplasmina cobre ligado, cobre urinário de 24 horas e/ou cobre hepático.

[00100] Os exemplos seguintes são apenas ilustrativos e não pretendem limitar a presente invenção.

#### EXEMPLOS

[00101] Os exemplos seguintes são apenas ilustrativos e não

pretendem limitar a presente invenção.

**EXEMPLO 1: Vetores AAV Contendo o hATP7B (AAV.hATP7Bco)**

[00102] Um vetor de terapia genética AAV8 exemplificativo.En34.O TBG-S1.hATP7Bco.PA75 foi construído por um vetor AAV8 contendo um cDNA humano de hATP7B otimizado por códon (hATP7Bco) sob o controle de um promotor TBG-S1 e um potenciador En34 (Figura 1). A cassette de expressão de ATP7B foi flanqueada por repetições terminais invertidas derivadas de AAV2 (ITRs) e incluiu ainda uma sequência de consenso Kozak e um sinal poly (A) de PA75. A sequência de AAV8.En34.O genoma de TBG-S1.hATP7Bco.PA75 é mostrado no nt 1 a nt 5056 da SEQ ID NO: 24.

[00103] O vetor AAV8.En34.TTR.hATP7Bco.PA75 foi construído como descrito acima com um promotor TTR específico de hepatócito em vez de TBG-S1. A sequência de AAV8.En34.TTR.hATP7Bco.PA75 mostrado na nt 1 a nt 5068 da SEQ ID NO: 26.

[00104] Um promotor de TTR modificado com a sequência mostrada como nt 21 a nt 190 da SEQ ID NO: 11, em vez de TBG-S1 foi utilizado para construir o vetor AAV.En34.mTTR.hATP7Bco.PA75. A sequência de AAV.En34.mTTR.hATP7Bco.PA75 é mostrada no nt 1 a nt 5048 da SEQ ID NO: 27.

[00105] O cassette de expressão ATP7B do vetor AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75 foi conduzido por um potenciador EnTTR e um promotor TTR com uma sequência de consenso de Kozak e um sinal poly (A) de PA75. A sequência de AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75 é mostrada no nt 1 a nt 5134 da SEQ ID NO: 23.

[00106] O vetor AAV8.EnABPS.TBG-S1.hATP7Bco.PA75 codifica um cDNA de ATP7B humano (hATP7Bco) otimizado por códon sob o controle de um potenciador ABP-S2 (potenciador ABPS) e um promotor TBG-S1, com uma sequência de consenso Kozak e um sinal poly PA75

(A). A sequência de AAV8.O ABPS.TBG-S1.hATP7Bco.PA75 é mostrado no nt 1 a nt 5064 da SEQ ID NO: 25.

[00107] Adicionalmente, vetores hATP7Bco truncados, incluindo AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco (MBD1Del).PA75 (como mostrado no nt 1 a nt 4945 da SEQ ID NO: 32), AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco (MBD2Del).PA75 (como mostrado no nt 1 a nt 4876 de SEQ ID NO: 31), AAV8.En34.TBG-S1 .hATP7Bco (MBD3Del).PA75 (nt 1 a nt 4978 da SEQ ID NO: 30), AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco (MBD1-2Del).PA75 (nt 1 a nt 4627 de SEQ ID NO: 35), AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco (MBD1-4Del).PA75 (nt 1 a nt 4021 da SEQ ID NO: 34), AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco (MBD1-5Del).PA75 (nt 1 a nt 3628 de SEQ ID NO: 33), AAV8.TBG.hATP7Bco (MBD1-4Del).PA75 (nt 1 a nt 4677 de SEQ ID NO: 29) e AAV8.TBG.hATP7Bco (MBD1-5Del).Os PA75 (nt 1 a nt 4284 da SEQ ID NO: 28) foram concebidos, construídos e produzidos como o hATP7Bco truncado indicado com uma sequência de consenso Kozak, um sinal PA75 Poly (A) e promotores e potenciadores como mostrado na Tabela 2.

[00108] Resumidamente, os plasmídeos que expressam uma versão otimizada por códon de hATP7B (hATP7Bco) a partir de um potenciador e promotor de transtirretina de tamanho reduzido foram empacotados com o capsídeo viral de AAV8.

[00109] O vetor foi preparado utilizando técnicas convencionais de transfecção tripla em células 293 como descrito, por exemplo, por Mizukami, Hiroaki et al. *A Protocol for AAV vector production and purification*. Diss. Division of Genetic Therapeutics, Center for MolecularMedicine, 1998., que é incorporada neste documento por referência. Todos os vectores foram produzidos pelo Vector Core na Universidade da Pensilvânia como descrito anteriormente [Lock, M., et al., Hum Gene Ther, 21: 1259-1271 (2010)].

Tabela 2

Elementos chave no vetor			ITR-ITR Tamanho (bp)	Sexo do camundongo (macho/ fêmea)	Idade do camundongo no início do estudo (semanas)	Diferença em níveis de cobre no soro das semanas 0 até 2	Diferença % em níveis de cobre no soro das semanas 0 até 2	Diferença em níveis de cobre no soro das semanas 0 até 4	Diferença % em níveis de cobre no soro das semanas 0 até 4
Potenciador	Promotor	Transgene							
EnTTR	TTR	hATP7Bco	5134	M	12	0,150	31%	0,158	33%
En34	TBG-S1	hATP7Bco	5056	M	11	0,182	38%	0,252	52%
En34	TTR	hATP7Bco	5069	M	10	0,120	25%	0,176	38%
ABPS	TBG-S1	hATP7Bco	5064	M	9	0,134	28%	0,154	32%
En34	mTTR	hATP7Bco	5084	M	12	0,294	61%	0,232	48%
En34	TBG-S1	hATP7Bco MBD1 Del	4945	M	11	0,106	22%	0,200	41%
En34	TBG-S1	hATP7Bco MBD2 Del	4876	M	11	0,052	11%	0,062	13%
En34	TBG-S1	hATP7Bco MBD3 Del	4978	M	10	0,058	12%	0,076	16%
En34	TBG-S1	hATP7Bco MBD1-2 Del	4627	M	11	0,072	15%	0,106	22%
En34	TBG-S1	hATP7Bco MBD1-4 Del	4021	M	11	0,132	27%	0,240	50%
En34	TBG-S1	hATP7Bco MBD1-5 Del	3628	M	10	0,190	39%	0,302	63%
TBG completo		hATP7Bco MBD1-4 Del	4677	M	10	0,160	33%	0,206	43%
TBG completo		hATP7Bco MBD1-5 Del	4284	M	10	0,300	62%	0,380	79%

## EXEMPLO 2: Um Modelo de Camundongo da Doença de Wilson

[00110] Antes do desenvolvimento de abordagens terapêuticas genéticas para o tratamento da doença de Wilson 5, o modelo animal do fenótipo da doença deve ser totalmente caracterizado. Os estudos descritos neste documento são a primeira caracterização detalhada tanto da cepa de camundongo *tx<sup>l</sup>* como da avaliação do metabolismo do cobre e da patologia da doença após o desenvolvimento de todos os camundongos *Atp7b* KO desde o nascimento. Na ausência da deficiência de cobre conflitante fornecida antes do desmame devido à deficiência de *Atp7b* nas glândulas mamárias de mães doentes, a linha do tempo de progressão da doença foi determinada com precisão. Camundongos *Atp7b* KO acumulam cobre no fígado desde o

nascimento com acumulação de cobre evidente aos dois meses de idade com doença hepática concomitante.

[00111] As doenças monogênicas que afetam órgãos isolados são alvos atraentes para abordagens de terapia gênica, especialmente se houver relativamente poucas lesões histológicas associadas. No entanto, para distúrbios metabólicos que afetam o fígado, muitas vezes pode haver danos graves ao parênquima hepático, como resultado da doença. Um dos exemplos clássicos disso é a doença de Wilson, uma doença autossômica recessiva causada por mutações na proteína da doença de Wilson (uma ATPase do tipo P transportadora de cobre, Atp7b). A falta de Atp7b funcional resulta no acúmulo de cobre no fígado e em outros tecidos, que se manifesta como doença do fígado com sintomas neurológicos ou psiquiátricos. A doença de Wilson pode ser tratada reduzindo a absorção de cobre ou removendo o excesso de cobre do corpo utilizando terapia quelante, mas, tal como para muitos outros distúrbios metabólicos, o transplante de fígado pode corrigir a deficiência genética associada com doença e substituir um órgão disfuncional. A doença de Wilson afeta 1:30.000 pessoas com diferentes sintomas e progressão da doença. Para permitir o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para a quelação e transplante de fígado, um modelo animal confiável dessa doença deve ser totalmente caracterizado. Existem vários modelos animais de camundongo e rato, previamente notificados, da doença de Wilson, incluindo os ratos Long-Evans Cinnamon (LEC) e várias cepas de camundongos transgênicos (1-6). Para avaliação do fenótipo da doença de Wilson em um modelo de camundongo, selecionamos o camundongo do leite tóxico (tx<sup>J</sup>) disponível no Jackson Labs (2). Esses camundongos têm uma mutação missense Gly712Asp no gene Atp7b, que está localizado no segundo domínio putativo de membranas da proteína codificada e resulta em uma proteína Atp7b disfuncional.

[00112] O nome original para esta cepa, o camundongo tóxico, é resultado do fato de Atp7b também ser expresso no tecido mamário, além do fígado. Portanto, o "surgimento espontâneo" do fenótipo do leite tóxico neste modelo é um resultado direto da doença de Wilson (7). Devido à deficiência da proteína Atp7b, o cobre não pode ser transportado da mãe para o leite materno (8). Filhotes doentes que amamentam de mães doentes apresentarão uma forma inversa da doença de Wilson (deficiência de cobre), pois eles são incapazes de receber qualquer cobre em sua dieta até que sejam desmamados e consumam ração normal para o camundongo. Essa forma inversa da doença de Wilson também explica a cor do avental branco e os defeitos mentais descritos anteriormente (9). Aqui, nós preferimos descrever este modelo de camundongo como um nocaute Atp7b (KO), e não como o *tx'*. Devido à disfunção da proteína Atp7b e ao fato de que todos os camundongos utilizados nesses estudos foram estimulados em mães adotivas de Balb/c dentro de 72 horas após o nascimento para mitigar a questão do leite tóxico. Portanto, a caracterização do fenótipo da doença de Wilson descrita neste documento foi separada de quaisquer questões subjacentes relacionadas à deficiência de cobre antes do desmame.

[00113] Todos os procedimentos em animais foram realizados de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais (IACUC) da Universidade da Pensilvânia.

[00114] Os camundongos ATP7B KO não expressam ATPase de transporte de cobre funcional (utsenko et al., Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases, Physiological Reviews, 87(3): 1011-46 (July 2007), serviram assim como um modelo de camundongo para doença de Wilson. Um estudo de história natural foi realizado para avaliar a progressão da doença de Wilson em camundongos ATP7B KO. O estudo foi realizado em duas fases. No primeiro, os

camundongos foram necropsiados em diferentes idades para avaliação da doença hepática. Na segunda fase, os camundongos foram acompanhados até os 9 meses de idade para avaliação de vários biomarcadores.

[00115] Os camundongos heterozigóticos e KO Atp7b foram avaliados quanto aos níveis de urina e de soro de cobre em uma base semanal e quinzenal, respectivamente, a partir dos 2 meses de idade durante 7 meses (FIG. 3A e 3B). Atp7b no fígado exporta cobre para a bile para excreção nas fezes (7). Na ausência de Atp7b, a excreção de cobre ocorrerá via trato urinário. Os níveis de cobre na urina foram inicialmente semelhantes nos dois genótipos estudados, mas aos 3 meses de idade o nível de cobre na urina dos camundongos Atp7b KO começou a aumentar em comparação com os animais heterozigóticos (Figura 3A). No final do estudo, os níveis de cobre na urina tinham uma média de 0,18 pg/g em camundongos heterozigóticos e 1,08 pg/g em camundongos Atp7b KO. Os níveis de cobre no soro nos camundongos Atp7b KO aos dois meses de idade foram significativamente diferentes dos animais heterozigóticos a 0,07 pg/g comparados com 0,47 pg/g ( $p < 0,0001$  pelo teste t de Student, FIG. 3B). Aos 3-4 meses de idade, os níveis séricos de cobre nos camundongos Atp7b KO começaram a subir, atingindo níveis equivalentes aos dos camundongos heterozigóticos. Havia pouca ou nenhuma diferença nos níveis de urina ou de cobre sérico em camundongos machos ou fêmeas. Os resultados da primeira fase mostram que o acúmulo de cobre no fígado foi observado desde o nascimento. Quando os camundongos Atp7b KO atingiram 2 meses de idade, a mancha de cobre de Timm revelou uma acumulação de cobre grave no fígado (FIG. 4).

[00116] As doenças monogênicas que afetam o metabolismo hepático podem ser divididas em duas subcategorias, aquelas com lesões no fígado e aquelas sem. Os pacientes com doença de Wilson

apresentam doença hepática moderada a grave, geralmente se manifestando como cirrose (13,14). Portanto, queríamos avaliar o curso do tempo para o desenvolvimento da patologia hepática neste modelo de camundongo da doença de Wilson. Camundongos Atp7b KO foram necropsiados aos 2, 3, 4, 5, 9, 10 e 12 meses de idade para avaliação das lesões do fígado ao longo do tempo (FIG. 5). Seções do fígado foram coradas com H&E e avaliadas para histopatologia de acordo com o sistema de pontuação 1-5 (FIG. 3C). Hipertrofia e degeneração hepatocelular mínima, juntamente com necrose e inflamação de célula única, estavam presentes em camundongos Atp7b KO a partir dos dois meses de idade. A gravidade da hipertrofia hepatocelular, degeneração e necrose foi maior aos 6 meses de idade e permaneceu consistente a partir daí. Outros parâmetros avaliados, incluindo inflamação, hiperplasia do ducto biliar e hiperplasia de células ovais, aumentaram ao longo do tempo de 2-3 meses a 7 meses de idade. Houve um aumento concomitante nas transaminases hepáticas, ALT e AST, dos valores normais aos dois meses de idade para 199 U/l e 381 U/l para ALT e AST, respectivamente, aos 10 meses (Tabela 3). A extensão do dano hepático aos 10 meses de idade também foi evidente a partir dos níveis séricos de bilirrubina total, quando estes subitamente subiram para 2,5 mg/dl. Além das lesões hepáticas, áreas de regeneração nodular hepática foram evidentes neste modelo de camundongo a partir dos 6 meses de idade (um exemplo é mostrado pelo asterisco na FIG. 5). Isso talvez não seja surpreendente devido à gravidade da doença hepática. Tabela 3

	<b>IDADE (MESES)</b>	<b>ALT (U/l)</b>	<b>AST (U/l)</b>	<b>BILIRRUBINA TOTAL (MG/DL)</b>	<b>N</b>
<b>ATP7B KO</b>	2	16	30	0,2	1
	3	164	190	0,2	1
	4	174	224	0,3	2

WT	5	279	175	0,2	5
	9	152	266	0,6	18
	10	199	381	2,5	2
	2	28	50	0,2	13
	3	29	54	0,2	8
	4	49	39	0,2	4
	5	30	41	0,1	2

[00117] Cortes de fígado também foram avaliados para fibrose e acúmulo de cobre por Sirius Vermelho e coloração de Timm, respectivamente (FIG. 5). Fibrose periportal focal ou multifocal foi observada aos 3 meses de idade nos camundongos Atp7b KO. Isto progrediu rapidamente para difundir a fibrose em ponte com a ruptura arquitetural aos 7 meses de idade. O desenvolvimento de lesões hepáticas foi provavelmente devido ao acúmulo maciço de cobre no fígado, como visto pela coloração de Timm (FIG. 5). A partir dos dois meses de idade, o fígado dos camundongos Atp7b KO ficou saturado com cobre, como mostrado pela coloração preta. A acumulação de cobre no fígado ocorre devido à exportação interrompida de cobre para a bÍlis na ausência de Atp7b funcional. Os níveis de cobre no fígado diminuíram com o tempo, provavelmente devido a danos nos hepatócitos e liberação de cobre no soro. Isso foi mostrado anteriormente, onde os valores de cobre são significativamente reduzidos com necrose submaciça ou maciça, e ainda mais reduzidos com regeneração e fibrose (1, 15-17). O tecido conjuntivo fibroso e os hepatócitos em regeneração não contêm excesso de concentração de cobre (18).

[00118] Os níveis de cobre na urina de camundongos ATP7B KO também foram monitorados. As amostras foram coletadas semanalmente no estudo de história natural e, em seguida, foi realizada espectrometria por plasma com acoplado indutivamente para avaliar a concentração de cobre. Os resultados demonstram que enquanto os

irmãos heterozigóticos mantinham um baixo nível de cobre, os camundongos Atp7b KO exibiam um transbordamento de cobre para a urina começando na terceira semana seguido por um crescimento constante da concentração urinária de cobre durante o período de observação (FIG. 2A, 3A), representando a alta taxa de excreção urinária de cobre observada nos pacientes com doença de Wilson.

[00119] O soro de camundongos Atp7b KO foi coletado quinzenalmente para avaliar a concentração de cobre via espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente. O resultado mostrou um nível muito baixo de cobre sérico até os 2 meses de idade em comparação com os irmãos heterozigóticos, sugerindo uma capacidade comprometida de extrair cobre do tecido para o sangue nos camundongos Atp7b KO. Quando os camundongos Atp7b KO tinham 3 a 4 meses de idade, a concentração de cobre no soro aumentou significativamente e atingiu o nível dos membros da ninhada heterozigótica (FIG. 2B, 3B).

[00120] Neste modelo de camundongo Atp7b KO, a progressão da doença foi a seguinte: Acúmulo de cobre no fígado foi observado pela coloração de cobre de Timm aos dois meses de idade, mas diminuiu ao longo do tempo semelhante ao descrito anteriormente por outros (1,15-17). Devido ao estímulo dos filhotes, o cobre está provavelmente se acumulando no fígado de camundongos Atp7b KO desde o nascimento e atingindo níveis de saturação por volta dos 2-3 meses de idade. Após o desenvolvimento de doença hepática aos dois meses de idade, o cobre é provavelmente liberado no soro, resultando em uma aparente diminuição no acúmulo de hepatócitos e elevação dos níveis séricos de cobre aos 3-4 meses de idade. Este aumento nos níveis séricos de cobre de níveis inicialmente baixos para aqueles similares aos heterozigotos é diferente do que foi relatado anteriormente para outro modelo de camundongo com doença de Wilson (17), em que os níveis

séricos de cobre na cepa Atp7b<sup>-/-</sup> são semelhantes aos observados em camundongos de tipo selvagem às 6 semanas de idade e aumentam ao longo do tempo para 2 a 3 vezes mais do que os camundongos de tipo selvagem às 44 semanas de idade.

[00121] Observa-se que o transbordamento de cobre para a urina começa aos 3 meses de idade, o que, de maneira similar, pode ser devido à necrose hepatocelular e subsequente liberação de cobre acumulado. Mecanismos alternativos para a excreção de cobre através do rim têm sido sugeridos, incluindo a falta de atividade de Atp7b no rim, resultando em aumento da excreção (23-25), ou acúmulo de cobre no fígado, levando a regulação negativa do transportador de cobre do fígado, Ctrl, e excreção urinária por um pequeno carreador de cobre (26). Mais uma vez, o curso de tempo da excreção urinária de cobre difere neste modelo de camundongo com o relatado anteriormente. Aqui, a excreção urinária de cobre é inicialmente semelhante em camundongos heterozigotos e Atp7b KO, mas aumenta nos camundongos KO ao longo do estudo. Em comparação, os níveis urinários de cobre são 3 vezes maiores que os do tipo selvagem às 6 semanas de idade na cepa Atp7b<sup>-/-</sup>, aumentam até as 14-20 semanas e diminuem substancialmente às 20 semanas de idade (26).

[00122] Hipertrofia hepatocelular, degeneração e pico de necrose aos 6 meses de idade, com provável observação concomitante de áreas de regeneração nodular hepática a partir desta idade. Esta progressão para a regeneração foi relatada para outros modelos de camundongos da doença de Wilson (17). No entanto, ao contrário dos outros modelos de camundongo, não houve evidência de colangiocarcinoma no camundongo Atp7b KO descrito neste documento. As regiões de fibrose foram observadas aos 3 meses de idade, que aumentaram rapidamente em gravidade ao longo do tempo com a ruptura arquitetural aos 7 meses de idade. Embora haja aumentos significativos nas transaminases

séricas aos 3-4 meses de idade, aumentos nos níveis séricos de bilirrubina só começam a ocorrer aos 9 meses, indicando doença hepática avançada.

[00123] Na segunda fase do estudo de história natural, crias de ninhadas Atp7b KO e heterozigóticas foram sacrificadas aos 8 meses de idade. Os níveis de ALT, AST e bilirrubina total foram obtidos. A FIG. 6A-6C. Coloração de H&E e, em seguida, histopatologia avaliada pelo patologista contra um esquema de pontuação, que é mostrado na FIG. 7. A pontuação de fibrose e a pontuação de coloração de cobre pela coloração de Timm são mostradas nas FIGURAS 8A e 8B, respectivamente. Os níveis de cobre no fígado são mostrados na FIG. 9.

#### EXEMPLO 3: Vetores AAV8.hATP7Bco no Modelo da Doença de Wilson

[00124] Camundongos Atp7b KO machos foram injetados i.v. com  $10^{10}$  GC/camundongo e  $10^{11}$  GC/camundongo de AAV8.TTR.hATP7Bco, e camundongos Atp7b KO fêmeas foram injetados i.v. com  $10^9$ ,  $10^{10}$ , e  $10^{11}$  GC/camundongo do mesmo vetor. Os níveis de cobre no soro foram monitorizados após a injeção vetorial (FIG. 10A e 10B). A administração de  $10^{10}$  ou  $10^{11}$  GC/camundongo nos camundongos Atp7b KO machos aumentou os níveis de cobre no soro de uma média de 0,11 pg/g para 0,52 pg/g e 0,34 pg/g duas semanas após a administração do vetor, respectivamente (FIG. 10A). No entanto, houve um efeito menor nos camundongos fêmeas (FIG. 10B). Os camundongos foram sacrificados 7 meses após a administração do vetor aos ~9 meses de idade e o fígado foi coletado para avaliação dos níveis de cobre no fígado. Os níveis de cobre no fígado em camundongos heterozigotos e Atp7b KO foram em média 6 µg/g e 222 µg/g, respectivamente (FIG. 10C). A administração do vector AAV8 em doses  $> 10^9$  GC/camundongo resultou em diminuições significativas nos

níveis de cobre no fígado em comparação com camundongos Atp7b KO não injetados, da mesma idade. No entanto, não houve diferenças significativas entre os níveis de cobre no fígado em camundongos fêmeas administrados com  $10^9$  GC/camundongo e camundongos Atp7b KO de controle. Para esta medição, houve um efeito mais forte da dose elevada de vetor em camundongos fêmea, uma vez que os níveis de cobre no fígado não eram significativamente diferentes de camundongos heterozigotos (FIG. 10C).

[00125] Os camundongos administrados com o vector AAV8 foram submetidos à necropsia aos 9 meses de idade e o fígado foi avaliado histologicamente quanto a parâmetros de doença hepática associada ao cobre, incluindo fibrose e níveis de cobre por coloração de Timm (FIG. 11). As secções do fígado foram coradas com H&E e avaliadas histologicamente de acordo com o sistema de pontuação 1-5 (FIG. 12A). Semelhante ao observado para os níveis de cobre no fígado, não houve diferença significativa nas lesões hepáticas entre camundongos Atp7b KO não injetados, pareados por idade e camundongos fêmeas administrados com  $10^9$ /camundongo do vetor AAV8. Houve uma diminuição dependente da dose nas lesões hepáticas em camundongos machos injetados com  $10^{11}$  GC/camundongo, que foram observados como tendo apenas cariocitomegalia leve (denotando hipertrofia e degeneração hepatocelular), inflamação leve e hiperplasia de células ovais periportal focal ou multifocal. Houve uma redução significativa na hipertrofia hepatocelular, degeneração/necrose e também na hiperplasia do ducto biliar em comparação com camundongos Atp7b KO não injetados, pareados por idade, em camundongos administrados com  $10^{10}$  e  $10^{11}$  GC/camundongo ( $p < 0,05$ ). Para inflamação e hiperplasia de células ovais, observou-se apenas redução significativa em comparação com camundongos Atp7b KO não injetados, da mesma idade, a uma dose de  $10^{11}$  GC/camundongo ( $p < 0,05$ ). Quando os

parâmetros histopatológicos foram combinados e avaliados usando o teste de probabilidade combinado de Fisher, houve uma diferença significativa em comparação com camundongos Atp7b KO não injetados e pareados por idade após a administração de ambos  $10^{10}$  e  $10^{11}$  GC/camundongo ( $p < 0,0001$ ).

[00126] Os camundongos machos que receberam a maior dose vector também não tiveram fibrose, que foi avaliada com coloração com Sirius Red (FIG. 11 e 12B). Para todos os outros camundongos administrados com vetor, não houve diferença significativa na fibrose em comparação com camundongos Atp7b KO não injetados, pareados por idade (Fig. 12B). No entanto, a redução na fibrose observada em camundongos fêmea administrados com  $10^{11}$  GC/camundongo foi suficiente para que também não houvesse diferença significativa entre a pontuação da fibrose hepática nestes camundongos e os camundongos heterozigóticos fêmea Atp7b. A coloração de Timm para acúmulo de cobre no fígado demonstrou resultados semelhantes aos observados pelos níveis quantitativos de cobre no fígado determinados por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (FIG. 12C). Não houve diferenças significativas na pontuação de coloração de Timm entre camundongos Atp7b KO não injetados, pareados por idade e qualquer um dos grupos administrados com o vetor. Para avaliar a eficácia dos vetores AAV8.hATP7Bco, camundongos Atp7b KO receberam uma administração *iv* de vários vetores de terapia gênica a  $3 \times 10^{12}$  GC/kg, incluindo AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75 (FIG. 21, grupo 1), AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco.PA75 (FIG. 21, grupo 2), AAV8.En34.TTR.hATP7Bco.PA75 (FIG. 21, grupo 3) e AAV8.EnABPS.TBG-S1.hATP7Bco.PA75 (FIG. 21, grupo 4). Os companheiros de ninhada heterozigotos e selvagens e os camundongos Atp7b KO sem tratamento serviram como controles. Amostras de sangue foram coletadas semanalmente para avaliar os níveis de ambas

as formas de ceruloplasmina ligada ao cobre e não ligada ao cobre via Western blot. No dia 21 após a administração, observou-se o aparecimento de ceruloplasmina ligada ao cobre nos camundongos Atp7b KO tratados com AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco.PA75, indicando uma extração de cobre promovida no sangue (FIG. 21, grupo 2). No entanto, sob o cenário experimental descrito acima, os outros três vectores testados não exibiram um aumento na ceruloplasmina ligada ao cobre (FIG. 21).

[00127] Para avaliar o acúmulo de cobre no fígado dos camundongos ATP7B KO injetados com os vectores AAV8.hATP7Bco aqui descritos, coloração de cobre de Timm foi realizada nas suas secções de fígado. Depósitos pretos indicam acúmulo de cobre. Os resultados são mostrados na FIG. 19B. A injeção com todos os cinco vetores em camundongos Atp7b KO machos levou a uma diminuição nos depósitos de sangue das secções hepáticas em comparação com as amostras de camundongos não tratados ou somente PBS, enquanto o vetor AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75 demonstrou o mínimo de depósitos negros e um padrão similar ao tipo selvagem (FIG. 19B). Camundongos fêmeas Atp7b KO (FIG. 19B) demonstraram mais depósitos de cobre no fígado em comparação com os machos, indicando uma diferença de gênero. Ainda comparado a camundongos não tratados, os camundongos fêmeas Atp7b KO demonstraram menos depósitos de cobre no fígado. A geração de anticorpos contra a proteína ATP7B humana em camundongos Atp7b KO machos e fêmeas injetados com vectores AAV hATP7Bco descritos neste documento está sendo investigada.

[00128] Enquanto isso, as amostras de soro foram coletadas e as concentrações de cobre foram avaliadas como descrito no Exemplo 2. Os dados foram representados graficamente na FIG. 15A e 15B para 10 camundongos fêmea e macho, respectivamente. O resultado demonstra

que o tratamento de  $3 \times 10^{12}$  GC/kg dos vectores AAV8.hATP7Bco aqui descritos aumentaram com sucesso o nível de cobre no soro nos camundongos Atp7b KO (FIGURAS 15A e 15B).

[00129] Outros testes foram realizados da seguinte forma:

Coorte	Vetor	Dose (GC/kg)	Sexo	Nº de camun- dongos	Idade dos camundongos no início do estudo
1	EnTTR.TTR	$3,0 \times 10^{12}$	F	5	11 semanas
2	EnTTR.TTR	$3,0 \times 10^{12}$	M	5	12 semanas
3	En34.TBG-S1	$3,0 \times 10^{12}$	F	5	11 semanas
4	En34.TBG-S1	$3,0 \times 10^{12}$	M	5	11 semanas
5	En34.TTR	$3,0 \times 10^{12}$	F	5	10 semanas
6	En34.TTR	$3,0 \times 10^{12}$	M	5	10 semanas
7	APBS.TBG-S1	$3,0 \times 10^{12}$	F	5	9 semanas
8	APBS.TBG-S1	$3,0 \times 10^{12}$	M	5	9 semanas
1	En34.mTTR	$3,0 \times 10^{12}$	F	5	12 semanas
2	En34.mTTR	$3,0 \times 10^{12}$	M	5	12 semanas

[00130] Níveis de cobre no soro ao longo do tempo são mostrados nas FIGURAS 15A e 15B. Os níveis de ALT, AST e bilirrubina total foram obtidos. FIGURAS 16A-C. A expressão relativa de ATP7B é mostrada na FIG. 17. Coloração de H&E e, em seguida, histopatologia avaliada pelo patologista contra um esquema de pontuação, que é mostrado na FIG. 18. A pontuação de fibrose e a pontuação de coloração de cobre por coloração de Timm são mostradas nas FIGURAS 19A e 19B, respectivamente.

EXEMPLO 4: Atividade da Oxidase da Ceruloplasmina no Modelo da Doença de Wilson Injetado com Vetores AAV.hATP7Bco

[00131] O cobre é um metal potencialmente tóxico, mas é essencial para um grande número de funções fisiológicas que atuam como cofator de uma variedade de enzimas. Após sua absorção intestinal, o cobre é transportado para os hepatócitos onde se liga ao ATP7B localizado na

membrana da rede trans-Golgi (TGN). Esta grande proteína transmembrana é responsável pela transferência do metal para enzimas dependentes de cobre. O carregamento de cobre em ceruloplasmina é essencial para a atividade ferroxidásica desta enzima e constitui uma importante via secretória para o metal, pois 95% do cobre presente no plasma de indivíduos saudáveis estão ligados à ceruloplasmina. Por favor, veja, por exemplo, Murillo, Oihana, et al. "Long-term metabolic correction of Wilson's disease in a murine model by gene therapy" *Journal of Hepatology* 64.2 (2016): 419-426, que está incorporado neste documento por referência.

[00132] Para medir a atividade da oxidase, 20 µl de soro foram processados utilizando o Kit Colorimétrico de Atividade de Ceruloplasmina da Sigma (MAKI 77) ou o Kit Colorimétrico de Atividade de Ceruloplasmina da BioVision seguindo os protocolos mostrados nas Informação de Produto correspondente, que é aqui incorporada por referência. Foram também realizados ensaios de atividade de oxidase de acordo com os protocolos apresentados em Schosinsky et al., "Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride" *Clinical Chemistry* 20.12 (1974): 1556-1563 e Murillo et al. "Long-term metabolic correction of Wilson's disease in a murine model by gene therapy" *Journal of Hepatology* 64.2 (2016): 419-426, que está incorporado neste documento por referência.

[00133] A atividade de oxidase da ceruloplasmina sérica dos camundongos Atp7b KO foi medida utilizando os quatro ensaios descritos acima. Amostras de camundongos selvagens e heterozigotos foram servidas como controle. Não foram detectadas diferenças entre os camundongos de tipo selvagem e os Atp7b KO.

[00134] Além disso, camundongos Atp7b KO foram tratados com ou sem sulfato de amônio. Camundongos selvagens foram fornecidos como controle. Não se detectou qualquer diferença no ensaio da

atividade de oxidase da ceruloplasmina entre os camundongos do tipo selvagem ou Atp7b KO utilizando o protocolo apresentado em Schosinsky et al., "Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride" Clinical Chemistry 20.12 (1974): 1556-1563.

[00135] Em outro experimento, os camundongos Atp7b KO foram tratados com ou sem sulfato de cobre. Camundongos selvagens foram fornecidos como controle. O ensaio de atividade de oxidase da ceruloplasmina realizado para detectar diferença entre os camundongos tratados com ou sem sulfato de cobre utilizando os quatro modos descritos acima. Os homogenatos de fígado dos camundongos aqui descritos também são coletados e testados quanto à atividade de oxidase da ceruloplasmina utilizando os quatro métodos descritos acima. Adicionou-se sulfato de cobre aos homogenatos de fígado e ele serviu como controle positivo.

#### EXEMPLO 5: Teste adicional de vetor AAV8.TTR.hATP7Bco

[00136] Determinar os efeitos dependentes da dose e a dose mínima eficaz (MED) dos vetores AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75, ambos camundongos ATP7B KO machos e fêmeas com 2 meses de idade, foram injetados intravenosamente com  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$  ou  $1 \times 10^{11}$  GC/camundongo do vetor. O western blot para ceruloplasmina demonstrou uma aparência de ceruloplasmina ligada ao cobre no soro de três dos quatro camundongos testados que receberam  $1 \times 10^{11}$  GC de AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75, sugerindo um aumento da extração de cobre (FIG. 14). Enquanto que após tratamento com  $1 \times 10^{10}$  GC do mesmo vector, um em cada cinco camundongos testados mostrou ceruloplasmina ligada ao cobre no sangue (FIG. 14). Essa data validou que uma única injeção intravenosa de AAV8.EnTTR.TTR.hATP7Bco.PA75at na dose de  $1 \times 10^{11}$  GC por camundongo promoveu com sucesso a extração de cobre em um

modelo murino de doença de Wilson.

#### EXEMPLO 6: Vetores truncados

[00137] As doenças monogênicas são excelentes candidatas para abordagens de terapia de substituição de genes usando vetores AAV. No entanto, há um limite para o tamanho do cDNA que pode ser empacotado dentro de um capsídeo do vetor AAV. O genoma de AAV do tipo selvagem tem 4.700 bp e pedidos para empacotar genomas maiores podem reduzir a integridade da sequência de DNA encapsulada dentro do capsídeo de AAV (19). Anteriormente, uma extensa pesquisa foi realizada para investigar maneiras de reduzir tanto o tamanho de um dado transgene quanto as sequências de controle transcricional e poliA necessárias para a expressão. Um exemplo de onde isto foi feito com sucesso é o desenvolvimento de um vector de terapia gênica para o tratamento de hemofilia A, envolvendo a geração da sequência do transgene com domínio B deletado para o fator VIII de coagulação humano que tem 4.374 bp de comprimento (19-21). Para o tratamento da doença de Wilson, o problema é aumentado quando o cDNA de ATP7B é de 4.395 bp. Por conseguinte, optou-se por utilizar uma sequência de potenciador e promotor de transtirretina de tamanho reduzido (TTR) para expressão de uma versão otimizada por códon do transgene ATP7B humano, em combinação com uma sequência poliA sintética de 75 bp (PA75) (19). O genoma de AAV resultante é de 5,1 kb e foi empacotado dentro do capsídeo de AAV8.

[00138] Adicionalmente, vetores hATP7Bco truncados, incluindo AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco (MBD1Del).PA75, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco (MBD2Del).PA75, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco (MBD3Del).PA75, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco (MBDI-2Del).PA75, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco (MBDI-4Del).PA75, AAV8.En34.TBG-S1.hATP7Bco (MBDI-5Del).PA75, AAV8.TBG.PI hATP7Bco (MBDI-4Del).PA75 e AAV8.TBG.PI.hATP7Bco (MBDI-5Del).PA75, foram

concebidos, produzidos e injetados intravenosamente em camundongos ATP7B KO em uma dose de  $3 \times 10^{12}$  GC/kg.

[00139] Camundongos Atp7b KO tratados com os vários vetores truncados descritos acima, e ninhadas heterozigóticas foram estudados e sacrificados aos 6 meses de idade. Níveis de cobre no soro ao longo do tempo são mostrados na FIG. 22. Os níveis de ALT, AST e bilirrubina total foram obtidos. FIG. 23. A expressão relativa de ATP7B é mostrada na FIG. 24. Coloração de H&E e, em seguida, histopatologia avaliada pelo patologista contra um esquema de pontuação, que é mostrado na FIG. 25. A pontuação de fibrose e a pontuação de coloração de cobre por coloração de Timm são mostradas na FIG. 26. Os níveis de cobre no fígado na necropsia são mostrados na FIG. 27.

#### EXEMPLO 7: Materiais e métodos para os experimentos acima

##### A. Produção do vetor AAV

[00140] Todos os vetores AAV foram produzidos pelo Penn Vector Core da Universidade da Pensilvânia, conforme descrito anteriormente (10). Resumidamente, os plasmídeos que expressam uma versão otimizada por códon de hATP7B (hATP7Bco) a partir de um potenciador e promotor de transtirretina de tamanho reduzido foram empacotados com o capsídeo viral de AAV8.

##### B. Camundongos

[00141] Pares reprodutivos de camundongos heterozigotos Atp7b <sup>+/-</sup> foram obtidos do The Jackson laboratory (Bar Harbor, ME, EUA) e uma colônia foi mantida na Universidade da Pensilvânia sob condições específicas livres de patógenos. Todos os procedimentos e protocolos de animais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais (IACUC) da Universidade da Pensilvânia. Atp7b KO foram gerados e utilizados para posterior reprodução. Todos os filhotes gerados a partir de pares de acasalamento Atp7b KO foram promovidos em mães adotivas Balb/c dentro de 72 horas após o nascimento.

Camundongos Atp7b KO machos e fêmeas com dois meses de idade foram injetados IV com  $10^9 - 10^{11}$  cópias genômicas (GC)/camundongo de AAV8.TTR.hATP7Bco via veia da cauda (n = 5/sexo/grupo).

#### C. Análises séricas

[00142] Coletou-se sangue nos pontos de tempo indicados nos tubos de separação de soro, deixou-se coagular e isolou-se o soro por centrifugação a 3500 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente. O soro foi analisado para níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e bilirrubina total pela Antech Diagnostics (Irvine, CA, EUA). O soro e a urina também foram analisados para os níveis de cobre por Exova (Edimburgo, Reino Unido).

#### D. Análise de cobre no fígado

[00143] As amostras de fígado coletadas na necropsia foram analisadas quanto aos níveis de cobre por Exova (Edimburgo, Reino Unido).

#### E. Histopatologia

[00144] Amostras de tecido embebidas em parafina fixadas em formalina foram seccionadas e coradas para hematoxilina e eosina (H&E) de acordo com os protocolos padrão. Para detectar a fibrose hepática, a coloração Sirius Red foi realizada em secções de parafina. As secções foram desparafinizadas e coradas durante 90 minutos em uma solução de 0,1% (p/v) de Direct Red (Sigma), 4% (p/v) de ácido pícrico (Sigma), lavadas com 0,01 N de HCl (2x1 min), desidratadas através de uma série de etanol e xileno, e lamínulas foram aplicadas.

#### F. Coloração de cobre de Timm

[00145] Secções de fígados embebidos em parafina fixados em formalina foram desparafinados e incubados sequencialmente em 0,5% de sulfeto de amônio (5 min), água deionizada (lavagem de 1 min), 0,1 N de HCl (2-3 min), água deionizada (lavagem de 2-3 min)) e revelador

(1 parte de nitrato de prata a 5%, 5 partes de hidroquinona a 2% (p/v)/ácido cítrico a 5% (p/v), durante aproximadamente 10 min). Secções de fígado de animais de controle (tipo selvagem e ATP7B KO) foram incluídas em cada ensaio e monitorizadas quanto à intensidade de coloração consistente. As secções foram finalmente lavadas em água, contrastadas com Nuclear Fast Red, desidratadas e lamínulas foram aplicadas.

#### G. Pontuação Histopatológica

[00146] As lesões histopatológicas foram pontuadas com base nos seguintes critérios. Hipertrofia e degeneração hepatocelular: 0, sem lesões significativas; 1, cariocitomegalia mínima (rara a ocasional, 1-2 hepatócitos dentro de um lóbulo), 2, cariocitomegalia leve (< 10% dos hepatócitos dentro de um lóbulo); 3, cariocitomegalia moderada (10-50% dos hepatócitos dentro de um lóbulo) com dissociação de hepatócitos e rara a pouca necrose celular única; 4, cariocitomegalia grave (51-90% dos hepatócitos dentro de um lóbulo) com extensa dissociação de hepatócitos e necrose frequente de célula única; a arquitetura hepática relativamente normal é mantida; 5, marcada por cariocitomegalia (> 90% dos hepatócitos dentro de um lóbulo) com colapso lobular e numerosas necroses de célula única. Inflamação: 0, nenhum; 1, leve - poucos agregados dentro das áreas de portal e focos raros dentro do parênquima; considerados dentro dos limites normais; 2, moderada - estendendo-se para os hepatócitos periportais adjacentes ou multifocalmente dentro do parênquima; 3, marcado - hepatócitos ligando ou dissecando ou de multifocais a coalescentes dentro do parênquima. Hiperplasia do ducto biliar: 0, nenhum; 1, focal ou multifocal nas áreas de portal; 2, hepatócitos dissecando na região periportal; 3, hepatócitos ligando ou dissecando com distorção arquitetural. Hiperplasia de células ovas: 0, nenhum; 1, focal ou multifocal (periportal); 2, hepatócitos ligando ou dissecando; 3,

hepatócitos ligando ou dissecando com distorção arquitetural. Regeneração nodular: 0, ausente; 1, presente.

[00147] O esquema de graduação para fibrose baseado na coloração de Sirius red foi derivado daqueles relatados na literatura (11): 0, nenhum; 1, focal ou multifocal; 2, ponte; 3, ponte com ruptura arquitetural, com notação sobre se a distribuição era centrolobular, no meio da zona, periportal ou difusa.

H. O esquema de graduação para acúmulo de cobre baseado na coloração de Timm foi o mesmo descrito anteriormente na literatura (12): 1, ausência ou poucos grânulos contendo cobre no citoplasma de um hepatócito ocasional; considerados dentro dos limites normais; 2, grânulos óbvios contendo cobre em alguns hepatócitos centrolobulares; considerados dentro dos limites normais; 3, leve - numerosos grânulos na maioria dos hepatócitos centrolobulares (um terço de cada lóbulo); 4, moderado - presença de numerosos grânulos em todos os hepatócitos centrolobulares e no meio da zona (aproximadamente dois terços dos hepatócitos em todos os lóbulos); 5 grânulos abundantes marcados em mais de dois terços das células do fígado em todos os lóbulos. Análise estatística

[00148] Para todos os dados, a média do grupo e o erro padrão da média (SEM) foram calculados e reportados. O teste *t* de Student foi realizado para comparar dois grupos e uma análise de variância unidirecional (AVOVA) com o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizada entre os grupos e estratificada por sexo. Os cinco parâmetros patológicos foram analisados na administração do vetor e comparados com aqueles em camundongos Atp7b KO não injetados da mesma idade. As comparações foram realizadas usando o teste da soma de postos de Wilcoxon dentro do programa R (versão 3.3.1; <https://cran.r-project.org>). A diferença em parâmetros patológicos combinados foi também avaliada para cada grupo de dose em

comparação com camundongos ATP7B KO não injetados com a mesma idade utilizando o teste de probabilidade combinado de Fisher dentro do programa R utilizando a função "sumlog" no pacote "metap". Um valor de  $p$  de 0,05 foi considerado significativo.

#### EXEMPLO 8: Discussão

[00149] Antes que um modelo de doença de camundongo possa ser usado para avaliar a capacidade de tradução de uma abordagem terapêutica para a clínica, o modelo deve ser extensivamente caracterizado. Embora a caracterização de outros modelos de camundongos da doença de Wilson foi realizada (1,15,17), este estudo é a primeira caracterização detalhada da linhagem de camundongos  $tx^J$  e a avaliação do metabolismo do cobre e da doença hepática após a criação de todos os camundongos  $Atp7b$  KO desde o nascimento. Na ausência da deficiência de cobre conflitante que ocorre antes do desmame devido à deficiência de  $Atp7b$  nas glândulas mamárias de mães doentes, a linha temporal da progressão da doença nesses camundongos pode ser mais precisamente determinada assegurando a separação do fenótipo da doença de quaisquer questões subjacentes relacionadas à deficiência de cobre antes do desmame. O desenvolvimento de doença hepática e regeneração nodular neste modelo de camundongo foi semelhante ao relatado anteriormente para a linhagem  $Atp7b^{-/-}$  desenvolvida por outros (1, 17). No entanto, a linha do tempo foi ligeiramente aumentada nesta linhagem de camundongo, provavelmente devido à criação de filhotes desde o nascimento, resultando em um suprimento contínuo de cobre.

[00150] Neste modelo de camundongo  $Atp7b$  KO, a progressão da doença foi a seguinte: Acúmulo de cobre no fígado foi observado pela coloração de cobre de Timm aos dois meses de idade, mas diminuiu ao longo do tempo semelhante ao descrito anteriormente por outros (1,15-17). Devido ao estímulo dos filhotes, o cobre está provavelmente se

acumulando no fígado de camundongos *Atp7b* KO desde o nascimento e atingindo níveis de saturação por volta dos 2-3 meses de idade. Após o desenvolvimento de doença hepática aos dois meses de idade, o cobre é provavelmente liberado no soro, resultando em uma aparente diminuição no acúmulo de hepatócitos e elevação dos níveis séricos de cobre aos 3-4 meses de idade. Este aumento nos níveis séricos de cobre de níveis inicialmente baixos para aqueles similares aos heterozigotos é diferente do que foi relatado anteriormente para outro modelo de camundongo da doença de Wilson (17), onde os níveis séricos de cobre na linhagem *fasAtp7b* são semelhantes aos observados em camundongos selvagens às 6 semanas de idade e aumentam ao longo do tempo para 2 a 3 vezes mais do que os camundongos do tipo selvagem às 44 semanas de idade.

[00151] Observamos que o transbordamento de cobre para a urina começa aos 3 meses de idade, o que, de maneira similar, pode ser devido à necrose hepatocelular e subsequente liberação de cobre acumulado. Mecanismos alternativos para a excreção de cobre através do rim têm sido sugeridos, incluindo a falta de atividade de *Atp7b* no rim, resultando em aumento da excreção (23-25), ou acúmulo de cobre no fígado, levando a regulação negativa do transportador de cobre do fígado, *Ctr1*, e excreção urinária por um pequeno carreador de cobre (26). Mais uma vez, o curso de tempo da excreção urinária de cobre difere neste modelo de camundongo com o relatado anteriormente. Aqui, a excreção urinária de cobre é inicialmente semelhante em camundongos heterozigotos e *Atp7b* KO, mas aumenta nos camundongos KO ao longo do estudo. Em comparação, os níveis urinários de cobre são 3 vezes maiores que os do tipo selvagem às 6 semanas de idade na linhagem *Atp7b*, aumentam até as 14-20 semanas e diminuem substancialmente às 20 semanas de idade (26).

[00152] Hipertrofia hepatocelular, degeneração e pico de necrose

aos 6 meses de idade, com provável observação concomitante de áreas de regeneração nodular hepática a partir desta idade. Esta progressão para a regeneração foi relatada para outros modelos de camundongos da doença de Wilson (17). No entanto, ao contrário dos outros modelos de camundongo, não houve evidência de colangiocarcinoma no camundongo Atp7b KO aqui descrito. As regiões de fibrose foram observadas aos 3 meses de idade, que aumentaram rapidamente em gravidade ao longo do tempo com a ruptura arquitetural aos 7 meses de idade. Embora haja aumentos significativos nas transaminases séricas aos 3-4 meses de idade, aumentos nos níveis séricos de bilirrubina só começam a ocorrer aos 9 meses, indicando doença hepática avançada.

[00153] Após a caracterização deste modelo de camundongo Atp7b KO, desenvolvemos uma abordagem de terapia gênica para o tratamento da doença de Wilson. Administração IV de um vetor AAV8 expressando uma versão otimizada por códon do transgene ATP7B humano em Atp7b

[00154] Os camundongos KO aos dois meses de idade resultaram em um aumento dos níveis de cobre no soro duas semanas após a administração do vetor. As doses mais altas de vetor avaliadas aqui ( $>10^9$  GC/camundongo) resultaram em reduções significativas nos níveis de cobre no fígado em comparação com camundongos Atp7b KO não injetados e pareados por idade. Houve uma redução significativa, dependente da dose, 5 nas lesões hepáticas, com apenas achados histopatológicos leves presentes em camundongos machos injetados com  $10^{11}$  GC/camundongo e uma completa falta de fibrose hepática. Portanto, a administração de uma abordagem de terapia gênica durante os estágios iniciais do início da doença preveniu danos no fígado e corrigiu o metabolismo do cobre em um modelo de camundongo da doença de Wilson.

[00155] Todas as publicações citadas neste relatório descritivo, bem

como os Pedidos de Patente Provisória US n. 62/440,659 e 62/473,656, são aqui incorporados por referência. De um modo semelhante, as SEQ ID NOs 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 são destinadas a estar dentro do escopo das reivindicações anexas.

#### Listagem de Sequência em Texto Livre

<u>Seq ID</u>	<u>Texto Livre</u>
<u>NO</u>	
4-15	<213> Sequência Artificial <223> sequência construída
17-35	<213> Sequência Artificial <223> sequência construída

#### REFERÊNCIAS

1. Buiakova OI, Xu J, Lutsenko S, Zeitlin S, Das K, Das S, Ross BM, et al. Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation. Hum Mol Genet 1999; 8:1665-1671.
2. Coronado V, Nanji M, Cox DW. The Jackson toxic milk mouse as a model for copper loading. Mamm Genome 2001; 12:793-795.
3. Theophilos MB, Cox DW, Mercer JF. The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease. Hum Mol Genet 1996; 5:1619-1624.
4. Sasaki N, Hayashizaki Y, Muramatsu M, Matsuda Y, Ando Y, Kuramoto T, Serikawa T, et al. The gene responsible for LEC hepatitis, located on rat chromosome 16, is the homolog to the human Wilson disease gene. Biochem Biophys Res Commun 1994; 202:512-518.
5. Wu J, Forbes JR, Chen HS, Cox DW. The LEC rat has a

deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nat Genet* 1994; 7:541-545.

6. Terada K, Sugiyama T. The Long-Evans Cinnamon rat: an animal model for Wilson's disease. *PediatrInt* 1999; 41:414-418.

7. Lutsenko S, Bames NL, Bartee MY, Dmitriev OY. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev* 2007; 87:1011-1046.

8. Michalczyk A, Bastow E, Greenough M, Camakaris J, Freestone D, Taylor P, Linder M, et al. ATP7B expression in human breast epithelial cells is mediated by lactational hormones. *J Histochem Cytochem* 2008; 56:389-399.

9. Bronson RT, Sweet HO, Davisson MT. Acute cerebral neuronal necrosis in copper deficient offspring of female mice with the toxic milk mutation. *Mouse Genome* 1995; 93:152-154.

10. Gao G, Lu Y, Calcedo R, Grant RL, Bell P, Wang L, Figueredo J, et al. Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates. *Mol Ther* 2006; 13:77-87.

11. Bernard JM, Newkirk KM, McRee AE, Whittemore JC, Ramsay EC. Hepatic lesions in 90 captive nondomestic felids presented for autopsy. *Vet Pathol* 2015; 52:369- 376.

12. Thornburg LP, Shaw D, Dolan M, Raisbeck M, Crawford S, Dennis GL, Olwin

DB. Hereditary copper toxicosis in West Highland white terriers. *Vet Pathol* 1986; 23:148-154.

13. Stromeyer FW, Ishak KG. Histology of the liver in Wilson's disease: a study of 34 cases. *Am J Clin Pathol* 1980; 73:12-24.

14. Roberts EA, Schilsky ML, American Association for Study of Liver D. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology* 2008; 47:2089-2111.

15. Biempica L, Rauch H, Quintana N, Stemlied I. Morphologic and

chemical studies on a murine mutation (toxic milk mice) resulting in hepatic copper toxicosis. *Lab Invest* 1988; 59:500-508.

16. Haywood S, Loughran M, Batt RM. Copper toxicosis and tolerance in the rat. III. Intracellular localization of copper in the liver and kidney. *Exp Mol Pathol* 1985; 43:209 - 219.

17. Huster D, Finegold MJ, Morgan CT, Burkhead JL, Nixon R, Vanderwerf SM, Gilliam CT, et al. Consequences of copper accumulation in the livers of the *Atp7b*<sup>-/-</sup> (Wilson disease gene) knockout mice. *Am J Pathol* 2006; 168:423-434.

18. Smedley R, Mullaney T, Rumble W. Copper-associated hepatitis in Labrador Retrievers. *Vet Pathol* 2009; 46:484-490.

19. Greig JA, Wang Q, Reichert AL, Chen SJ, Hanlon AL, Tipper CH, Clark KR, et al. Characterization of Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Human Factor VIII Gene Therapy in Hemophilia A Mice. *Hum Gene Ther* 2017; 28:392-402.

20. Toole JJ, Pittman DD, Orr EC, Murtha P, Wasley LC, Kaufman RJ. A large region (approximately equal to 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:5939-5942.

21. Ward NJ, Buckley SM, Waddington SN, Vandendriessche T, Chuah MK, Nathwani AC, McIntosh J, et al. Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression. *Blood* 2011; 117:798-807.

22. Davidoff AM, Ng CY, Zhou J, Spence Y, Nathwani AC. Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood* 2003; 102:480-488.

23. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 1993; 5:327-337.

24. Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, Tanzi RE, Chernov I, Devoto M, Brzustowicz LM, et al. Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nat Genet* 1993; 5:338-343.
25. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 1993; 5:344-350.
26. Gray LW, Peng F, Molloy SA, Pendyala VS, Muchenditsi A, Muzik O, Lee J, et al. Urinary copper elevation in a mouse model of Wilson's disease is a regulated process to specifically decrease the hepatic copper load. *PLoS One* 2012; 7:e38327.

## REIVINDICAÇÕES

1. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV) com utilidade terapêutica dirigida ao fígado para Doença de Wilson (WD), **caracterizado** pelo fato de que o referido rAAV compreende um capsídeo de AAV e um genoma de vetor empacotado nele, o referido genoma de vetor compreendendo:

- (a) uma sequência de AAV 5' de repetição de terminal invertida (ITR);
- (b) um promotor;
- (c) uma sequência de codificação que codifica uma ATPase 2 transportadora de cobre humana (ATP7B);
- (d) uma AAV 3' ITR.

2. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de codificação de (c) é SEQ ID NO: 1.

3. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o capsídeo de rAAV é um capsídeo de AAV8.

4. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o promotor é promotor de TBG ou promotor de TBG-S1.

5. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o promotor é o promotor A1AT.

6. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o promotor é o promotor LSP.

7. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o promotor é o promotor de TTR.

8. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que AAV 5' ITR e/ou AAV3' ITR é de AAV2.

9. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o genoma do vetor compreende adicionalmente um poliA.

10. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o poliA é de 75 aa em comprimento.

11. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um WPRE.

12. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um íntron.

13. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o íntron é de beta-globina humana IVS2 ou SV40.

14. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um potenciador.

15. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o potenciador é um potenciador APB, potenciador ABPS, potenciador alfa mic/bik, potenciador TTR, en34 ou potenciador ApoE.

16. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o genoma do vetor apresenta cerca de 3 quilobases a cerca de 5,5 quilobases de tamanho.

17. Suspensão aquosa adequada para administração em um

paciente de Doença de Wilson (WD), **caracterizada** pelo fato de que a referida suspensão um que compreende um líquido de suspensão aquosa e cerca de  $1 \times 10^{12}$  GC/mL to about  $1 \times 10^{14}$  GC/mL de um vírus adenoassociado recombinante (rAAV) de utilidade terapêutica dirigida ao fígado para Doença de Wilson (WD), tal rAAV tendo um capsídeo de AAV e empacotado nele um genoma de vetor que compreende:

- (a) uma sequência de AAV 5' de repetição de terminal invertida (ITR);
- (b) um promotor;
- (c) uma sequência de codificação que codifica uma ATPase 2 transportadora de cobre humana (ATP7B); e
- (d) uma AAV 3' ITR.

18. Suspensão de acordo com a reivindicação 17, **caracterizada** pelo fato de que a suspensão é adequada para injeção intravenosa.

19. Suspensão de acordo com a reivindicação 17, **caracterizada** pelo fato de que a suspensão compreende adicionalmente um tensoativo, conservante e/ou tampão dissolvido no líquido de suspensão aquoso.

20. Método de tratamento de um paciente tendo Doença de Wilson (WD) com um Vírus adenoassociado recombinante (rAAV) como definido na reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que rAAV é fornecida de cerca de  $1 \times 10^{10}$  a cerca de  $1 \times 10^{15}$  cópias de genoma (GC)/kg numa suspensão aquosa, em que o GC é calculado como determinado baseado em oqPCR ou ddPCR.

21. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV) de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o genoma do vetor compreende SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 ou SEQ ID NO: 27.

22. Suspensão de acordo com a reivindicação 17,

**caracterizado** pelo fato de que o capsídeo de rAAV é um capsídeo de AAV8.

23. Vírus adenoassociado recombinante (rAAV) de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende potenciador/promotor En34.TBG-S1.

24. Uso do Vírus adenoassociado recombinante (rAAV), como definido em qualquer das reivindicações 1 a 16, **caracterizada** pelo fato de que é na preparação de uma composição farmacêutica e/ou suspensão aquosa no tratamento de Doença de Wilson (WD) em um indivíduo com necessidade do mesmo.

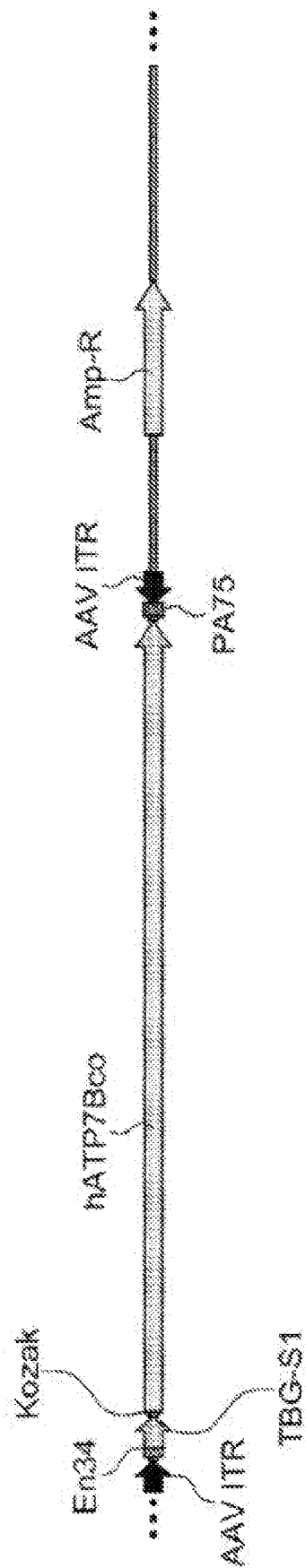


FIG. 1

FIG. 2A

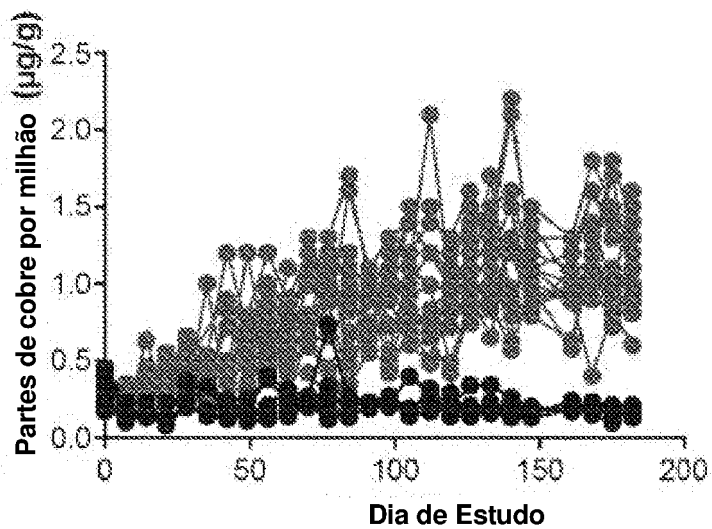


FIG. 2B

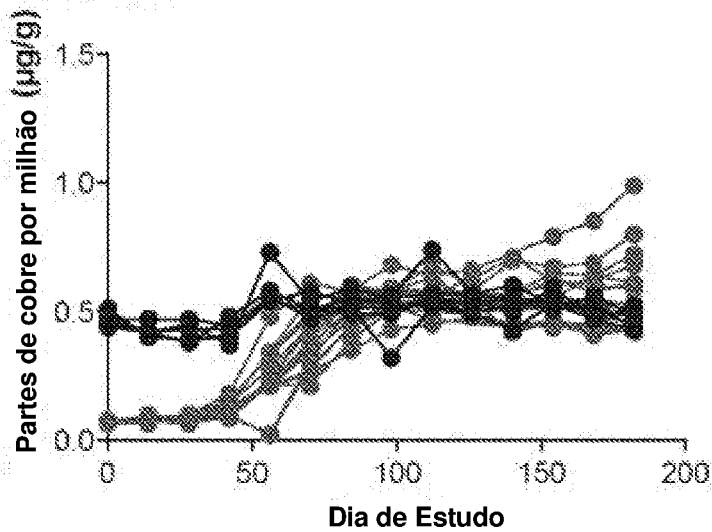


FIG. 3A

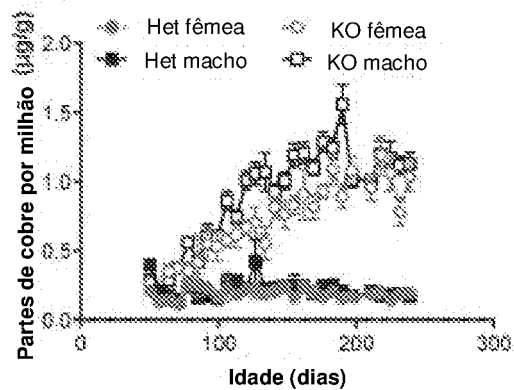


FIG. 3B

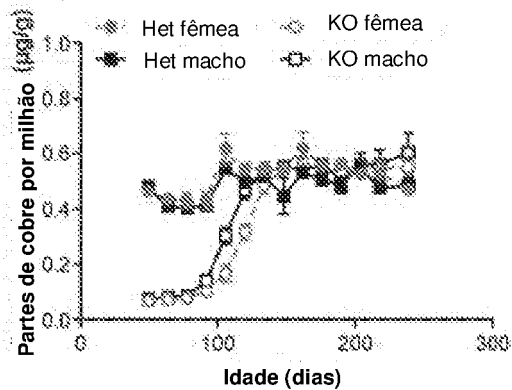


FIG. 3C

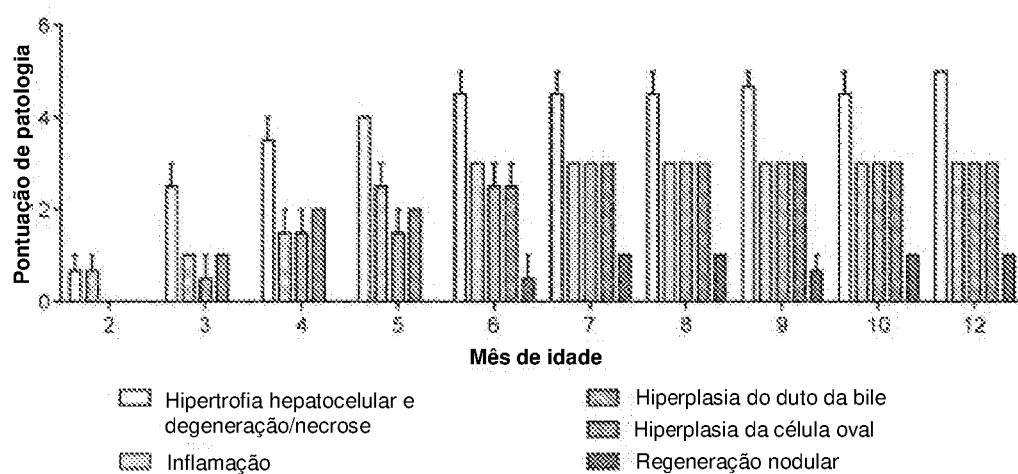
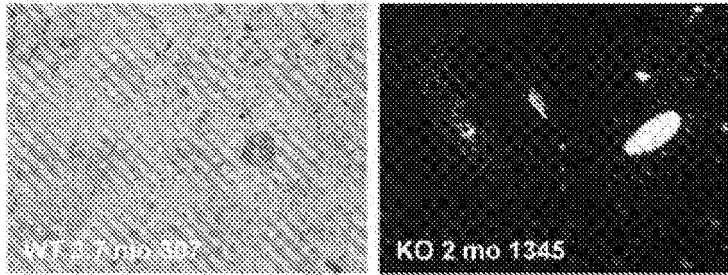


FIG. 4



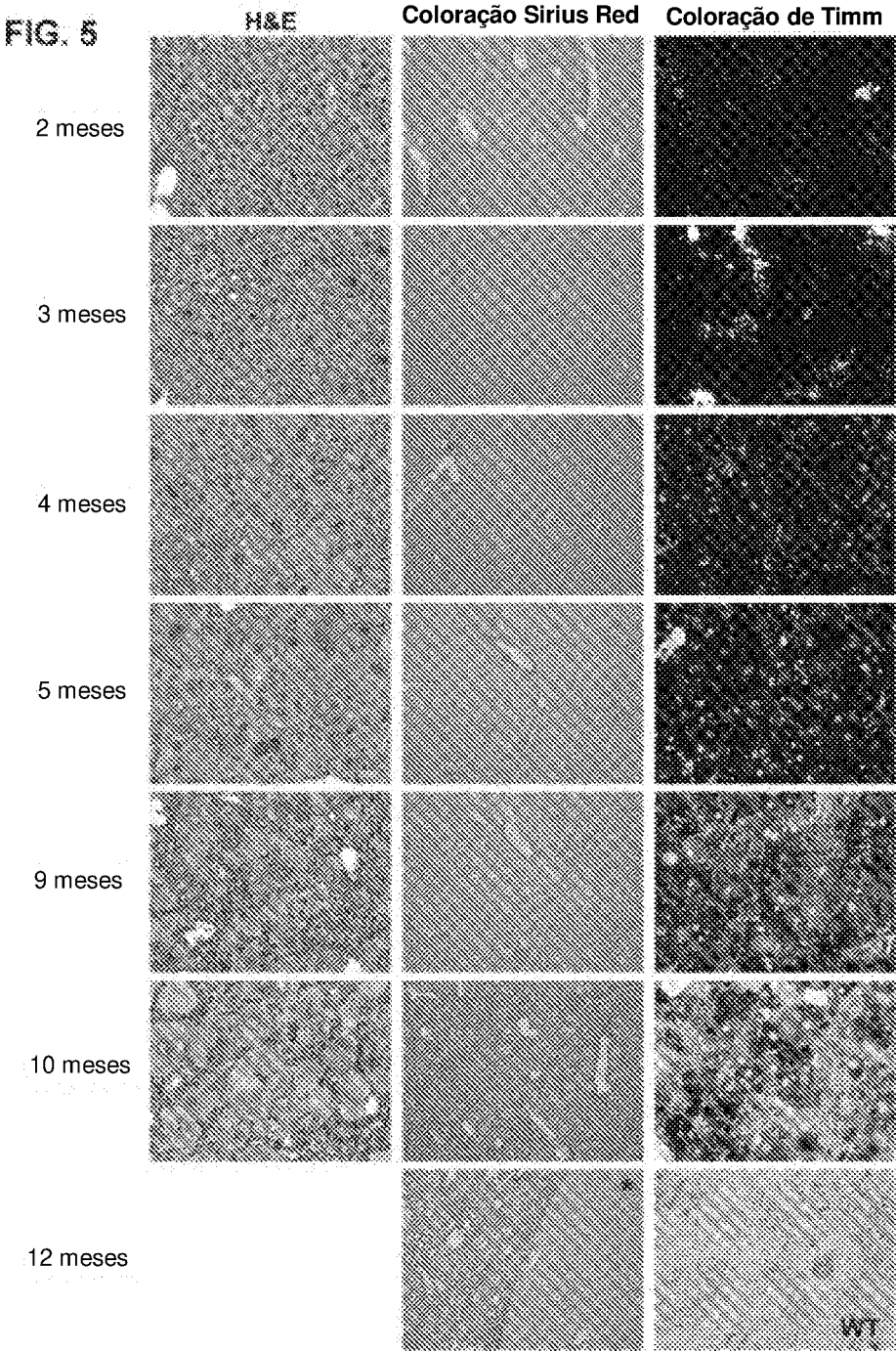


FIG. 6A

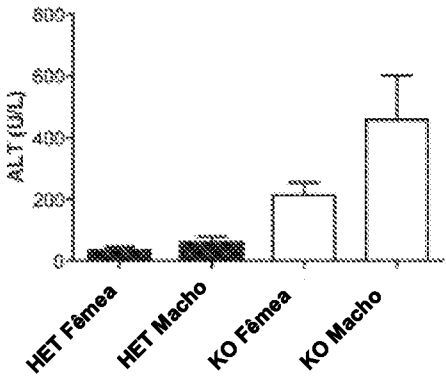


FIG. 6B

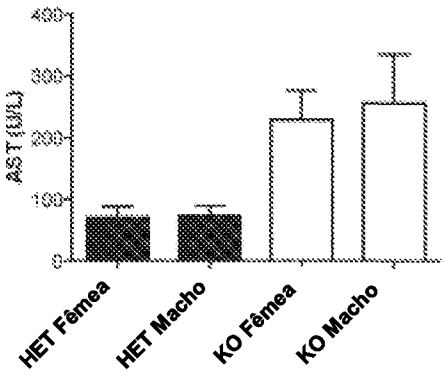


FIG. 6C

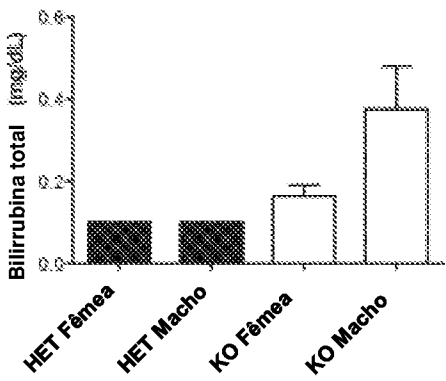


FIG. 7

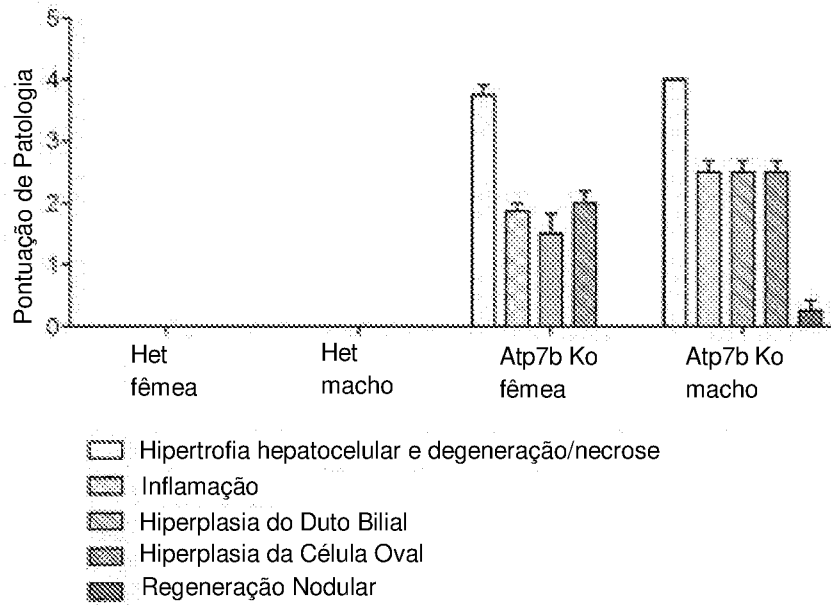


FIG. 8A

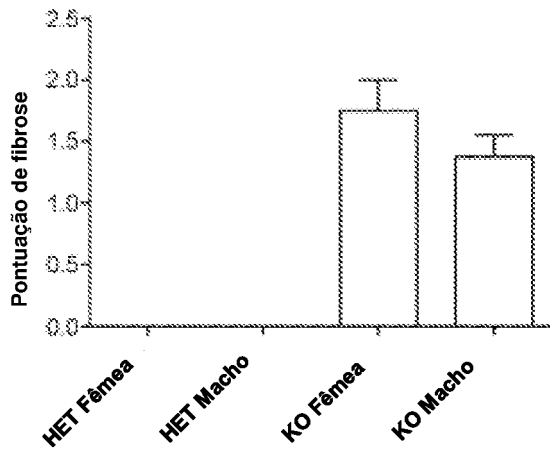
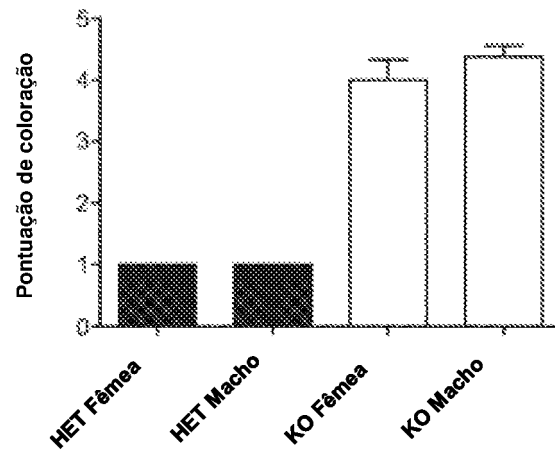


FIG. 8B



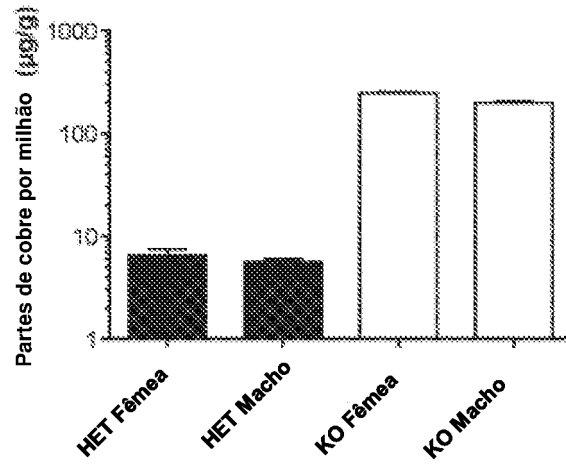
**FIG. 9**

FIG. 10A

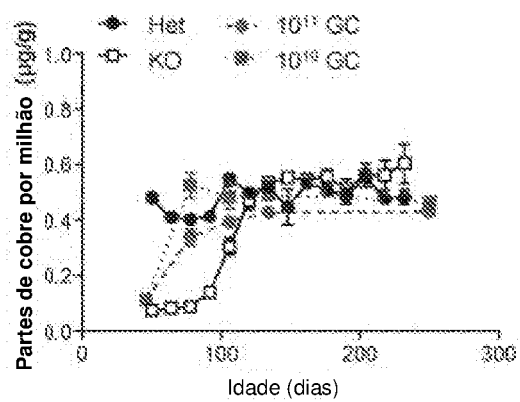


FIG. 10B

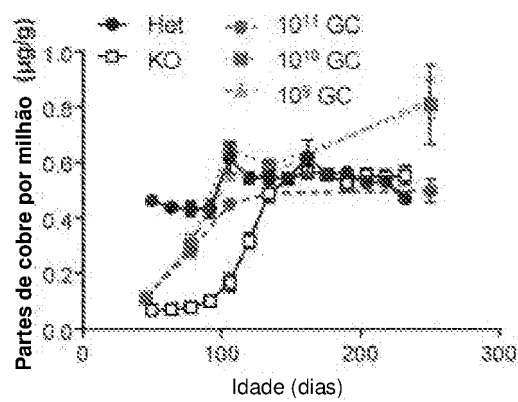
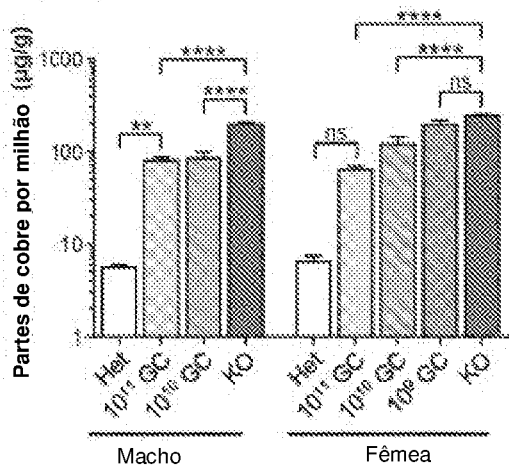


FIG. 10C



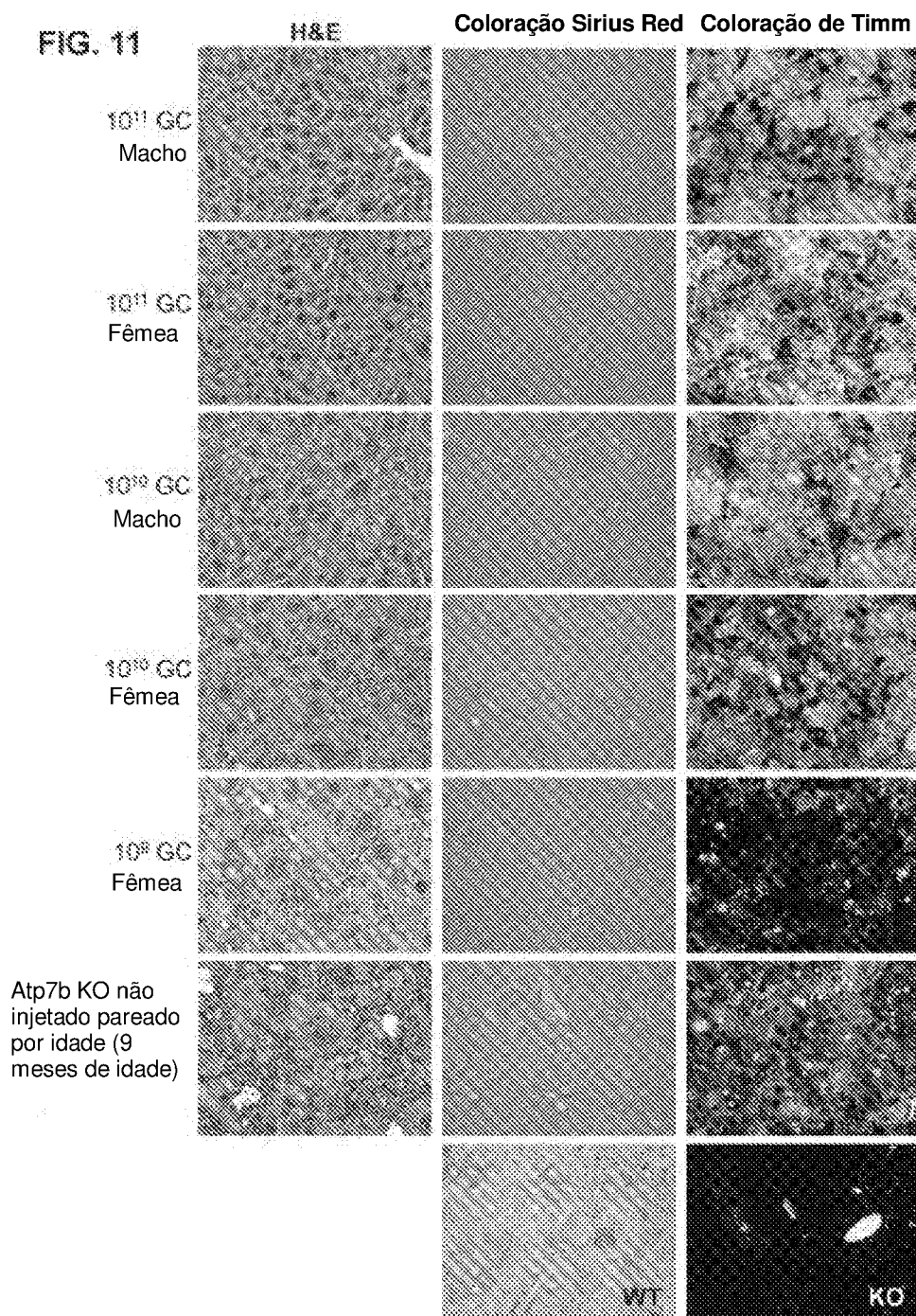


FIG. 12A

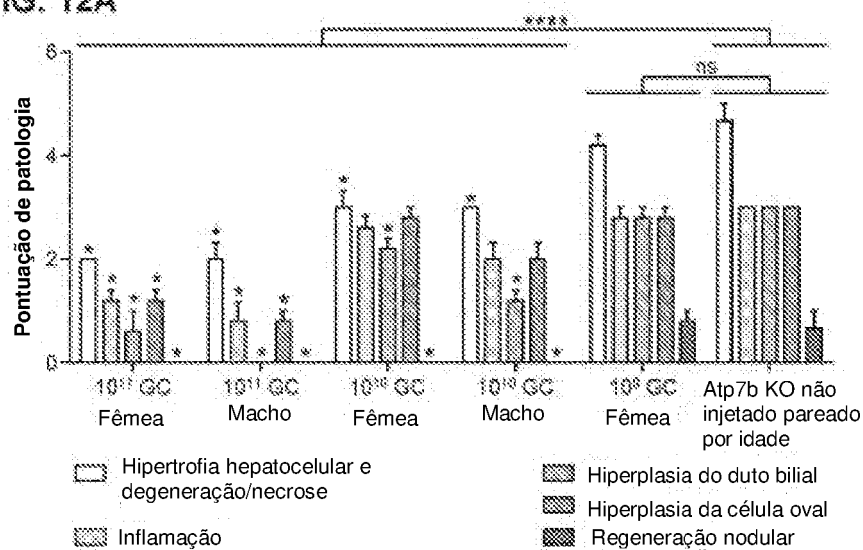


FIG. 12B

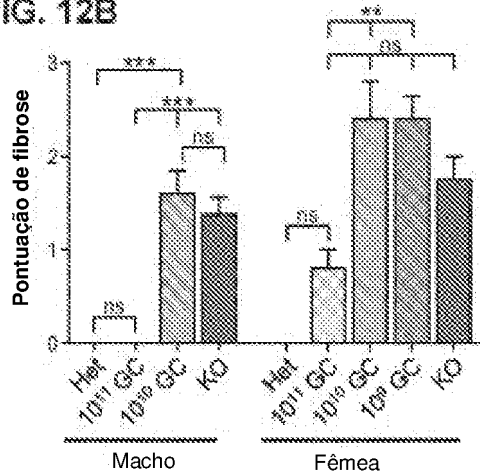


FIG. 12C

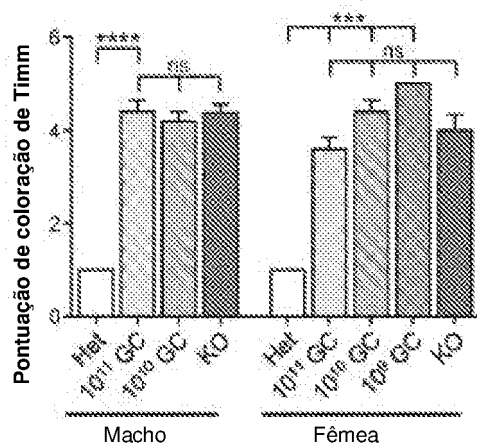


FIG. 13A

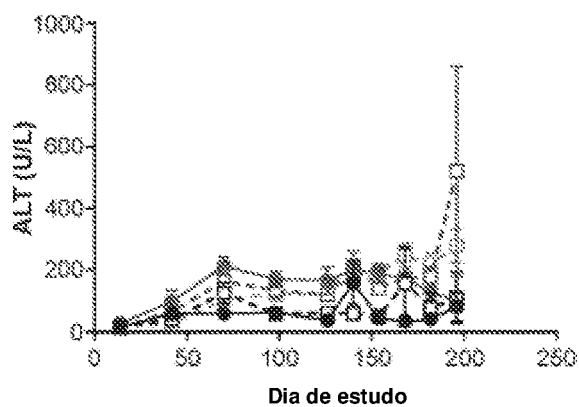


FIG. 13B

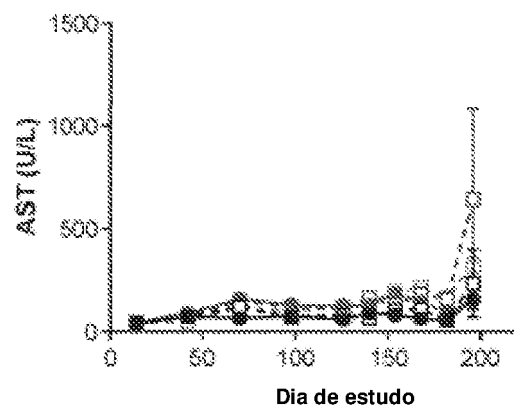
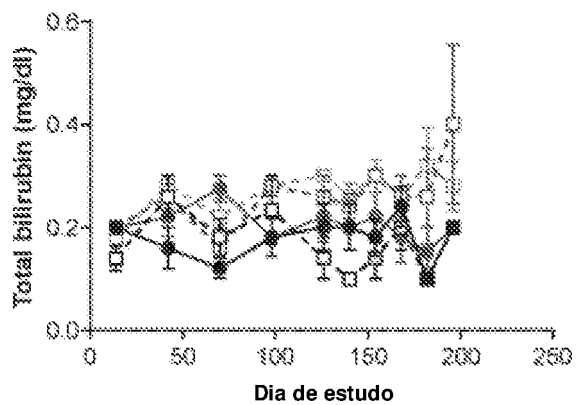


FIG. 13C



- $10^{11}$  GC/camundongo macho
- $10^{11}$  GC/camundongo fêmea
- ◆  $10^{10}$  GC/camundongo macho
- ◇  $10^{10}$  GC/camundongo fêmea
- $10^8$  GC/camundongo fêmea

FIG. 14

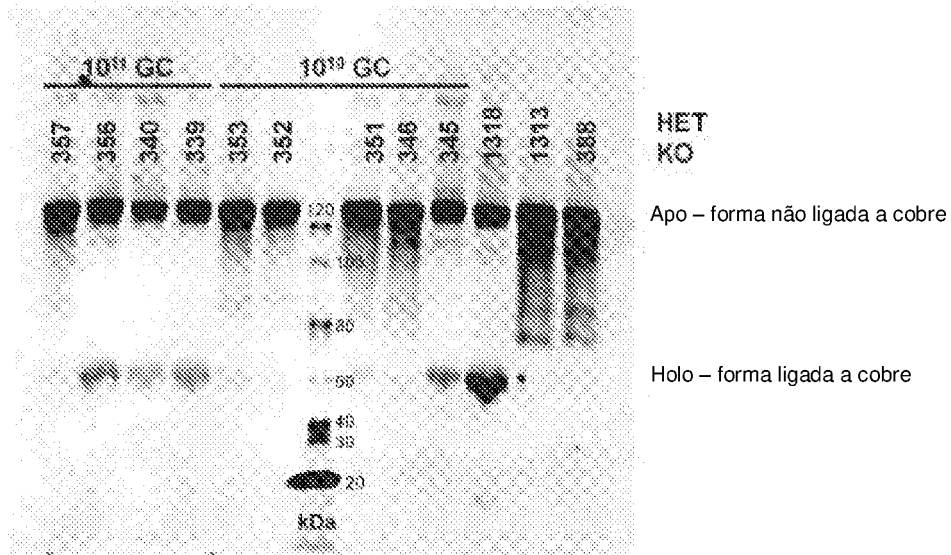


FIG. 15A

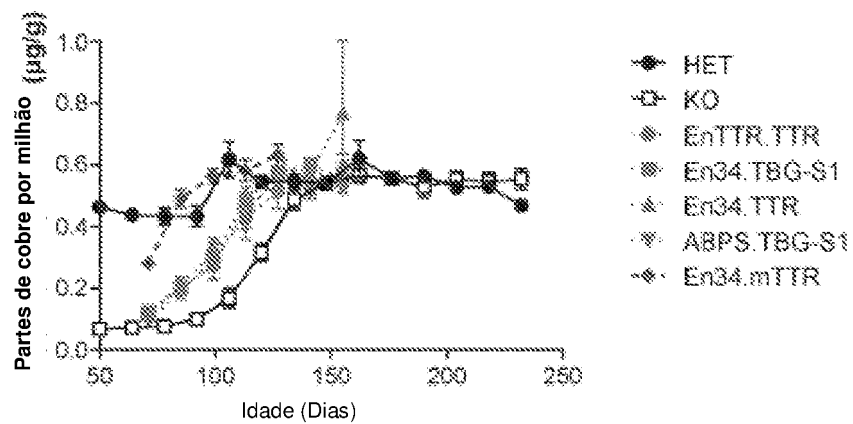


FIG. 15B

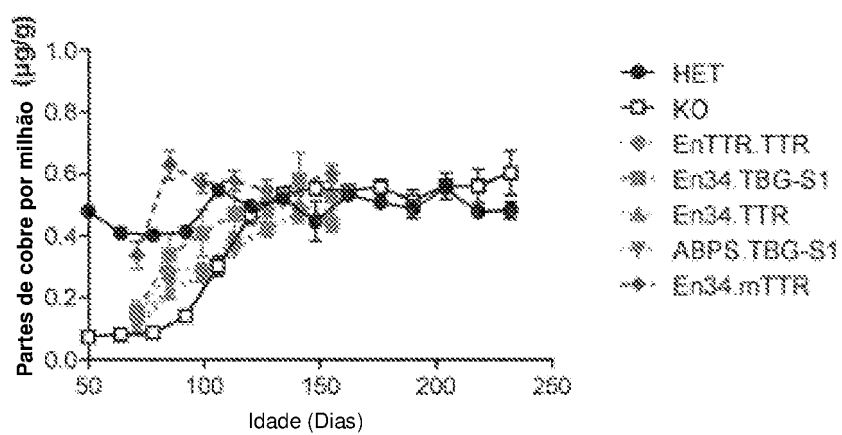


FIG. 16A

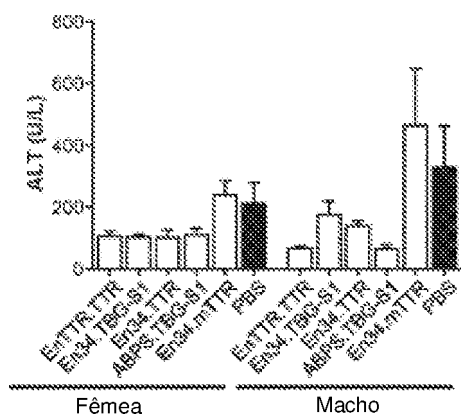


FIG. 16B

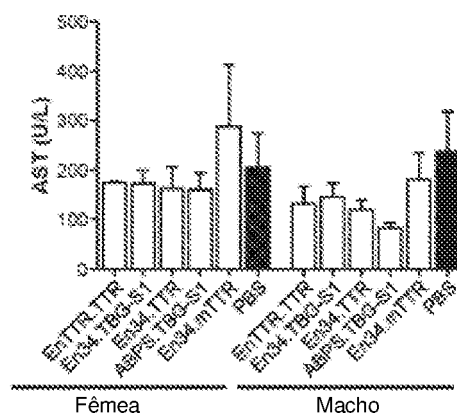


FIG. 16C

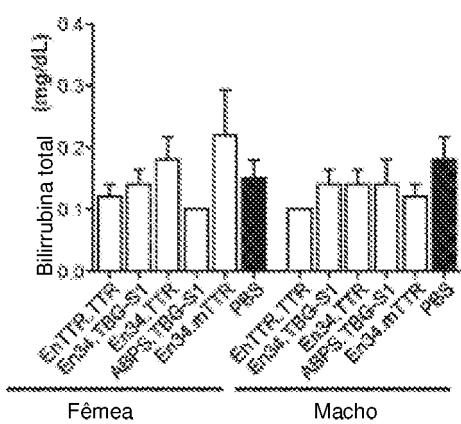


FIG. 17

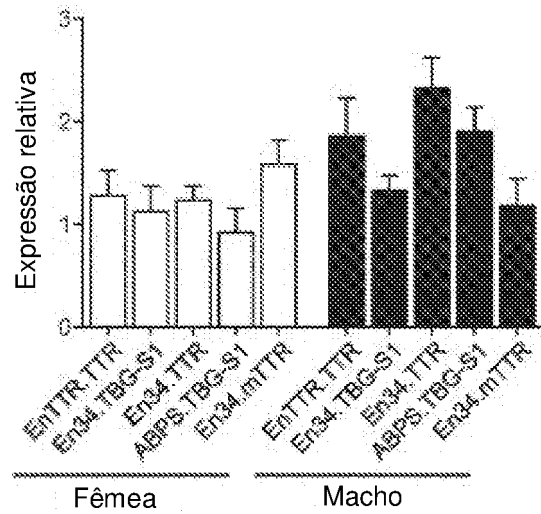


FIG. 18

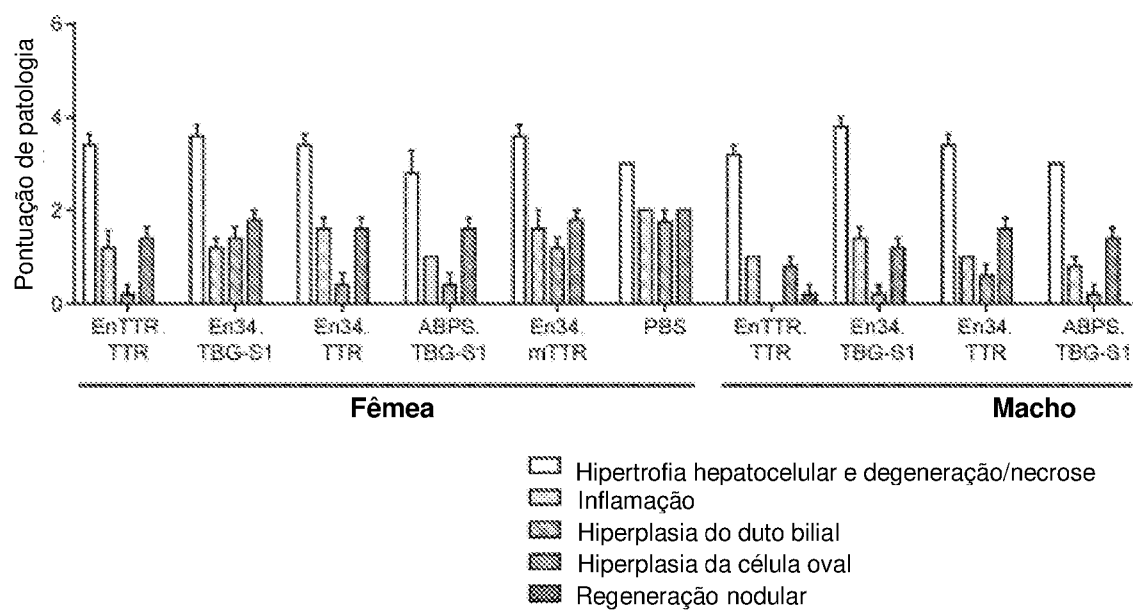


FIG. 19A

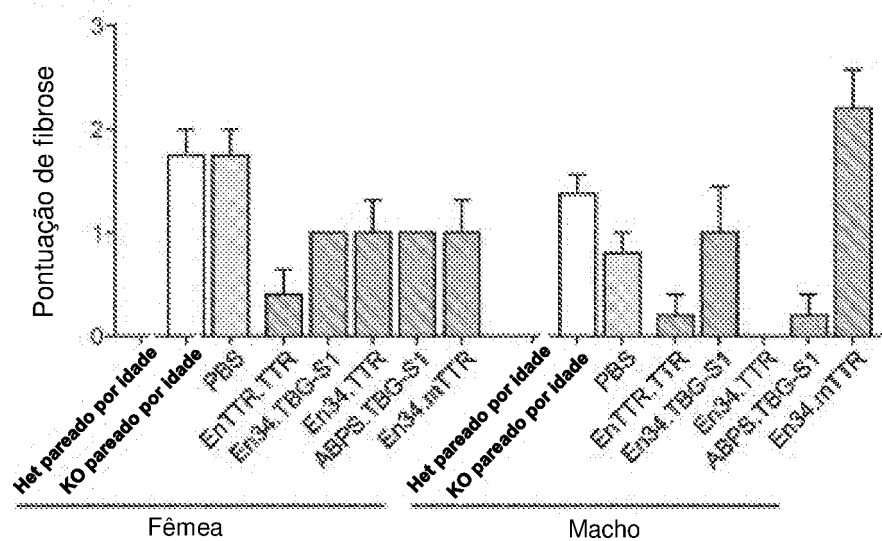


FIG. 19B

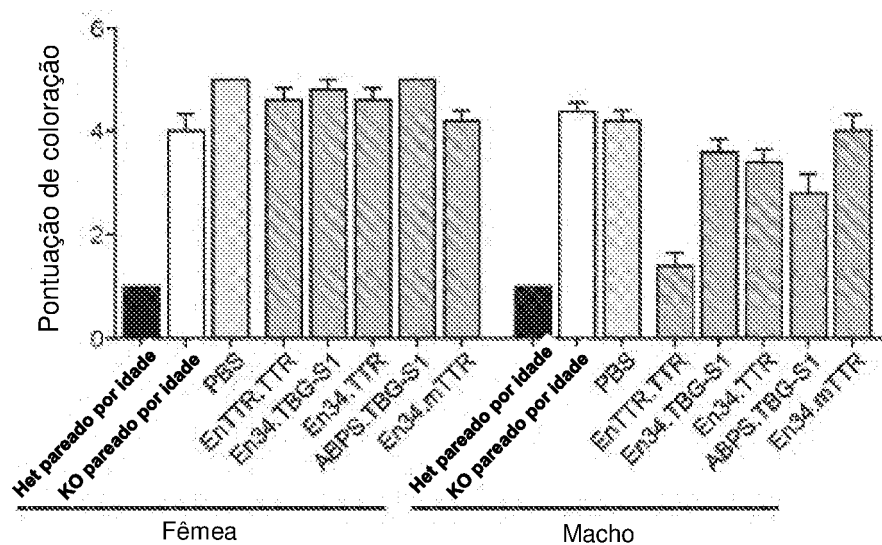


FIG. 20

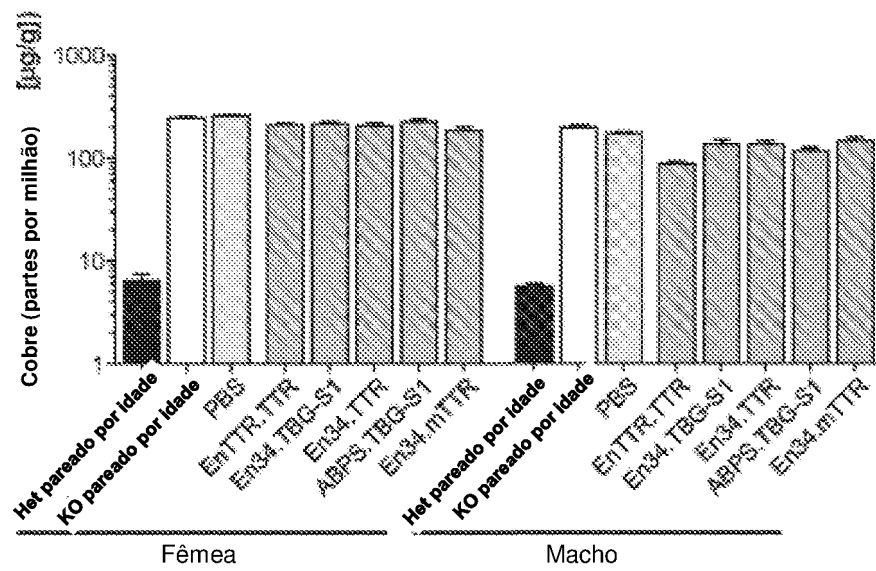


FIG. 21

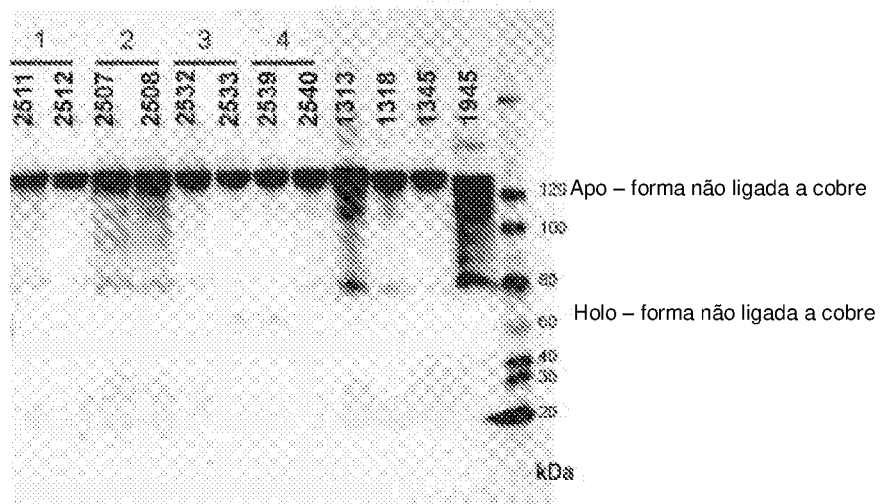


FIG. 22

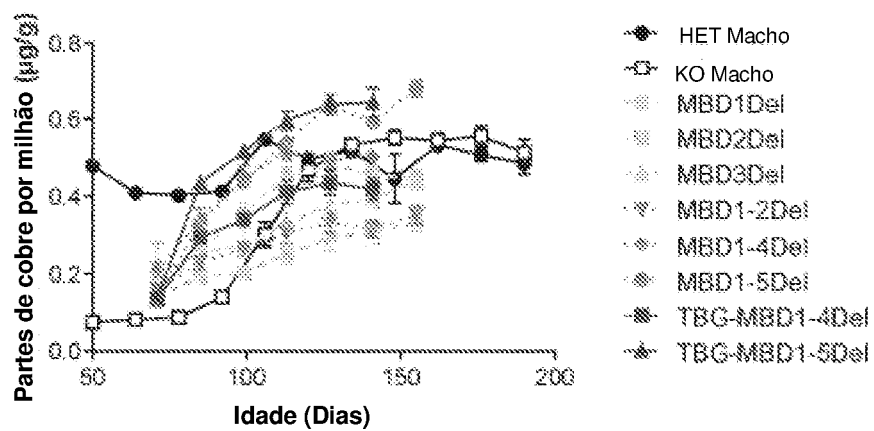


FIG. 23A

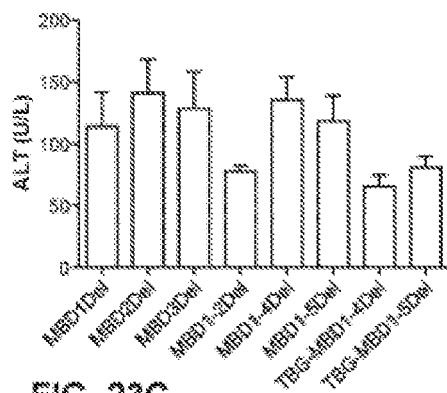


FIG. 23B

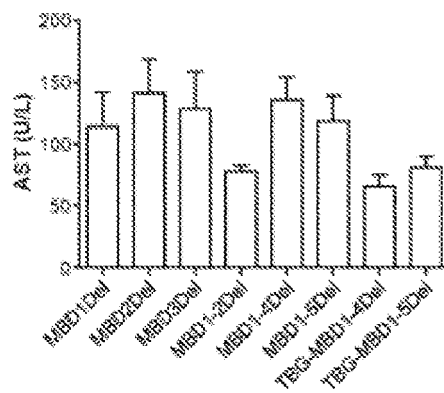


FIG. 23C

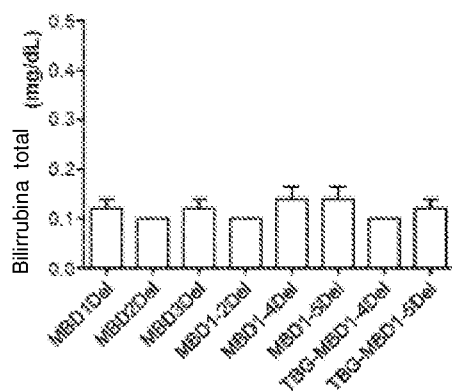


FIG. 24

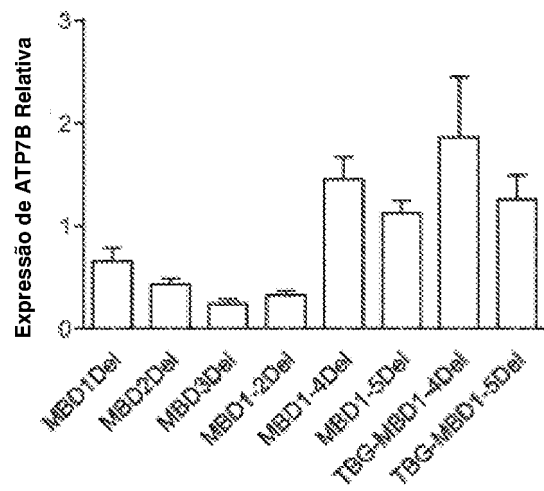


FIG. 25

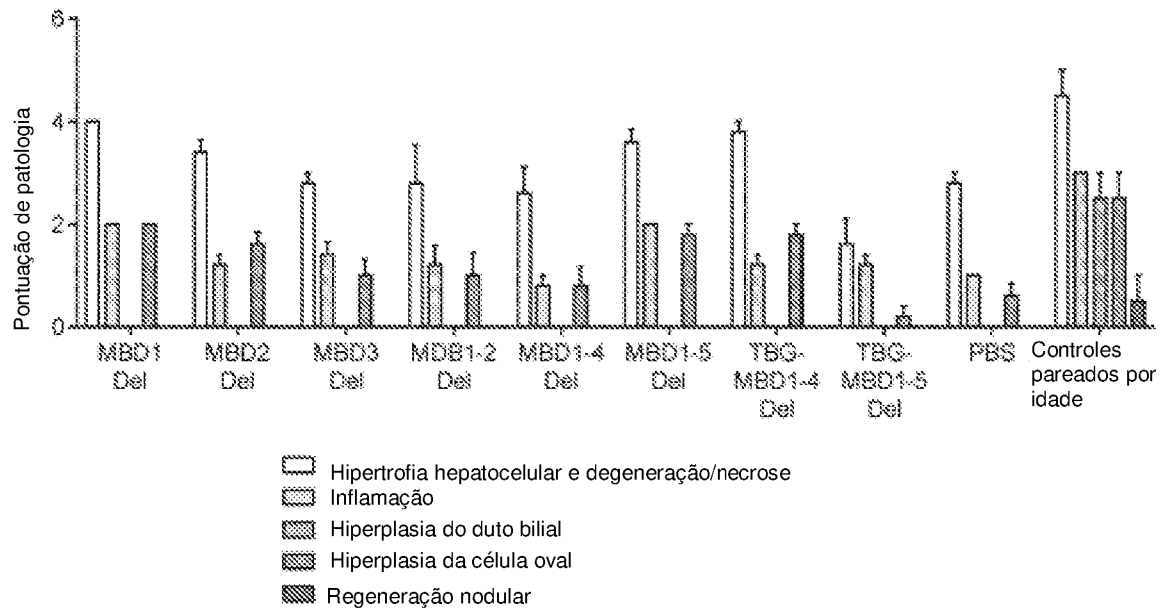


FIG. 26A

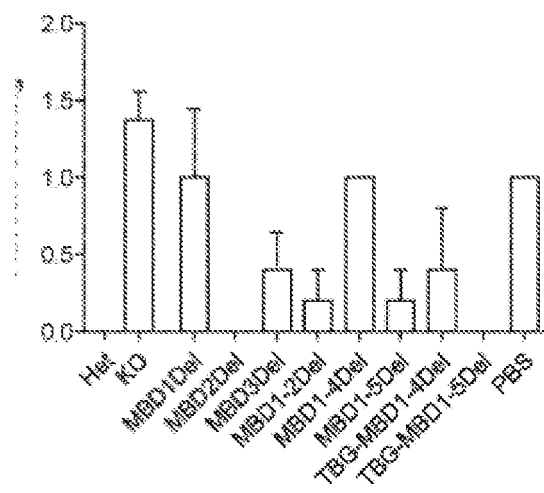


FIG. 26B

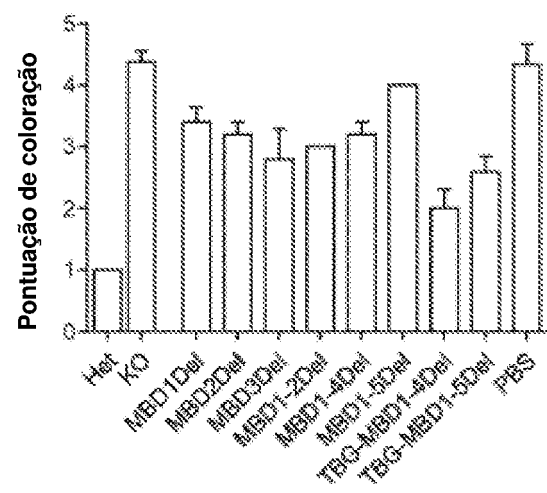
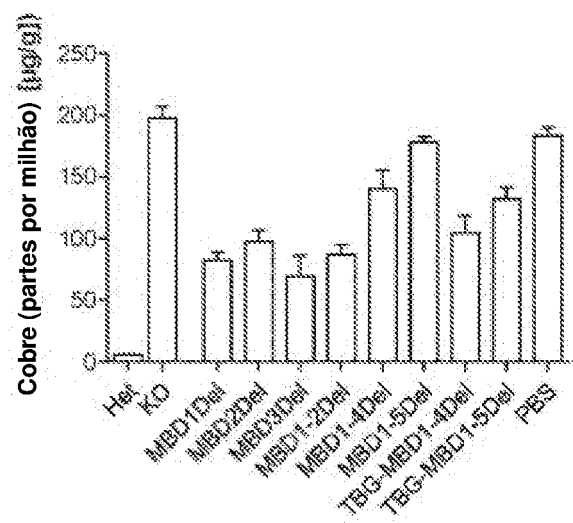


FIG. 27



## RESUMO

**"TERAPIA GÊNICA PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE WILSON".**

Composições e regimes úteis no tratamento da Doença de Wilson são fornecidos. As composições incluem vírus adenoassociados recombinantes (rAAV) com um potenciador de transtirretina e promotor da expressão dirigida de uma hidroxilase de fenilalanina humana ATP7B.

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 - 07-2019 -
- Data de Geração do Código: 22/07/2019
- Hora de Geração do Código: 10:49:52
- Código de Controle:
  - Campo 1: 51707D47EE3AE62C
  - Campo 2: 6EE8F5AF808F2518