



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

(21) BR 112021006060-0 A2



(22) Data do Depósito: 30/09/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 20/07/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES ÚTEIS PARA TRATAMENTO DE GANGLIOSIDOSE GM1

(51) Int. Cl.: A61K 48/00; C12N 15/86; C12N 9/38.

(30) Prioridade Unionista: 01/10/2018 US 62/739,811; 17/04/2019 US 62/835,178.

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

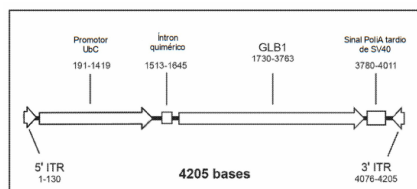
(72) Inventor(es): JAMES M. WILSON; CHRISTIAN HINDERER; NATHAN KATZ.

(86) Pedido PCT: PCT US2019053797 de 30/09/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/072354 de 09/04/2020

(85) Data da Fase Nacional: 29/03/2021

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES ÚTEIS PARA TRATAMENTO DE GANGLIOSIDOSE GM1. Um vírus adenoassociado recombinante (rAAV) compreendendo um capsídeo AAVhu68 e um genoma de vetor compreendendo um gene lisossomal de beta-galactosidase (por exemplo, gene de galactosidase beta 1, GBL1) é fornecido (isto é, rAAVhu68.GBL1). Também é fornecida uma composição contendo uma quantidade eficaz de rAAVhu68.GBL1 para melhorar os sintomas de gangliosidose GM1, incluindo, por exemplo, aumento da média de vida, diminuição da necessidade de tubo de alimentação, redução na incidência e frequência de convulsões, redução na progressão para declínio neurocognitivo e/ou melhora no desenvolvimento neurocognitivo.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**COMPOSIÇÕES ÚTEIS PARA TRATAMENTO DA GANGLIOSIDOSE GM1**”.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA DE MATERIAL APRESENTADO EM FORMA ELETRÔNICA

[001] O Requerente por meio deste incorpora por referência o material de Listagem de Sequências depositado em forma eletrônica junto com este. Este arquivo é denominado “18-8537PCT_SequenceListing_ST25.txt”, datado de 29 de agosto de 2019 e tem 144.703 bytes.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] A gangliosidose GM1, daqui em diante referida como GM1, é uma doença recessiva de armazenamento lisossomal causada por mutações no gene *GLB1* que codifica a beta galactosidase do ácido lisossomal (β -gal), uma enzima que catalisa a primeira etapa na degradação do gangliosídeo GM1 e do sulfato de queratano. (Brunetti-Pierri and Scaglia, 2008, GM1 gangliosidosis: Review of clinical, molecular, and therapeutic aspects, *Molecular Genetics and Metabolism*, 94: 391-96). O gene *GLB1* está localizado no cromossomo 3 e leva a dois mRNAs com splicing alternativo, um transcrito de 2,5 kb que codifica a enzima lisossomal β -gal e um transcrito de 2,0 kb que codifica a proteína de ligação à elastina (EBP) (Oshima *et al.* 1988, Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human β -galactosidase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 157: 238-44; Morreau *et al.* 1989, Alternative splicing of beta-galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a beta-galactosidase-related protein, *Journal of Biological Chemistry*, 264: 20655-63). β -gal é sintetizado como um precursor de 85 kDa que é glicosilado pós-tradução para uma forma de 88 kDa e processado na enzima lisossomal de 64 kDa madura (D'Azzo *et al.* 1982, Molecular defect in combined beta-galactosidase and neuraminidase deficiency in man, *Proceedings of the National Aca-*

demy of Sciences, 79: 4535-39). Nos lisossomas, a enzima é complexada com a proteína protetora catepsina A (PPCA) e neuraminidase hidrolases.

[003] Em pacientes portadores de alelos de *GLB1* que produzem pouco ou nenhum β -gal residual, o gangliosídeo GM1 se acumula nos neurônios por todo o cérebro, resultando em uma doença neurodegenerativa rapidamente progressiva (Brunetti-Pierri and Scaglia 2008). Embora os mecanismos moleculares que levam à patogênese da doença ainda não sejam bem compreendidos, as hipóteses incluem morte celular neuronal e desmielinização acompanhada por astrogliose e microgliose em áreas de vacuolização neuronal grave, apoptose neuronal (Tessitore *et al.* 2004, GM1-Ganglioside-Mediated Activation of the Unfolded Protein Response Causes Neuronal Death in a Neurodegenerative Gangliosidosis, *Molecular Cell*, 15: 753-66), transporte axoplasmático anormal resultando em deficiência de mielina (van der Voorn *et al.* 2004, The leukoencephalopathy of infantile GM1 gangliosidosis: oligodendrocytic loss and axonal dysfunction, *Acta Neuropathologica*, 107: 539-45), interações neuronal-oligodendroglial perturbadas (Folkerth 1999, Abnormalities of Developing White Matter in Lysosomal Storage Diseases, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58: 887-902; Kaye *et al.* 1992, Dysmyelinogenesis in animal model of GM1 gangliosidosis', *Pediatric Neurology*, 8: 255-61), e respostas inflamatórias (Jeyakumar *et al.* 2003, Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis, *Brain*, 126: 974-87).

[004] Atualmente não há terapias modificadoras da doença para GM1. Cuidados de suporte e tratamentos sintomáticos, incluindo colocação de tubo de alimentação, terapia respiratória e medicamentos antiepiléticos são abordagens terapêuticas atuais (Jarnes Utz *et al.* 2017,

Infantile gangliosidoses: Mapping a timeline of clinical changes, *Molecular Genetics and Metabolism*, 121: 170-79). A terapia de redução de substrato (SRT) com miglustato, um inibidor da glicosilceramida sintase, foi avaliada em pacientes GM1 e GM2. Embora o miglustato seja geralmente bem tolerado, ele não resultou em melhora acentuada no controle dos sintomas ou na progressão da doença e alguns pacientes apresentam efeitos colaterais gastrointestinais limitantes da dose (Shapiro *et al.*, 2009, Regier *et al.*, 2016b). Quando usado em combinação com uma dieta cetogênica, o miglustato demonstrou ser bem tolerado e aumentar a sobrevida em alguns pacientes (Jarnes Utz *et al.*, 2017). No entanto, deve-se notar que não foram realizados estudos controlados randomizados com miglustato e o miglustato não foi aprovado para o tratamento da gangliosidose GM1. A experiência com o transplante de células-tronco hematopoiéticas (HSCT) com medula óssea ou sangue do cordão umbilical nesta doença é limitada. O transplante de medula óssea realizado em um paciente com GM1 tipo 2 resultou na normalização dos níveis de β -galactosidase de células brancas em um paciente com gangliosidose GM1 de início juvenil pré-sintomático, não melhorou o resultado clínico em longo prazo (Shield *et al.*, 2005, Bone marrow transplantation correcting β -galactosidase activity does not influence neurological outcome in juvenile GM1-gangliosidosis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 28 (5): 797-798.). O lento tempo para resultado do HSCT o torna inadequado para a doença GM1 tipo 1 rapidamente progressiva (Peters and Steward, 2003, Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone Marrow Transplantation*. 31: 229.). O vírus adenoassociado (AAV), um membro da família Parvovírus, é um pequeno vírus icosaédrico não envelopado com genomas de DNA linear de fita simples (ssDNA) de cerca de 4,7 quilobases (kb) de comprimento. O genoma tipo selvagem compreende repetições terminais invertidas (ITRs) em

ambas as extremidades da fita de DNA e duas estruturas de leitura aberta (ORFs): *rep* e *cap*. *Rep* é composto por quatro genes sobrepostos que codificam proteínas rep necessárias para o ciclo de vida de AAV, e *cap* contém sequências de nucleotídeos sobrepostas de proteínas do capsídeo: VP1, VP2 e VP3, que se autoagrupam para formar um capsídeo de uma simetria icosaédrica.

[005] AAV é atribuído ao gênero, *Dependovirus*, porque o vírus foi descoberto como um contaminante em estoques de adenovírus purificados. O ciclo de vida do AAV inclui uma fase latente na qual os genomas do AAV, após a infecção, são especificamente integrados nos cromossomos do hospedeiro e uma fase infecciosa na qual, após a infecção por adenovírus ou vírus herpes simplex, os genomas integrados são subsequentemente resgatados, replicados e empacotados em vírus infecciosos. As propriedades de não patogenicidade, ampla gama de infecciosidade do hospedeiro, incluindo células que não se dividem, e potencial integração cromossômica sítio-específica tornam o AAV uma ferramenta atraente para transferência de genes.

[006] O que é desejável são terapêuticas alternativas para o tratamento de condições associadas ao gene *GLB1* anormal.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007] Um vírus adenoassociado (AAV), terapêutico, recombinante (r), de replicação deficiente é útil para o tratamento e/ou redução dos sintomas associados à gangliosidose GM1 em pacientes humanos em necessidade do mesmo. O rAAV é desejavelmente defeituoso para replicação e carrega um genoma de vetor compreendendo um gene *GLB1* que codifica (h) β -galactosidase humana sob o controle de sequências regulatórias que direcionam sua expressão em células humanas direcionadas, que podem ser denominadas como rAAV.GLB1 como aqui utilizado. Em certas modalidades, o rAAV compreende um capsídeo AA-

Vhu68. Este é rAAV é aqui denominado, rAAVhu68.GLB1, mas em certos casos os termos rAAVhu68.Vetor GLB1, rAAVhu68.hGLB1, vetor rAAVhu68.hGLB1, AAVhu68.GLB1 ou AAVhu68.Os vetores GLB1 são usados indiferentemente para fazer referência ao mesmo construto. Em certas modalidades, o genoma do vetor é inteiramente exógeno ao capsídeo AAVhu68, uma vez que não contém sequências genômicas AAVhu68. Em certas modalidades, um capsídeo diferente do capsídeo AAVhu68 pode ser utilizado. Em uma outra modalidade, o capsídeo de AAV é adequado para entregar um genoma de vetor no sistema nervoso central (CNS, por exemplo, neurônios, células gliais, células epiteliais ou outras células no CNS). Além disso, são fornecidos métodos, vetores (vetores virais ou não virais, como plasmídeos) e células para uso na produção (por exemplo, geração e/ou purificação) do rAAV.

[008] Em certas modalidades, o gene *GLB1* codifica um peptídeo sinal e a sequência de aminoácidos GLB1 madura dos aminoácidos 24 a 677 da SEQ ID NO: 4 ou um fragmento funcional do mesmo. Em certas modalidades, o peptídeo sinal GLB1 humano nativo é usado, *por exemplo*, a sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 23 de SEQ ID NO: 4.

[009] Em certas modalidades, o gene *GLB1* tem uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8, ou uma sequência pelo menos 95% a 99,9% idêntica para SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8. Em uma outra modalidade, a sequência de ácido nucleico de *GLB1* codifica os aminoácidos 24 a 677 da SEQ ID NO: 4 ou um fragmento funcional dos mesmos. Em outra modalidade, a sequência de ácido nucleico *GLB1* codifica uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 ou um fragmento funcional dos mesmos.

[0010] Em certas modalidades, as sequências regulatórias compreendem um promotor da ubiquitina C humana (UbC).

[0011] Em certas modalidades, o genoma do vetor tem uma sequência selecionada de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 ou SEQ ID NO: 15.

[0012] Em certas modalidades, é fornecida uma composição farmacêutica aquosa que compreende um tampão de formulação e o rAAV.GLB1 (por exemplo, rAAVhu68.GLB1). Em certas modalidades, o tampão de formulação compreende: um líquido cefalorraquidiano artificial compreendendo solução salina tamponada e um ou mais dentre sódio, cálcio, magnésio, potássio ou suas misturas; e um tensoativo. Em certas modalidades, o tensoativo compreende cerca de 0,0005% a cerca de 0,001% da suspensão. Em uma outra modalidade, a porcentagem (%) é calculada com base na razão de peso (p) (*isto é*, p/p). Em certas modalidades, a composição está a um pH de 7,2 a 7,8. Em certas modalidades, a composição está a um pH de 6,2 a 7,7. Em certas modalidades, a composição está a um pH de 6,0 a 7,5. Em uma modalidade, o pH é de cerca de 7.

[0013] Em certas modalidades, um método de tratamento de pacientes com gangliosidose GM1 compreende a administração de um rAAV.GLB1 (por exemplo, rAAVhu68.GLB1) conforme descrito aqui, ou uma composição contendo o mesmo conforme fornecido. O método envolve a entrega do rAAV.GLB1 a um paciente humano com gangliosidose GM1. Em certas modalidades, o rAAV.GLB1 ou composição é administrado por meio de uma injeção sub-occipital guiada por CT na cisterna magna. Em certas modalidades, o método envolve a entrega de rAAV.GLB1 ou composição a um paciente humano em uma dose única.

[0014] Em certas modalidades, um rAAV.GLB1 (como, rAAVhu68.GLB1) ou uma composição compreendendo o mesmo é administrável a um paciente por meio de uma injeção intracisterna magna (ICM). Em certas modalidades, um rAAV.GLB1 (por exemplo, rAA-

Vhu68.GLB1) ou uma composição compreendendo o mesmo é fornecida, a qual pode ser administrada a um paciente com gangliosidose infantil que tem 18 meses de idade ou menos. Um rAAV.GLB1 (por exemplo, rAAVhu68.GLB1) ou uma composição compreendendo o mesmo é fornecida, a qual pode ser administrada a um paciente em necessidade para melhorar os sintomas de gangliosidose GM1, por exemplo, sintomas neurológicos de GM1. Em certas modalidades, a melhora da gangliosidose GM1 inclui aumento da expectativa de vida média, diminuição da necessidade de tubo de alimentação, redução na incidência e frequência de convulsões, redução na progressão em direção ao declínio neurocognitivo e/ou melhora no desenvolvimento neurocognitivo.

[0015] Estes e outros aspectos da invenção estão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0016] A FIG 1A fornece um esquema de um genoma de vetor AAV mostrando 5' ITR, promotor de ubiquitina C humana (UbC), íntron químico, gene *GLB1* que codifica β -galactosidase humana (β -gal), sinal de SV40 poliA tardio e 3' ITR (ou seja, "AAVhu68.Ubc.hGLB1co.SV40").

[0017] A FIG 1B fornece um esquema de um cis-plasmídeo contendo um genoma de vetor AAV transportado pelo plasmídeo *cis*, pAAV.UbC.hGLB1co.SV40.KanR. GLB1, β -galactosidase; ITR, repetições terminais invertidas; KanR, resistência à canamicina; Ori, origem de replicação; PolyA, poliadenilação; e UbC, ubiquitina C.

[0018] A FIG 1C fornece um esquema de um trans-plasmídeo compreendendo uma sequência de codificação para uma replicase AAV2 de comprimento total (AAV2 Rep) que codifica quatro proteínas e o gene de capsídeo AAVhu68 VP1 (que codifica as proteínas VP1, VP2 e VP3).

AAV2, vírus adenoassociado sorotipo 2; AAVhu68, vírus adenoassociado sorotipo hu68; Cap, capsídeo; KanR, resistência à canamicina; Ori, origem de replicação; e Rep, replicase.

[0019] As FIGs 2A e 2B ilustram a atividade β -gal no cérebro e líquido cefalorraquidiano (CSF), respectivamente, de camundongos de tipo selvagem tratados com rAAVhu68.GLB1 que expressa β -gal humana usando diferentes promotores. Os camundongos do tipo selvagem foram tratados com uma única injeção ICV de rAAVhu68.GLB1 que expressa GLB1 humano de um promotor CB7, EF1a ou UbC (n = 10 por grupo). Camundongos de tipo selvagem não tratados (n = 5) serviram como controles. O cérebro (córtex frontal) e o CSF foram coletados 14 dias após rAAVhu68.A administração de GLB1 e a atividade β -gal foram medidas usando um substrato fluorogênico. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

[0020] As FIGs 3A - 3E ilustram a atividade β -gal do soro e de órgãos periféricos. A atividade β -gal foi medida em amostras de soro (FIG 3A), bem como de pulmão (FIG 3B), fígado (FIG 3C), coração (FIG 3D) e baço (FIG 3E), respectivamente, usando um substrato fluorogênico. PBS: solução salina tamponada com fosfato (veículo), AAV: vírus adenoassociado (AAVhu68.UbC.hGLB1). * p <0,05, ** p <0,01 Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. NS: não significativo.

[0021] As FIGs 4A - 4B ilustram a atividade β -gal no cérebro e CSF. O cérebro (córtex frontal) e o CSF foram coletados na necropsia e a atividade β -gal medida usando um substrato fluorogênico. PBS: solução salina tamponada com fosfato (veículo), AAV: vírus adenoassociado (AAVhu68.UbC.hGLB1). * p <0,05, ** p <0,01 Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. NS: não significativo.

[0022] A FIG 5 mostra a redução da atividade da hexosaminidase (HEX) em cérebros de rAAVhu68.Camundongos GLB1^{-/-} tratados com GLB1. O cérebro (córtex frontal) foi coletado na necropsia e a atividade

HEX medida usando um substrato fluorogênico. PBS: solução salina tamponada com fosfato (veículo), AAV: vírus adenoassociado (AAVhu68.UbC.hGLB1). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. NS: não significativo.

[0023] A FIG 6 mostra a correlação entre a atividade β -gal e os anticorpos anti- β -gal. A atividade β -gal e os anticorpos anti- β -gal séricos foram medidos em amostras de soro coletadas de camundongos tratados com AAV no momento da necropsia. Cada ponto representa um animal individual.

[0024] As FIGs 7A - 7G mostram a correção de anormalidades da marcha em camundongos GLB1^{-/-} tratados com AAV. As FIGs 7A e 7B mostram que camundongos GLB1^{-/-} não tratados ($n = 12$) e GLB1^{+/-} de controle ($n = 22$) com uma idade média de 5 meses foram avaliados usando o sistema CatWalk em dois dias consecutivos. A velocidade média de caminhada (FIG 7A) e o comprimento das impressões das patas traseiras (FIG 7B) foram quantificados para cada animal em pelo menos 3 tentativas. ** $p < 0,01$ Teste de Mann Whitney. As FIGs 7C e 7D mostram que os camundongos GLB1^{+/-} ($n = 15$) ou GLB1^{-/-} ($n = 15$) de quatro meses de idade tratados com veículo e os camundongos GLB1^{-/-} tratados com AAV ($n = 14$) foram avaliados usando o sistema CatWalk. A velocidade média de caminhada (FIG 7C) e o comprimento das pegadas traseiras (FIG 7D) foram quantificados para cada animal em pelo menos 3 tentativas no segundo dia de teste. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. NS: não significativo. As FIGs 7E-G mostram impressões da pata traseira representativas para os camundongos GLB1^{-/-} tratados com AAV (FIG 7G) e GLB1^{+/-} tratados com veículo (FIG 7E) e GLB1^{-/-} (FIG 7F).

[0025] As FIGs 8A e 8B mostram a correlação entre a velocidade de caminhada e os parâmetros de marcha. Controles de GLB1^{+/-} ($n =$

22) foram avaliados usando o sistema CatWalk em dois dias consecutivos. Parâmetros de marcha medidos em pelo menos três tentativas no segundo dia de teste foram registrados. A análise de correlação demonstrou uma forte correlação entre a velocidade de caminhada e os parâmetros da marcha, como o comprimento da passada (Spearman $r = 0,7432$, $p < 0,001$, FIG 8A). Ao contrário, o comprimento da impressão da pata traseira foi independente da velocidade (Spearman $r = -0,1239$, $p = 0,423$, FIG 8B).

[0026] As FIGs 9A - 9F fornecem atividade β -gal (FIG 9A), peso corporal (FIG 9B), pontuação de exame neurológico (pontuação de exame neurológico, FIG 9C), comprimento da impressão da pata traseira (FIG 9D) e tempo de balanço (FIG 9E) e comprimento da passada (FIG 9F) do membro posterior de camundongos GLB1^{-/-} que receberam uma de 4 doses de rAAVhu68.UbC.GLB1 (1.3×10^{11} GC, 4.4×10^{10} GC, $1,3 \times 10^{10}$ GC ou $4,4 \times 10^9$ GC) ou veículo por injeção ICV. Camundongos GLB1^{+/-} administrados com veículo (Het + Veículo servem como controle. Mais detalhes são fornecidos no Exemplo 4, Seção A.

[0027] As FIGs 10A - 10B fornecem um alinhamento que mostra a sequência de aminoácidos da proteína do capsídeo vp1 de AAVhu68 (SEQ ID NO: 2) (denominado hu.68.vp1 em alinhamento), com AAV9 (SEQ ID NO: 20), AAVhu31 (denominado hu.31 em alinhamento, SEQ ID NO: 21) e AAVhu32 (denominado hu.32 em alinhamento, SEQ ID NO: 22). Em comparação com AAV9, AAVhu31 e AAVhu32, duas mutações (A67E e A157V) foram consideradas críticas em AAVhu68 e circuladas na FIG.

[0028] As FIGs 11A - 11E fornecem um alinhamento da sequência de ácido nucleico que codifica a proteína do capsídeo vp1 de AAVhu68 (SEQ ID NO: 1), com AAV9 (SEQ ID NO: 23), AAVhu31 (SEQ ID NO: 24) e AAVhu32 (SEQ ID NO: 25).

[0029] A FIG 12A fornece um fluxograma ilustrativo do processo de

fabricação para a produção de rAAVhu68. Princípio ativo de GLB1. AEX, troca aniônica; CRL, Charles River Laboratories; ddPCR, reação em cadeia da polimerase digital de gotículas; DMEM, meio Eagle modificado de Dulbecco; DNA, ácido desoxirribonucleico; FFB, tampão de formulação final; GC, cópias do genoma; HEK293, células 293 de rim embrionário humano; ITFFB, tampão de formulação final intratecal; PEI, polietilenimina; Ph. Eur., European Pharmacopoeia; SDS-PAGE, eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio poliacrilamida; TFF, filtração de fluxo tangencial; USP, Farmacopeia dos Estados Unidos; WCB, banco de células de trabalho.

[0030] A FIG 12B fornece um fluxograma ilustrativo para o processo de fabricação para a produção de rAAVhu68. Medicamento de GLB1. Ad5, adenovírus sorotipo 5; AUC, ultracentrifugação analítica; BDS, princípio ativo a granel; BSA, albumina de soro bovino; CZ, Crystal Zenith; ddPCR, reação em cadeia da polimerase digital de gotículas; E1A, região inicial 1A (gene); ELISA, ensaio de imunoabsorção enzimática; FDP, medicamento final; GC, cópias do genoma; HEK293, células 293 de rim embrionário humano; ITFFB, tampão de formulação final intratecal; KanR, resistência à canamicina (gene); MS, espectrometria de massa; NGS, sequenciamento de última geração; Ph. Eur., European Pharmacopoeia; qPCR, reação em cadeia da polimerase quantitativa; SDS-PAGE, eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio poliacrilamida; TCID₅₀ 50% da dose infectante da cultura de tecidos; UPLC, cromatografia líquida de ultra desempenho; USP, United States Pharmacopoeia.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0031] Composições e métodos baseados em vírus adenoassociados (AAV) para o tratamento de gangliosidose GM1 (GM1) são fornecidos aqui. Uma quantidade eficaz de cópias do genoma (GC) de um AAV

recombinante (rAAV) possuindo um capsídeo de AAVhu68 e carregando um genoma de vetor que codifica a enzima β -galactosidase humana normal (GLB1) (rAAVhu68.GLB1) é administrada ao paciente. De-sejavelmente, este rAAVhu68.GLB1 é formulado com um tampão aquoso. Em certas modalidades, a suspensão é adequada para injeção intratecal. Em certas modalidades, rAAVhu68.GLB1 é AAVhu68.UbC.GLB1 (também denominado AAVhu68.UbC.hGLB1), em que o gene *GLB1* (ou seja, β -galactosidase (também denominado como enzima GLB1, β -gal ou galactosidase como aqui utilizado) que codifica a sequência) está sob o controle de sequências regulatórias que incluem um promotor derivado de humano ubiquitina C (UbC). Em certas modalidades, as composições são distribuídas por meio de uma injeção intracisterna magna (ICM).

[0032] As sequências de ácido nucleico que codificam o capsídeo de um vírus adenoassociado do clade F, que é aqui denominado AAVhu68, são utilizadas na produção do capsídeo AAVhu68 e AAV recombinante (rAAV) que transporta o genoma do vetor. Tal como aqui utilizado, o termo "genoma de vetor" se refere a uma molécula de ácido nucleico que é empacotada em um capsídeo viral, por exemplo, um capsídeo AAV, e é capaz de ser entregue a uma célula hospedeira ou uma célula em um paciente. Em certas modalidades, o genoma do vetor é uma cassete de expressão com sequências de repetição terminal invertida (ITR) necessárias para empacotar o genoma do vetor no capsídeo de AAV na extremidade 5' e 3' extrema e contendo entre elas um gene *GLB1* conforme descrito aqui operacionalmente ligado a sequências que direcionam a sua expressão. Detalhes adicionais relacionados a AAVhu68 são fornecidos em WO 2018/160582, incorporado por referência em sua totalidade neste documento, e nesta descrição detalhada. Os níveis de dose de rAAVhu68.GLB1 aqui descritos são bem adequados para entrega do genoma do vetor compreendendo o gene *GLB1*

para células dentro do sistema nervoso central (CNS), incluindo cérebro, hipocampo, córtex motor, cerebelo e neurônios motores. Estes rAAVhu68.O GLB1 pode ser usado para direcionar outras células dentro do CNS e certos outros tecidos e células fora do CNS. Alternativamente, o capsídeo de AAVhu68 pode ser substituído por outro capsídeo que também é adequado para entregar um genoma de vetor ao CNS, por exemplo, AAVcy02, AAV8, AAVrh43, AAV9, AAVrh08, AAVrh10, AAVbb01, AAVhu37, AAVrh20, AAVrh39, AAV1, AAVhu48, AAVcy05, AAVhu11, AAVhu32 ou AAVpi02.

I. GM1 e o gene GLB1 terapêutico

[0033] A gangliosidose GM1 (*ou seja*, GM1) pode ser classificada em três tipos com base no fenótipo clínico: (1) tipo 1 ou forma infantil com início desde o nascimento até 6 meses, rapidamente progressiva com hipotonia, degeneração grave do sistema nervoso central (CNS) e morte por 1 a 2 anos de idade; (2) tipo 2 infantil tardio ou juvenil com início de 7 meses a 3 anos, atraso no desenvolvimento motor e cognitivo e progressão mais lenta; e (3) adulto tipo 3 ou variante crônica com início tardio (3 a 30 anos), um distúrbio extrapiramidal progressivo devido à deposição local de glicosfingolípídeo no núcleo caudado (Brunetti-Pierri e Scaglia, 2008. GM1 gangliosidosis: Review of clinical, molecular, and therapeutic aspects, *Molecular Genetics and Metabolism*, 94: 391-96). Sujeitos com GM1 infantil com início dos sintomas antes dos 6 meses de idade exibem uniformemente progressão rápida e previsível de deficiência motora e cognitiva. A maioria dos pacientes morre nos primeiros anos de vida (sobrevida mediana de 46 meses, Jarnes Utz *et al.*, 2017). Apesar de uma fisiopatologia subjacente compartilhada, o fenótipo de GM1 adulto (Tipo 3) é variável e o curso da doença é notavelmente mais brando. A maioria dos pacientes com GM1 do tipo 3 desenvolve os primeiros sintomas neurológicos no final da infância, com pouca progressão subsequente na idade adulta.

[0034] A gravidade de cada tipo está inversamente relacionada à atividade residual do mutante β -gal (Brunetti-Pierri and Scaglia, 2008) que é codificado por um gene *GLB1*. Mais de 130 mutações de *GLB1* causadoras de doenças foram identificadas em humanos (Hofer *et al.*, 2010, Phenotype determining alleles in GM1 gangliosidosis patients bearing novel GLB1 mutations. *Clinical Genetics*. 78(3):236-246; e Caciotti *et al.*, 2011, M1 gangliosidosis and Morquio B disease: An update on genetic alterations and clinical findings. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1812 (7): 782-790.). Embora várias mutações de *GLB1* tenham sido genética e bioquimicamente analisadas e correlacionadas com o fenótipo clínico (Gururaj *et al.*, 2005, Magnetic Resonance Imaging Findings and Novel Mutations in GM1 Gangliosidosis. *Journal of Child Neurology*. 20(1):57-60; Caciotti *et al.*, 2011; e Sperb *et al.*, 2013, Genotypic and phenotypic characterization of Brazilian patients with GM1 gangliosidosis. *Gene*. 512 (1): 113-116), muitas mutações de *GLB1* permanecem não caracterizadas. Em termos gerais, o genótipo do paciente resulta em quantidades variáveis de atividade enzimática residual, mas, de modo geral, quanto maior a atividade enzimática residual, menos grave é o fenótipo (Ou *et al.*, 2018, SAAMP 2.0: An algorithm to predict genotype-phenotype correlation of lysosomal storage diseases. *Clinical Genetics*. 93 (5): 1008-1014.). O diagnóstico de GM1 é confirmado por ensaio bioquímico de β -gal e neuraminidase e/ou por análise molecular de *GLB1*. No entanto, existem limitações para o uso de correlações genótipo-fenótipo na previsão da apresentação clínica de um indivíduo afetado, uma vez que a atividade enzimática residual *per se* não pode prever os subtipos de doença causados por mutações no gene *GLB1* (Hofer *et al.*, 2010, Caciotti *et al.*, 2011, Ou *et al.*, 2018). O valor preditivo é melhor para indivíduos com duas mutações graves (*ou seja*, mutações que não mostram atividade da enzima

GLB1), que comumente se apresentam com um fenótipo de início precoce grave (Caciotti *et al.*, 2011, Sperb *et al.*, 2013). Os dados sobre a concordância entre irmãos, embora esparsos, indicam que o curso clínico em irmãos com GM1 infantil é semelhante em termos de tempo para o início e as manifestações prevalentes da doença (Gururaj *et al.*, 2005).

[0035] O vetor de terapia gênica fornecido aqui, *isto é*, rAAV.GLB1 (por exemplo, rAAVhu68.GLB1, rAAVhu68.UbC.GLB1), ou a composição que compreende o mesmo é útil para o tratamento de condições associadas a deficiências em níveis normais de beta-galactosidase funcional. Tal como aqui utilizado, o vetor de terapia gênica se refere a um rAAV como aqui descrito que é adequado para utilização no tratamento de um paciente. Em certas modalidades, o vetor de terapia gênica ou a composição aqui fornecida é útil para o tratamento do Tipo 1 de GM1. Em certas modalidades, o vetor de terapia gênica ou a composição aqui fornecida é útil para o tratamento do tipo 2 de GM1. Em certas modalidades, o vetor de terapia gênica ou a composição aqui fornecida é útil para o tratamento do Tipo 3 de GM1. Em certas modalidades, o vetor de terapia gênica ou a composição aqui fornecida é útil para o tratamento do Tipo 1 e Tipo 2 de GM1. Em certas modalidades, o vetor de terapia gênica ou a composição aqui fornecida é útil para o tratamento de paciente GM1 que tem 18 meses de idade ou menos. Em certas modalidades, o vetor de terapia gênica ou a composição aqui fornecida é para o tratamento de GM1 que exclui o Tipo 3. Em certas modalidades, o vetor de terapia gênica ou a composição aqui fornecida é útil para o tratamento de condições neurológicas associadas a deficiências em níveis normais de β -galactosidase funcional. Em certas modalidades, o vetor de terapia gênica ou a composição aqui fornecida é útil para a melhoria dos sintomas associados à gangliosidose GM1. Em certas modalidades, o vetor de terapia gênica ou a composição aqui fornecida é

útil para a melhoria dos sintomas neurológicos associados à gangliosidose GM1.

[0036] Em certas modalidades, o paciente tem gangliosidose infantil e tem 18 meses de idade ou menos. Em certas modalidades, os pacientes que recebem o rAAV.GLB1 têm de 1 a 18 meses de idade. Em certas modalidades, os pacientes que recebem o rAAV.GLB1 têm de quatro a 18 meses de idade. Em certas modalidades, o bebê tem menos de quatro meses de idade. Em certas modalidades, os pacientes que recebem o rAAV.GLB1 têm cerca de 1, cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 11, cerca de 12, cerca de 13, cerca de 14, cerca de 15, cerca de 16, cerca de 17 ou cerca de 18 meses de idade. Em certas modalidades, o paciente é uma criança, *por exemplo*, de 18 meses a 3 anos de idade. Em certas modalidades, o paciente que recebe o rAAV.GLB1 tem de 3 anos a 6 anos de idade, de 3 anos a 12 anos de idade, de 3 anos a 18 anos de idade, de 3 anos a 30 anos de idade. Em certas modalidades, os pacientes têm mais de 18 anos de idade.

[0037] Em certas modalidades, a melhora dos sintomas associados à gangliosidose GM1 é observada após o tratamento, incluindo, *por exemplo*, aumento da expectativa de vida (sobrevivência); menor necessidade de tubo de alimentação; redução na incidência, frequência e duração das crises, início tardio das crises; melhoria da qualidade de vida, por exemplo, medida pelo PedsQL; redução na progressão em direção ao declínio neurocognitivo e/ou melhora no desenvolvimento neurocognitivo, *por exemplo*, melhor desenvolvimento ou melhora nos comportamentos adaptativos, cognição, linguagem (comunicação receptiva e expressiva) e função motora (motor grosso, motor fino), conforme medido pelas Escalas de Bayley de desenvolvimento infantil e infantil, terceira edição (BSID-III) e as escalas de comportamento adaptativo de Vineland, segunda edição (Vineland-II); idade cognitiva anterior e

idade-na-perda posterior para marcos motores; aumento retardado do volume do tecido cerebral (córtex cerebral e outras estruturas menores) e volume ventricular, diminuição atrasada do tamanho das subestruturas cerebrais, incluindo o corpo caloso, caudado e putâmen, bem como o córtex cerebelar, e estabilização na atrofia cerebral e alterações volumétricas; progressão atrasada da intensidade do sinal T1/T2 anormal no tálamo e nos gânglios da base; aumento da atividade da enzima β -gal (GLB1) no CSF e no soro; redução da concentração de GM1 no CSF; redução dos níveis de sulfato de queratana sérico e/ou urinário, diminuição da atividade da hexosaminidase; redução da resposta inflamatória no cérebro; atraso do volume anormal do fígado e do baço; EEG anormal tardio e potenciais evocados visuais (VEP); e/ou melhorias na disfagia, função da marcha, habilidades motoras, linguagem e/ou função respiratória.

[0038] Em certas modalidades, o paciente recebe uma co-terapia após a injeção de rAAV.GLB1 para a qual eles não seriam elegíveis sem a terapia de AAV aqui descrita. Essas co-terapias podem incluir terapia de reposição enzimática, terapia de redução de substrato (*por exemplo*, com miglustato (OGT 918, N-butil-desoxinojirimicina), tratamento com tanganil (acetil-DL-leucina), terapia respiratória, uso de tubo de alimentação, medicamentos antiepilépticos), ou transplante de células-tronco hematopoéticas (HSCT) com medula óssea ou sangue do cordão umbilical.

[0039] Opcionalmente, uma co-terapia imunossupressora pode ser usada em um sujeito em necessidade. Os imunossupressores para tal co-terapia incluem, entre outros, glicocorticoides, esteroides, antimetabolitos, inibidores de células T, um macrolídeo (*por exemplo*, uma rapamicina ou rapalog) e agentes citostáticos, incluindo um agente alquilante, um antimetabólito, um antibiótico citotóxico, um anticorpo ou um

agente ativo na imunofilina. O supressor imunológico pode incluir mostarda nitrogenada, nitrosourea, composto de platina, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, fluorouracil, dactinomicina, antraciclina, mitomicina C, bleomicina, mitramicina, anticorpos direcionados para o receptor de IL-2-(CD25-) ou CD3, anticorpos anti-IL-2, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, IFN- β , IFN- γ , um opioide ou agente de ligação a TNF- α (fator de necrose tumoral alfa). Em certas modalidades, a terapia imunossupressora pode ser iniciada 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou mais dias antes ou após a administração de rAAV.GLB1. Essa terapia imunossupressora pode envolver a administração de um, dois ou mais fármacos (*por exemplo*, glicocorticoides, prednelisona, micofenolato de mofetil (MMF) e/ou sirolimus (*ou seja*, rapamicina)). Tais fármacos imunossupressoras podem ser administrados a um paciente/sujeito em necessidade uma, duas ou mais vezes na mesma dose ou em uma dose ajustada. Essa terapia pode envolver a coadministração de dois ou mais fármacos, o (*por exemplo*, prednelisona, micofenolato de mofetila (MMF) e/ou sirolimus (*ou seja*, rapamicina)) no mesmo dia. Uma ou mais desses fármacos podem ser continuados após a administração de rAAV.GLB1, na mesma dose ou em uma dose ajustada. Essa terapia pode durar cerca de 1 semana (7 dias), cerca de 60 dias ou mais, conforme necessário. Em certas modalidades, um regime sem tacrolimus é selecionado.

[0040] Em certas modalidades, uma "quantidade eficaz" de rAAV.GLB1 (por exemplo, rAAV.GLB1, rAAV.UbC.GLB1) conforme fornecido neste documento é a quantidade que atinge a melhoria dos sintomas associados à gangliosidose GM1. Em certas modalidades, uma "quantidade eficaz" de rAAV.GLB1, conforme fornecido aqui, é a quantidade que atinge um ou mais dos seguintes parâmetros: farmacodinâmica de GLB1 aumentada e atividade biológica no líquido cefalorraquidiano (CSF), farmacodinâmica de GLB1 aumentada e atividade bioló-

gica no soro, aumento da expectativa de vida média (sobrevida) do paciente, progressão tardia da doença de gangliosidose GM1 (avaliada por um ou mais de idade cognitiva, idade na perda e porcentagem de pacientes que mantêm ou adquirem marcos de desenvolvimento e motores apropriados para a idade) e melhorias no desenvolvimento neurocognitivo com base em uma ou mais mudanças nas pontuações de comunicação cognitiva, motora grossa, motora fina, receptiva e expressiva equivalentes à idade das Escalas de Bayley de Desenvolvimento Infantil e Juvenil (BSID, por exemplo, BSID Terceira Edição (BSID-III)), mudança na pontuação padrão para cada domínio das escalas de comportamento adaptativo de Vineland. Para crianças mais velhas e adultos, uma "quantidade eficaz" de rAAV.GLB1 conforme fornecido neste documento pode, em algumas modalidades, ser uma quantidade que melhora a disfagia, a função de marcha, as habilidades motoras, a linguagem e/ou a função respiratória, a mudança nas pontuações padrão para cada domínio das escalas de comportamento adaptativo de Vineland, segunda edição (Vineland-II), diminuíram a frequência das crises e a idade de início das crises, melhorou a probabilidade de independência do tubo de alimentação aos 24 meses de idade. Exemplos de marcos de desenvolvimento e motores apropriados para a idade são fornecidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO). Ver, *por exemplo*, Wijnhoven T.M., *et al.* (2004). Assessment of gross motor development in the WHO Multicentre Growth Reference Study. *Food Nutr Bull.* 25 (1 Supl): S37-45, bem como na tabela a seguir. Em certas modalidades, uma "quantidade eficaz" de rAAV.GLB1 (tal como, rAAVhu68, GLB1), conforme fornecido aqui, é a quantidade que atinge os efeitos farmacodinâmicos de rAAV.GLB1 no CSF e na atividade de GLB1 no soro, na concentração de GM1 no CSF e no soro e no sulfato de queratana na urina; mudanças em MRI; monitoramento de volume do fígado e do baço; monitoramento em EEG e potenciais evocados visuais (VEP).

Marco Motor Bruto	Critérios de Desempenho do Estudo de Referência de Crescimento Multicêntrico
Sentado sem apoio	A criança senta-se ereta com a cabeça erguida por pelo menos 10 segundos. A criança não usa braços ou mãos para equilibrar o corpo ou a posição de apoio.
Rastejando com as mãos e joelhos	A criança se move alternadamente para a frente ou para trás nas mãos e joelhos. O estômago não toca a superfície de suporte. Existem movimentos contínuos e consecutivos, pelo menos três seguidos.
De pé com ajuda	A criança fica em pé em ambos os pés, segurando um objeto estável (<i>por exemplo</i> , móveis) com as duas mãos, sem se apoiar nele. O corpo não empurra o objeto estável e as pernas suportam a maior parte do peso corporal. Assim, a criança fica em pé com ajuda por pelo menos 10 segundos.
Caminhando com ajuda	A criança está na posição vertical com as costas retas. A criança dá passos para o lado ou para a frente segurando um objeto estável (<i>por exemplo</i> , móveis) com uma das mãos. Uma perna avança enquanto a outra sustenta parte do peso do corpo. A criança dá pelo menos cinco passos dessa maneira.
Independência	A criança fica em posição vertical em ambas as pernas (não nos dedos dos pés) com as costas retas. As pernas suportam 100% do peso da criança. Não há contato com uma pessoa ou objetos. A criança fica sozinha por pelo menos 10 segundos.
Caminhando sozinho	A criança dá pelo menos cinco passos independentemente na posição vertical com as costas retas. Uma perna avança enquanto a outra sustenta a maioria do peso do corpo. Não há contato com uma pessoa ou objeto.

Adaptado de (Wijnhoven et al., 2004, Assessment of gross motor development in the WHO Multicentre Growth Reference Study." Food Nutr Bull. 25(1 Suppl):S37-45). *Abreviações*: WHO, Organização Mundial da Saúde.

[0041] O rAAV.GLB1 aqui descrito, e as composições que os compreendem, contêm um gene *GLB1* (*ou seja*, sequência de codificação β -gal) que codifica e expressa a β -galactosidase humana (que também pode ser denominada como enzima GLB1 normal) ou um fragmento funcional da mesma. A enzima GLB1 catalisa a hidrólise de β -galactosídeo em monossacarídeos. A sequência de aminoácidos da β -galactosidase humana (2034 pb, 677 aa, Genbank # AAA51819.1, EC3.2.1.23) é reproduzida aqui como SEQ ID NO: 4, que também é reconhecida como β -galactosidase, Isoforma 1. Veja, por exemplo, UniProtKB - P16278 (BGAL_HUMAN). Em certas modalidades, a enzima GLB1 pode ter uma sequência do aminoácido 24 ao aminoácido 677 da SEQ ID NO: 4 (isto

é, enzima GLB1 madura sem peptídeo sinal). Em certas modalidades, a enzima GLB1 pode ter uma sequência do aminoácido 31 ao aminoácido 677 da SED ID NO: 4 (isto é, β -galactosidase, Isoforma 3). Em certas modalidades, a enzima GLB1 é a Isoforma 2 com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. Qualquer fragmento que retém a função da β -galactosidase de comprimento total pode ser codificado pelo gene *GLB1* conforme descrito neste documento e é referido como um "fragmento funcional". Por exemplo, um fragmento funcional de β -galactosidase pode ter pelo menos cerca de 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ou mais da atividade da β -galactosidase de comprimento total (*ou seja*, a enzima GLB1 normal que pode ser β -galactosidase possuindo uma sequência do aminoácido 24 ao aminoácido 677 SEQ ID NO: 4, ou qualquer uma das três isoformas). Os métodos de avaliação da atividade β -galactosidase podem ser encontrados nos Exemplos, bem como em publicações. Ver, por exemplo, Radoslaw Kwapiszewski, Determination of Acid β -Galactosidase Activity: Methodology and Perspectives. Indian J Clin Biochem. Janeiro de 2014; 29 (1): 57–62. Em certas modalidades, o fragmento funcional é uma β -galactosidase truncada, que carece de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 ou mais aminoácidos no terminal N e/ou terminal C da β -galactosidase de comprimento total. Em certas modalidades, o fragmento funcional contém cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 ou mais substituições de aminoácidos conservadoras em comparação com a β -galactosidase de comprimento total. Conforme usado aqui, uma substituição conservativa de aminoácidos é uma substituição de aminoácidos em uma proteína que muda um determinado aminoácido para um aminoácido diferente com propriedades bioquímicas semelhantes (*por exemplo* carga, hidrofobicidade e tamanho).

[0042] Em uma modalidade, o gene *GLB1* tem a sequência de SEQ

ID NO: 5. Em certas modalidades, o gene *GLB1* é projetado para ter a sequência de SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o gene *GLB1* é projetado para ter a sequência de SEQ ID NO: 7. Em certas modalidades, o gene *GLB1* é projetado para ter a sequência de SEQ ID NO: 8. Em certas modalidades, o gene *GLB1* é projetado para ter uma sequência que é pelo menos 95% idêntica a 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o gene *GLB1* é projetado para ter uma sequência que é pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99% ou pelo menos cerca de 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o gene *GLB1* é projetado para ter uma sequência que é pelo menos 95% idêntica a 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 7. Em certas modalidades, o gene *GLB1* é projetado para ter uma sequência que é pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99% ou pelo menos cerca de 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 7. Em certas modalidades, o gene *GLB1* é projetado para ter uma sequência que é pelo menos 95% idêntica a 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 8. Em certas modalidades, o gene *GLB1* é projetado para ter uma sequência que é pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99% ou pelo menos cerca de 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 8. Em uma outra modalidade, a sequência projetada codifica uma β -galactosidase de comprimento total ou um fragmento funcional da mesma. Em ainda uma outra modalidade, a sequência geneticamente modificada codifica o aminoácido 24 ao aminoácido 677 da SEQ ID NO: 4 ou um fragmento funcional do mesmo. Em outra modalidade, a sequência geneticamente modificada codifica uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 ou um fragmento funcional dos mesmos.

[0043] Em certas modalidades, o gene *GLB1* codifica uma enzima

GLB1 que compreende um peptídeo sinal (líder) e a proteína madura GLB1, aminoácidos 24 a 677 de SEQ ID NO: 4. A sequência líder é preferencialmente de origem humana ou um derivado de uma sequência líder humana e tem cerca de 15 a cerca de 28 aminoácidos, preferencialmente cerca de 20 a 25 aminoácidos, ou cerca de 23 aminoácidos de comprimento. Em certas modalidades, o peptídeo sinal é o peptídeo sinal nativo (aminoácidos 1 a 23 de SEQ ID NO: 4). Em certas modalidades, a enzima GLB1 compreende uma sequência líder exógena no lugar da sequência líder nativa (aminoácidos 1-23 de SEQ ID NO: 4). Em outra modalidade, o líder pode ser de uma IL2 humana ou de um líder mutado. Em outra modalidade, um sinal de secreção de serpinF1 humano pode ser usado como um peptídeo líder.

II. AAVhu68

[0044] AAVhu68 (anteriormente denominado AAV3G2) varia de outro vírus Clade F AAV9 por dois aminoácidos codificados nas posições 67 e 157 de vp1, com base na numeração de SEQ ID NO: 2. Ao contrário, o outro Clade F AAV (AAV9, hu31, hu31) tem um Ala na posição 67 e um Ala na posição 157. São fornecidos novos capsídeos de AAVhu68 e/ou capsídeos de AAV projetados tendo valina (Val ou V) na posição 157 com base na numeração de SEQ ID NO: 2 e, opcionalmente, um ácido glutâmico (Glu ou E) na posição 67 com base na numeração de SEQ ID NO: 2.

[0045] Como usado no presente documento, o termo "clade", no que se refere a grupos de AAV, se refere a grupos de AAV que são filogeneticamente relacionados entre si, conforme determinado usando um algoritmo de Associação por Vizinhaça por um valor de inicialização de pelo menos 75% (de pelo menos 1.000 replicatas) e uma medição da distância de correção de Poisson não superior a 0,05, com base no alinhamento da sequência de aminoácidos AAV vp1. O algoritmo de Associação por Vizinhaça foi descrito na literatura. Ver, *por exemplo*,

M. Nei and S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics* (Oxford University Press, New York (2000). Estão disponíveis programas de computador que podem ser usados para implementar esse algoritmo. Por exemplo, o programa MEGA v2.1 implementa o método Nei-Gojori modificado. Usando essas técnicas e programas de computador, e a sequência de uma proteína do capsídeo do AAV vp1, um versado na técnica pode determinar rapidamente se um AAV selecionado está contido em um dos clades aqui identificados, em outro clade, ou está fora desses clades. Ver, *por exemplo*, G Gao, *et al*, *J Virol*, 2004 Jun; 78(10): 6381-6388, que identifica os Clades A, B, C, D, E e F e fornece sequências de ácidos nucleicos do novo AAV, Números de Acesso ao GenBank AY530553 a AY530629. Ver também WO 2005/033321.

[0046] Em certas modalidades, um capsídeo de AAVhu68 é ainda caracterizado por um ou mais dos seguintes. As proteínas do capsídeo AAVhu68 compreendem: proteínas AAVhu68 vp1 produzidas por expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos prevista de 1 a 736 da SEQ ID NO: 2, proteínas vp1 produzidas a partir da SEQ ID NO: 1 ou proteínas vp1 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 1 que codifica a sequência de aminoácidos prevista de 1 a 736 de SEQ ID NO: 2; AAVhu68 proteínas vp2 produzidas por expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos prevista de pelo menos cerca de aminoácidos 138 a 736 da SEQ ID NO: 2, proteínas vp2 produzidas a partir de uma sequência compreendendo pelo menos os nucleotídeos 412 a 2211 da SEQ ID NO: 1, ou proteínas vp2 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica a pelo menos nucleotídeos 412 a 2211 de SEQ ID NO: 1 que codifica a sequência de aminoácidos prevista de pelo menos cerca de aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 2; e/ou proteínas vp3 AAVhu68 produzidas por expressão de uma sequência de ácido

nucleico que codifica a sequência de aminoácidos prevista de pelo menos cerca de aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 2, proteínas vp3 produzidas a partir de uma sequência compreendendo pelo menos os nucleotídeos 607 a 2211 de SEQ ID NO: 1, ou proteínas vp3 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica a pelo menos nucleotídeos 607 a 2211 de SEQ ID NO: 1 que codifica a sequência de aminoácidos prevista de pelo menos cerca de aminoácidos 203 a 736 da SEQ ID NO: 2.

[0047] As proteínas AAVhu68 vp1, vp2 e vp3 são tipicamente expressas como variantes de splice alternativas codificadas pela mesma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos vp1 de comprimento total (aminoácidos (aa) 1 a 736). Opcionalmente, a sequência de codificação de vp1 é usada sozinha para expressar as proteínas vp1, vp2 e vp3. Alternativamente, esta sequência pode ser co-expressa com um ou mais de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos AAVhu68 vp3 (cerca de aa 203 a 736) sem a região única de vp1 (cerca de aa 1 a cerca de 137) e/ou regiões únicas de vp2 (cerca de aa 1 a cerca de aa 202), ou uma fita complementar a esta, o mRNA ou tRNA correspondente (por exemplo, o mRNA transcrito de cerca de nucleotídeo (nt) 607 a cerca de nt 2211 de SEQ ID NO: 1), ou uma sequência de pelo menos 70% a pelo menos 99% (*por exemplo*, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99%) idêntica à SEQ ID NO: 1 que codifica aa 203 a 736 da SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, ou alternativamente, a sequência de codificação de vp1 e/ou de codificação de vp2 pode ser co-expressa com a sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos AAVhu68 vp2 de SEQ ID NO: 2 (cerca de aa 138 a 736) sem a região única de vp1 (cerca de aa 1 a cerca de 137), ou uma fita complementar a esta, o mRNA ou tRNA correspondente (por exemplo, o mRNA transcrito de nt 412 a 2211

de SEQ ID NO: 1), ou uma sequência de pelo menos 70% a pelo menos 99% (*por exemplo*, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99%) idêntica à SEQ ID NO: 1 que codifica cerca de aa 138 a 736 de SEQ ID NO: 2.

[0048] Conforme descrito neste documento, um rAAVhu68 tem um capsídeo de rAAVhu68 produzido em um sistema de produção que expressa capsídeos de uma sequência de ácido nucleico de AAVhu68 que codifica a sequência de aminoácidos vp1 de SEQ ID NO: 2 e, opcionalmente, sequências de ácido nucleico adicionais, *por exemplo*, codificando um vp 3 proteína livre das regiões únicas de vp1 e/ou vp2. O rAAVhu68 resultante da produção usando uma única sequência de ácido nucleico vp1 produz as populações heterogêneas de proteínas vp1, proteínas vp2 e proteínas vp3. Mais particularmente, o capsídeo de AAVhu68 contém subpopulações dentro das proteínas vp1, dentro das proteínas vp2 e dentro das proteínas vp3 que possuem modificações dos resíduos de aminoácidos preditos na SEQ ID NO: 2. Essas subpopulações incluem, no mínimo, resíduos de asparagina desamidada (N ou Asn). Por exemplo, as asparaginas nos pares asparagina - glicina são altamente desamidadas.

[0049] Em uma modalidade, a sequência de ácido nucleico de AAVhu68 vp1 tem a sequência de SEQ ID NO: 1, ou uma fita complementar a esta, *por exemplo*, o mRNA ou tRNA correspondente. Em certas modalidades, as proteínas vp2 e/ou vp3 podem ser expressas adicional ou alternativamente a partir de sequências de ácido nucleico diferentes da vp1, *por exemplo*, para alterar a razão das proteínas vp em um sistema de expressão selecionado. Em certas modalidades, também é fornecida uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos AAVhu68 vp3 da SEQ ID NO: 2 (cerca de aa 203 a 736) sem a região única vp1 (cerca de aa 1 a cerca de 137) e/ou regiões únicas de vp2 (cerca de aa 1 a cerca de aa 202), ou uma fita complementar às

mesmas, o mRNA ou tRNA correspondente (cerca de nt 607 a cerca de nt 2211 de SEQ ID NO: 1). Em certas modalidades, também é fornecida uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos AAVhu68 vp2 da SEQ ID NO: 2 (cerca de aa 138 a 736) sem a região única de vp1 (cerca de aa 1 a cerca de 137), ou uma fita complementar ao mesmo, o mRNA ou tRNA correspondente (nt 412 a 2211 de SEQ ID NO: 1).

[0050] No entanto, outras sequências de ácido nucleico que codificam a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 podem ser selecionadas para uso na produção de capsídeos de rAAVhu68. Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico tem a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 ou uma sequência pelo menos 70% a 99% idêntica, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99%, idêntica à SEQ ID NO: 1 que codifica a SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico tem a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 ou uma sequência pelo menos 70% a 99%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99%, idêntica a cerca de nt 412 a cerca de nt 2211 de SEQ ID NO: 1 que codifica a proteína de capsídeo vp2 (cerca de aa 138 a 736) de SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico tem a sequência de ácido nucleico de cerca de nt 607 a cerca de nt 2211 da SEQ ID NO: 1 ou uma sequência pelo menos 70% a 99%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99%, idêntica a nt 607 a cerca de nt 2211 de SEQ ID NO: 1 que codifica a proteína de capsídeo vp3 (cerca de aa 203 a 736) de SEQ ID NO: 2.

[0051] É do conhecimento da técnica conceber sequências de ácidos nucleicos que codificam esse capsídeo de AAVhu68, incluindo DNA

(genômico ou cDNA) ou RNA (*por exemplo*, mRNA). Em certas modalidades, a sequência de ácido nucleico que codifica a proteína do capsídeo AAVhu68 vp1 é fornecida na SEQ ID NO: 1. Ver, *também*, as FIGS 11A-11E. Em outras modalidades, uma sequência de ácido nucleico de 70% a 99,9% de identidade com a SEQ ID NO: 1 pode ser selecionada para expressar as proteínas do capsídeo AAVhu68. Em certas outras modalidades, a sequência de ácido nucleico é pelo menos cerca de 75% idêntica, pelo menos 80% idêntica, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97% idêntica ou pelo menos 99% a 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 1. Essas sequências de ácido nucleico podem ser otimizadas por códons para expressão em um sistema selecionado (*isto é*, tipo de célula) pode ser projetado por vários métodos. Essa otimização pode ser realizada usando métodos que estão disponíveis online (*por exemplo*, GeneArt), métodos publicados ou uma empresa que fornece serviços de otimização de codificação, *por exemplo*, como DNA2.0 (Menlo Park, CA). Um método de otimização por códon é descrito, *por exemplo*, na Publicação de Patente Internacional US WO 2015/012924, que é aqui incorporado por referência na sua totalidade. Ver também, *por exemplo*, a Publicação de Patente U.S. 2014/0032186 e a Publicação de Patente U.S. 2006/0136184. Adequadamente, o comprimento total da estrutura de leitura aberta (ORF) para o produto é modificado. No entanto, em algumas modalidades, apenas um fragmento da ORF pode ser alterado. Utilizando um destes métodos, pode-se aplicar as frequências a qualquer sequência polipeptídica e produzir um fragmento de ácido nucleico de uma região de codificação otimizada por códons que codifica o polipeptídeo. Estão disponíveis várias opções para realizar alterações reais aos códons ou para sintetizar as regiões de codificação otimizadas por códons concebidas como aqui descrito. Tais modificações ou sínteses podem ser realizadas usando manipulações biológicas moleculares padrão e de rotina bem conhecidas pelos

versados na técnica. Numa abordagem, uma série de pares de oligonucleotídeos complementares de 80-90 nucleotídeos cada um em comprimento e abrangendo o comprimento da sequência desejada são sintetizados por métodos padrão. Estes pares de oligonucleotídeos são sintetizados de modo a que, após recozimento, formem fragmentos de fita dupla de 80-90 pares de bases, *contendo extremidades coesivas, por exemplo*, cada oligonucleotídeo no par é sintetizado para estender 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, ou mais bases além da região que é complementar ao outro oligonucleotídeo no par. As extremidades de fita simples de cada par de oligonucleotídeos são concebidas para recozer com a extremidade de fita simples de outro par de oligonucleotídeos. Os pares de oligonucleotídeos são autorizados a hibridar e aproximadamente cinco a seis destes fragmentos de fita dupla são então permitidos hibridar juntos através das extremidades coesivas de fita simples, e depois são ligados e clonados em um vetor de clonagem bacteriano padrão, por exemplo, um Vetor TOPO® disponível na Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif. O construto é, então, sequenciado por métodos padrão. Vários destes construtos consistem em 5 a 6 fragmentos de fragmentos de 80 a 90 pares de bases ligados entre si, *isto é*, fragmentos de cerca de 500 pares de bases, de tal modo que a sequência inteira desejada é representada em uma série de construtos de plasmídeo. Os insertos destes plasmídeos são, então, cortados com enzimas de restrição apropriadas e ligadas em conjunto para formar o construto final. O construto final é, então, clonado num vetor de clonagem bacteriana padrão e sequenciado. Métodos adicionais seriam imediatamente evidentes para o versado na técnica. Além disso, a síntese genética está prontamente disponível comercialmente.

[0052] Em certas modalidades, o capsídeo AAVhu68 é produzido usando uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo

menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99%, que codifica a sequência de aminoácidos vp1 da SEQ ID NO: 2 com uma modificação (*por exemplo*, aminoácido desamidado) como aqui descrito. Em certas modalidades, a sequência de aminoácidos vp1 é reproduzida na SEQ ID NO: 2.

[0053] Como usado neste documento, quando usado para se referir a proteínas do capsídeo vp, o termo "heterogêneo" ou qualquer variação gramatical do mesmo, se refere a uma população que consiste em elementos que não são iguais, por exemplo, tendo monômeros vp1, vp2 ou vp3 (proteínas) com diferentes sequências de aminoácidos modificados. SEQ ID NO: 2 fornece a sequência de aminoácidos codificada da proteína AAVhu68 vp1. O termo "heterogêneo", conforme usado em conjunto com as proteínas vp1, vp2 e vp3 (alternativamente chamadas de isoformas), se refere a diferenças na sequência de aminoácidos das proteínas vp1, vp2 e vp3 dentro de um capsídeo. O capsídeo de AAV contém subpopulações dentro das proteínas vp1, dentro das proteínas vp2 e dentro das proteínas vp3 que possuem modificações dos resíduos de aminoácidos preditos. Essas subpopulações incluem, no mínimo, certos resíduos de asparagina desamidada (N ou Asn). Por exemplo, certas subpopulações compreendem pelo menos uma, duas, três ou quatro posições de asparaginas (N) altamente desamidadas em pares asparagina-glicina e, opcionalmente, compreendendo ainda outros aminoácidos desamidados, em que a desamidação resulta em uma mudança de aminoácido e outras modificações opcionais.

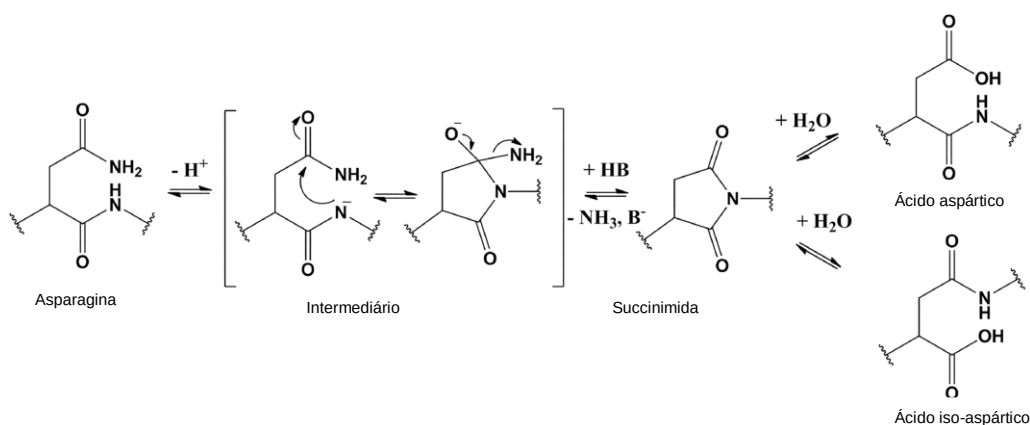
[0054] Como usado neste documento, uma "subpopulação" de proteínas vp se refere a um grupo de proteínas vp que tem pelo menos uma característica definida em comum e que consiste em pelo menos um membro do grupo a menos do que todos os membros do grupo de referência, a menos que especificado de outra forma. Por exemplo, uma "subpopulação" de proteínas vp1 é pelo menos uma (1) proteína vp1 e

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

[0055] A menos que especificado de outra forma, altamente desamidado se refere a pelo menos 45% desamidado, pelo menos 50% desamidado, pelo menos 60% desamidado, pelo menos 65% desamidado, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99% ou até cerca de 100% desamidado em uma posição de aminoácido referenciada, em comparação com a sequência de aminoácidos predita na posição de aminoácido de referência (*por exemplo*, pelo menos 80% das asparaginas no aminoácido 57 com base na numeração da SEQ ID NO: 2 (AAVhu68) podem ser desamidadas com base nas proteínas vp1 totais podem ser desamidadas com base nas proteínas vp1, vp2 e vp3 totais). Essas porcentagens podem ser determinadas usando gel 2D, técnicas de espectrometria de massa ou outras técnicas adequadas.

[0056] Sem desejar estar limitado pela teoria, acredita-se que a desamidação de pelo menos resíduos altamente desamidados nas proteínas vp no capsídeo de AAV seja principalmente não enzimática, sendo causada por grupos funcionais dentro da proteína do capsídeo que de-

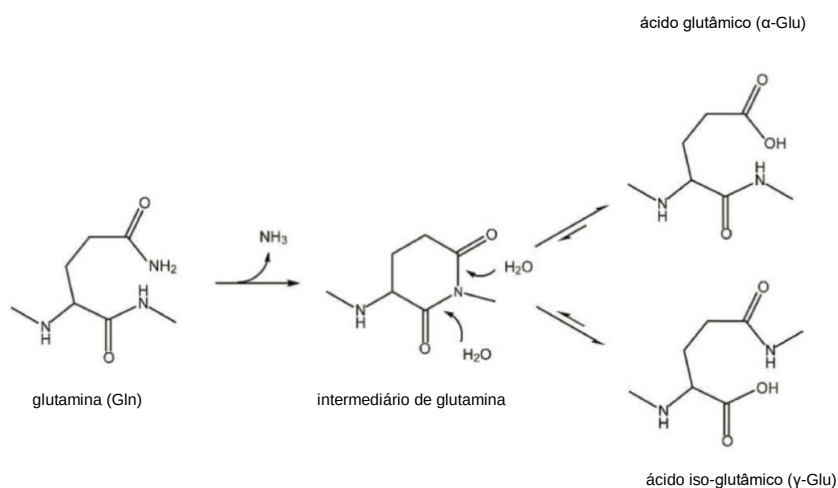
samidam asparaginas selecionadas e, em menor grau, resíduos de glutamina. A montagem eficiente do capsídeo da maioria das proteínas vp1 de desamidação indica que esses eventos ocorrem após a montagem do capsídeo ou que a desamidação em monômeros individuais (vp1, vp2 ou vp3) é bem tolerada estruturalmente e não afeta amplamente a dinâmica da montagem. A desamidação extensiva na região única de VP1 (VP1-u) (~aa 1-137), geralmente considerada como localizada internamente antes da entrada celular, sugere que a desamidação de VP pode ocorrer antes da montagem do capsídeo. A desamidação de N pode ocorrer através do átomo de nitrogênio da espinha dorsal de seu resíduo C-terminal conduz um ataque nucleofílico ao átomo de carbono do grupo amida da cadeia lateral de Asn. Pensa-se que se forma um resíduo de succinimida de anel fechado intermediário. O resíduo de succinimida então conduz a hidrólise rápida para levar ao produto final ácido aspártico (Asp) ou ácido iso-aspártico (IsoAsp). Portanto, em certas modalidades, a desamidação da asparagina (N ou Asn) leva a um Asp ou IsoAsp, que pode se interconverter através do intermediário succinimida, *por exemplo*, conforme ilustrado a seguir.



[0057] Conforme fornecido neste documento, cada N desamidado em VP1, VP2 ou VP3 pode ser independentemente ácido aspártico (Asp), ácido isoaspártico (isoAsp), aspartato e/ou uma mistura de interconversão de Asp e isoAsp, ou combinações dos mesmos. Qualquer razão adequada de ácido α - e isoaspártico pode estar presente. Por

exemplo, em certas modalidades, a razão pode ser de 10:1 a 1:10 aspártico para isoaspártico, cerca de 50:50 aspártico:isoaspártico ou cerca de 1:3 aspártico:isoaspártico ou outra razão selecionada.

[0058] Em certas modalidades, uma ou mais glutamina (Q) podem desamidar em ácido glutâmico (Glu), *ou seja*, ácido α -glutâmico, ácido γ -glutâmico (Glu) ou uma mistura de ácido α e γ -glutâmico, que pode se interconverter através de um intermediário comum de glutarinimida. Qualquer razão adequada de ácido α - e γ -glutâmico pode estar presente. Por exemplo, em certas modalidades, a razão pode ser de 10:1 a 1:10 α a γ , cerca de 50:50 α : γ , ou cerca de 1:3 α : γ , ou outra razão selecionada.



[0059] Assim, um rAAV inclui subpopulações dentro do capsídeo de rAAV das proteínas vp1, vp2 e/ou vp3 com aminoácidos desamidados, incluindo, no mínimo, pelo menos uma subpopulação compreendendo pelo menos uma asparagina altamente desamidada. Além disso, outras modificações podem incluir isomerização, particularmente em posições de resíduo de ácido aspártico (D ou Asp) selecionadas. Em ainda outras modalidades, as modificações podem incluir uma amidação em uma posição Asp.

[0060] Em certas modalidades, um capsídeo de AAV contém subpopulações de vp1, vp2 e vp3 tendo pelo menos 4 a pelo menos cerca

de 25 posições de resíduos de aminoácidos desamidados, dos quais pelo menos 1% a 10% são desamidados em comparação com a sequência de aminoácidos codificada do proteínas vp. A maioria destes pode ser resíduos de N. No entanto, os resíduos Q também podem ser desamidados.

[0061] Em certas modalidades, um rAAV tem um capsídeo de AAV com proteínas vp1, vp2 e vp3 tendo subpopulações que compreendem combinações de dois, três, quatro ou mais resíduos desamidados nas posições estabelecidas na tabela fornecida no Exemplo 1 e aqui incorporada por referência. A desamidação no rAAV pode ser determinada usando eletroforese em gel 2D e/ou espectrometria de massa (MS) e/ou técnicas de modelagem de proteína. A cromatografia online pode ser realizada com uma coluna Acclaim PepMap e um sistema Thermo Ultimate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um Q Exactive HF com uma fonte NanoFlex (Thermo Fisher Scientific). Os dados de MS são adquiridos usando um método top-20 dependente de dados para o Q Exactive HF, escolhendo dinamicamente os íons precursores ainda não sequenciados mais abundantes das varreduras de pesquisa (200-2000 m/z). O sequenciamento é realizado por meio de fragmentação de dissociação colisional de alta energia com um valor alvo de íons $1e5$ determinado com controle de ganho automático preditivo e um isolamento de precursores foi realizado com uma janela de 4 m/z. Varreduras de pesquisa foram adquiridas com uma resolução de 120.000 em m/z 200. A resolução para os espectros de HCD pode ser definida para 30.000 em m/z200 com um tempo máximo de injeção de íons de 50 ms e uma energia de colisão normalizada de 30. O nível de RF da lente S pode ser definido em 50, para dar a transmissão ideal da região m/z ocupada pelos peptídeos do digest. Os íons precursores podem ser excluídos com estados de carga simples, não atribuídos ou seis e mais altos da seleção de fragmentação. O software BioPharma Finder 1.0

(Thermo Fischer Scientific) pode ser usado para análise dos dados adquiridos. Para o mapeamento de peptídeos, as pesquisas são realizadas usando um banco de dados FASTA de proteína de entrada única com carbamidometilação definida como uma modificação fixa; e oxidação, desamidação e fosforilação definidas como modificações variáveis, uma precisão de massa de 10 ppm, uma alta especificidade de protease e um nível de confiança de 0,8 para espectros de MS/MS. Exemplos de proteases adequadas podem incluir, *por exemplo*, tripsina ou quimotripsina. A identificação por espectrometria de massa de peptídeos desamidados é relativamente simples, pois a desamidação adiciona à massa da molécula intacta +0,984 Da (a diferença de massa entre os grupos –OH e –NH₂). A percentagem de desamidação de um peptídeo particular é determinada pela área de massa do peptídeo desamidado dividida pela soma da área dos peptídeos desamidados e nativos. Considerando o número de sítios de desamidação possíveis, as espécies isobáricas que são desamidadas em diferentes sítios podem comigrar em um único pico. Consequentemente, fragmentos de íons originários de peptídeos com múltiplos sítios de desamidação potenciais podem ser usados para localizar ou diferenciar múltiplos sítios de desamidação. Nestes casos, as intensidades relativas dentro dos padrões de isótopos observados podem ser usadas para determinar especificamente a abundância relativa dos diferentes isômeros de peptídeo desamidado. Este método presume que a eficiência de fragmentação para todas as espécies isoméricas é a mesma e independente do sítio de desamidação. Versados na técnica entendem que uma série de variações desses métodos ilustrativos pode ser usada. Por exemplo, espectrômetros de massa adequados podem incluir, *por exemplo*, um espectrômetro de massa de tempo de voo quadrupolo (QTOF), como um Waters Xevo ou Agilent 6530 ou um instrumento orbitrap, como o Orbitrap Fusion ou Orbitrap Velos (Thermo Fisher). Os sistemas de cromatografia líquida adequados incluem, *por*

exemplo, o sistema Acquity UPLC da Waters ou os sistemas Agilent (séries 1100 ou 1200). O software de análise de dados adequado pode incluir, *por exemplo*, MassLynx (Waters), Pinpoint and Pepfinder (Thermo Fischer Scientific), Mascot (Matrix Science), Peaks DB (Bioinformatics Solutions). Ainda outras técnicas podem ser descritas, *por exemplo*, em X. Jin *et al*, Hu Gene Therapy Methods, Vol. 28, No. 5, pp. 255-267, publicado em 16 de junho de 2017.

[0062] Além de desamidações, outras modificações podem ocorrer, não resultando na conversão de um aminoácido em um resíduo de aminoácido diferente. Essas modificações podem incluir resíduos acetilados, isomerizações, fosforilações ou oxidações.

[0063] Modulação da Desamidação: Em certas modalidades, o AAV é modificado para alterar a glicina em um par asparagina-glicina, para reduzir a desamidação. Em outras modalidades, a asparagina é alterada para um aminoácido diferente, *por exemplo*, uma glutamina que desamida a uma taxa mais lenta; ou a um aminoácido que carece de grupos amida (*por exemplo*, glutamina e asparagina contêm grupos amida); e/ou a um aminoácido que carece de grupos amina (*por exemplo*, lisina, arginina e histidina contêm grupos amina). Como usado neste documento, aminoácidos sem amida ou grupos laterais de amina se referem a, *por exemplo*, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cistina, fenilalanina, tirosina ou triptofano e/ou prolina. As modificações, tais como descritas, podem ser em um, dois ou três dos pares asparagina-glicina encontrados na sequência de aminoácidos AAV codificada. Em certas modalidades, tais modificações não são feitas em todos os quatro pares asparagina - glicina. Assim, um método para reduzir a desamidação de AAV e/ou variantes de AAV engenheiradas com taxas de desamidação mais baixas. Adicionalmente, ou alternativamente, um ou mais outros aminoácidos amida podem ser alterados para

um aminoácido não amida para reduzir a desamidação do AAV. Em certas modalidades, um capsídeo de AAV mutante, conforme descrito neste documento, contém uma mutação em um par arginin-glicina, de modo que a glicina seja alterada para uma alanina ou uma serina. Um capsídeo de AAV mutante pode conter um, dois ou três mutantes em que o AAV de referência contém nativamente quatro pares NG. Em certas modalidades, um capsídeo de AAV pode conter um, dois, três ou quatro mutantes, onde o AAV de referência contém nativamente cinco pares de NG. Em certas modalidades, um capsídeo de AAV mutante contém apenas uma única mutação em um par NG. Em certas modalidades, um capsídeo de AAV mutante contém mutações em dois pares NG diferentes. Em certas modalidades, um capsídeo de AAV mutante contém mutação em dois pares NG diferentes que estão localizados em um local estruturalmente separado no capsídeo de AAV. Em certas modalidades, a mutação não está na região única de VP1. Em certas modalidades, uma das mutações está na região única de VP1. Opcionalmente, um capsídeo de AAV mutante não contém modificações nos pares NG, mas contém mutações para minimizar ou eliminar a desamidação em uma ou mais asparaginas, ou uma glutamina, localizada fora de um par NG.

[0064] Em certas modalidades, é fornecido um método para aumentar a potência de um rAAV que compreende a engenharia de um capsídeo de AAV que elimina um ou mais dos NGs no capsídeo de AAV de tipo selvagem. Em certas modalidades, a sequência de codificação para o "G" do "NG" é engenheirada para codificar outro aminoácido. Em certos exemplos abaixo, um "S" ou um "A" é substituído. No entanto, podem ser selecionadas outras sequências de codificação de aminoácidos adequadas. Ver, a tabela do Exemplo 1, aqui incorporada por referência.

[0065] Na proteína do capsídeo de AAVhu68, 4 resíduos (N57, N329, N452, N512) exibem rotineiramente níveis de desamidação >

70% e na maioria dos casos > 90% em vários lotes. Resíduos de asparagina adicionais (N94, N253, N270, N304, N409, N477 e Q599) também exibem níveis de desamidação de até ~ 20% em vários lotes. Os níveis de desamidação foram inicialmente identificados usando uma digestão de tripsina e verificados com uma digestão de quimotripsina.

[0066] O capsídeo de AAVhu68 contém subpopulações dentro das proteínas vp1, dentro das proteínas vp2 e dentro das proteínas vp3 que possuem modificações dos resíduos de aminoácidos preditos na SEQ ID NO: 2. Essas subpopulações incluem, no mínimo, certos resíduos de asparagina desamidada (N ou Asn). Por exemplo, certas subpopulações compreendem pelo menos uma, duas, três ou quatro posições de asparaginas (N) altamente desamidadas em pares asparagina-glicina na SEQ ID NO: 2 e, opcionalmente, compreendendo ainda outros aminoácidos desamidados, em que a desamidação resulta em uma mudança de aminoácido e outras modificações opcionais. SEQ ID NO: 3 fornece uma sequência de aminoácidos de um capsídeo de AAVhu68 modificado, ilustrando posições que podem ter alguma porcentagem de aminoácidos desamidados ou modificados de outra forma. As várias combinações destas e outras modificações estão aqui descritas.

[0067] Em outras modalidades, o método envolve aumentar o rendimento de um rAAV e, assim, aumentar a quantidade de um rAAV que está presente no sobrenadante antes de, ou sem a necessidade de lise celular. Este método envolve a engenharia de um gene do capsídeo de AAV VP1 para expressar uma proteína do capsídeo possuindo Glu na posição 67, Val na posição 157, ou ambos com base em um alinhamento tendo a numeração de aminoácidos da proteína do capsídeo de AAVhu68 vp1. Em outras modalidades, o método envolve a engenharia do gene do capsídeo de VP2 para expressar uma proteína do capsídeo com Val na posição 157. Em ainda outras modalidades, o rAAV tem um capsídeo modificado compreendendo as proteínas de capsídeo vp1 e

vp2 Glu na posição 67 e Val na posição 157.

[0068] Conforme usado neste documento, um "capsídeo de AAV9" é um capsídeo de AAV autoagrupado composto de várias proteínas AAV9 vp. As proteínas AAV9 vp são tipicamente expressas como variantes de splice alternativas codificadas por uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 23 ou uma sequência de pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99% dos mesmos, que codifica a sequência de aminoácidos vp1 de acesso ao GenBank: AAS99264. Em certas modalidades, "capsídeo de AAV9" inclui um AAV com uma sequência de aminoácidos que é 99% idêntica a AAS99264 ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 20. Ver também US7906111 e WO 2005/033321. Como usado aqui, "variantes de AAV9" incluem as descritas em, por exemplo, WO2016/049230, US 8.927.514, US 2015/0344911 e US 8.734.809.

[0069] Métodos de geração do capsídeo, sequências de codificação, portanto, e métodos para produção de rAAV foram descritos. Ver, *por exemplo*, Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) e US 2013/0045186A1.

[0070] O termo "homologia substancial" ou "similaridade substancial", quando se refere a um ácido nucleico, ou fragmento do mesmo, indica que, quando alinhado de maneira ideal com inserções ou deleções de nucleotídeos apropriadas com outro ácido nucleico (ou sua fita complementar), há identidade de sequência de nucleotídeos em pelo menos cerca de 95 a 99% das sequências alinhadas. Preferencialmente, a homologia é sobre a sequência de comprimento total, ou uma estrutura de leitura aberta desta, ou outro fragmento adequado que tem pelo menos 15 nucleotídeos de comprimento. Exemplos de fragmentos adequados estão descritos aqui.

[0071] Os termos "identidade de sequência", "identidade de sequência

percentual" ou "idêntico percentual" no contexto de sequências de ácido nucleico se referem aos resíduos nas duas sequências que são os mesmos quando alinhados para máxima correspondência. A comparação da duração da identidade da sequência pode ser superior ao comprimento total do genoma, é desejável o comprimento total de uma sequência de codificação de genes ou um fragmento de pelo menos cerca de 500 a 5000 nucleotídeos. No entanto, a identidade entre fragmentos menores, *por exemplo*, de pelo menos cerca de nove nucleotídeos, usualmente pelo menos cerca de 20 a 24 nucleotídeos, pelo menos cerca de 28 a 32 nucleotídeos, pelo menos cerca de 36 ou mais nucleotídeos, também pode ser desejada. Da mesma forma, a "porcentagem de identidade de sequência" pode ser prontamente determinada para sequências de aminoácidos, ao longo do comprimento total de uma proteína ou um fragmento da mesma. Adequadamente, um fragmento tem pelo menos cerca de 8 aminoácidos de comprimento e pode ter até cerca de 700 aminoácidos. Exemplos de fragmentos adequados estão descritos aqui.

[0072] O termo "homologia substancial" ou "similaridade substancial", ao se referir a aminoácidos ou fragmentos dos mesmos, indica que, quando alinhada de forma otimizada com inserções ou deleções de aminoácidos apropriadas com outro aminoácido (ou sua fita complementar), há identidade de sequência de aminoácidos em pelo menos cerca de 95 a 99% das sequências alinhadas. Preferencialmente, a homologia é sobre a sequência de comprimento total, ou uma proteína desta, *por exemplo*, uma proteína cap, uma proteína rep ou um fragmento desta que tem pelo menos 8 aminoácidos, ou mais desejavelmente, pelo menos 15 aminoácidos de comprimento. Exemplos de fragmentos adequados estão descritos aqui.

[0073] Pelo termo "altamente conservado" entende-se pelo menos 80% de identidade, preferencialmente pelo menos 90% de identidade e,

mais preferencialmente, mais de 97% de identidade. A identidade é rapidamente determinada por um versado na técnica, recorrendo a algoritmos e programas de computador conhecidos pelos versados na técnica.

[0074] Geralmente, ao se referir a “identidade”, “homologia” ou “semelhança” entre dois vírus adenoassociados diferentes, “identidade”, “homologia” ou “semelhança” é determinada em referência a sequências “alinhadas”. Sequências “alinhadas” ou “alinhamentos” referem-se a múltiplas sequências de ácido nucleico ou proteína (aminoácidos), frequentemente contendo correções para bases ou aminoácidos ausentes ou adicionais em comparação com uma sequência de referência. Nos exemplos, os alinhamentos de AAV são realizados usando as sequências AAV9 publicadas como um ponto de referência. Os alinhamentos são realizados usando qualquer um de uma variedade de Programas de Alinhamento de Sequência Múltipla publicamente ou comercialmente disponíveis. Exemplos de tais programas incluem, “Clustal Omega”, “Clustal W”, “CAP Sequence Assembly”, “MAP”, e “MEME”, que são acessíveis através de Web Servers na Internet. Outras fontes para tais programas são conhecidas dos versados na técnica. Como alternativa, os utilitários Vector NTI também são usados. Existem também vários algoritmos conhecidos na técnica que podem ser utilizados para medir a identidade da sequência de nucleotídeos, incluindo os contidos nos programas descritos acima. Como outro exemplo, as sequências polinucleotídicas podem ser comparadas utilizando o Fasta™, um programa em GCG Versão 6.1. O Fasta™ fornece alinhamentos e a porcentagem de identidade de sequência das regiões com melhor sobreposição entre as sequências de consulta e pesquisa. Por exemplo, a porcentagem de identidade de sequência entre sequências de ácidos nucleicos pode ser determinada usando o Fasta™ com seus parâmetros

padrão (tamanho de palavra 6 e fator NOPAM para a matriz de pontuação), conforme fornecido na versão 6.1 do GCG, aqui incorporada por referência. Programas de alinhamento de múltiplas sequências também 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 usado em configurações padrão, embora um versado na técnica possa alterar essas configurações conforme necessário. Alternativamente, um versado na técnica pode utilizar outro algoritmo ou programa de computador que proporciona pelo menos o nível de identidade ou alinhamento como aquele proporcionado pelos algoritmos e programas referenciados. Ver, *por exemplo*, J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27(13):2682-2690 (1999).

III. rAAV

[0075] O vírus adenoassociado recombinante (rAAV) foi descrito como veículos adequados para administração de genes. Normalmente, uma casete de expressão exógena compreendendo o transgene (por exemplo, o gene *GLB1*) para administrar pelo rAAV substitui os genes *rep* funcionais e o gene *cap* da fonte de AAV nativa, resultando em um vetor incompetente para replicação. Essas funções *rep* e *cap* são fornecidas em *trans* durante o sistema de produção de vetor, mas ausentes no rAAV final.

[0076] Como indicado anteriormente, é fornecido um rAAV que tem um capsídeo de AAV e um genoma de vetor que compreende, no mínimo, repetições terminais invertidas de AAV (ITRs) necessárias para empacotar o genoma do vetor no capsídeo, um gene *GLB1* e sequências regulatórias que direcionam a expressão desse. Em certas modalidades, o capsídeo de AAV é de AAVhu68. Os exemplos aqui utilizam

um genoma de vetor AAV de fita simples, mas em certas modalidades, um rAAV pode ser utilizado na invenção que contém o genoma de vetor AAV auto-complementar (sc).

[0077] Os elementos de controle regulatório necessários estão operacionalmente ligados ao gene (*por exemplo*, *GLB1*) de uma maneira que permite sua transcrição, tradução e/ou expressão em uma célula que pega o rAAV. Como usado neste documento, sequências “operacionalmente ligadas” incluem tanto as sequências de controle de expressão que são contíguas com o gene de interesse quanto as sequências de controle de expressão que atuam em *trans* ou a uma distância para controlar o gene de interesse. Essas sequências regulatórias incluem tipicamente, *por exemplo*, um ou mais de um promotor, um intensificador, um íntron, um poliA, um ligante de autoclivação (*por exemplo*, furina, furina-F2A, um IRES). Os exemplos abaixo utilizam o promotor CB7 (*por exemplo*, SEQ ID NO: 10), o promotor EF1a (*por exemplo*, SEQ ID NO: 11) ou o promotor ubiquitina C humana (UbC) (*por exemplo*, SEQ ID NO: 9) para a expressão de gene *GLB1*. No entanto, em certas modalidades, outros promotores, ou um promotor adicional, podem ser selecionados.

[0078] Em certas modalidades, além do gene *GLB1*, uma sequência não-AAV que codifica outro ou mais produtos gênicos pode ser incluída. Tais produtos gênicos podem ser, *por exemplo*, um peptídeo, polipeptídeo, proteína, molécula de RNA funcional (*por exemplo*, miRNA, inibidor de miRNA) ou outro produto gênico de interesse. Produtos gênicos úteis podem incluir miRNAs. miRNAs e outros pequenos ácidos nucleicos interferentes regulam a expressão de gene por meio da clivagem/degradação do transcrito do RNA alvo ou repressão translacional do RNA mensageiro alvo (mRNA). Os miRNAs são expressos nativamente, normalmente como produtos finais de RNA não traduzidos de 19-25. Os miRNAs exibem sua atividade por meio de interações específicas de

sequência com as regiões 3' não traduzidas (UTR) dos mRNAs alvo. Esses miRNAs expressos endogenamente formam precursores em hairpin que são subsequentemente processados em um duplex de miRNA e, posteriormente, em uma molécula de miRNA de fita simples "madura". Este miRNA maduro guia um complexo multiproteico, miRISC, que identifica o sítio alvo, *por exemplo*, nas regiões 3' UTR, de mRNAs alvo com base em sua complementaridade com o miRNA maduro.

[0079] O genoma do vetor de AAV normalmente compreende as sequências de repetição do terminal invertido 5' e 3' (ITR) que agem como *cis* (Ver, *por exemplo*, B. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)). As sequências de ITR têm cerca de 145 pares de bases (pb) de comprimento. De preferência, substancialmente todas as sequências que codificam as ITRs são utilizadas na molécula, embora algum grau de modificação menor dessas sequências seja permissível. A capacidade de modificar essas sequências ITR está dentro da habilidade na técnica. (Ver, *por exemplo*, textos como Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); and K. Fisher et al., J. Virol., 70:520 532 (1996)). Um exemplo de tal molécula empregada na presente invenção é um plasmídeo de "ação cis" contendo o transgene, no qual a sequência do transgene selecionada e os elementos regulatórios associados são flanqueados pelas sequências ITR 5' e 3' AAV. Numa modalidade, as ITRs são de um AAV diferente daquele que fornece um capsídeo. Em uma modalidade, as sequências de ITR são de AAV2. Uma versão abreviada da ITR 5', denominada Δ ITR, foi descrita na qual o sítio de resolução de terminal e sequência-D (*trs*) são eliminados. Em outras modalidades, são utilizadas as ITRs AAV 5'e 3' de comprimento total. No entanto, as ITRs de outras fontes de AAV podem ser selecionadas. Onde a fonte das ITRs é de AAV2 e o capsídeo

de AAV é de outra fonte de AAV, o rAAV resultante pode ser denominado pseudotipado. No entanto, outras configurações desses elementos podem ser adequadas.

[0080] Em certas modalidades, uma sequência promotora adicional ou alternativa pode ser incluída como parte das sequências de controle de expressão (sequências regulatórias), *por exemplo*, localizada entre a sequência 5' ITR selecionada e a sequência de codificação. Promotores constitutivos, promotores reguláveis (*ver, por exemplo*, WO 2011/126808 e WO 2013/04943), promotores específicos de tecido (por exemplo, um promotor específico de neurônio ou um promotor específico de célula glial, ou um promotor específico de CNS) ou um promotor responsivo a pistas fisiológicas podem ser utilizados nos rAAVs aqui descritos. O(s) promotor(es) podem ser selecionados a partir de fontes diferentes, *por exemplo*, intensificador/promotor imediato-precocce de citomegalovírus humano (CMV), o intensificador/promotor precocce de SV40, o promotor de polimovírus JC, proteína básica de mielina (MBP) ou promotores de proteína glial fibrilar acídica (GFAP), promotor associado à latência (LAP) do vírus herpes simplex (HSV-1), promotor de repetição do terminal longo (LTR) do vírus do rouse sarcoma (RSV), promotor específico de neurônio (NSE), promotor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), hSYN, promotor do hormônio de concentração de melanina (MCH), CBA, promotor de metaloproteína de matriz (MPP) e o promotor de beta-actina de frango. Outro promotor adequado pode incluir um promotor CB7. Além de um promotor, um genoma do vetor pode conter uma ou mais outras sequências de iniciação de transcrição, sequências de terminação de transcrição, sequências intensificadoras apropriadas, sinais de processamento de RNA eficientes, tais como sinais de emenda e poliadenilação (poliA); sequências que estabilizam o mRNA citoplasmático, por exemplo, WPRE; sequências que intensificam a eficiência da tradução (*ou seja*, sequência de

consenso Kozak); sequências que intensificam a estabilidade da proteína; e quando desejado, sequências que intensificam a secreção do produto codificado. Um exemplo de um intensificador adequado é o intensificador de CMV. Outros intensificadores adequados incluem os que são apropriados para as indicações desejadas do tecido alvo. Em uma modalidade, as sequências regulatórias compreendem um ou mais intensificadores de expressão. Em uma modalidade, as sequências regulatórias contêm dois ou mais intensificadores de expressão. Esses intensificadores podem ser iguais ou podem diferir uns dos outros. Por exemplo, um intensificador pode incluir um intensificador precoce imediato de CMV. Este intensificador pode estar presente em duas cópias localizadas adjacentes uma à outra. Alternativamente, as cópias duplas do intensificador podem ser separadas por uma ou mais sequências. Em ainda outra modalidade, o cassete de expressão contém ainda um íntron, *por exemplo*, o íntron de beta-actina de galinha. Em certas modalidades, o íntron é um íntron quimérico (CI) - um íntron híbrido que consiste em um doador de splice de beta-globina humana e elementos aceitadores de splice de imunoglobulina G (IgG). Outros íntrons adequados incluem os conhecidos na técnica, *por exemplo*, como são descritos em WO 2011/126808. Exemplos de sequências poliA adequadas incluem, *por exemplo*, SV40, SV50, hormônio de crescimento bovino (bGH), hormônio de crescimento humano e poliAs sintéticos. Opcionalmente, uma ou mais sequências podem ser selecionadas para estabilizar o mRNA. Um exemplo de tal sequência é uma sequência WPRE modificada, que pode ser projetada a montante da sequência poliA e a jusante da sequência de codificação (ver, *e.g.*, MA Zanta-Boussif, *et al*, *Gene Therapy* (2009) 16: 605-619). Em certas modalidades, nenhuma sequência WPRE está presente.

[0081] Em certas modalidades, são construídos genomas de vetor que compreendem um 5' AAV ITR - promotor - intensificador opcional -

íntron opcional - gene *GLB1* - poliA - 3' ITR. Em certas modalidades, os ITRs são de AAV2. Em certas modalidades, mais de um promotor está presente. Em certas modalidades, o intensificador está presente no genoma do vetor. Em certas modalidades, mais de um intensificador está presente. Em certas modalidades, um íntron está presente no genoma do vetor. Em certas modalidades, o intensificador e o íntron estão presentes. Em certas modalidades, o íntron é um íntron quimérico (CI) - um íntron híbrido que consiste em um doador de splice de beta-globina humana e elementos aceptadores de splice de imunoglobulina G (IgG). Em certas modalidades, o poliA é um SV40 poli A (*isto é*, um sinal de poliadenação (PolyA) derivado dos genes tardios do vírus símio 40 (SV40)). Em certas modalidades, o poliA é uma beta-globina de coelho (RBG) poli A. Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende um 5' AAV ITR - promotor CB7 - gene *GLB1* - RBG poli A - 3' ITR. Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende um 5' AAV ITR - promotor EF1a - gene *GLB1* - SV40 poli A - 3' ITR. Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende um 5' AAV ITR - promotor UbC - gene *GLB1* - SV40 poli A - 3' ITR. Em certas modalidades, o gene *GLB1* tem a SEQ ID NO: 5. Em certas modalidades, o gene *GLB1* tem a SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o gene *GLB1* tem a SEQ ID NO: 7. Em certas modalidades, o gene *GLB1* tem a SEQ ID NO: 8. Em certas modalidades, o genoma do vetor tem a sequência da SEQ ID NO: 12 ou uma sequência de pelo menos cerca de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%, a cerca de 99,9% idêntica à mesma. Em certas modalidades, o genoma do vetor tem a sequência da SEQ ID NO: 13 ou uma sequência de pelo menos cerca de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%, a cerca de 99,9% idêntica à mesma. Em certas modalidades, o genoma do vetor tem a sequência da SEQ ID NO: 14 ou uma sequência de pelo menos cerca de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou

99%, a cerca de 99,9% idêntica à mesma. Em certas modalidades, o genoma do vetor tem a sequência da SEQ ID NO: 15 ou uma sequência de pelo menos cerca de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%, a cerca de 99,9% idêntica à mesma. Em certas modalidades, o genoma do vetor tem a sequência da SEQ ID NO: 16 ou uma sequência de pelo menos cerca de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%, a cerca de 99,9% idêntica à mesma.

IV. Produção de rAAV

[0082] Para uso na produção de um vetor viral AAV (*por exemplo*, um AAV recombinante (r)), os genomas do vetor podem ser transportados em qualquer vetor adequado, *por exemplo*, um plasmídeo, que é distribuído a uma célula hospedeira de empacotamento. Os plasmídeos úteis nesta invenção podem ser geneticamente modificados de modo que sejam adequados para replicação e empacotamento *in vitro* em células procarióticas, células de inseto, células de mamífero, entre outras. As técnicas de transfecção adequadas e as células hospedeiras de empacotamento são conhecidas e/ou podem ser prontamente concebidas por um versado na técnica. Um processo de produção ilustrativo é fornecido nas FIGs 12A - 12B.

[0083] Os métodos para gerar e isolar AAVs adequados para uso como vetores são conhecidos na técnica. Ver, em geral, *por exemplo*, Grieger & Samulski, 2005, Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications, *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145; Buning *et al.*, 2008, Recent developments in adeno-associated virus vector technology, *J. Gene Med.* 10:717-733; e as referências citadas abaixo, cada uma das quais é aqui incorporada por referência na sua totalidade. Para empacotar um gene em vírions, as ITRs são os únicos componentes de AAV necessários *em cis* no mesmo construto que a molécula de ácido nucleico que

contém o gene. Os genes *cap* e *rep* podem ser fornecidos em *trans*.

[0084] Em uma modalidade, o elemento genético selecionado pode ser distribuído a uma célula de empacotamento de AAV por qualquer método adequado, incluindo transfecção, eletroporação, distribuição de lipossomas, técnicas de fusão de membranas, grânulos revestidos com DNA de alta velocidade, infecção viral e fusão de protoplastos. Células de empacotamento de AAV estáveis também podem ser feitas. Os métodos utilizados para fazer tais construtos são conhecidos daqueles versados na manipulação de ácido nucleico e incluem engenharia genética, engenharia recombinante e técnicas sintéticas. Ver, *por exemplo*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

[0085] O termo "intermediário de AAV" ou "intermediário de vetor de AAV" se refere a um capsídeo de rAAV agrupado que não possui as sequências genômicas desejadas empacotadas nele. Eles também podem ser chamados de capsídeo "vazio". Tal capsídeo pode conter nenhuma sequência genômica detectável de um cassete de expressão, ou apenas sequências genômicas parcialmente empacotadas que são insuficientes para atingir a expressão do produto de gene (por exemplo, β -gal). Esses capsídeos vazios não são funcionais para transferir o gene de interesse para uma célula hospedeira. Em certas modalidades, o rAAV.GLB1 ou a composição aqui descrita pode ser pelo menos cerca de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 99,9% livre de um intermediário AAV, isto é, contendo menos de 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ou 0,1% de intermediários de AAV.

[0086] O vírus adenoassociado recombinante (AAV) aqui descrito pode ser gerado usando técnicas conhecidas. Ver, *por exemplo*, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. Tal método envolve a cultura de uma célula hospedeira que contém uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína do capsídeo de

AAV; um gene *rep* funcional; um cassete de expressão composto por, no mínimo, repetições terminais invertidas (ITRs) de AAV e um transgene; e funções auxiliares suficientes para permitir o empacotamento do cassete de expressão na proteína do capsídeo de AAV. Métodos de geração do capsídeo, sequências de codificação, portanto, e métodos para produção de vetores virais de rAAV foram descritos. Ver, *por exemplo*, Gao, *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) e US 2013/0045186A1.

[0087] Em uma modalidade, é fornecida uma cultura de células de produção útil para a produção de um AAV recombinante (tal como rAAVhu68). Tal cultura de células contém um ácido nucleico que expressa a proteína do capsídeo de AAV na célula hospedeira; uma molécula de ácido nucleico adequada para empacotamento no capsídeo de AAV, *por exemplo*, um genoma de vetor que contém ITRs de AAV e um gene GLB1 operacionalmente ligado a sequências regulatórias que direcionam a expressão do gene em uma célula (por exemplo, uma célula em um paciente em necessidade); e funções *rep* de AAV e funções auxiliares de adenovírus suficientes para permitir o empacotamento do genoma do vetor no capsídeo de AAV recombinante. Em uma modalidade, a cultura de células é composta de células de mamíferos (*por exemplo*, células 293 de rim embrionário humano, entre outras) ou células de inseto (*por exemplo*, células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9)). Em certas modalidades, o baculovírus fornece as funções auxiliares necessárias para empacotar o genoma do vetor no capsídeo de AAVhu68 recombinante.

[0088] Opcionalmente, as funções *rep* são fornecidas por um AAV diferente do AAV fonte de capsídeo, AAVhu68. Em certas modalidades, pelo menos partes das funções *rep* são de AAVhu68. Em outra modalidade, a proteína *rep* é uma proteína *rep* heteróloga diferente de AA-

Vhu68 rep, por exemplo, mas não limitado a, proteína rep de AAV1, proteína rep de AAV2, proteína rep de AAV3, proteína rep de AAV4, proteína rep de AAV5, proteína rep de AAV6, proteína rep de AAV7, proteína rep de AAV8; ou rep 78, rep 68, rep 52, rep 40, rep68/78 e rep40/52; ou um fragmento da mesma; ou outra fonte. Qualquer uma dessas sequências de capsídeo de AAVhu68 ou AAV mutante pode estar sob o controle de sequências de controle regulatórias exógenas que direcionam sua expressão em uma célula hospedeira.

[0089] Em uma modalidade, as células são fabricadas em uma cultura de células adequada (*por exemplo*, HEK 293 ou Sf9) ou suspensão. Os métodos para fabricar os vetores de terapia genética aqui descritos incluem métodos bem conhecidos na técnica, tais como geração de DNA de plasmídeo utilizado para a produção dos vetores de terapia genética, geração vetorial e purificação vetorial. Em algumas modalidades, o vetor de terapia genética é rAAV e os plasmídeos gerados são um plasmídeo cis de AAV que codifica o genoma do vetor AAV compreendendo o gene de interesse, um plasmídeo trans de AAV contendo genes rep e cap de AAV e um plasmídeo auxiliar de adenovírus. O processo de geração vetorial pode incluir etapas do método, como iniciação de cultura celular, passagem de células, semeadura de células, transfecção de células com o DNA de plasmídeo, permuta de meio pós-transfecção para meio livre de soro e colheita de células contendo vetor e meio cultural. As células e os meios de cultura contendo vetor colhidos são aqui referidos como colheita de células brutas. Em ainda outro sistema, os vetores de terapia genética são introduzidos em células de inseto por infecção com vetores baseados em baculovírus. Para revisões sobre estes sistemas de produção, ver geralmente, *por exemplo*, Zhang *et al.*, 2009, "Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," *Human Gene Therapy* 20:922-929, o conteúdo de cada um dos quais está aqui incorporado

por referência na sua totalidade. Métodos de produção e utilização destes e outros sistemas de produção de AAV são também descritos nas seguintes Patentes U.S., o conteúdo de cada um dos quais é aqui incorporado por referência na sua totalidade: 5.139.941; 5.741.683; 6.057.152; 6.204.059; 6.268.213; 6.491.907; 6.660.514; 6.951.753; 7.094.604; 7.172.893; 7.201.898; 7.229.823; e 7.439.065.

[0090] A colheita de células brutas pode depois ser submetida a etapas do método, tais como concentração da colheita do rAAV, diafiltração da colheita do rAAV, microfluidização da colheita do rAAV, digestão por nuclease da colheita do rAAV, filtração do intermediário microfluidizado, purificação bruta por cromatografia, purificação bruta por ultracentrifugação, permuta de tampão por filtração de fluxo tangencial e/ou formulação e filtração para preparar o rAAV em massa.

[0091] Uma purificação por cromatografia de afinidade em duas etapas em alta concentração de sal seguida por cromatografia em resina de troca aniônica é usada para purificar o medicamento do rAAV e remover os capsídeos vazios. Esses métodos são descritos em mais detalhes em WO 2017/160360, Publicação de Patente Internacional No. PCT/US2016/065970, depositado em 9 de dezembro de 2016 e seus documentos prioritários, Pedido de Patente 62/322.071, depositados em 13 de abril de 2016 e 62/226.357, depositado em 11 de dezembro de 2015 e intitulados "Scalable Purification Method for AAV9", que é incorporado por referência aqui.

[0092] Para calcular o teor de partículas vazias e cheias, os volumes da banda VP3 para uma amostra selecionada (*por exemplo*, nos exemplos aqui, uma preparação purificada por gradiente de iodixanol onde # de cópias de genoma (GC) = # de partículas) são representados graficamente contra partículas de GC carregadas. A equação linear resultante ($y = mx + c$) é usada para calcular o número de partículas nos volumes de banda dos picos do artigo de teste. O número de partículas

(pt) por 20 μ L carregado é, então, multiplicado por 50 para dar partículas (pt)/mL. Pt/mL dividido por GC/mL dá a razão de partículas para cópias do genoma (pt/GC). Pt/mL-GC/mL dá pt/mL vazio. O pt/mL vazio dividido por pt/mL e x 100 proporciona a porcentagem de partículas vazias.

[0093] Geralmente, os métodos para o ensaio de capsídeos vazios e partículas de rAAV com genomas de vetor empacotados são conhecidos na técnica. Ver, *por exemplo*, Grimm *et al.*, *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer *et al.*, *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128. Para testar o capsídeo desnaturado, os métodos incluem submeter o estoque de AAV tratado a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, consistindo em qualquer gel capaz de separar as três proteínas do capsídeo, por exemplo, um gradiente de gel contendo Tris-acetato a 3-8% no tampão, depois levar o gel até o material da amostra ser separado, e transferir o gel para as membranas de nylon ou nitrocelulose, de preferência nylon. Os anticorpos anticapsídeo AAV são então utilizados como anticorpos primários que se ligam a proteínas de capsídeo desnaturadas, de preferência um anticorpo monoclonal anticapsídeo AAV, mais preferencialmente o anticorpo monoclonal anti-AAV-2 B1 (Wobus *et al.*, *J. Virol.* (2000) 74:9281-9293). Um anticorpo secundário é, então, usado, um que se liga ao anticorpo primário e contém um meio para detectar ligação com o anticorpo primário, mais preferencialmente, um anticorpo anti-IgG contendo uma molécula de detecção ligada covalentemente a este, mais preferencialmente um anticorpo de ovelha anti-IgG de camundongo ligado covalentemente a peroxidase de rábano. Um método para detectar a ligação é utilizado para determinar semiquantitativamente a ligação entre os anticorpos primário e secundário, de preferência um método de detecção capaz de detectar emissões de isótopos radioativos, radiação eletromagnética ou alterações colorimétricas, mais preferencialmente um kit de detecção de quimiluminescência. Por exemplo, para SDS-PAGE, amostras das frações da coluna podem ser

tomadas e aquecidas em tampão de carga de SDS-PAGE contendo agente de redução (*por exemplo*, DTT) e proteínas do capsídeo foram resolvidas em géis de poliacrilamida pré-moldados (*por exemplo*, Novex). A coloração com prata pode ser realizada usando o SilverXpress (Invitrogen, CA) de acordo com as instruções do fabricante ou outro método de coloração adequado, *por exemplo*, manchas SYPRO de rubi ou coomassie. Numa modalidade, a concentração de genomas vetoriais de AAV (vg) em frações da coluna pode ser medida por PCR quantitativa em tempo real (Q-PCR). As amostras são diluídas e digeridas com DNase I (ou outra nuclease adequada) para remover o DNA exógeno. Após a inativação da nuclease, as amostras são posteriormente diluídas e amplificadas utilizando iniciadores e uma sonda fluorogênica TaqMan™ específica para a sequência de DNA entre os iniciadores. O número de ciclos necessários para atingir um nível definido de fluorescência (ciclo de limiar, Ct) é medido para cada amostra num Sistema de Detecção de Sequências Applied Biosystems Prism 7700. DNA plasmídico contendo sequências idênticas às contidas no rAAV é empregado para gerar uma curva padrão na reação Q-PCR. Os valores do limiar do ciclo (Ct) obtidos a partir das amostras são utilizados para determinar o título do genoma vetorial normalizando-o ao valor Ct da curva padrão do plasmídeo. Ensaio de ponto final baseados na PCR digital também podem ser usados.

[0094] Em um aspecto, é utilizado um método de q-PCR otimizado que utiliza uma serina protease de largo espectro, *por exemplo*, proteinase K (tal como está comercialmente disponível na Qiagen). Mais particularmente, o ensaio de título de genoma qPCR otimizado é semelhante a um ensaio padrão, exceto que após a digestão com DNase I, as amostras são diluídas com tampão de proteinase K e tratadas com proteinase K seguida de inativação por calor. Adequadamente, as amostras são diluídas com tampão de proteinase K numa quantidade

igual ao tamanho da amostra. O tampão de proteinase K pode ser concentrado até 2 vezes ou mais alto. Tipicamente, o tratamento com proteinase K é de cerca de 0,2 mg/mL, mas pode variar entre 0,1 mg/mL e cerca de 1 mg/mL. A etapa de tratamento é geralmente conduzida a cerca de 55 °C durante cerca de 15 minutos, mas pode ser realizada a uma temperatura mais baixa (*por exemplo*, cerca de 37 °C a cerca de 50 °C) durante um período de tempo mais longo (*por exemplo*, cerca de 20 minutos a cerca de 30 minutos), ou uma temperatura mais alta (*por exemplo*, até cerca de 60 °C) por um período de tempo mais curto (*por exemplo*, cerca de 5 a 10 minutos). Similarmente, a inativação do calor geralmente, a cerca de 95 °C durante cerca de 15 minutos, mas a temperatura pode ser diminuída (*por exemplo*, cerca de 70 a cerca de 90°C) e o tempo prolongado (*por exemplo*, cerca de 20 minutos a cerca de 30 minutos). As amostras são então diluídas (*por exemplo*, 1.000 vezes) e submetidas à análise TaqMan como descrito no ensaio padrão.

[0095] Além disso, ou alternativamente, a PCR digital por gota (ddPCR) pode ser usada. Por exemplo, foram descritos métodos para determinar títulos do genoma de vetores AAV de fita simples e autocomplementares por ddPCR. Ver, *por exemplo*, M. Lock *et al*, Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14.

[0096] Em resumo, o método para separar partículas de rAAVhu68 tendo sequências genômicas empacotadas de intermediários AAVhu68 deficientes em genoma envolve submeter uma suspensão compreendendo partículas virais AAVhu68 recombinantes e intermediários de capsídeo AAVhu68 a cromatografia líquida de desempenho rápido, em que as partículas virais AAVhu68 e intermediários AAVhu68 estão ligados a uma resina de troca aniônica forte equilibrada a um pH de cerca de 10,2 e submetida a um gradiente de sal enquanto monitora o eluato quanto à absorbância ultravioleta em cerca de 260 nanômetros (nm) e

cerca de 280 nm. Embora seja menos ideal para rAAVhu68, o pH pode estar na faixa de cerca de 10,0 a 10,4. Neste método, os capsídeos completos de AAVhu68 são coletados a partir de uma fração que é eluída quando a razão de A260/A280 atinge um ponto de inflexão. Em um exemplo, para a etapa de Cromatografia de afinidade, o produto diafiltrado pode ser aplicado a uma resina de afinidade Capture Select™ Poros- AAV2/9 (Life Technologies) que captura com eficiência o sorotipo AAV2/hu68. Sob essas condições iônicas, uma porcentagem significativa de DNA e proteínas celulares residuais flui através da coluna, enquanto as partículas do AAV são capturadas com eficiência.

[0097] Também é fornecido aqui um vetor de produção (tal como um plasmídeo) ou uma célula hospedeira para produzir o genoma do vetor e/ou o rAAV.GLB1 conforme aqui descrito. Tal como aqui utilizado, um vetor de produção que transporta um genoma de vetor para uma célula hospedeira para gerar e/ou empacotar um vetor de terapia gênica como aqui descrito.

[0098] O rAAV.GLB1 (por exemplo, rAAVhu68.GLB1) é suspenso em uma composição adequada fisiologicamente compatível (*por exemplo*, uma solução salina tamponada). Esta composição pode ser congelada para armazenamento, posteriormente descongelada e opcionalmente diluída com um diluente adequado. Alternativamente, o rAAV.GLB1 pode ser preparado como uma composição que é adequada para administração a um paciente sem prosseguir com as etapas de congelamento e descongelamento.

V. Composições e Usos

[0099] São fornecidas aqui composições contendo pelo menos um estoque de rAAV (*por exemplo*, um estoque de rAAVhu68 ou um estoque de rAAVhu68 mutante) e um carreador, excipiente e/ou conservante opcional. Um estoque de rAAV se refere a uma pluralidade de rAAV que são iguais, *por exemplo*, tais como nas quantidades descritas a seguir

na discussão de concentrações e unidades de dosagem.

[00100] Em particular, a composição é para o tratamento da gangliosidose GM1. Em uma modalidade, a composição é adequada para administração a um paciente com gangliosidose GM1 ou um paciente com gangliosidose infantil que tem 18 meses de idade ou menos. Em uma modalidade, a composição é adequada para administração a um paciente em necessidade da mesma para melhorar os sintomas da gangliosidose GM1 ou melhorar os sintomas neurológicos da gangliosidose GM1. Em algumas modalidades, a composição é para uso na fabricação de um medicamento para o tratamento da gangliosidose GM1.

[00101] Como usado neste documento, "carreador" inclui todo e qualquer solvente, meio de dispersão, veículos, revestimentos, diluentes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardamento da absorção, tampões, soluções transportadoras, suspensões, coloides e semelhantes. A utilização de tais meios e agentes para substâncias farmacologicamente ativas é bem conhecida na técnica. Ingredientes ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições.

[00102] Em certas modalidades, é fornecida neste documento uma composição compreendendo o rAAV.GLB1 conforme descrito neste documento e um carreador farmacologicamente aceitável. A frase "farmacologicamente aceitável" refere-se a entidades e composições moleculares que não produzem uma reação indesejável alérgica ou semelhante quando administradas a um hospedeiro.

[00103] Em certas modalidades, é fornecida neste documento uma composição compreendendo o rAAV.GLB1 conforme descrito neste documento e um veículo de administração. Os veículos de distribuição, tais como lipossomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas e semelhantes, podem ser utilizados para

a introdução das composições da presente invenção em células hospedeiras adequadas. Em particular, os genomas do vetor administrado de rAAV podem ser formulados para distribuição seja encapsulado em uma partícula lipídica, um lipossoma, uma vesícula, uma nanoesfera ou uma nanopartícula ou semelhante.

[00104] Em uma modalidade, uma composição inclui uma formulação final adequada para administração a um sujeito/paciente, *por exemplo*, é uma suspensão líquida aquosa tamponada a um pH fisiologicamente compatível e concentração de sal. Opcionalmente, um ou mais tensoativos estão presentes na formulação. Em outra modalidade, a composição pode ser transportada como um concentrado que é diluído para administração a um sujeito. Em outras modalidades, a composição pode ser liofilizada e reconstituída no momento da administração.

[00105] Um tensoativo adequado, ou combinação de tensoativos, pode ser selecionado de tensoativos não iônicos que não sejam tóxicos. Em uma modalidade, um tensoativo copolímero de bloco difuncional que termina em grupos hidroxila primários é selecionado, *por exemplo*, como Pluronic® F68 [BASF], também conhecido como Poloxâmero 188, que tem um pH neutro, tem um peso molecular médio de 8400. Outros tensoativos e outros poloxâmeros podem ser selecionados, *ou seja*, copolímeros triblocos não iônicos compostos de uma cadeia hidrofóbica central de polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) flanqueada por duas cadeias hidrofílicas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)), SOLUTOL HS 15 (Macrogol-15 Hidroxiestearato), LABRASOL (Glicerídeo polioxi caprílico), éter oleílico de polioxi 10, TWEEN (ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitano), etanol e polietileno glicol. Numa modalidade, a formulação contém um poloxâmero. Estes copolímeros são comumente nomeados com a letra "P" (para poloxâmero) seguidos de três dígitos: os dois primeiros dígitos x 100 dão a massa molecular aproxi-

mada do núcleo de polioxipropileno, e o último dígito x 10 indica o percentual de polioxietileno. Em uma modalidade, o Poloxamer 188 é selecionado. Em uma modalidade, o tensoativo pode estar presente em uma quantidade de até cerca de 0,0005% a cerca de 0,001% (com base na proporção em peso, p/p%) da suspensão. Em outra modalidade, o tensoativo pode estar presente em uma quantidade de até cerca de 0,0005% a cerca de 0,001% (com base na razão de volume, v/v%) da suspensão. Em ainda outra modalidade, o tensoativo pode estar presente em uma quantidade de até cerca de 0,0005% a cerca de 0,001% da suspensão, em que n% indica n gramas por 100 mL da suspensão.

[00106] O rAAV.GLB1 é administrado em quantidades suficientes para transfectar as células e fornecer níveis suficientes de transferência e expressão de gene para fornecer um benefício terapêutico sem efeitos adversos indevidos, ou com efeitos fisiológicos medicamente aceitáveis, que podem ser determinados pelos versados nas técnicas médicas. As vias convencionais e farmacologicamente aceitáveis de administração incluem, mas não estão limitadas a, distribuição direta a um órgão desejado (*por exemplo*, o cérebro, CSF, fígado (opcionalmente através da artéria hepática), pulmão, coração, olho, rim,), por via de administração oral, inalação, intranasal, intratecal, intratraqueal, intra-arterial, intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intradérmica, intraparenquimal, intracerebroventricular, intratecal, ICM, punção lombar e outras vias parentais. As vias de administração podem ser combinadas, se desejado.

[00107] As dosagens do rAAV.GLB1 dependem principalmente de fatores como a condição a ser tratada, a idade, o peso e a saúde do paciente e, portanto, podem variar entre os pacientes. Por exemplo, uma dosagem humana terapeuticamente eficaz do rAAV.GLB1 está geralmente na faixa de cerca de 25 a cerca de 1000 microlitros a cerca de 100 mL de solução contendo concentrações de cerca de 1×10^9 a $1 \times$

10^{16} cópias do genoma do vetor. Em certas modalidades, um volume de cerca de 1 mL a cerca de 15 mL, ou cerca de 2,5 mL a cerca de 10 mL ou cerca de 5 mL de suspensão é administrado. Em certas modalidades, um volume de cerca de 1, cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 11, cerca de 12, cerca de 13, cerca de 14 ou cerca de 15 mL de suspensão é administrado.

[00108] Em algumas modalidades, a composição é para administração em uma dose única. Em algumas modalidades, a composição é para administração em doses múltiplas.

[00109] Em certas modalidades, uma dose de cerca de 8×10^{12} cópias do genoma (GC) de rAAV.GLB1 por paciente a cerca de 3×10^{14} GC de rAAV.GLB1 por paciente é administrada no volume aqui descrito. Em certas modalidades, uma dose de cerca de 2×10^{12} GC de rAAV.GLB1 por paciente a cerca de 3×10^{14} GC de rAAV.GLB1 por paciente, ou de cerca de 2×10^{13} GC de rAAV.GLB1 por paciente a cerca de 3×10^{14} GC de rAAV.GLB1 por paciente, ou de cerca de 8×10^{13} GC de rAAV.GLB1 por paciente a cerca de 3×10^{14} GC de rAAV.GLB1 por paciente, ou cerca de 9×10^{13} GC de rAAV.GLB1 por paciente, ou cerca de $8,9 \times 10^{12}$ a $2,7 \times 10^{14}$ GC no total são administrados no volume.

[00110] Em certas modalidades, uma dose de 1×10^{10} GC de rAAV.GLB1 por g de massa cerebral (GC/g de massa cerebral) a $3,4 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral é administrada no volume como aqui descrito. Em certas modalidades, uma dose de $3,4 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral a $3,4 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral, ou de $1,0 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral a $3,4 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral, ou cerca de $1,1 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral, ou de cerca de $1,1 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral a cerca de $3,3 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral são administrados no volume. Em certas modalidades, uma dose de cerca de $3,0 \times 10^9$, cerca de $4,0 \times 10^9$, cerca de $5,0 \times 10^9$, cerca de $6,0 \times 10^9$, cerca de $7,0$

$\times 10^9$, cerca de $8,0 \times 10^9$, cerca de $9,0 \times 10^9$, cerca de $1,0 \times 10^{10}$, cerca de $1,1 \times 10^{10}$, cerca de $1,5 \times 10^{10}$, cerca de $2,0 \times 10^{10}$, cerca de $2,5 \times 10^{10}$, cerca de $3,0 \times 10^{10}$, cerca de $3,3 \times 10^{10}$, cerca de $3,5 \times 10^{10}$, cerca de $4,0 \times 10^{10}$, cerca de $4,5 \times 10^{10}$, cerca de $5,0 \times 10^{10}$, cerca de $5,5 \times 10^{10}$, cerca de $6,0 \times 10^{10}$, cerca de $6,5 \times 10^{10}$, cerca de $7,0 \times 10^{10}$, cerca de $7,5 \times 10^{10}$, cerca de $8,0 \times 10^{10}$, cerca de $8,5 \times 10^{10}$, cerca de $9,0 \times 10^{10}$, cerca de $9,5 \times 10^{10}$, cerca de $1,0 \times 10^{11}$, cerca de $1,1 \times 10^{11}$, cerca de $1,5 \times 10^{11}$, cerca de $2,0 \times 10^{11}$, cerca de $2,5 \times 10^{11}$, cerca de $3,0 \times 10^{11}$, cerca de $3,3 \times 10^{11}$, cerca de $3,5 \times 10^{11}$, cerca de $4,0 \times 10^{11}$, cerca de $4,5 \times 10^{11}$, cerca de $5,0 \times 10^{11}$, cerca de $5,5 \times 10^{11}$, cerca de $6,0 \times 10^{11}$, cerca de $6,5 \times 10^{11}$, cerca de $7,0 \times 10^{11}$, cerca de $7,5 \times 10^{11}$, cerca de $8,0 \times 10^{11}$, cerca de $8,5 \times 10^{11}$, cerca de $9,0 \times 10^{11}$ GC por grama de massa cerebral é administrado no volume. Em certas modalidades, a dose reflete a dose eficaz mínima mostrada em um modelo animal GM1 e ajustada para uso em um paciente humano com base em cópias do genoma por grama de massa cerebral. Em uma modalidade, a dose para uso em um paciente humano é calculada usando as massas cerebrais presumidas listadas na tabela a seguir.

Idade do Sujeito	Massa cerebral presumida (g)
≥ 4 a <9 meses	600
≥ 9 a <18 meses	1000
≥ 18 meses a <3 anos	1100
≥ 3 anos	1300

[00111] A dosagem é ajustada para equilibrar o benefício terapêutico contra quaisquer efeitos colaterais e essas dosagens podem variar dependendo da aplicação terapêutica para a qual o rAAV.GLB1 é empregado. Os níveis de expressão do produto transgene (por exemplo, β -gal) podem ser monitorados para determinar a frequência de dosagem que resulta em rAAV.GLB1, preferencialmente rAAV contendo o mini-

gene (por exemplo, o gene *GLB1*). Opcionalmente, regimes de dosagem semelhantes aos descritos para fins terapêuticos podem ser utilizados para imunização usando as composições da invenção.

[00112] As composições de vírus com defeito para replicação podem ser formuladas em unidades de dosagem para conter uma quantidade de vírus com defeito para replicação (por exemplo, rAAV.GLB1, rAAVhu68.GLB1 ou rAAVhu68.UbC.GLB1) que está na faixa de cerca de $1,0 \times 10^9$ GC a cerca de $1,0 \times 10^{16}$ GC (para tratar um sujeito), incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa, e preferencialmente $1,0 \times 10^{12}$ GC a $1,0 \times 10^{14}$ GC para um paciente humano. Em uma modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , ou 9×10^9 GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , ou 9×10^{10} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , ou 9×10^{11} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , ou 9×10^{12} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou frações dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , ou 9×10^{13} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou frações dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} , ou 9×10^{14} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou frações dentro da faixa.

Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} , ou 9×10^{15} GC por dose incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em uma modalidade, para a aplicação humana, a dose pode variar de 1×10^{10} a cerca de 1×10^{12} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou frações dentro da faixa.

[00113] Estas doses anteriores podem ser administradas em uma variedade de volumes de formulação de carreador, excipiente ou tampão, variando de cerca de 25 a cerca de 1.000 microlitros, ou volumes maiores incluindo todos os números dentro da faixa, dependendo do tamanho da área a ser tratada, o título viral usado, a via de administração e o efeito desejado do método. Numa modalidade, o volume de transportador, excipiente ou tampão é pelo menos cerca de 25 μL . Numa modalidade, o volume é de cerca de 50 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 75 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 100 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 125 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 150 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 175 μL . Ainda numa outra modalidade, o volume é de cerca de 200 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 225 μL . Ainda numa outra modalidade, o volume é de cerca de 250 μL . Ainda numa outra modalidade, o volume é de cerca de 275 μL . Ainda numa outra modalidade, o volume é de cerca de 300 μL . Ainda numa outra modalidade, o volume é de cerca de 325 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 350 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 375 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 400 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 450 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 500 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 550 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 600 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 650 μL . Numa outra modalidade, o volume é de cerca de 700

μL. Em uma outra modalidade, o volume é de cerca de 700 a 1.000 μL. [00114] Em certas modalidades, a dose pode estar na faixa de cerca de 1×10^9 GC /g de massa cerebral a cerca de 1×10^{12} GC /g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose pode estar na faixa de cerca de 3×10^{10} GC /g de massa cerebral a cerca de 3×10^{11} GC /g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose pode estar no intervalo de cerca de 5×10^{10} GC/g de massa cerebral a cerca de $1,85 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral.

[00115] Em uma modalidade, os construtos virais podem ser distribuídos em doses de pelo menos cerca de 1×10^9 GC a cerca de 1×10^{15} , ou cerca de 1×10^{11} a 5×10^{13} GC. Os volumes adequados para distribuição destas doses e concentrações podem ser determinados por um versado na técnica. Por exemplo, volumes de cerca de 1 μL a 150 mL podem ser selecionados, com os volumes mais altos sendo selecionados para adultos. Tipicamente, para recém-nascidos, um volume adequado é de cerca de 0,5 mL a cerca de 10 mL, para bebês mais velhos, podem ser selecionados cerca de 0,5 mL a cerca de 15 mL. Para crianças pequenas, um volume de cerca de 0,5 mL a cerca de 20 mL pode ser selecionado. Para crianças, volumes de até 30 mL podem ser selecionados. Para pré-adolescentes e adolescentes, volumes de até 50 mL podem ser selecionados. Em ainda outras modalidades, um paciente pode receber uma administração intratecal em um volume de cerca de 5 mL a cerca de 15 mL são selecionados, ou cerca de 7,5 mL a cerca de 10 mL. Outros volumes e dosagens adequados podem ser determinados. A dosagem pode ser ajustada para equilibrar o benefício terapêutico contra quaisquer efeitos colaterais e essas dosagens podem variar dependendo da aplicação terapêutica para a qual o rAAV.GLB1 é empregado.

[00116] O rAAV.GLB1 descrito anteriormente pode ser administrado às células hospedeiras de acordo com métodos publicados. O rAAV, de

preferência suspenso num transportador fisiologicamente compatível, pode ser administrado a um paciente mamífero humano ou não humano. Em certas modalidades, para administração a um paciente humano, o rAAV é adequadamente suspenso em uma solução aquosa contendo solução salina, um tensoativo e um sal ou mistura de sais fisiologicamente compatível. Adequadamente, a formulação é ajustada a um pH fisiologicamente aceitável, por exemplo, na faixa de pH 6 a 9, ou pH 6,0 a 7,5, ou pH 6,2 a 7,7, ou pH 6,5 a 7,5, pH 7,0 a 7,7 ou pH 7,2 a 7,8 ou cerca de 7,0. Em certas modalidades, a formulação é ajustada a um pH de cerca de 6,0, cerca de 6,1, cerca de 6,2, cerca de 6,3, cerca de 6,4, cerca de 6,5, cerca de 6,6, cerca de 6,7, cerca de 6,8, cerca de 6,9, cerca de 7,0, cerca de 7,1, cerca de 7,2, cerca de 7,3, cerca de 7,4, cerca de 7,5, cerca de 7,6, cerca de 7,7 ou cerca de 7,8. Em certas modalidades, um pH de cerca de 7,28 a cerca de 7,32, cerca de 6,0 a cerca de 7,5, cerca de 6,2 a cerca de 7,7, cerca de 7,5 a cerca de 7,8, cerca de 6,0, cerca de 6,1, cerca de 6,2, cerca de 6,3, cerca de 6,4, cerca de 6,5, cerca de 6,6, cerca de 6,7, cerca de 6,8, cerca de 6,9, cerca de 7,0, cerca de 7,1, cerca de 7,2, cerca de 7,3, cerca de 7,4, cerca de 7,5, cerca de 7,6, cerca de 7,7 ou cerca de 7,8 podem ser desejados para administração intratecal; enquanto que para administração intravenosa, um pH de cerca de 6,8 a cerca de 7,2 pode ser desejado. No entanto, outros pHs dentro das faixas mais amplas e esses subintervalos podem ser selecionados para outra via de distribuição.

[00117] Em uma outra modalidade, a composição inclui um carreador, diluente, excipiente e/ou adjuvante. Os transportadores adequados podem ser facilmente selecionados por um versado na técnica, tendo em vista a indicação para a qual o vírus de transferência é direcionado. Por exemplo, um carreador adequado inclui solução salina, que pode ser formulada com uma variedade de soluções tampão (*por exemplo,*

solução salina tamponada com fosfato). Outros transportadores exemplificativos incluem solução salina estéril, lactose, sacarose, fosfato de cálcio, gelatina, dextrano, ágar, pectina, óleo de amendoim, óleo de ger-gelim e água. O tampão/carreador deve incluir um componente que impeça a aderência do rAAV ao tubo de infusão, mas não interfira com a atividade de ligação do rAAV *in vivo*. Um tensoativo adequado, ou combinação de tensoativos, pode ser selecionado de tensoativos não iônicos que não sejam tóxicos. Em uma modalidade, um tensoativo de copolímero em bloco bifuncional terminando em grupos hidroxila primários é selecionado, por exemplo, como Poloxâmero 188 (também conhecido sob os nomes comerciais Pluronic® F68 [BASF], Lutrol® F68, Synperonic® F68, Kolliphor® P188) que tem um pH neutro, tem um peso molecular médio de 8.400. Outros tensoativos e outros poloxâmeros podem ser selecionados, ou seja, copolímeros triblocos não iônicos compostos de uma cadeia hidrofóbica central de polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) flanqueada por duas cadeias hidrofílicas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)), SOLUTOL HS 15 (Macrogol-15 Hidroxiestearato), LABRASOL (Glicerídeo polioxi caprílico), éter oleílico de polioxi, TWEEN (ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitano), etanol e polietileno glicol. Numa modalidade, a formulação contém um poloxâmero. Estes copolímeros são comumente nomeados com a letra "P" (para poloxâmero) seguidos de três dígitos: os dois primeiros dígitos x 100 dão a massa molecular aproximada do núcleo de polioxipropileno, e o último dígito x 10 indica o percentual de polioxietileno. Em uma modalidade, o Poloxamer 188 é selecionado. O tensoativo pode estar presente numa quantidade até cerca de 0,0005% a cerca de 0,001% da suspensão.

[00118] Em um exemplo, a formulação pode conter, *por exemplo*, solução salina tamponada compreendendo um ou mais de cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, dextrose, sulfato de magnésio (*por exemplo*,

sulfato de magnésio $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloreto de potássio, cloreto de cálcio (*por exemplo*, cloreto de cálcio $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato de sódio dibásico e misturas dos mesmos, em água. Adequadamente, para distribuição intratecal, a osmolaridade está dentro de uma faixa compatível com o líquido cefalorraquidiano (*por exemplo*, cerca de 275 miliosmoles/litro (mOsm/L) a cerca de 290 mOsm/L); ver, *por exemplo*, emedicine.medscape.com/article/2093316-overview. Opcionalmente, para distribuição intratecal, um diluente disponível comercialmente pode ser usado como um agente de suspensão ou em combinação com outro agente de suspensão e outros excipientes opcionais. Ver, *por exemplo*, a solução Elliotts B® [Lukare Medical]. Cada 10 mL de solução Elliotts B contém:

Cloreto de sódio, USP	73 mg
Bicarbonato de sódio, USP	19 mg
Dextrose, USP	8 mg
Sulfato de magnésio $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, USP	3mg
Cloreto de potássio, USP	3 mg
Cloreto de cálcio $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, USP	2mg
Fosfato de sódio, dibásico $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, USP	2mg
Água para injeção, USP	qs 10 mL

Concentração de eletrólitos:

Sódio	149 mEq/litro	Bicarbonato	22,6 mEq/litro
Potássio	4,0 mEq/litro	Cloreto	132 mEq/litro
Cálcio	2,7 mEq/litro	Sulfato	2,4 mEq/litro
Magnésio	2,4 mEq/litro	Fosfato	1,5 mEq/litro

[00119] As fórmulas e pesos moleculares dos ingredientes são:

INGREDIENTE	FÓRMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR
Cloreto de sódio	NaCl	58,44
Bicarbonato de Sódio	NaHCO ₃	84,01
Dextrose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16
Sulfato de Magnésio $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Mg ₂ SO ₄ $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,48
Cloreto de potássio	KCl	74,55
Cloreto de cálcio $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	CaCl ₂ $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,01
Fosfato de sódio, dibásico $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Na ₂ HPO ₄ $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	268,07

[00120] O pH da solução Elliotts B é de 6 a 7,5 e a osmolaridade é de 288 mOsmol por litro (calculado).

[00121] Em certas modalidades, o tampão de formulação intratecal final (ITFFB) tampão de formulação compreende um líquido cefalorraquidiano artificial compreendendo solução salina tamponada e um ou mais dentre sódio, cálcio, magnésio, potássio ou suas misturas; e um tensoativo. Em certas modalidades, o tensoativo compreende cerca de 0,0005% a cerca de 0,001% da suspensão. Em uma outra modalidade, a porcentagem (%) é calculada com base na razão de peso (p) (isto é, p/p).

[00122] Em certas modalidades, a composição contendo o rAA-Vhu68.GLB1 (por exemplo, a formulação ITFFB) está a um pH na faixa de 6,0 a 7,5, ou 6,2 a 7,7, ou 6,8 a 8, ou 7,2 a 7,8, ou 7,5 a 8. Em certas modalidades, a formulação final está a um pH de cerca de 7 ou 7 a 7,4 ou 7,2. Em certas modalidades, para administração intratecal, um pH acima de 7,5 pode ser desejado, *por exemplo*, 7,5 a 8 ou 7,8.

[00123] Em certas modalidades, um pH de cerca de 7 é desejado para a administração intratecal, bem como outras vias de administração.

[00124] Em certas modalidades, a formulação pode conter uma solução aquosa salina tamponada que não compreende bicarbonato de sódio. Tal formulação pode conter uma solução aquosa salina tamponada compreendendo um ou mais de fosfato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e suas misturas, em água, tal como um tampão de Harvard. A solução aquosa pode ainda conter Kolliphor® P188, um poloxâmero que está comercialmente disponível na BASF que foi anteriormente vendido com o nome comercial Lutrol® F68. Em certas modalidades, a solução aquosa pode ter um pH de 7,2. Em certa modalidade, a solução aquosa pode ter um pH de cerca de 7.

[00125] Em outra modalidade, a formulação pode conter uma solução aquosa salina tamponada compreendendo Fosfato de Sódio 1 mM (Na_3PO_4), cloreto de sódio 150 mM (NaCl), cloreto de potássio 3 mM (KCl), cloreto de cálcio 1,4 mM (CaCl_2), cloreto de magnésio 0,8 mM (MgCl_2) e 0,001% de poloxâmico (*por exemplo*, Kolliphor®) 188. Em certas modalidades, a formulação tem um pH de cerca de 7,2. Em certas modalidades, a formulação tem um pH de cerca de 7. Ver, por exemplo, harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html. Em certas modalidades, o tampão de Harvard é preferido devido à melhor estabilidade de pH observada com o tampão de Harvard. A tabela a seguir fornece uma comparação do tampão de Harvard e do tampão B de Elliot.

[00126] Composições do líquido cefalorraquidiano (CSF)

Componente	Unidades	CSF	B de Elliot	de Harvard
Na^+	mEq/L	117-137	149	150
K^+	mEq/L	2,3-4,6	4,0	3,0
Mg^{2+}	mEq/L	2,2	2,4	0,8
Ca^{2+}	mEq/L	2,2	2,7	1,4
Cl^-	mEq/L	113-127	132	155
HCO_3^-	mEq/L	22,9	22,6	0
Fos.	mg/dL	1,2-2,1	1,5	1,0
Glicose	mg/dL	45-80	80	-
Pluronic	%	-	0,001% (adicionado)	0,001% (adicionado)
Osmolaridade	mOsm/L	295	288	290
pH		7,31	6,0-7,5* Desvio para 9+ (8,2+ sem titulação)	7,2 (titulado para)

[00127] Em certas modalidades, o tampão de formulação é CSF artificial com Pluronic F68. Em outras modalidades, a formulação pode conter um ou mais intensificadores de permeação. Exemplos de intensificadores de permeação adequados podem incluir, *por exemplo*, manitol, glicocolato de sódio, taurocolato de sódio, desoxicolato de sódio, salicilato de sódio, caprilato de sódio, caprato de sódio, lauril sulfato de

sódio, éter polioxietileno-9-laurel ou EDTA.

[00128] Opcionalmente, as composições da invenção podem conter, além do rAAV e do(s) transportador(es), outros ingredientes farmacêuticos convencionais, tais como conservantes ou estabilizadores químicos. Conservantes exemplificativos adequados incluem clorobutanol, sorbato de potássio, ácido sórbico, dióxido de enxofre, propil galato, parabenos, etil vanilina, glicerina, fenol e paraclorofenol. Estabilizadores químicos adequados incluem gelatina e albumina.

[00129] As composições de acordo com a presente invenção podem compreender um transportador farmaceuticamente aceitável, tal como definido acima. Adequadamente, as composições aqui descritas compreendem uma quantidade eficaz de um ou mais AAV suspensos em um transportador farmaceuticamente adequado e/ou misturados com excipientes adequados concebidos para distribuição ao sujeito por injeção, bomba osmótica, cateter intratecal ou para distribuição por outro dispositivo ou via. Em um exemplo, a composição é formulada para distribuição intratecal. Em uma modalidade, a composição é formulada para administração por meio de uma injeção intracisterna magna (ICM). Em uma modalidade, a composição é formulada para administração por meio de uma injeção sub-occipital guiada por CT na cisterna magna.

[00130] Como usado neste documento, os termos "distribuição intratecal" ou "administração intratecal" se referem a uma via de administração de fármacos por injeção no canal medular, mais especificamente no espaço subaracnoide, de modo a atingir o líquido cefalorraquidiano (CSF). A distribuição intratecal pode incluir punção lombar, intraventricular (incluindo intracerebroventricular (ICV)), suboccipital/intracisternal e/ou C1-2. Por exemplo, o material pode ser introduzido para difusão através do espaço subaracnoide por meio de punção lombar. Em outro exemplo, a injeção pode estar na cisterna magna.

[00131] Como usado neste documento, os termos "distribuição intracisternal" ou "administração intracisternal" se referem a uma via de administração de drogas diretamente no líquido cefalorraquidiano da cisterna magna cerebellomedularis, mais especificamente por meio de uma punção suboccipital ou por injeção direta em cisterna magna ou via tubo permanentemente posicionado.

[00132] Em certas modalidades, uma composição aquosa compreendendo um tampão de formulação e um rAAV.GLB1 (por exemplo, rAAVhu68.GLB1), conforme fornecido aqui, é administrado a um paciente em necessidade da mesma. Em certas modalidades, o rAAV.GLB1 tem um capsídeo de AAV (por exemplo, um capsídeo de AAVhu68) e um genoma de vetor compreendendo um 5' AAV ITR - promotor - intensificador opcional - íntron opcional - gene GLB1 - poliA - 3' ITR. Em certas modalidades, os ITRs são de AAV2. Em certas modalidades, mais de um promotor está presente. Em certas modalidades, o intensificador está presente no genoma do vetor. Em certas modalidades, mais de um intensificador está presente. Em certas modalidades, um íntron está presente no genoma do vetor. Em certas modalidades, o intensificador e o íntron estão presentes. Em certas modalidades, o poliA é um SV40 poli A. Em certas modalidades, o poliA é uma beta-globina de coelho (RBG) poli A. Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende um 5' AAV ITR - promotor CB7 - gene GLB1 - RBG poli A - 3' ITR. Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende um 5' AAV ITR - EF1a promotor - gene GLB1 - SV40 poli A - 3' ITR. Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende um 5' AAV ITR - promotor UbC - gene GLB1 - SV40 poli A - 3' ITR. Em certas modalidades, o gene GLB1 tem a SEQ ID NO: 5. Em certas modalidades, o gene GLB1 tem a SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o gene GLB1 tem a SEQ ID NO: 7. Em certas modalidades, o gene GLB1 tem a SEQ ID NO: 8. Em certas modalidades, o genoma do vetor tem a sequência de SEQ ID NO: 12. Em

certas modalidades, o genoma do vetor tem a sequência de SEQ ID NO: 13. Em certas modalidades, o genoma do vetor tem a sequência de SEQ ID NO: 14. Em certas modalidades, o genoma do vetor tem a sequência de SEQ ID NO: 15. Em certas modalidades, o genoma do vetor tem a sequência de SEQ ID NO: 16.

[00133] Em certas modalidades, o tampão de formulação final compreende: um líquido cefalorraquidiano artificial compreendendo solução salina tamponada e um ou mais dentre sódio, cálcio, magnésio, potássio ou suas misturas; e um tensoativo. Em certas modalidades, o tensoativo é cerca de 0,0005% a cerca de 0,001% da suspensão. Em certas modalidades, o tensoativo é Pluronic F68. Em certas modalidades, o Pluronic F68 está presente em uma quantidade de cerca de 0,0001% da suspensão. Em certas modalidades, a composição está em um pH na faixa de 7,5 a 7,8 para administração intratecal. Em certas modalidades, a composição está em um pH na faixa de 6,2 a 7,7, ou 6,9 a 7,5, ou cerca de 7 para administração intratecal. Em uma modalidade, a porcentagem (%) é calculada com base na razão de peso ou razão de volume. Em outra modalidade, a porcentagem representa “grama por 100ml de volume final”.

[00134] Em certas modalidades, o tratamento da composição aqui descrita tem degeneração assintomática mínima a leve de neurônios sensoriais DRG em animais e/ou em pacientes humanos, bem tolerada em relação à toxicidade do nervo sensorial e lesões subclínicas de neurônios sensoriais.

[00135] Em certas modalidades, a composição aqui descrita é útil para melhorar os resultados funcionais e clínicos no sujeito/paciente tratado. Tais resultados podem ser medidos em cerca de 30 dias, cerca de 60 dias, cerca de 90 dias, cerca de 4 meses, cerca de 5 meses, cerca de 6 meses, cerca de 7 meses, cerca de 8 meses, cerca de 9 meses, cerca de 10 meses, cerca de 11 meses, cerca de 12 meses, cerca de

13 meses, cerca de 14 meses, cerca de 15 meses, cerca de 16 meses, cerca de 17 meses, cerca de 18 meses, cerca de 19 meses, cerca de 20 meses, cerca de 21 meses, cerca de 22 meses, cerca de 23 meses, cerca de 24 meses, cerca de 2,5 anos, cerca de 3 anos, cerca de 3,5 anos, cerca de 4 anos, cerca de 4,5 anos e depois anualmente até cerca de 5 anos após a administração da composição. A frequência de medição pode ser cerca de a cada 1 mês, cerca de a cada 2 meses, cerca de a cada 3 meses, cerca de a cada 4 meses, cerca de a cada 5 meses, cerca de a cada 6 meses, cerca de a cada 7 meses, cerca de a cada 8 meses, cerca de a cada 9 meses, cerca de a cada 10 meses, cerca de a cada 11 meses ou cerca de a cada 12 meses.

[00136] Em certas modalidades, a composição aqui descrita mostra a farmacodinâmica e a eficácia clínica medida em indivíduos tratados em comparação com controles não tratados.

[00137] Em certas modalidades, a eficácia farmacodinâmica, eficácia clínica, resultados funcionais ou resultados clínicos podem ser medidos por meio de um ou mais dos seguintes: (1) sobrevivência, (2) independência do tubo de alimentação, (3) diário de convulsões, *por exemplo*, incidência, início, frequência, duração e tipo de convulsão, (4) qualidade de vida, *por exemplo*, conforme medido por PedsQL, (5) desenvolvimento neurocognitivo e comportamental, (6) expressão ou atividade da enzima β -gal, *por exemplo* no soro ou CSF, e (7) outros parâmetros, conforme descrito neste documento. As Escalas Bayley de Desenvolvimento Infantil e as Escalas Vineland podem ser usadas para quantificar os efeitos da composição no desenvolvimento e/ou mudanças nos comportamentos adaptativos, cognição, linguagem, função motora e qualidade de vida relacionada à saúde.

[00138] Em certas modalidades, o desenvolvimento neurocognitivo é baseado em um ou mais dos seguintes: mudança nas pontuações de

comunicação cognitiva, motora grossa, motora fina, receptiva e expressiva equivalente à idade das Escalas Bayley de Desenvolvimento Infantil e Infantil; mudança nas pontuações padrão para cada domínio das escalas de comportamento adaptativo de Vineland; e qualidade de vida pediátrica pela mudança na classificação total no Pediatric Quality of Life Inventory e na escala infantil do Pediatric Quality of Life Inventory (PedsQL e PedsQL-IS).

[00139] BSID (Escala de Desenvolvimento Infantil de Bayley): é usada principalmente para avaliar o desenvolvimento de bebês e crianças pequenas, com idades de 1 a 42 meses (Albers e Grieve, 2007, Test Review: Bayley, N. (2006). Bayley Scales of Infant and Toddler Development— Terceira Edição San Antonio, TX: Harcourt Assessment. Journal of Psychoeducational Assessment. 25 (2): 180-190). Consiste em uma série padronizada de tarefas lúdicas de desenvolvimento e deriva um quociente de desenvolvimento convertendo pontuações brutas de itens concluídos com sucesso em pontuações de escala e pontuações compostas e comparando as pontuações com normas tomadas de crianças com desenvolvimento típico da mesma idade. O Bayley-III tem 3 subtestes principais; uma Escala Cognitiva, que inclui itens como atenção a objetos familiares e desconhecidos, procura de um objeto caído e brincadeira de faz de conta; uma escala de linguagem, que avalia a compreensão e expressão da linguagem (*por exemplo*, capacidade de seguir instruções e nomear objetos); e uma escala motora que mede as habilidades motoras grossas e finas (*por exemplo*, agarrar, sentar, empilhar blocos e subir escadas). A versão mais atual é o BSID-III

[00140] Vineland: avalia o comportamento adaptativo desde o nascimento até a idade adulta (0–90 anos) em cinco domínios: comunicação, habilidades de vida diária, socialização, habilidades motoras e comportamento não adaptativo. A versão mais atual é o Vineland III. As melho-

rias do Vineland-II para o Vineland-III incorporam perguntas para permitir uma melhor compreensão das deficiências de desenvolvimento.

[00141] O BSID e o Vineland foram escolhidos com base nos dados do único estudo prospectivo de pacientes com gangliosidose GM1 infantil (Brunetti-Pierri and Scaglia, 2008, GM1 gangliosidosis: Review of clinical, molecular, and therapeutic aspects. *Molecular Genetics and Metabolism*. 94 (4): 391-396.). Pontuações de idade equivalente no BSID-III mostraram um declínio para o piso da escala de teste aos 28 meses de idade para os domínios cognitivo e motor grosso, e as pontuações na escala de comportamento adaptativo Vineland-II permaneceram mensuráveis, embora muito abaixo do normal, aos 28 meses de idade. Embora essas ferramentas tenham mostrado efeitos de chão, elas se mostraram escalas apropriadas para medir as mudanças no desenvolvimento dessa população gravemente prejudicada, a validade transcultural das escalas as torna adequadas para estudos internacionais.

[00142] PedsQOL e PedsQL-IS: Como no caso de doenças pediátricas graves, o fardo da doença para a família é significativo. O Pediatric Quality of Life Inventory™ é uma ferramenta validada que avalia a qualidade de vida em crianças e seus pais (por meio de relatórios de procuração dos pais). Foi validado em crianças e adolescentes saudáveis e tem sido usado em várias doenças pediátricas (Iannaccone et al., 2009, The PedsQL in pediatric patients with Spinal Muscular Atrophy: feasibility, reliability, and validity of the Pediatric Quality of Life Inventory Generic Core Scales and Neuromuscular Module. *Neuromuscular disorders : NMD*. 19 (12): 805-812; Absoud et al., 2011, Pediatric UK demyelinating disease longitudinal study (PUDDLs). " *BMC Pediatrics*. 11(1):68; and Consolaro and Ravelli, 2016, hapter 5 - Assessment Tools in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases*. R. Cimaz e T. Lehman, Elsevier. 11: 107-127). Portanto, o

PedsQL está incluído para avaliar o impacto do rAAV.GLB1 na qualidade de vida do paciente e de sua família. Ela pode ser aplicada a pais de crianças a partir de 2 anos e, portanto, pode ser informativa uma vez que as crianças crescem com mais de 5 anos de idade durante o período de acompanhamento. The Pediatric Quality of Life Inventory™ Infant Scale (Varni et al., 2011, "The PedsQL™ Infant Scales: feasibility, internal consistency reliability, and validity in healthy and ill infants." Quality of Life Research. 20 (1): 45-55.) é um instrumento modular validado, preenchido pelos pais e projetado para medir um instrumento de qualidade de vida relacionada à saúde, especificamente para bebês saudáveis e doentes com idades entre 1 e 24 meses.

[00143] Dada a gravidade da doença na população alvo, os sujeitos podem ter alcançado habilidades motoras por inscrição, desenvolvido e subsequentemente perdido outros marcos motores, ou ainda não mostraram sinais de desenvolvimento de marcos motores. As avaliações rastreiam a idade do atingimento e idade da perda para todos os marcos. O atingimento do marco motor é definido para seis marcos brutos com base nos critérios da WHO descritos na Tabela fornecida neste documento na Seção I GM1 e o gene terapêutico GLB1. Dado que os sujeitos com gangliosidose GM1 infantil podem desenvolver sintomas dentro dos meses de vida, e a aquisição do primeiro marco motor da WHO (sentar sem apoio) normalmente não se manifesta antes dos 4 meses de idade (mediana: 5,9 meses de idade), este ponto final pode precisar de sensibilidade para avaliar a extensão do benefício terapêutico, especialmente em indivíduos que apresentavam sintomas mais evidentes no momento do tratamento. Por esse motivo, a avaliação de marcos de desenvolvimento adequados à idade que podem ser aplicados a bebês também está incluída (Scharf et al., 2016, Developmental Milestones. *Pediatr Rev.* 37 (1): 25-37; questionário 38, 47.). Uma lacuna é que a ferramenta

publicada se destina ao uso por médicos e pais, e organiza as habilidades em torno da idade típica de aquisição de marcos sem fazer referência a intervalos normais. No entanto, os dados podem ser informativos para sumarizar a retenção, aquisição ou perda de marcos de desenvolvimento ao longo do tempo em relação a crianças não tratadas com doença GM1 infantil ou o tempo típico de aquisição em crianças neurotípicas.

[00144] À medida que a doença progride, as crianças podem desenvolver convulsões. O início da atividade convulsiva nos permite determinar se o tratamento com rAAV.GLB1 pode prevenir ou retardar o início das convulsões ou diminuir a frequência dos eventos convulsivos nessa população. Os pais são solicitados a manter diários de convulsões, que rastreiam o início, a frequência, a duração e o tipo de convulsão.

[00145] Em certas modalidades, a eficácia farmacodinâmica, eficácia clínica, resultados funcionais ou resultados clínicos também podem incluir manifestações do CNS da doença, por exemplo, alterações volumétricas medidas em MRI ao longo do tempo. O fenótipo infantil de todas as gangliosidoses mostrou ter um padrão consistente de macrocefalia e aumento rápido do volume de MRI intracraniano com volume de tecido cerebral (córtex cerebral e outras estruturas menores) e volume ventricular. Além disso, várias subestruturas cerebrais menores, incluindo o corpo caloso, caudato e putâmen, bem como o córtex cerebelar, geralmente diminuem de tamanho conforme a doença progride (Regier et al., 2016s e Nestratil et al., 2018, como citado aqui). O tratamento com rAAV.GLB1 pode retardar ou interromper a progressão das manifestações da doença do CNS com evidência de estabilização na atrofia e alterações volumétricas. Mudanças (normais/anormais) na intensidade do sinal T1/T2 no tálamo e gânglios basais também podem ser incluídas com base na evidência relatada de mudanças na estrutura talâmica em pacientes com gangliosidose GM1 e GM2 (Kobayashi and

Takashima, 1994, Thalamic hyperdensity on CT in infantile GM1-gangliosidosis." Brain and Development. 16 (6): 472-474). Em certas modalidades, a eficácia farmacodinâmica, eficácia clínica, resultados funcionais ou resultados clínicos podem incluir mudanças no volume total do cérebro, volume da subestrutura do cérebro e volume do ventrículo lateral medido por MRI; e/ou mudanças na intensidade do sinal T1/T2 no tálamo e na atividade dos gânglios basais.

[00146] Alternativa ou adicionalmente, a eficácia farmacodinâmica, eficácia clínica, resultados funcionais ou resultados clínicos podem incluir biomarcadores, por exemplo, farmacodinâmica e atividade biológica de rAAV.GLB1, atividade da enzima β -gal (GLB1), que pode ser medida no CSF e no soro, concentração de GM1 no CSF, níveis de sulfato de queratana no soro e urina, redução da atividade de hexosaminidase e ressonância magnética cerebral, que demonstra atrofia rápida e consistente na gangliosidose GM1 infantil (Regier et al., 2016b, como citado aqui).

[00147] Em certas modalidades, a composição aqui descrita é útil para desacelerar a progressão da doença, por exemplo, conforme avaliado pela idade na realização, idade na perda e porcentagem de crianças que mantêm ou adquirem marcos de desenvolvimento e motores apropriados para idade (conforme definido pela World Health Critérios da Organização [WHO]).

[00148] Em certas modalidades, a eficácia farmacodinâmica, eficácia clínica, resultados funcionais ou resultados clínicos podem incluir o volume do fígado e do baço; e/ou EEG e potenciais evocados visuais (VEP).

VI. Aparelho e Método para Administração de uma Composição Farmacêutica no Líquido Cefalorraquidiano

[00149] Em um aspecto, o rAAV ou composição fornecida neste documento pode ser administrado por via intratecal por meio do método

e/ou do dispositivo fornecido nesta seção e descrito em WO 2018/160582, que está incorporado neste documento por referência. Alternativamente, outros dispositivos e métodos podem ser selecionados.

[00150] Em certas modalidades, o método compreende as etapas de injeção sub-occipital guiada por CT via agulha espinhal na cisterna magna de um paciente. Conforme aqui utilizado, o termo Tomografia Computadorizada (CT) se refere à radiografia na qual uma imagem tridimensional de uma estrutura corporal é construída por computador a partir de uma série de imagens em corte transversal planas feitas ao longo de um eixo.

[00151] No dia do tratamento, a concentração apropriada de rAAV.GLB1 é preparada. Uma seringa contendo 5,6 mL de rAAV.GLB1 na concentração apropriada é administrada na sala de procedimento. O seguinte pessoal está presente para a administração do medicamento em estudo: intervencionista realizando o procedimento; anestesiológista e técnico(s) respiratório(s); enfermeiras e assistentes médicos; Técnicos de CT (ou sala de operação); coordenador de pesquisa do local. Antes da administração do fármaco, uma punção lombar é realizada para remover um volume predeterminado de CSF e, em seguida, injetar contraste iodado intratecalmente (IT) para auxiliar na visualização da anatomia relevante da cisterna magna. O contraste intravenoso (IV) pode ser administrado antes ou durante a inserção da agulha como uma alternativa ao contraste intratecal. A decisão de usar contraste IV ou IT fica a critério do intervencionista. O sujeito é anestesiado, intubado e posicionado na mesa de procedimento. O local da injeção é preparado e coberto com técnica estéril. Uma agulha espinhal (22-25 G) é introduzida na cisterna magna sob orientação fluoroscópica. Uma agulha introdutora maior pode ser usada para auxiliar na colocação da agulha. Após a confirmação da colocação da agulha, o conjunto de extensão é conectado à agulha raquidiana e pode ser preenchido com CSF. A critério do

intervencionista, uma seringa contendo material de contraste pode ser conectada ao conjunto de extensão e uma pequena quantidade injetada para confirmar a colocação da agulha na cisterna magna. Após a colocação da agulha ser confirmada pela orientação da CT+/- injeção de contraste, uma seringa contendo 5,6 mL de rAAV.GLB1 é conectada ao conjunto de extensão. Os conteúdos da seringa são injetados lentamente durante 1-2 minutos, fornecendo um volume de 5,0 mL. A agulha é lentamente removida do sujeito.

[00152] Vias adicionais ou alternativas de administração para o método intratecal aqui descrito incluem, por exemplo, administração sistêmica, oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular.

[00153] Em uma modalidade, as doses podem ser dimensionadas pela massa cerebral, o que fornece uma aproximação do tamanho do compartimento CSF. Em uma outra modalidade, as conversões de dose são baseadas em uma massa cerebral de 0,4 g para um camundongo adulto, 90 g para um macaco rhesus juvenil e 800 g para crianças de 4 a 18 meses de idade. A tabela a seguir fornece doses ilustrativas para um estudo MED murino, estudo de toxicologia NHP e doses humanas equivalentes.

Dose (GC/g de massa cerebral)	Camundongo (GC)	NHP (GC)	Humano (GC)
$3,33 \times 10^{11}$	$1,30 \times 10^{11}$	$3,00 \times 10^{13}$	$2,70 \times 10^{14}$
$1,11 \times 10^{11}$	$4,40 \times 10^{10}$	$1,00 \times 10^{13}$	$8,90 \times 10^{13}$
$3,33 \times 10^{10}$	$1,30 \times 10^{10}$	$3,00 \times 10^{12}$	$2,70 \times 10^{13}$
$1,11 \times 10^{10}$	$4,40 \times 10^9$	-	$8,90 \times 10^{12}$

[00154] Em certas modalidades, um rAAV.GLB1 é administrado a um sujeito em uma dose única. Em certas modalidades, doses múltiplas (por exemplo, 2 doses) podem ser desejadas. Por exemplo, para crianças com menos de 6 meses, podem ser desejadas doses múltiplas administradas em dias, semanas ou meses, separados.

[00155] Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de cerca de 1×10^9 GC/g de massa cerebral a cerca de 5×10^{11} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de cerca de 1×10^9 GC/g de massa cerebral a cerca de 3

$\times 10^{11}$ GC. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de cerca de 1×10^{10} GC/g de massa cerebral a cerca de 3×10^{11} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose de rAAV.GLB1 é de 1×10^{10} GC/massa cerebral a $3,33 \times 10^{11}$ GC/massa cerebral. Em certas modalidades, a dose de rAAV.GLB1 é de 1×10^{11} GC/massa cerebral a $3,33 \times 10^{11}$ GC/massa cerebral. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de $1,11 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral a $3,33 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral.

[00156] Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de cerca de 1×10^{10} GC/g de massa cerebral a $3,4 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de cerca de $3,4 \times 10^{10}$ GC/g massa cerebral a $3,4 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de cerca de $1,0 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral a $3,4 \times 10^{11}$ GC /g de massa cerebral. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de cerca de $1,1 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de pelo menos $1,11 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral. Em outras modalidades, doses diferentes podem ser selecionadas.

[00157] Em modalidades preferidas, o sujeito é um paciente humano. Neste caso, uma dose única de rAAV.GLB1 é de cerca de 1×10^{12} GC a cerca de 3×10^{14} GC. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de 9×10^{12} GC a 3×10^{14} GC. Em certas modalidades, a dose de rAAV.GLB1 é de 5×10^{13} GC a 3×10^{14} GC. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de $8,90 \times 10^{13}$ GC a $2,70 \times 10^{14}$ GC. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de 8×10^{12} cópias do genoma (GC) por paciente a 3×10^{14} GC por paciente. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de 2×10^{13} GC por paciente a 3×10^{14} GC por paciente. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de 8×10^{13} GC por paciente a 3×10^{14}

GC por paciente. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de cerca de 9×10^{13} GC por paciente. Em certas modalidades, uma dose única de rAAV.GLB1 é de pelo menos $8,90 \times 10^{13}$ GC. Em outras modalidades, doses diferentes podem ser selecionadas.

[00158] As composições podem ser formuladas em unidades de dosagem para conter uma quantidade de AAV que está na faixa de cerca de 1×10^9 cópias do genoma (GC) a cerca de 5×10^{14} GC (para tratar um sujeito médio de 70 kg de peso corporal). Em algumas modalidades, a composição é formulada em unidade de dosagem para conter uma quantidade de AAV na faixa de 1×10^9 cópias do genoma (GC) a 5×10^{13} GC; de 1×10^{10} cópias do genoma (GC) a 5×10^{14} GC; de 1×10^{11} GC a 5×10^{14} GC; de 1×10^{12} GC a 5×10^{14} GC; de 1×10^{13} GC a 5×10^{14} GC; de $8,9 \times 10^{13}$ GC a 5×10^{14} GC; ou de $8,9 \times 10^{13}$ GC a $2,7 \times 10^{14}$ GC. Em certas modalidades, a composição é formulada em unidade de dosagem para conter uma quantidade de AAV de pelo menos 1×10^{13} GC, $2,7 \times 10^{13}$ GC, ou $8,9 \times 10^{13}$ GC.

[00159] Em uma modalidade, uma punção lombar é realizada em que cerca de 15 mL (ou menos) a cerca de 40 mL de CSF são removidos e em que rAAV.GLB1 é misturado com o CSF e/ou suspenso em um carreador compatível e administrado ao sujeito. Em um exemplo, a concentração de rAAV.GLB1 é de 1×10^{10} cópias de genoma (GC) a 5×10^{14} GC; de 1×10^{11} GC a 5×10^{14} GC; de 1×10^{12} GC a 5×10^{14} GC; de 1×10^{13} GC a 5×10^{14} GC; de $8,9 \times 10^{13}$ GC a 5×10^{14} GC; ou de $8,9 \times 10^{13}$ GC a $2,7 \times 10^{14}$ GC, mas outras quantidades, como cerca de 1×10^9 GC, cerca de 5×10^9 GC, cerca de 1×10^{10} GC, cerca de 5×10^{10} GC, cerca de 1×10^{11} GC, cerca de 5×10^{11} GC, cerca de 1×10^{12} GC, cerca de 5×10^{12} GC, cerca de $1,0 \times 10^{13}$ GC, cerca de 5×10^{13} GC, cerca de $1,0 \times 10^{14}$ GC, ou cerca de 5×10^{14} GC. Em certas modalidades, a concentração em GC é ilustrada como GC por punção lombar. Em certas modalidades, a concentração em CG é ilustrada como GC

por mL.

[00160] Uma co-terapia pode ser administrada com as composições de rAAV.GLB1 fornecidas neste documento. As co-terapias, tais como descritas anteriormente neste pedido, estão aqui incorporadas por referência.

[00161] Uma dessas co-terapia pode ser um modulador imunológico. Os imunossuppressores para tal coterapia incluem, entre outros, glicocorticoides, esteroides, antimetabolitos, inibidores de células T, um macrolídeo (por exemplo, uma rapamicina ou rapalog) e agentes citostáticos, incluindo um agente alquilante, um antimetabólito, um antibiótico citotóxico, um anticorpo ou um agente ativo na imunofilina. O supressor imunológico pode incluir mostarda nitrogenada, nitrosourea, composto de platina, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, fluorouracil, dactinomicina, antraciclina, mitomicina C, bleomicina, mitramicina, anticorpos direcionados para o receptor de IL-2-(CD25-) ou CD3, anticorpos anti-IL-2, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, IFN- β , IFN- γ , um opioide ou agente de ligação ao TNF- α (fator de necrose tumoral alfa). Em certas modalidades, a terapia imunossupressora pode ser iniciada antes da administração da terapia genética. Essa terapia pode envolver a coadministração de duas ou mais drogas, o (por exemplo, prednelisona, micofenolato de mofetil (MMF) e/ou sirolimus (ou seja, rapamicina)) no mesmo dia. Um ou mais desses medicamentos podem ser continuados após a administração da terapia genética, na mesma dose ou em uma dose ajustada. Essa terapia pode durar cerca de 1 semana, cerca de 15 dias, cerca de 30 dias, cerca de 45 dias, 60 dias ou mais, conforme necessário.

[00162] Por exemplo, quando a nutrição é uma preocupação na GM1, a colocação de um tubo de gastrostomia é apropriada. Conforme a função respiratória se deteriora, traqueotomia ou suporte respiratório não invasivo é oferecido. Uma cadeira elétrica e outros equipamentos

podem melhorar a qualidade de vida.

[00163] As palavras "compreendem", "compreende" e "compreendendo" devem ser interpretadas inclusivamente em vez de exclusivamente. As palavras "consiste", "consistir" e suas variantes devem ser interpretadas exclusivamente, e não de forma inclusiva. Embora várias modalidades no relatório descritivo sejam apresentadas utilizando linguagem "compreensiva", sob outras circunstâncias, uma modalidade relacionada também se destina a ser interpretada e descrita usando a linguagem "consistindo em" ou "consistindo essencialmente em".

[00164] O termo "expressão" é aqui utilizado no seu significado mais amplo e compreende a produção de RNA ou de RNA e proteína. Com relação ao RNA, o termo "expressão" ou "tradução" se refere, em particular, à produção de peptídeos ou proteínas. A expressão pode ser transitória ou estável.

[00165] Como usado neste documento, o termo "título de NAb" mede a quantidade de anticorpo neutralizante (por exemplo, NAB anti-AAV) que neutraliza o efeito fisiológico do seu epítipo alvo (por exemplo, um AAV). Os títulos de NAb anti-AAV podem ser medidos como descrito em, por exemplo, Calcedo, R., et al., Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 2009. 199(3): p. 381-390, que é aqui incorporado por referência.

[00166] Em algumas modalidades, a administração do AAV ou da composição melhora os sintomas da gangliosidose GM1 ou melhora os sintomas neurológicos da gangliosidose GM1. Em algumas modalidades, após o tratamento, o paciente tem um ou mais de aumento da média de vida, diminuição da necessidade de tubo de alimentação, redução na incidência e frequência de convulsões, redução na progressão em direção ao declínio neurocognitivo e/ou melhora no desenvolvimento neurocognitivo.

[00167] Conforme usado aqui, um "cassete de expressão" se refere a uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação, um promotor e pode incluir outras sequências regulatórias dos mesmos. Em certas modalidades, um genoma de vetor pode conter dois ou mais cassetes de expressão. Em outras modalidades, o termo "transgene" pode ser usado alternadamente com "cassete de expressão". Tipicamente, tal cassete de expressão para gerar um vetor viral contém a sequência de codificação para o produto de gene aqui descrito flanqueada por sinais de empacotamento do genoma viral e outras sequências de controle de expressão, tais como aquelas aqui descritas.

[00168] O termo "heterólogo", quando usado com referência a uma proteína ou um ácido nucleico, indica que a proteína ou o ácido nucleico compreende duas ou mais sequências ou subsequências que não são encontradas na mesma relação entre si na natureza. Por exemplo, o ácido nucleico é tipicamente produzido de forma recombinante, tendo duas ou mais sequências de genes não relacionados dispostos para fazer um novo ácido nucleico funcional. Por exemplo, em uma modalidade, o ácido nucleico tem um promotor de um gene arranjado para dirigir a expressão de uma sequência de codificação de um gene diferente. Assim, com referência à sequência de codificação, o promotor é heterólogo.

[00169] Um "vírus de replicação defeituosa" ou "vetor viral" se refere a uma partícula viral sintética ou artificial em que um genoma de vetor compreendendo um cassete de expressão contendo um gene de interesse (por exemplo, GLB1) é empacotado em um capsídeo viral (por exemplo, AAV ou bocavírus) ou envelope, onde quaisquer sequências genômicas virais também empacotadas dentro do capsídeo ou envelope viral são deficientes para replicação; ou *seja*, eles não podem gerar vírions descendentes, mas retêm a capacidade de infectar células alvo.

Em uma modalidade, o genoma do vetor viral não inclui genes que codificam as enzimas necessárias para replicar (o genoma pode ser geneticamente modificado para ser "sem reforço" - contendo apenas o gene de interesse flanqueado pelos sinais necessários para amplificação e embalagem do genoma artificial), mas esses genes podem ser fornecidos durante a produção. Por conseguinte, ele é considerado seguro para uso em terapia genética, uma vez que a replicação e a infecção por vírions da progênie não podem ocorrer exceto na presença da enzima viral necessária para a replicação.

[00170] Tal como aqui utilizado, uma "quantidade eficaz" se refere à quantidade da composição de rAAV que distribui e expressa nas células alvo uma quantidade do produto gênico do genoma do vetor. Uma quantidade eficaz pode ser determinada com base em um modelo animal, em vez de um paciente humano. Exemplos de um modelo murino ou NHP adequado são descritos neste documento.

[00171] Deve-se notar que o termo "um" ou "uma", se refere a um ou mais, por exemplo, "um intensificador", é entendido como representando um ou mais intensificadores. Como tal, os termos "um" (ou "uma"), "um ou mais" e "pelo menos um" são usados aqui de forma intercambiável.

[00172] Conforme descrito anteriormente, o termo "cerca de" quando usado para modificar um valor numérico significa uma variação de $\pm$ 10%, a menos que especificado de outra forma.

[00173] Conforme descrito anteriormente, os termos "aumentar" "diminuir" "reduzir" "melhorar" "melhorar" "atrasar" "mais cedo" "diminuir" "cessar" ou qualquer variação gramatical dos mesmos, ou quaisquer termos semelhantes que indiquem uma mudança, significam uma variação de cerca de 5 vezes, cerca de 2 vezes, cerca de 1 vez, cerca de 90%, cerca de 80%, cerca de 70%, cerca de 60%, cerca de 50%, cerca de

40%, cerca de 30%, cerca de 20%, cerca de 10%, cerca de 5% em comparação com a referência correspondente (*por exemplo*, controle não tratado, nível correspondente de um paciente GM1 ou um paciente GM1 em um determinado estágio ou um sujeito saudável ou um humano saudável sem GM1)), a menos que especificado de outra forma.

[00174] "Paciente" ou "sujeito", conforme usado neste documento, se refere a um animal mamífero, incluindo um humano, um animal veterinário ou de fazenda, um animal doméstico ou de estimação e animais normalmente usados para pesquisa clínica. Numa modalidade, o sujeito destes métodos e composições é um humano. Em certas modalidades, o paciente tem GM1.

[00175] Salvo definido em contrário neste pedido, os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado como vulgarmente entendido por um versado na técnica e por referência a textos publicados, que proporcionam aos versados na técnica um guia geral para muitos dos termos utilizados no presente pedido.

EXEMPLOS

[00176] Os exemplos seguintes são apenas ilustrativos e não pretendem limitar a presente invenção.

EXEMPLO 1: AAVhu68 + Desamidação

[00177] AAVhu68 foi analisado quanto a modificações. Resumidamente, AAVhu68 foi produzido usando genomas de vetor que não são relevantes para este estudo, cada um produzido usando métodos convencionais de transfecção tripla em células 293. Para uma descrição geral dessas técnicas, ver, *por exemplo*, Bell CL, *et al.*, O receptor AAV9 e sua modificação para melhorar a transferência de genes de pulmão *in vivo* em camundongos. *J Clin Invest.* 2011; 121: 2427–2435. Resumidamente, *por exemplo*, um plasmídeo que codifica a sequência a ser empacotada (um transgene expresso a partir de um promotor de β -actina

de galinha, um íntron e um poli A derivado do gene tardio do vírus Simian 40 (SV40)) flanqueado por repetições terminais invertidas de AAV2, foi empacotado por transfecção tripla de células HEK293 com plasmídeos que codificam o gene *rep* AAV2 e o gene *cap* AAVhu68 e um plasmídeo auxiliar de adenovírus (pAdΔF6). As partículas virais de AAV resultantes podem ser purificadas usando centrifugação em gradiente de CsCl, concentradas e congeladas para uso posterior.

[00178] Desnaturação e alquilação: A 100 µg da preparação viral descongelada (solução de proteína), adicionar 2 µl de Ditioneitol 1M (DTT) e 2 µl de cloridrato de guanidina 8M (GndHCl) e incubar a 90°C por 10 minutos. Deixe a solução esfriar até a temperatura ambiente e, em seguida, adicione 5 µl de iodoacetamida 1M (IAM) recém-preparada e incube por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Após 30 minutos, extinguir a reação de alquilação adicionando 1 µl de DTT 1M.

[00179] Digestão: À solução de proteína desnaturada, adicione Bicarbonato de Amônio 20mM, pH 7,5-8 em um volume que dilui a concentração final de GndHCl para 800mM. Adicione a solução de tripsina para uma proporção de 1:20 de tripsina para proteína e incube a 37 °C durante a noite. Após a digestão, adicione TFA a um final de 0,5% para extinguir a reação de digestão.

[00180] Espectrometria de massa: Aproximadamente 1 micrograma da mistura de digestão combinada é analisado por UHPLC-MS/MS. A LC é realizada em um sistema UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific). A fase móvel A é água MilliQ com 0,1% de ácido fórmico. A fase móvel B é acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de LC é executado de 4% de B a 6% de B ao longo de 15 min, depois a 10% de B durante 25 min (40 minutos no total), depois a 30% de B durante 46 min (86 minutos no total). As amostras são carregadas diretamente na coluna. O tamanho da coluna é de 75 cm x 15 µm I.D. e é embalado com meio C18 de 2 microns (Acclaim PepMap). O LC é conectado a um

espectrômetro de massa quadrupolo-Orbitrap (Q-Exactive HF, Thermo Scientific) por meio de ionização por eletropulverização nanoflex usando uma fonte. A coluna é aquecida a 35°C e uma tensão de eletroaspersão de 2,2 kV é aplicada. O espectrômetro de massa é programado para adquirir espectros de massa em tandem dos 20 íons principais. Resolução MS completa para 120.000 e resolução MS/MS para 30.000. A energia de colisão normalizada é definida para 30, controle automático de ganho para 1e5, MS de preenchimento máximo para 100 ms, MS/MS de preenchimento máximo para 50 ms.

[00181] Processamento de dados: Os arquivos de dados RAW do espectrômetro de massa foram analisados por BioPharma Finder 1.0 (Thermo Scientific). Resumidamente, todas as pesquisas exigiram tolerância de massa de precursor de 10 ppm, tolerância de massa de fragmento de 5 ppm, clivagem triptica, até 1 clivagem perdida, modificação fixa de alquilação de cisteína, modificação variável de oxidação de metionina/triptofano, desamidação de asparagina/glutamina, fosforilação, metilação e amidação.

[00182] Na tabela a seguir, T se refere à tripsina e C se refere à quimiotripsina.

Modificação AAVhu68													
Enzima	T	T	T	T	C	C	C	C	T	T	T		
% de cobertura	93,6	92	93,1	92,5	90,2	89,7	91,1	88,9	98,9	97	94,6	92,4	
+ Desamidação (Deamid)													
~N35													
N57+ Desamid	87,6	95,5	89,3	88,2	90,5	96,3	86,4	84,8	100,0	100,0	99,0	92,7	
N66 + Desamid	4,7												
N94+ Desamid	11,3	10,9	11,0	5,3	11,6	10,4	10,8	5,6	5,0	11,1	5,4	16,0	
N113 + Desamid			1,8										
~N253+ Desamid	17,7	22,0	21,1	15,0	17,0	22,6	20,5	15,6	4,2	5,5			
Q259 + Desamid	35,2	25,6	21,0		35,4	26,3	20,9	9,2					
~N270+ Desamid	16,4	25,1	23,2	16,6	15,9	24,9	23,5	16,1	0,2				
~N304+	2,6	2,9	2,8	1,3	2,5	2,8	2,9	1,3	16,6	10,3			

Desamid												
~N314+Desamid									6,5			
N319 + Desamid	0,3	2,8	2,8	0,2		2,9	2,8	0,2				
N329+ Desamid	72,7	85,6	89,1	86,8	71,0	87,2	88,7	84,7	85,5	79,4	78,9	91,8
N336 + Desamid		30,8	9,3	100,0		31,0	9,2	95,7				
~N409+ Desamid	21,3	22,9	23,9	24,0	22,0	23,4	24,7	24,2				
N452+ Desamid	98,8	99,7	99,2	100,0	98,9	97,3	98,1	95,2	98,2	68,7	67,4	49,4
N477+ Desamid	4,4	4,3	4,3	2,6	4,5	4,4	4,3	2,6			0,8	
N512+ Desamid	97,5	97,9	95,3	95,7	92,2	91,8	99,2	96,1	99,7	98,2	87,9	75,7
~N515+ Desamid	8,2	21,0	16,0		8,3	21,0	16,5	0,0	2,5	3,0		15,1
~Q599+ Desamid	4,0	15,4	10,1	13,6	4,0	15,5	10,0	13,8	15,8			
N628 + Desamid	5,3		5,6		5,4	0,0	5,4	0,0				
N651+ Desamid	0,9	1,6	1,6						0,5			
N663+ Desamid	3,4		3,5	3,7	3,4	0,0	3,4	3,6				
N709+ Desamid	0,6	0,8	20,2	0,6	0,6	0,8	19,8	0,6	0,3	1,3	0,1	0,2
N735									25,0	42,7		21,7
+ Acetilação (Ac):												
K332 + Ac				100,0								
~ K693 + Ac	13,0		13,5									
~ K666 + Ac				93,8								
~K68+ Ac		59,2										
+ Isomerização (Iso):												
D97 + Iso	0,5	0,4	0,4	0,2	0,5		0,4	0,2				
D107 + Iso		0,3		0,3		0,3						
D384 + Iso	0,8				0,9							
+ Fosforilação (Fos)												
S149 + Fos	5,8	5,7	5,2	9,8	5,7	5,9	5,2	9,9				
~ S499 + Fos.				30,6								
~ T569 + Fos.	0,9											
~ S586 + Fos.		3,6										
+ Oxidação												
~ W23 + Oxi		4,7	5,5			4,8	5,5					
W247 + Oxi	1,5	0,4	0,7		1,4							
W247 + Oxi para quinurenina		0,1				0,1						

W306 + Oxi	0,7	0,9	1,6	1,8	0,7	1,0	1,6	1,8				
W306 + Oxidação para quinurenina			0,3				0,3					
M404 + Oxi	0,1		0,2		0,1		0,2					
M436 + Oxi	4,9		10,2	23,0	4,8		10,2	22,6				
~ M518 + Oxi	29,9		1,5	10,6	29,9		1,5	10,5				
~ M524 + Oxi	18,8	31,6	52,7		18,4	31,1	52,5	14,2				
M559 + Oxi	19,0	21,6	19,6	20,9	19,6	21,3	20,1	20,9				
~ M605 + Oxi	12,2	15,2			12,8	14,8						
W619 + Oxi	1,0		0,6	1,5	1,0		0,6	1,5				
W619+Oxidação			20,3									
~M640+ Oxi	23,5	64,2	24,6		22,4	21,1	25,6					
W695 + Oxi	0,3		0,4	0,4	0,3		0,4	0,4				
+Amidação												
~ D297 + Amidação		72,9		73,3								

[00183] Na proteína do capsídeo de AAVhu68, 4 resíduos (N57, N329, N452, N512) exibem rotineiramente níveis de desamidação > 70% e na maioria dos casos > 90% em vários lotes. Resíduos de asparagina adicionais (N94, N253, N270, N304, N409, N477 e Q599) também exibem níveis de desamidação de até ~ 20% em vários lotes. Os níveis de desamidação foram inicialmente identificados usando uma digestão de tripsina e verificados com uma digestão de quimotripsina.

[00184] Consequentemente, AAV compreendendo proteínas do capsídeo de AAVhu68 podem incluir uma população heterogênea de proteínas do capsídeo porque o AAV pode conter proteínas do capsídeo de AAVhu68 exibindo diferentes níveis de desamidação. A população heterogênea de proteínas AAVhu68 vp1 tendo vários níveis de desamidação pode ser proteínas vp1 produzidas por expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos predita de 1 a 736 da SEQ ID NO: 2, proteínas vp1 produzidas a partir da SEQ ID NO: 1, ou proteínas vp1 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 1 que codifica a sequência de aminoácidos predita de 1 a 736 da SEQ ID NO: 2. A população heterogênea de proteínas AAVhu68 vp2 tendo vários níveis de

desamidação pode ser proteínas vp2 produzidas por expressão a partir de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos predita de pelo menos cerca dos aminoácidos 138 a 736 da SEQ ID NO: 2, proteínas vp2 produzidas a partir de uma sequência que compreende pelo menos nucleotídeos 412 a 2211 da SEQ ID NO: 1, ou proteínas vp2 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica aos pelo menos nucleotídeos 412 a 2211 da SEQ ID NO: 1 que codifica a sequência de aminoácidos predita de pelo menos cerca dos aminoácidos 138 a 736 da SEQ ID NO: 2. A população heterogênea de proteínas AAVhu68 vp3 tendo vários níveis de desamidação pode ser vp3 produzida por expressão a partir de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos predita de pelo menos cerca dos aminoácidos 203 a 736 da SEQ ID NO: 2, proteínas vp3 produzidas a partir de uma sequência que compreende pelo menos nucleotídeos 607 a 2211 da SEQ ID NO: 1, ou proteínas vp3 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica aos pelo menos nucleotídeos 607 a 2211 da SEQ ID NO: 1 que codifica a sequência de aminoácidos predita de pelo menos cerca dos aminoácidos 203 a 736 da SEQ ID NO: 2.

[00185] Macacos Rhesus adultos foram administrados com AAVhu68 por ICM.CB7.Cl.eGFP.WPRE.rBG ($3,00 \times 10^{13}$ GC) e necropsiado 28 dias depois para avaliar a transdução do vetor. A transdução de AAVhu68 foi observada em áreas generalizadas do cérebro (dados não mostrados). Assim, o capsídeo de AAVhu68 oferece a possibilidade de correção cruzada no CNS.

EXEMPLO 2: Fabricação - Componentes e Materiais

[00186] Os vetores são construídos a partir de plasmídeos cis contendo uma sequência de codificação para GLB1 humana expressa a partir do promotor da beta-actina de galinha com um intensificador de

citomegalovírus (CB7) [SEQ ID NO: 10], promotor alfa do fator de iniciação de alongamento humano 1 (EF1a) [SEQ ID NO: 11] ou promotor da ubiquitina C humana (UbC) [SEQ ID NO: 9] (1229 pb, GenBank # D63791.1)] flanqueado por repetições terminais invertidas de AAV2. Várias sequências de codificação para GLB1 humano [sequência aa de SEQ ID NO: 4] são construídas. A sequência de tipo selvagem é reproduzida na SEQ ID NO: 5. Várias sequências de codificação de GLB1 projetadas foram geradas e são fornecidas na SEQ ID NO: 6, 7 ou 8.

[00187] Os vetores são empacotados em um capsídeo de sorotipo hu68 de AAV por transfecção tripla de células HEK 293 aderentes e purificados por centrifugação em gradiente de iodixanol como previamente descrito em Lock, M., *et al.* Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale. *Human Gene Therapy* 21, 1259-1271 (2010). O capsídeo de Hu68 do sorotipo AAV foi descrito em WO2018/160582, que está aqui incorporado por referência na sua totalidade.

[00188] Mais particularmente, AAVhu68.GLB1 são produzidos por transfecção de plasmídeo triplo de células HEK293 WCB humanas com: 1) o plasmídeo do genoma do vetor *cis* AAV, 2) o plasmídeo *trans* AAV denominado pAAV2/hu68.KanR que codifica a replicase AAV2 (rep) e capsídeo AAVhu68 (cap), e 3) o plasmídeo de adenovírus auxiliar denominado pAdΔF6.KanR.

[00189] Descrição dos elementos de sequência do plasmídeo do genoma do vetor *cis* AAV:

- Repetição do Terminal Invertido (ITR): As ITRs são sequências idênticas, complementares reversas derivadas de AAV2 (130bp, GenBank # NC001401) que flanqueiam todos os componentes do genoma do vetor. As sequências de ITR funcionam como a origem da replicação do DNA do vetor e o sinal de empacotamento do genoma do vetor, quando AAV e as funções auxiliares de adenovírus são fornecidas

em *trans*. Como tal, as sequências ITR representam as únicas sequência *cis* necessárias para a replicação e empacotamento do genoma viral.

- Promotor: Elemento regulador derivado do promotor da ubiquitina C humana (UbC): Este promotor onipresente (1229 pb, GenBank # D63791.1) foi selecionado para conduzir a expressão do transgene em qualquer tipo de célula do CNS.

- Sequência de codificação: o gene GLB1, baseado no uso maximizado de códons humanos, codifica a beta-galactosidase. A enzima GLB1 catalisa a hidrólise de galactose ligada a β de gangliosídeos (2034 bp, 677 aa, Genbank # AAA51819.1, EC3.2.1.23).

- Íntron quimérico (CI) - um íntron híbrido que consiste em um doador de união de beta-globina humana e elementos aceptores de splice de imunoglobulina G (IgG)

- Sinal de poliadenilação SV40 (239 bp, Genbank # KP659662.1): O sinal de poliadenilação SV40 facilita a poliadenilação eficiente do gene mRNA em *cis*. Este elemento funciona como um sinal para a terminação transcricional, um evento de clivagem específica na extremidade 3' do transcrito nascente e adição de uma cauda de poliadenila longa.

[00190] AAVhu68 *Trans* Plasmídeo: pAAV2/hu68.KanR

[00191] O AAV2/hu68 *trans* plasmídeo pAAV2/hu68.KanR foi construído no laboratório do Dr. James M. Wilson na Universidade da Pensilvânia. O plasmídeo AAV2/hu68 *trans* codifica as quatro proteínas de tipo selvagem (WT) AAV2 replicase (Rep) necessárias para a replicação e empacotamento do genoma do vetor AAV. O plasmídeo *trans* AAV2/hu68 também codifica três proteínas do capsídeo da proteína do vírion WT AAVhu68 (Cap), que se montam em uma casca do vírion do sorotipo AAV hu68 para abrigar o genoma do vetor AAV. A sequência AAVhu68 foi obtida a partir de DNA de tecido cardíaco humano.

[00192] Para criar o plasmídeo *trans* AAV2/hu68, o gene cap AAV9 do plasmídeo pAAV2/9n que codifica os genes cap AAV2 rep e AAV9 de tipo selvagem em uma cadeia principal de plasmídeo derivado do vetor pBluescript KS foi removido e substituído pelo gene cap AAVhu68. O gene de resistência à ampicilina (AmpR) também foi substituído pelo gene de resistência à canamicina (KanR), resultando em pAAV2/hu68.KanR. O promotor p5 de AAV, que normalmente aciona a expressão de rep, é movido da extremidade 5' de rep para a extremidade 3' de cap, deixando para trás um promotor p5 truncado a montante de rep. Este promotor truncado serve para regular negativamente a expressão de rep e, conseqüentemente, maximizar a produção do vetor (FIG 1C). Todas as partes componentes do plasmídeo foram verificadas por sequenciamento direto.

[00193] pAdDeltaF6 (KanR) Plasmídeo auxiliar de adenovírus

[00194] O plasmídeo pAdDeltaF6 (KanR) tem um tamanho de 15.774 pb. O plasmídeo contém as regiões do genoma do adenovírus que são importantes para a replicação do AAV, ou seja, E2A, E4 e VA RNA (as funções E1 do adenovírus são proporcionadas pelas células HEK293), mas não contém outra replicação de adenovírus ou genes estruturais. O plasmídeo não contém os elementos *cis* críticos para replicação, como as repetições terminais invertidas adenovirais e, portanto, não se espera geração de adenovírus infecciosos. O plasmídeo foi derivado de um clone molecular de Ad5 com E1, E3 eliminado (pBHG10, um plasmídeo baseado em pBR322). As deleções foram introduzidas no DNA de Ad5 para remover a expressão de genes de adenovírus desnecessários e reduzir a quantidade de DNA de adenovírus de 32 kb a 12 kb. Finalmente, o gene de resistência à ampicilina foi substituído pelo gene de resistência à canamicina para criar pAdeltaF6 (KanR). Os genes adenovirais E2, E4 e VA1 que permanecem neste plasmídeo, juntamente com E1, que está presente nas células HEK293, são necessários para

a produção do vetor AAV.

[00195] AAVhu68.GM1 são fabricados por transfecção transitória de células HEK293 seguida de purificação a jusante. Um diagrama de fluxo do processo de fabricação é mostrado nas FIGs 12A - 12B. Os principais reagentes que entram na preparação do produto são indicados no lado esquerdo do diagrama e as avaliações de qualidade do processo são representadas no lado direito do diagrama. Uma descrição de cada etapa de produção e purificação também é fornecida.

[00196] Cultura de células e colheita: O processo de produção de cultura e colheita de células compreende quatro etapas principais de fabricação: semeadura e expansão de células, transfecção transitória, colheita de vetor e purificação de vetor (FIG 12A).

[00197] Semeadura e expansão de células: uma linha de células HEK293 totalmente caracterizada é usada para o processo de produção.

[00198] Transfecção transitória: Após aproximadamente 4 dias de crescimento (meio DMEM + 10% FBS), o meio de cultura celular é substituído por meio DMEM livre de soro fresco e as células são transfectadas com os 3 plasmídeos de produção usando um método de transfecção à base de polietilenoimina (PEI). Inicialmente, uma mistura de DNA/PEI é preparada contendo plasmídeo *cis* (genoma do vetor), plasmídeo *trans* (genes rep e cap) e plasmídeo auxiliar em uma razão com PEI de grau GMP (PEIPro HQ, PolyPlus Transfection SA). Esta razão de plasmídeo foi determinada como sendo ideal para a produção de AAV em estudos de otimização em pequena escala. Após misturar bem, a solução é deixada em temperatura ambiente por até 25 minutos, em seguida, adicionada a meio sem soro para extinguir a reação e, finalmente, adicionada ao biorreator iCELLis. O reator é controlado por temperatura e DO, e as células são incubadas por 5 dias.

[00199] Coleta de vetores: células e meios transfectados são colhidos do biorreator PALL iCELLis usando sacos de bioprocessos descartáveis, bombeando assepticamente o meio para fora do biorreator. Após a colheita, detergente, endonuclease e $MgCl_2$ (um cofator para a endonuclease) são adicionados para liberar o vetor e digerir o DNA não empacotado. O produto (em um saco de bioprocesso descartável) é incubado a 37°C durante 2 horas em um misturador de uso único com controle de temperatura para proporcionar tempo suficiente para digestão enzimática de DNA celular e plasmídico residual presente na colheita como resultado do procedimento de transfecção. Esta etapa é realizada para minimizar a quantidade de DNA residual no medicamento do vetor final. (DP) Após a incubação, NaCl é adicionado a uma concentração final de 500 mM para auxiliar na recuperação do produto durante a filtração e a filtração do fluxo tangencial a jusante (TFF).

[00200] Purificação do vetor: Células e detritos celulares são removidos do produto usando um pré-filtro e cápsula de filtro de profundidade (1,2 / 0,22 μm) conectada em série como um tubo fechado estéril e conjunto de bolsa que é acionado por uma bomba peristáltica. A purificação garante que os filtros a jusante e as colunas de cromatografia sejam protegidos contra incrustação e a filtração por redução de biocarga garante que, no final do trem de filtros, qualquer biocarga potencialmente introduzida durante o processo de produção a montante seja removida antes da purificação a jusante.

[00201] Processo de purificação: O processo de purificação compreende quatro etapas principais de fabricação: concentração e troca de tampão por TFF, cromatografia de afinidade, cromatografia de troca aniônica e concentração e troca de tampão por TFF. Essas etapas do processo são representadas no diagrama do processo de visão geral (FIG 12B). Descrições gerais de cada um desses processos são fornecidas a seguir

[00202] Filtração de fluxo tangencial em larga escala: A redução do volume (20 vezes) do produto purificado é obtida pela TFF usando um conjunto de membrana, saco e tubo de bioprocessamento estéril e fechado personalizado. O princípio do TFF é escoar uma solução sob pressão paralela a uma membrana de porosidade adequada (100 kDa). O diferencial de pressão direciona moléculas de tamanho menor através da membrana e efetivamente para o fluxo de resíduos, mantendo moléculas maiores que os poros da membrana. Ao recircular a solução, o fluxo paralelo varre a superfície da membrana, evitando o entupimento dos poros da membrana e a perda de produto por meio da ligação à membrana. Ao escolher um tamanho de poro de membrana e área de superfície apropriados, uma amostra líquida pode ser rapidamente reduzida em volume enquanto retém e concentra a molécula desejada. A diafiltração em aplicações de TFF envolve a adição de um tampão novo à amostra em recirculação na mesma taxa em que o líquido está passando através da membrana e na corrente de resíduos. Com volumes crescentes de diafiltração, quantidades crescentes das moléculas pequenas são removidas da amostra em recirculação. Esta diafiltração resulta em uma purificação modesta do produto clarificado, mas também alcança troca de tampão compatível com a etapa subsequente de cromatografia em coluna de afinidade. Consequentemente, utilizamos uma membrana PES de 100 kDa para concentração que é então diafiltrada com um mínimo de 4 diavolumes de um tampão composto de Tris 20 mM pH 7,5 e NaCl 400 mM. O produto diafiltrado é então ainda purificado com uma cápsula de filtro de 1,2/0,22 µm de profundidade para remover qualquer material precipitado.

[00203] Cromatografia de afinidade: O produto diafiltrado é aplicado a uma resina de afinidade de PorosTM Capture-SelectTM AAV (Life Technologies) que captura com eficiência o sorotipo AAVhu68. Sob essas con-

dições iônicas, uma porcentagem significativa de DNA e proteínas celulares residuais flui através da coluna, enquanto as partículas do AAV são capturadas com eficiência. Após a aplicação, a coluna é tratada com 5 volumes de uma solução de endonuclease de baixo teor de sal (250 U/mL de endonuclease, 20 mM de Tris pH 7,5 e 40 mM de NaCl, 1,5 mM de $MgCl_2$) para remover qualquer célula hospedeira restante e ácido nucleico de plasmídeo. A coluna é lavada para remover impurezas de alimentação adicionais, seguida por uma etapa de eluição de baixo pH (NaCl 400 mM, Citrato de sódio 20 mM, pH 2,5) que é imediatamente neutralizado por coleta em um volume 1/10 de um tampão de neutralização (Bis Tris 200 mM Propano, pH 10,2).

[00204] Cromatografia de troca aniônica: Para conseguir uma redução adicional de impurezas em processo, incluindo partículas de AAV vazias, o agrupado de eluição de Poros AAV é diluído 50 vezes (Bis Tris Propano 20 mM, 0,001% de Pluronic F68, pH 10,2) para reduzir a força iônica e permitir a ligação a uma matriz de monólito CIMultus™ QA (BIA Separations). Após uma lavagem com baixo teor de sal, o produto do vetor é eluído usando um gradiente linear de sal de NaCl de 60 volumes de coluna (CV) (NaCl 10-180 mM). Esse gradiente de sal superficial eficazmente separa as partículas do capsídeo sem um genoma de vetor (partículas vazias) das partículas que contêm o genoma do vetor (partículas completas) e resulta em uma preparação enriquecida para os partículas completas. O eluato do pico de partícula completo é recolhido, neutralizado e diluído 20 vezes em Bis Tris Propano 20 mM, Pluronic F68 a 0,001%, pH 10,2 e reaplicado na mesma coluna, que foi limpa no local. O gradiente de sal NaCl 10-180 mM é reaplicado e o pico de partícula completo apropriado é coletado. A área do pico é avaliada e comparada com os dados anteriores para determinação do rendimento aproximado do vetor.

[00205] Concentração e troca de tampão por filtração de fluxo tangencial de fibra oca: O intermediário de troca aniônica agrupado é concentrado e trocado de tampão usando TFF. Nesta etapa, uma membrana TFF de fibra oca de 100 kDa é usada. Durante esta etapa, o produto é levado a uma concentração alvo e, em seguida, trocado por tampão no tampão de formulação final intratecal (ITFFB, isto é, CSF artificial com 0,001% de Pluronic® F68). O produto é esterilizado por filtração (0,22 µm), armazenado em recipientes esterilizados e congelado a ≤ -60 ° C em um local de quarentena até a liberação para o preenchimento final.

[00206] Preenchimento final: O produto congelado é descongelado, agrupado e ajustado para a concentração alvo (etapa de diluição ou concentração via TFF) usando o tampão de formulação final. O produto é filtrado terminalmente através de um filtro de 0,22 µm e colocado em frascos estéreis West Pharmaceutical's Crystal Zenith (polímero de olefina cíclica) e rolhas com selos cravados em um volume de preenchimento a ser determinado. Os frascos são rotulados individualmente. Os frascos rotulados são armazenados a ≤ 60 °C.

EXEMPLO 3

[00207] Um vetor de AAV otimizado que expressa β-gal humano foi desenvolvido e o impacto da administração do vetor no CSF foi avaliado na atividade da enzima cerebral, lesões de armazenamento lisossomal e sinais neurológicos usando um modelo de doença murina.

A. Materiais e Métodos:

[00208] Procedimentos com animais: Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Uso e Cuidado Institucional de Animais da Universidade da Pensilvânia. Camundongos knockout para GLB1 foram obtidos no RIKEN BioResource Research Center. Os camundongos foram mantidos como portadores heterozigotos em um fundo C57BL/6J. Para as injeções ICV, os vetores foram diluídos em

solução salina tamponada com fosfato estéril (Gibco) para um volume de 5 μ L, e as injeções foram realizadas à mão livre em camundongos anestesiados com isoflurano usando uma seringa estanque ao gás personalizada (Hamilton) e uma agulha cimentada de calibre 27 de 10 mm, com tubo de plástico conectado à base da agulha para limitar a penetração a uma profundidade de 3 mm. A coleta de sangue submandibular foi realizada em camundongos anestesiados com isoflurano. O sangue foi coletado em tubos separadores de soro, coagulado e separado por centrifugação antes da alíquota e congelamento a ≤ -60 °C. No momento da necropsia, os camundongos foram sedados com cetamina e xilazina e o CSF foi coletado por punção suboccipital usando agulha de calibre 32 conectada ao tubo de polietileno. A eutanásia foi realizada por deslocamento cervical. CSF, coração, pulmão, fígado e baço foram imediatamente congelados em gelo seco e armazenados a ≤ -60 °C. Os cérebros foram removidos e uma fatia coronal do lobo frontal foi coletada e congelada para estudos bioquímicos. O restante do cérebro foi usado para análise histológica.

[00209] Os vetores foram gerados conforme descrito nos Exemplos 1 e 2.

[00210] Razão de partículas vazias:cheias: As amostras de vetor são carregadas em células com peças centrais de epon de carvão de dois canais com comprimento de caminho óptico de 12 mm. O tampão de diluição fornecido é carregado no canal de referência de cada célula. As células carregadas são então colocadas em um rotor analítico AN-60Ti e carregadas em uma ultracentrífuga analítica Beckman-Coulter ProteomeLab XL-I equipada com detectores de absorbância e RI. Após o equilíbrio total da temperatura a 20°C, o rotor é levado à velocidade final de funcionamento de 12.000 rpm. Absorvância em varreduras de 280 nm são registradas aproximadamente a cada 3 minutos por aproxima-

damente 5,5 horas (110 varreduras no total para cada amostra). Os dados brutos são analisados usando o método c (s) e implementados no programa de análise SEDFIT. As distribuições de tamanho resultantes são representadas graficamente e os picos integrados. Os valores percentuais associados a cada pico representam a fração da área do pico da área total sob todos os picos e são baseados nos dados brutos gerados a 280 nm; muitos laboratórios usam esses valores para calcular as razões de partículas vazias:cheias. No entanto, como as partículas vazias e cheias têm coeficientes de extinção diferentes neste comprimento de onda, os dados brutos podem ser ajustados de acordo. A razão da partícula vazia e os valores de pico do monômero cheio antes e depois do ajuste do coeficiente de extinção é usada para determinar a razão de partícula vazia: cheia.

[00211] Ensaio de AAV competente para replicação: Uma amostra é analisada quanto à presença de AAV2/hu68 (rcAAV) competente para replicação que poderia surgir durante o processo de produção. O componente baseado em células consiste em inocular monocamadas de células HEK293 (P1) com diluições da amostra de teste e adenovírus humano tipo 5 (Ad5) de tipo selvagem (WT). A quantidade máxima do produto testado é $1,0 \times 10^{10}$ GC do produto vetorial. Devido à presença de adenovírus, rcAAV amplifica na cultura de células. Após 2 dias, um lisado celular é gerado e o Ad5 é inativado pelo calor. O lisado purificado é então passado para uma segunda rodada de células (P2) para aumentar a sensibilidade (novamente na presença de Ad5). Após 2 dias, um lisado celular é gerado e o Ad5 é inativado pelo calor. O lisado purificado é então passado para uma terceira rodada de células (P3) para maximizar a sensibilidade (novamente na presença de Ad5). Após 2 dias, as células são lisadas para liberar DNA, que é então submetido a qPCR para detectar sequências cap AAVhu68. A amplificação de sequências cap de AAVhu68 de uma maneira dependente de Ad5 indica

a presença de rcAAV. O uso de um controle positivo substituto AAV2/hu68 contendo os genes AAV2 rep e AAVhu68 cap permite que o limite de detecção do ensaio seja determinado (0,1, 1, 10 e 100 IU). Usando uma diluição em série de rAAV ($1,0 \times 10^{10}$, $1,0 \times 10^9$, $1,0 \times 10^8$, e $1,0 \times 10^7$ GC), a quantidade aproximada de rcAAV presente na amostra de teste pode ser quantificada.

[00212] Potência *in vitro*: para relacionar o título do ddPCR GC à expressão do gene, é realizado um bioensaio de potência relativa *in vitro*. Resumidamente, as células são plaqueadas em uma placa de 96 poços e incubadas a 37 °C/5% de CO₂ durante a noite. No dia seguinte, as células são infectadas com o vetor AAV diluído em série e são incubadas a 37 °C/5% de CO₂ por até 3 dias. O sobrenadante celular é coletado e analisado quanto à atividade β-gal com base na clivagem de um substrato fluorogênico.

[00213] Proteína total, proteína do capsídeo, pureza da proteína e razão da proteína do capsídeo: As amostras de vetor são primeiro quantificadas para proteína total contra uma curva padrão de proteína de albumina de soro bovino (BSA) usando um ensaio de ácido bicinconínico (BCA). A determinação é feita misturando partes iguais da amostra com um reagente Micro-BCA fornecido no kit. O mesmo procedimento é aplicado a diluições de um padrão BSA. As misturas são incubadas a 60 °C e a absorbância medida a 562 nm. Uma curva padrão é gerada a partir da absorbância padrão das concentrações conhecidas usando um ajuste de 4 parâmetros. Amostras desconhecidas são quantificadas de acordo com a regressão de 4 parâmetros. Para fornecer uma determinação semiquantitativa da pureza do rAAV, as amostras são normalizadas para o título do genoma e $5,0 \times 10^9$ GC são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) sob condições de redução. O gel SDS-PAGE é então corado com corante SYPRO Ruby. Quaisquer bandas de impurezas são quantificadas

por densitometria. As bandas coradas que aparecem além das três proteínas específicas de AAV (VP1, VP2 e VP3) são consideradas impurezas de proteínas. A porcentagem da massa de impurezas, bem como o peso molecular aproximado das bandas de contaminantes, são relatados. O gel SDS-PAGE também é usado para quantificar as proteínas VP1, VP2 e VP3 e determinar sua razão.

[00214] Ensaios de atividade enzimática: Os tecidos foram homogeneizados em NaCl a 0,9%, pH 4,0, usando um homogeneizador de esferas de aço (TissueLyzer, Qiagen). Após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras foram purificadas por centrifugação e o teor de proteína foi quantificado por ensaio BCA. Amostras de soro foram usadas diretamente para ensaios enzimáticos. Para o ensaio de atividade β -gal, 1 μ L de amostra foi combinado com 99 μ L de 0,5 mM de 4-metilumbeliferil β -D-galactopiranosídeo (Sigma M1633) em 0,15 M de NaCl, 0,05% de Triton-X100, 0,1 M de acetato de sódio, pH 3,58. A reação foi incubada a 37 °C durante 30 minutos, depois parada pela adição de 150 μ L de glicina 290 mM, citrato de sódio 180 mM, pH 10,9. A fluorescência foi comparada com diluições padrão de 4MU. A atividade β -gal é expressa em nmol 4MU liberados por hora por mg de proteína (tecidos) ou por ml de soro ou CSF. O ensaio HEX foi realizado da mesma maneira que o ensaio de atividade β -gal usando 1 mM 4-Metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma M2133) como substrato e volumes de amostra de 1 μ L para lisados de tecido e 2 μ L para soro.

[00215] Histologia: Os cérebros foram fixados durante a noite em 4% de paraformaldeído, equilibrados em 15% e 30% de sacarose e, em seguida, congelados em meio de incorporação de OCT. As crio-seções foram coradas com filipina (Sigma, 10 μ g/mL) ou anticorpos contra GFAP ou LAMP1.

[00216] ELISA de anticorpo anti- β -gal: Placas de ELISA de poliestireno de alta ligação foram revestidas durante a noite com 100 μ L por

poço de β -gal humano recombinante (R&D Systems) a uma concentração de 1 μ g/mL em PBS. As placas foram lavadas e bloqueadas durante 2 horas à temperatura ambiente com albumina de soro bovino a 2% em PBS. Os poços duplicados foram incubados com amostras de soro diluídas 1:1.000 em PBS durante uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas, incubadas por uma hora com um anticorpo policlonal IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase de rábano silvestre diluído 1:5.000 em solução de bloqueio e desenvolvido usando substrato TMB.

[00217] Análise da marcha: A análise da marcha foi realizada utilizando o sistema CatWalk XT (Noldus) de acordo com as instruções do fabricante. Os camundongos foram testados em dois dias consecutivos. Pelo menos 3 ensaios completos foram adquiridos para cada animal em cada dia de teste. Ensaios com duração de mais de 5 segundos, ou ensaios em que o animal não percorreu todo o comprimento do aparelho antes de parar ou se virar foram excluídos da análise.

B. Resultados:

[00218] Cassetes de transgene foram projetadas consistindo em um cDNA de GLB1 humano conduzido pelo promotor de beta actina de galinha com um intensificador de citomegalovírus (CB7), promotor alfa do fator de iniciação de alongamento humano 1 (EF1a) ou promotor da ubiquitina C humana (UbC). Cada cassete foi embalado em um capsídeo AAVhu68, e uma dose única de 10^{11} cópias do genoma (GC) foi administrada por injeção intracerebroventricular (ICV) para camundongos do tipo selvagem. Duas semanas após a injeção, a atividade β -gal foi medida no cérebro e no CSF (FIGs 2A - 2B). O vetor carregando o promotor UbC alcançou elevações estatisticamente significativas na atividade β -gal no cérebro e no CSF, com atividade enzimática quase 2 vezes maior do que a de camundongos do tipo selvagem não tratados no cérebro e 10 vezes maior no CSF. O vetor de AAVhu68.UbC.hGLB1 foi, portanto,

selecionado para estudos adicionais.

[00219] A eficácia do vetor otimizado foi avaliada no modelo de camundongo GLB1^{-/-}. Modelos de camundongo de gangliosidose GM1 foram desenvolvidos por inserção direcionada de cassetes de resistência à neomicina no 6° e/ou 15° éxons do gene GLB1. Hahn, C.N., *et al.* Generalized CNS disease and massive GM1-ganglioside accumulation in mice defective in lysosomal acid beta-galactosidase. *Human molecular genetics* 6, 205-211 (1997) and Matsuda, J., *et al.* Beta-galactosidase-deficient mouse as an animal model for GM1-gangliosidosis. *Glycoconjugate journal* 14, 729-736 (1997). Semelhante aos pacientes infantis com gangliosidose GM1, esses camundongos não expressam β -gal funcional e exibem um rápido acúmulo de gangliosídeo GM1 no cérebro. O armazenamento de GM1 no cérebro já é aparente nas primeiras semanas de vida e, aos 3 meses de idade, os camundongos GLB1^{-/-} têm um grau semelhante de acúmulo de GM1 no cérebro ao de um paciente infantil GM1 de 8 meses de idade (Hahn 1997, conforme citado acima). O fenótipo clínico do camundongo GLB1^{-/-} modela mais de perto o da gangliosidose infantil GM1, com anormalidades motoras aparecendo por volta dos 4 meses de idade e sintomas neurológicos graves (*por exemplo*, ataxia ou paralisia), necessitando de eutanásia apresentada por volta dos 10 meses de idade (Hahn 1997; Matsuda 1997, conforme citado acima). O modelo de camundongo GLB1^{-/-} não exibe nenhum envolvimento de órgãos periféricos, ao contrário dos pacientes infantis GM1 que frequentemente desenvolvem deformidades ósseas e hepatoesplenomegalia (Hahn 1997; Matsuda 1997, como citado acima). O camundongo GLB1^{-/-} é, portanto, um modelo representativo das características neurológicas da gangliosidose GM1 infantil, mas não das manifestações da doença sistêmica.

[00220] Os camundongos GLB1^{-/-} foram tratados com um mês de

idade e observados até os quatro meses de idade, quando eles normalmente desenvolveriam anormalidades marcadas na marcha associadas a níveis cerebrais de GM1 semelhantes aos de pacientes com gangliosidose GM1 infantil com doença avançada (Matsuda 1997, como citado acima). Os camundongos GLB1^{-/-} foram tratados com uma única injeção ICV de $1,0 \times 10^{11}$ cópias do genoma (GC) de AAVhu68.UbC.hGLB1 (n = 15) ou veículo (n = 15). Um grupo de camundongos heterozigotos (GLB1^{+/-}) tratados com veículo (n = 15) serviu como controles normais. O soro foi coletado no dia da injeção (Dia 0) e nos Dias 10, 28, 60 e 90. A função motora foi avaliada por meio do sistema de análise de marcha CatWalk XT (Noldus) 90 dias após o tratamento, após o qual os animais foram sacrificados e os tecidos coletados para análise histológica e bioquímica.

[00221] Um camundongo tratado com AAV morreu durante o procedimento de injeção ICV. Todos os outros camundongos sobreviveram até o ponto final do estudo de 90 dias. A distribuição de AAV no CSF demonstrou resultar na distribuição do vetor no sangue periférico e na transdução hepática significativa. (Hinderer, C., *et al.* Intrathecal gene therapy corrects CNS pathology in a feline model of mucopolysaccharidosis I. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 22, 2018-2027 (2014); Gray, S.J., Nagabhushan Kalburgi, S., McCown, T.J. & Jude Samulski, R. Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene therapy* 20, 450-459 (2013); Haurigot, V., *et al.* Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *The Journal of Clinical Research* (2013); Hinderer, C., *et al.* Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. *Molecular Therapy. Methods & clinical development* 1, 14051 (2014); Hordeaux, J., *et al.* Toxicology Study of Intra-Cisterna

Magna Adeno-Associated Virus 9 Expressing Human Alpha-L-Iduronidase in Rhesus Macaques. *Molecular Therapy. Methods & clinical development* 10, 79-88 (2018)). Camundongos GLB1^{-/-} tratados com AAVhu68.UbC.hGLB1 apresentaram atividade sérica β -gal maior do que a de controles heterozigotos (GLB1^{+/-}) 10 dias após a administração do vetor (FIG 3A). Os anticorpos séricos contra β -gal humano foram detectados em 5/15 camundongos tratados com AAVhu68.UbC.hGLB1 no dia 90. A atividade sérica elevada β -gal persistiu ao longo do estudo para todos, exceto dois camundongos, ambos os quais desenvolveram anticorpos contra β -gal humana (FIG 6). Órgãos periféricos, incluindo o coração, pulmão, fígado e baço, também exibiram atividade β -gal elevada (FIGs 3B-3E). Alguns animais que desenvolveram anticorpos contra o produto do transgene humano apresentaram menor atividade β -gal em órgãos periféricos.

[00222] O CSF coletado no momento da necropsia demonstrou atividade β -gal excedendo a dos controles heterozigotos em camundongos GLB1^{-/-} tratados com AAVhu68.UbC.hGLB1 (FIG 4B). A atividade β -gal nos cérebros de camundongos tratados com vetor foi semelhante aos controles heterozigotos (FIG 4A). Os anticorpos anti- β -gal não pareceram afetar os níveis de β -gal no cérebro ou no CSF.

[00223] A correção das anormalidades cerebrais foi avaliada por meio de ensaios bioquímicos e histológicos. As enzimas lisossomais são frequentemente reguladas positivamente no contexto de armazenamento lisossomal, uma observação que foi confirmada em pacientes com gangliosidose GM1 (Van Hoof, F. & Hers, H.G. The abnormalities of lysosomal enzymes in mucopolysaccharidoses. *European Journal of Biochemistry* 7, 34-44 (1968)). Portanto, a atividade da enzima lisossomal hexosaminidase (HEX) foi medida em lisados cerebrais. A atividade de HEX foi elevada em amostras de cérebro de camundongos GLB1^{-/-} tratados com veículo e foi normalizada em animais tratados com vetor (FIG

5).

[00224] Lesões de armazenamento lisossomal foram avaliadas pela coloração de seções cerebrais com filipina, uma molécula fluorescente que se liga ao gangliosídeo GM1, bem como imunomarcacão para a membrana associada ao lisossoma 1 (proteína LAMP1). A filipina também se liga ao colesterol não esterificado, embora estudos anteriores tenham demonstrado que a coloração com filipina reflete principalmente o acúmulo de GM1 em camundongos GLB1^{-/-} (Arthur, J.R., Heinecke, K.A. & Seyfried, T.N. Filipin recognizes both GM1 and cholesterol in GM1 gangliosidosis mouse brain. *Journal of lipid research* 52, 1345-1351 (2011)). A coloração de filipina revelou acentuado acúmulo de GM1 em neurônios do córtex, hipocampo e tálamo de camundongos GLB1^{-/-} tratados com veículo que foi normalizado em camundongos tratados com AAVhu68.UbC.hGLB1 (dados não mostrados). A imuno-histoquímica de LAMP1 demonstrou aumento da coloração da membrana lisossomal no córtex e tálamo de camundongos GLB1^{-/-}, que foi reduzida em camundongos tratados com vetor (dados não mostrados). A gliose foi avaliada por coloração para o marcador de astrócitos, proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Os camundongos GLB1^{-/-} tratados com vetor exibiram astrogliose acentuadamente reduzida no tálamo em comparação com os controles tratados com veículo (dados não mostrados).

[00225] A fim de avaliar a função neurológica em camundongos GLB1^{-/-} tratados com vetor, a análise da marcha foi realizada aos 4 meses de idade (3 meses após a administração do vetor ou veículo). Os camundongos GLB1^{-/-} não tratados foram previamente observados para exibir anormalidades de marcha clinicamente aparentes por volta dos 3-4 meses de idade. Avaliações quantitativas de marcha realizadas usando o sistema CatWalk em uma coorte de camundongos GLB1^{-/-} não tratados e controles normais revelaram uma variedade de anormalida-

des, incluindo velocidade de caminhada voluntária mais lenta, diferenças no comprimento da passada e a duração de algumas fases do ciclo de passos (FIGs 7C e 7D). Devido à velocidade de caminhada significativamente mais lenta dos camundongos GLB1^{-/-}, a interpretação de muitas dessas diferenças aparentes foi complicada pela dependência da velocidade da maioria dos parâmetros de marcha (FIGs 8A e 8B) (Batka, R.J., *et al.* The need for speed in rodent locomotion analyses. Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007) 297, 1839-1864 (2014)). Os camundongos GLB1^{-/-} também exibiram uma anormalidade consistente na colocação das patas traseiras, que pode ser medida como um comprimento aumentado das impressões das patas traseiras (FIG 7D). Esta anormalidade foi considerada independente da velocidade de caminhada, consistente com relatórios anteriores (Batka, *et al.*, como citado acima), tornando-se uma assinatura de marcha útil para avaliar disfunção de marcha independente de velocidade em camundongos GLB1^{-/-} (FIGs 8A e 8B). Os testes conduzidos usando a mesma coorte de camundongos em dois dias consecutivos revelaram que a velocidade de caminhada voluntária mais lenta e o comprimento da impressão posterior aumentada são observações reproduzíveis em camundongos GLB1^{-/-} não tratados (FIGs 7A e 7B). Os camundongos GLB1^{-/-} tratados com veículo exibiram anormalidades de marcha semelhantes às previamente identificadas em animais não tratados (FIGs 7A-7G). A velocidade de caminhada e o comprimento de impressão foram normalizados em camundongos GLB1^{-/-} tratados com vetor (FIGs 7A-7G).

C. Discussão:

[00226] Este estudo demonstrou diminuição das lesões de armazenamento neuronal em camundongos GLB1^{-/-} tratados com um vetor AAV com 4 semanas de idade. Isso ocorre uma semana após o aparecimento de lesões de armazenamento cerebral proeminentes neste modelo (Hahn 1997, como citado aqui). Estes resultados sugerem que a

administração de AAVhu68.hGLB1 no CSF aumenta a atividade β -gal do cérebro, reduz as lesões de armazenamento lisossomal neuronal e evita o declínio neurológico, e a transferência de genes pode prevenir e reverter o armazenamento de GM1 no cérebro.

EXEMPLO 4: Modelos Animais

A. Identificação da dose mínima eficaz (MED) de AA-Vhu68.UbC.GLB1 no modelo de camundongo GLB1^{-/-}

[00227] O impacto de diferentes doses de rAAVhu68.UbC.GLB1 foi avaliada em lesões do CNS e sinais neurológicos no modelo de camundongo GLB1^{-/-}. A eficácia foi avaliada pela atividade enzimática sérica, redução de lesões cerebrais, sinais neurológicos medidos por análise de marcha automatizada (por exemplo, através do sistema CatWalk) e um exame neurológico padronizado (por exemplo, avaliação de 9 pontos de postura, função motora, sensação e reflexos) realizado por um revisor cego e sobrevivência. Análises de segurança (incluindo coleta e análise de sangue) também foram realizadas. Camundongos GLB1^{-/-} de quatro semanas de idade receberam uma de 4 doses de rAAVhu68.UbC.GLB1 ($1,3 \times 10^{11}$ GC, $4,4 \times 10^{10}$ GC, $1,3 \times 10^{10}$ GC ou $4,4 \times 10^9$ GC) ou veículo por injeção ICV (n = 24 por grupo). Os irmãos heterozigotos da mesma ninhada tratados com veículo (n = 24) serviram como controles normais.

[00228] A atividade da enzima β -gal sérica, a análise da marcha e o exame neurológico foram realizados em metade dos animais de cada grupo a cada 60 dias, enquanto os pesos corporais foram medidos pelo menos a cada 30 dias em um período de observação de 120 dias. Os resultados estão representados graficamente como FIGs 9A-9F e brevemente descritos a seguir.

[00229] Todos os camundongos tratados pareciam saudáveis, exibindo ganho de peso normal. Durante o período de observação, não foram detectadas diferenças significativas nos pesos corporais entre os

grupos (FIG 9B).

[00230] A expressão da enzima sérica foi consistente com o estudo discutido no Exemplo 3. Como mostrado na FIG 9A, a atividade da enzima β -gal dos camundongos GLB1^{-/-} tratados com veículo (que serviu como um controle negativo) permaneceu em torno de 10 nmol/mL/hora, enquanto o grupo de controle positivo (que são camundongos GLB1^{+/-} tratados com veículo) demonstrou uma atividade enzimática de cerca de 100 nmol/mL/h. Após o tratamento com rAAVhu68.UbC.GLB1 a uma dose de $4,4 \times 10^{10}$ GC por camundongo, a atividade da enzima β -gal aumentou significativamente em comparação com o controle negativo no Dia 60 e no Dia 120. Uma dose mais alta de rAAVhu68.UbC.GLB1 a $1,3 \times 10^{11}$ GC por camundongo resultou em uma atividade da enzima β -gal maior do que o controle positivo no Dia 60 com uma elevação adicional no Dia 120.

[00231] O fenótipo de marcha do camundongo GM1 também foi consistente com os resultados anteriores mostrados no Exemplo 3. A classificação do exame neurológico, o comprimento da impressão da pata traseira, o tempo de balanço do membro posterior e o comprimento da passada do membro posterior foram adquiridos e os resultados estão representados nas FIGs. 9C-9F. Para todos os quatro parâmetros plotados, há uma diferença estatística significativa entre o controle negativo e o controle positivo, indicando que esses parâmetros podem servir como bons indicadores para avaliar a eficácia. Em comparação com camundongos GLB1^{-/-} tratados com veículo, camundongos tratados com $4,4 \times 10^{10}$ GC de rAAVhu68.UbC.GLB1 mostrou melhorias significativas no comprimento da impressão da pata traseira, tempo de balanço do membro posterior e comprimento da passada do membro posterior. Uma dose mais alta de $1,3 \times 10^{11}$ GC proporcionou um tempo de balanço aumentado e um comprimento de passada mais longo no membro posterior, indicando correções bem-sucedidas. O exame neurológico é mais

sensível em comparação com a análise da marcha. Uma melhora dependente da dosagem mostrada pela pontuação neurológica diminuída com o aumento da dose foi observada como mostrado na FIG 9C, enquanto o tratamento com $1,3 \times 10^{10}$ GC de rAAVhu68.UbC.GLB1 apresentou significância estatística na pontuação total em comparação ao controle negativo. A evidência de correção de fenótipo foi observada em doses tão baixas quanto $1,3 \times 10^{10}$ GC por camundongo.

[00232] O mesmo conjunto de parâmetros continua sendo coletado nesta coorte de animais por pelo menos mais 150 dias, quando todos os animais não tratados devem permanecer vivos. São avaliadas as mudanças de sobrevivência em relação a camundongos Glb1^{-/-} não tratados.

[00233] A primeira metade dos animais discutidos no parágrafo anterior é sacrificada 270 dias após o tratamento. A metade restante dos animais é sacrificada 150 dias após o tratamento. Outros 24 camundongos serviram como um controle de necropsia de linha de base. As comparações histológicas e bioquímicas são realizadas entre animais tratados e não tratados para todos os animais sacrificados. Após a necropsia, os cérebros são seccionados e corados para LAMP1 para avaliar as lesões de armazenamento lisossomal, que são quantificadas usando um sistema de imagem automatizado. A atividade β -gal é medida no cérebro, soro e órgãos periféricos. Para análise de segurança, o sangue é coletado na necropsia para hemogramas completos e painéis de química sérica, e o cérebro, medula espinhal, coração, pulmões, fígado, baço, rins e gônadas são coletados para avaliação histopatológica por um patologista veterinário certificado. A menor dose de rAAVhu68.UbC.GLB1 que atinge uma redução significativa de lesões de armazenamento cerebral em relação aos camundongos GLB1^{-/-} tratados com veículo é selecionada como a dose eficaz mínima (MED).

B. Estudo de toxicologia em primatas não humanos (NHPs)

[00234] Os macacos Rhesus foram selecionados para estudos de toxicologia porque eles reproduzem melhor o tamanho e a anatomia do CNS da população de pacientes (crianças de 4 a 18 meses de idade) e podem ser tratados usando a via de administração clínica (ROA). Os animais juvenis foram selecionados para serem representativos da população pediátrica do ensaio. Em uma modalidade, os macacos rhesus juvenis têm de 15 a 20 meses de idade. A semelhança em tamanho, anatomia e ROA, resultando em distribuição de vetores representativos e perfis de transdução, permitem uma avaliação precisa da toxicidade. Além disso, avaliações neurológicas mais rigorosas são realizadas em NHPs do que em modelos de roedores, permitindo uma detecção mais sensível da toxicidade do CNS.

[00235] Um estudo de segurança compatível com GLP de 120 dias é conduzido em macacos rhesus juvenis para investigar a toxicologia de AAVhu68.UbC.GLB1 após a administração ICM. O período de avaliação de 120 dias foi selecionado, pois isso permite tempo suficiente para um produto transgene secretado atingir níveis de platô estáveis após a administração de ICM AAV. O projeto do estudo está descrito na Tabela a seguir. Os macacos Rhesus recebem um de três níveis de dose: $3,0 \times 10^{12}$ GC no total, $1,0 \times 10^{13}$ GC no total ou $3,0 \times 10^{13}$ GC no total ($n = 6/\text{dose}$) ou veículo ($n = 4$). Os níveis de dose foram selecionados para serem equivalentes aos que são avaliados no estudo MED quando dimensionados pela massa cerebral (assumindo 0,4 g para camundongos e 90 g para macacos rhesus). São realizados exames neurológicos de linha de base, patologia clínica (contagens de células com diferenciais, química clínica e painel de coagulação), química do CSF e citologia do CSF. Depois da administração de AAVhu68.UbC.GLB1 ou de veículo, os animais são monitorados diariamente para sinais de angústia e comportamento anormal.

[00236] Avaliações de patologia clínica de sangue e CSF e exames

neurológicos são realizados semanalmente durante 30 dias após a administração de rAAVhu68.UbC.GLB1 ou de veículo, e a cada 30 dias a partir de então. Na linha de base e em cada ponto de tempo de 30 dias daí em diante, anticorpos neutralizantes para AAVhu68 e respostas de linfócitos T citotóxicos (CTL) para AAVhu68 e para o produto transgene AAVhu68.UbC.GLB1 são avaliados por um ensaio de imunospot ligado a enzima (ELISpot) de interferon gama (IFN- γ).

[00237] Estudo de toxicologia das Boas Práticas de Laboratório (GLP) do macaco Rhesus

Designação de Grupo	1	2	3	4
Número de macacos	4	6	6	6
Sexo/Idade	M + F/juvenil	M + F/juvenil	M + F/juvenil	M + F/juvenil
Artigo de teste	Veículo	AAVhu68.UbC.GLB1	AAVhu68.UbC.GLB1	AAVhu68.UbC.GLB1
Via de administração	ICM	ICM	ICM	ICM
Dose do vetor (dose total)	N/A	$3,0 \times 10^{12}$ GC	$1,0 \times 10^{13}$ GC	$3,0 \times 10^{13}$ GC
Dia da necropsia	60 (3) 120 (3)	60 (3) 120 (3)	60 (3) 120 (3)	60 (3) 120 (3)

[00239] Após a administração de rAAVhu68.UbC.GLB1 ou veículo, metade dos animais é sacrificada no Dia 60 e metade é sacrificada no Dia 120. Os tecidos são colhidos para exame histopatológico microscópico abrangente. O exame histopatológico se concentra nos tecidos do sistema nervoso central (cérebro, medula espinhal e gânglios da raiz dorsal) e no fígado porque esses são os tecidos mais transduzidos após a administração de ICM de vetores AAVhu68. Além disso, os linfócitos são colhidos do baço e da medula óssea para avaliar a presença de células T reativas para o produto tanto do capsídeo quanto do produto do transgene nesses órgãos no momento da necropsia.

[00240] A biodistribuição do vetor é avaliada por PCR quantitativo em amostras de tecido. Os genomas do vetor são quantificados em amostras de soro e CSF.

C. Toxicidade de neurônios sensoriais em estudos não clínicos de AAV

[00241] Estudos não clínicos avaliando a administração sistêmica e

intratecal (IT) de AAV demonstraram consistentemente transdução eficiente de neurônios sensoriais dentro dos gânglios da raiz dorsal (DRG) e, em alguns casos, evidências de toxicidade envolvendo essas células. A administração intratecal pode permitir a transdução de neurônios sensoriais porque seus axônios centrais estão expostos ao CSF, ou o rAAV pode atingir diretamente o corpo celular, uma vez que o DRG está exposto ao CSF espinhal.

[00242] Espera-se que a degeneração assintomática mínima a leve dos neurônios sensoriais DRG apareça no estudo toxicológico de AA-Vhu68.UbC.GLB1 GLP NHP em todas as doses avaliadas. Com base nos dados não clínicos e clínicos existentes para outros programas AAV, é antecipado que os achados dos neurônios sensoriais não se traduzem em eventos adversos em humanos e, portanto, lesões neuronais sensoriais assintomáticas não são usadas para a determinação da dose máxima tolerada (MTD) em estudos não clínicos. No entanto, o verdadeiro risco de toxicidade dos neurônios sensoriais em humanos é desconhecido. O ensaio atual é projetado para melhorar ainda mais o perfil de segurança de ensaios clínicos anteriores de AAV usando uma via de administração ICM que requer doses mais baixas de AA-Vhu68.UbC.GLB1 do que as tipicamente administradas sistemicamente, e que parece resultar em um menor grau de toxicidade dos neurônios sensoriais. Este estudo emprega monitoramento detalhado para alterações sensoriais, bem como estudos de condução nervosa para detectar até mesmo toxicidade DRG subclínica. Dada a gravidade da gangliosidose GM1 infantil, espera-se que o perfil de risco-benefício para a administração de ICM de AA-Vhu68.UbC.GLB1 permaneça favorável, apesar do risco desconhecido de toxicidade dos neurônios sensoriais.

EXEMPLO 5: Um estudo de escalonamento de dose multicêntrico, de rótulo aberto, de fase 1/2, para avaliar a segurança e a tolerabilidade de

doses únicas de rAAVhu68.GLB1 administrado na cisterna magna (ICM) de pacientes pediátricos com gangliosidose GM1 infantil

[00243] Sujeitos entre 1 mês e 18 meses de idade com a forma infantil de gangliosidose GM1 são selecionados para o estudo de fase 1/2, pois representam a população com a maior necessidade não atendida e o curso de doença mais devastador caracterizado pelo declínio rápido e previsível do comprometimento tanto motor quanto cognitivo (Jarnes Utz *et al.*, 2017, Infantile gangliosidoses: Mapping a timeline of clinical changes. *Molecular Genetics and Metabolism*. 121 (2): 170-179). Pacientes com gangliosidose GM1 infantil geralmente têm início de sintomas com manifestações neurológicas antes dos 6 meses de idade, com alguns pacientes que se apresentam ao nascimento com hipotonia, retardo psicomotor ou outras manifestações da doença (Caciotti *et al.*, 2011, GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: An update on genetic alterations and clinical findings. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1812 (7):782-790). A maioria dos pacientes com GM1 infantil morre nos primeiros anos de vida (sobrevida média de 19-46 meses, dependendo do estudo e do nível de cuidados de suporte (Regier *et al.*, 2016, MRI/MRS as a surrogate marker for clinical progression in GM1 gangliosidosis. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 170(3):634-644.; Regier *et al.*, 2016, The GM1 and GM2 Gangliosidoses: Natural History and Progress toward Therapy. *Pediatric endocrinology reviews: PER*. 13 Suppl 1:663-673; and Jarnes Utz *et al.*, 2017). Consequentemente, esses pacientes representam a população com o perfil de risco/benefício potencialmente mais favorável. Além disso, o declínio rápido e previsível nesses pacientes apoia um projeto de estudo robusto e permite a avaliação dos resultados funcionais dentro de um período de acompanhamento razoável. Para este grupo, o tratamento deve estabilizar a patologia subjacente, estabilizando assim a progressão da doença, prolongando a sobrevivência, evitando a perda

de habilidades (como marcos de desenvolvimento adquiridos, habilidades neurocognitivas e/ou motoras) e retardar a progressão do declínio neurocognitivo e comportamental.

[00244] Os estudos não clínicos de segurança do procedimento de administração conduzidos em primatas não humanos adultos são mais representativos do tamanho e da anatomia da cisterna magna de bebês com 4 meses de idade ou mais. No entanto, dado o curso rápido da doença após o início dos sintomas e a idade precoce no início dos sintomas, o tratamento deve ocorrer o mais cedo possível para maximizar o benefício potencial da terapia gênica. O limite inferior de idade utilizado aqui é de 1 mês de idade no momento da inscrição para garantir que o tratamento e, especificamente, o procedimento de ICM possam ser realizados com segurança. Após uma revisão cuidadosa de exames de imagem de bebês com 1 ou 2 semanas de idade, um radiologista intervencionista especialista da Universidade da Pensilvânia indicou que não há nenhuma preocupação anatômica específica com a realização de administração de ICM guiada por CT em um bebê de 1 mês, desde que a justificativa para o tratamento seja suportada. Conforme discutido anteriormente, os pacientes com GM1 infantil (Tipo 1) têm um curso rápido da doença com idade típica de início das convulsões e outros sinais de doença avançada por volta dos 18 meses de idade (Jarnes Utz et al., 2017). Devido à doença neurológica avançada, o limite superior de idade de 18 meses foi selecionado para evitar o recrutamento de sujeitos que podem ter potencial limitado para se beneficiar do AA-Vhu68.GLB1 além da estabilização da doença em um baixo nível de função clínica. Estudos de história natural indicam que os pacientes com gangliosidose GM1 infantil perderam a maioria dos marcos de desenvolvimento aos 2 anos de idade.

[00245] Como afirmado anteriormente, dado o curso rápido e devastador da doença após o início dos sintomas, o tratamento deve ocorrer

o mais cedo possível para maximizar o benefício potencial da terapia genética. Os dados sobre a concordância entre irmãos sugerem que o curso clínico em irmãos com GM1 infantil é semelhante em termos de tempo para o início e as manifestações prevalentes da doença (Gururaj *et al.*, 2005). Magnetic Resonance Imaging Findings and Novel Mutations in GM1 Gangliosidosis. *Journal of Child Neurology*. 20 (1): 57-60). Portanto, um bebê pré-sintomático com diagnóstico genético e bioquímico confirmado de gangliosidose GM1 pode ser incluído no estudo se tiver um irmão mais velho afetado que tenha documentado o início dos sintomas (com hipotonia) antes dos 6 meses de idade.

[00246] O estudo é um estudo de Fase 1/2, aberto, de escalonamento de dose de AAVhu68.GLB1 para avaliar a segurança, tolerabilidade e pontos de avaliação de eficácia exploratória após uma dose única de AAVhu68.GLB1 administrada na cisterna magna (ICM) de sujeito pediátrico com a forma infantil de GM1. Este estudo inscreve até 12 sujeitos pediátricos com a forma infantil de gangliosidose GM1 (Tipo 1) e os sujeitos recebem uma dose única de AAVhu68.GLB1 administrado por ICM. Os sujeitos são acompanhados por 2 anos para avaliar a segurança, tolerabilidade, farmacodinâmica e resultados clínicos, com acompanhamento adicional de longo prazo (LTFU) por um total de 5 anos após o tratamento para avaliar os resultados em longo prazo e durabilidade da expressão do transgene e respostas clínicas. O LTFU para 5 anos após o tratamento permite a avaliação da durabilidade da expressão do transgene e a avaliação se o tratamento é eficaz em prolongar a sobrevida e estabilizar o sujeito em um nível de função superior aos pacientes não tratados de acordo com o projeto de Orientação da FDA para a Indústria: Acompanhamento em longo prazo após administração de produtos de terapia genética humana (julho de 2018), regulamentos europeus, brasileiros e outros locais. Após a conclusão do estudo, os sujeitos podem ser convidados a se inscrever em um registro

de pacientes para continuar a ser monitorado para resultados em longo prazo, incluindo segurança (monitoramento de eventos oncológicos), sobrevivência e resultados clínicos. Desenvolvimento subsequente de AAVhu68.GLB1 inclui a expansão para o tratamento de pacientes com formas mais leves de início tardio da doença.

[00247] Duas doses de rAAVhu68.GLB1 são avaliadas com dosagem escalonada e sequencial de sujeitos. Os níveis de dose de rAAVhu68.GLB1 são determinados com base nos dados do estudo MED murino e do estudo de toxicologia GLP NHP e consistem em uma dose baixa (administrada à Coorte 1) e uma dose alta (administrada à Coorte 2). A dose alta é baseada na dose máxima tolerada (MTD) no estudo de toxicologia do NHP dimensionada para uma dose humana equivalente. Uma margem de segurança é aplicada de modo que a dose alta selecionada para sujeitos humanos seja de um terço a metade da dose humana equivalente. A dose baixa normalmente é 2-3 vezes menor do que a dose alta selecionada, desde que seja uma dose que exceda a MED escalonada equivalente em estudos com animais. Isso garantiria que ambos os níveis de dose tenham o potencial de conferir benefício terapêutico, com o entendimento de que, se tolerada, a dose mais alta seria esperada como vantajosa. A avaliação sequencial da dose baixa seguida da dose alta permite a identificação da dose máxima tolerada (MTD) das duas doses testadas. Finalmente, uma coorte de expansão (Coorte 3) recebe a MTD de rAAVhu68.GLB1. Os 6 sujeitos na Coorte 3 (MTD) são incluídos simultaneamente, sem dosagem escalonada. A coorte 3 pode receber tratamento combinado com transplante de células-tronco hematopoéticas (HSCT) e rAAVhu68.GLB1. Se tolerada, espera-se que a dose mais alta seja vantajosa.

[00248] O foco principal deste estudo é avaliar a segurança e tolerabilidade de rAAVhu68.GLB1. Estudos de NHP de administração por ICM de AAVhu68 demonstraram degeneração assintomática mínima a leve

de neurônios sensoriais DRG em alguns animais, portanto, exames detalhados são realizados para avaliar a toxicidade do nervo sensorial, e estudos de condução nervosa sensorial são empregados neste ensaio para monitorar lesões neuronais sensoriais subclínicas. Digno de nota, a perda da função neuronal sensorial (devido à potencial toxicidade dos gânglios da raiz dorsal) é avaliada por estudos de condução nervosa sensorial conduzidos em 30 dias, 3 meses, 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses e em intervalos anuais daí em diante. Dado que as lesões dos neurônios sensoriais aparecem dentro de 2–4 semanas após a administração de AAV em estudos não clínicos de NHP, as avaliações mais frequentes durante 3 meses após o tratamento permitiriam a avaliação de eventos semelhantes em humanos, permitindo variabilidade potencial na cinética de toxicidade. O acompanhamento ao longo do estudo permitiria a avaliação dos efeitos tardios caso o curso do tempo fosse diferente em humanos, ou caso fossem observadas sequelas clínicas, para avaliar por quanto tempo elas persistem e se melhoram, permanecem estáveis ou pioram com o tempo.

[00249] Os pontos de avaliação farmacodinâmica e de eficácia também são avaliados neste estudo e foram escolhidos por seu potencial para demonstrar resultados funcionais e clínicos significativos nesta população. Os pontos de avaliação são medidos em 30 dias, 90 dias, 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses e depois anualmente até o período de acompanhamento de 5 anos, exceto para os que requerem sedação e/ou LP. Durante a fase de acompanhamento em longo prazo, a frequência de medição diminui para uma vez a cada 12 meses. Esses pontos de tempo foram selecionados para facilitar a avaliação completa da segurança e tolerabilidade de rAAVhu68.GLB1. Os pontos de tempo iniciais e o intervalo de 6 meses também foram selecionados em consideração à rápida taxa de progressão da doença em pacientes infantis GM1 não tratados. Esta abordagem permite uma avaliação completa da

farmacodinâmica e medidas de eficácia clínica em indivíduos tratados durante um período de acompanhamento para o qual existem dados comparadores não tratados e durante o qual se espera que os pacientes não tratados apresentem declínio significativo.

[00250] Os pontos de avaliação de eficácia secundários e exploratórios incluem sobrevivência, independência do tubo de alimentação, incidência e frequência de convulsões, qualidade de vida medida por PedsQL e desenvolvimento neurocognitivo e comportamental. As escalas de Bayley de desenvolvimento infantil e as escalas de Vineland são usadas para quantificar os efeitos do rAAVhu68.GLB1 no desenvolvimento e mudanças nos comportamentos adaptativos, cognição, linguagem, função motora e qualidade de vida relacionada à saúde. Cada medida foi usada na população com doença GM1 ou em uma população relacionada e são posteriormente refinadas com base na entrada de pais e famílias para selecionar as medidas que são mais significativas e impactantes para eles. Para padronizar as avaliações, os centros participantes do estudo são treinados na administração das várias escalas por um neuropsicólogo experiente.

[00251] Dada a gravidade da doença na população alvo, os sujeitos podem ter alcançado habilidades motoras por inscrição, desenvolvido e subsequentemente perdido outros marcos motores, ou ainda não mostraram sinais de desenvolvimento de marcos motores. As avaliações rastreiam a idade de atingimento e idade de perda para todos os marcos. A realização do marco motor é definida para seis marcos brutos com base nos critérios da WHO.

[00252] Dado que os sujeitos com gangliosidose GM1 infantil podem desenvolver sintomas dentro dos meses de vida, e a aquisição do primeiro marco motor da WHO (sentar sem apoio) normalmente não se manifesta antes dos 4 meses de idade (mediana: 5,9 meses de idade), este ponto final pode precisar de sensibilidade para avaliar a extensão

do benefício terapêutico, especialmente em indivíduos que apresentavam sintomas mais evidentes no momento do tratamento. Por esse motivo, a avaliação de marcos de desenvolvimento adequados à idade que podem ser aplicados a bebês também está incluída (Scharf et al., 2016, Developmental Milestones. *Pediatr Rev.* 37 (1): 25-37; questionário 38, 47.). Estes dados podem ser informativos para sumarizar a retenção, aquisição ou perda de marcos de desenvolvimento ao longo do tempo em relação a crianças não tratadas com doença GM1 infantil ou o tempo típico de aquisição em crianças neurotípicas.

[00253] À medida que a doença progride, as crianças podem desenvolver convulsões. O início da atividade convulsiva nos permite determinar se o tratamento com rAAVhu68.GLB1 pode prevenir ou retardar o início das convulsões ou diminuir a frequência dos eventos convulsivos nesta população. Os pais são solicitados a manter diários de convulsões, que rastreiam o início, a frequência, a duração e o tipo de convulsão. Essas entradas são discutidas e interpretadas pelo médico em cada visita.

[00254] Para avaliar o efeito de rAAVhu68.GLB1 nas manifestações do CNS das alterações volumétricas da doença são medidas na MRI ao longo do tempo. O fenótipo infantil de todas as gangliosidoses mostrou ter um padrão consistente de macrocefalia e aumento rápido do volume de MRI intracraniano com volume de tecido cerebral (córtex cerebral e outras estruturas menores) e volume ventricular. Além disso, várias subestruturas cerebrais menores, incluindo o corpo caloso, caudato e putâmen, bem como o córtex cerebelar, geralmente diminuem de tamanho conforme a doença progride (Regier et al., 2016 e Nestratil et al., 2018, como citado aqui). Espera-se que o tratamento com rAAVhu68.GLB1 retarde ou interrompa a progressão das manifestações da doença do CNS com evidência de estabilização na atrofia e alterações volumétri-

cas. As mudanças na avaliação do ponto de avaliação expiratório (normais/anormais) na intensidade do sinal T1/T2 no tálamo e gânglios basais é baseada na evidência relatada de mudanças na estrutura talâmica em pacientes com gangliosidose GM1 e GM2 (Kobayashi and Takashima, 1994, Thalamic hyperdensity on CT in infantile GM1-gangliosidosis. *Brain and Development*. 16 (6): 472-474).

[00255] Os biomarcadores para o ensaio incluem atividade da enzima β -gal (GLB1), que pode ser medida no CSF e no soro, e MRI do cérebro, que demonstra atrofia rápida e consistente na gangliosidose GM1 infantil (Regier et al., 2016b, como citado aqui). Biomarcadores adicionais são investigados no CSF e no soro das amostras coletadas.

A. Objetivo principal:

- Avaliar a segurança e tolerabilidade de rAAVhu68.GLB1 por 2 anos após a administração de uma dose única na cisterna magna (ICM).

B. Objetivos secundários:

- Avaliar a farmacodinâmica e a atividade biológica de rAAVhu68.GLB1 ao longo de 24 meses após uma única dose de ICM, com base na atividade de GLB1 no CSF e no soro. Essa avaliação pode incluir ainda a concentração de GM1 no CSF e os níveis de sulfato de queratana no soro e na urina e a atividade da hexosaminidase.

- Avaliar o impacto do rAAVhu68.GLB1 na sobrevivência
- Avaliar o impacto do rAAVhu68.GLB1 sobre a probabilidade de dependência de tubo de alimentação aos 24 meses de idade
- Avaliar a progressão da doença conforme avaliada pela idade na realização, idade na perda e porcentagem de crianças que mantêm ou adquirem marcos de desenvolvimento e motores apropriados para a idade (conforme definido pelos critérios da Organização Mundial da Saúde [WHO])

- Avaliar o impacto do rAAVhu68.GLB1 no desenvolvimento neurocognitivo com base em:

- nas Mudança nas pontuações de comunicação cognitiva, motora grossa, motora fina, receptiva e expressiva equivalente à idade das Escalas Bayley de Desenvolvimento Infantil e Infantil

- nas Mudança nas pontuações padrão para cada domínio das escalas de comportamento adaptativo de Vineland

C. Objetivos Exploratórios:

- Avaliar melhor a eficácia de rAAVhu68.GLB1 até 24 meses após uma única dose de ICM medida por:

- o Idade de início e frequência de convulsões avaliadas por um diário de convulsões

- o Avaliar o impacto de rAAVhu68.GLB1 na qualidade de vida pediátrica por mudança na pontuação total no Pediatric Quality of Life Inventory- e na escala infantil do Pediatric Quality of Life Inventory (PedsQL e PedsQL-IS)

- Avaliar ainda os efeitos farmacodinâmicos de rAAVhu68.GLB1 até 24 meses após uma única dose de ICM medida por:

- o Mudanças no volume total do cérebro, volume da subestrutura do cérebro e volume do ventrículo lateral medido por MRI

- o Mudanças na intensidade do sinal T1/T2 na atividade do tálamo e dos gânglios basais,

- Avaliar o efeito de rAAVhu68.GLB1 no volume do fígado e baço.

- Avaliar o efeito de rAAVhu68.GLB1 no EEG, ECHO e potenciais evocados visuais (VEP).

D. Projeto do Estudo:

[00256] Estudo multicêntrico, aberto, de aumento de dose de braço único de rAAVhu68.GLB1 (Tabela a seguir). Até um total de 12 sujeitos pediátricos com gangliosidose GM1 infantil estão inscritos em coortes

de 2 doses e recebem uma dose única de rAAVhu68.GLB1 administrado por injeção de ICM. A segurança e a tolerabilidade são avaliadas por 2 anos, e todos os sujeitos são acompanhados por 5 anos após a administração de rAAVhu68.GLB1 para a avaliação em longo prazo da segurança e tolerabilidade, farmacodinâmica (durabilidade da expressão do transgene) e durabilidade dos resultados clínicos.

Nome do Produto:	AAVhu68.UbC.GLB1
Inserções de genes:	Versão com códon otimizado do gene <i>GLB1</i> humano que codifica beta-galactosidase (beta-gal ou β -gal)
Elemento de Controle:	Elemento regulador derivado do promotor da ubiquitina C humana (UbC)
Outros Elementos:	Intron quimérico (CI) - um intron híbrido que consiste em um doador de splice de beta-globina humana e elementos aceptores de splice de imunoglobulina G (IgG) Um sinal de poliadenilação (PolyA) derivado de genes tardios do vírus Simian 40 (SV40)
Sorotipo AAV:	Hu68

[00257] Os sujeitos em potencial são rastreados dos dias -35 a -1 antes da dosagem para determinar a elegibilidade para o estudo. Os sujeitos que atendem aos critérios de inclusão/exclusão são admitidos no hospital na manhã do Dia 1 ou por prática institucional. Os sujeitos recebem uma dose única por ICM de rAAVhu68.GLB1 no Dia 1 e permanecem no hospital por pelo menos 24 horas após a dosagem para observação. As avaliações subsequentes são realizadas 7, 14 e 30 dias após a dosagem, depois a cada 60 dias no primeiro ano e a cada 90 dias no segundo ano. A segurança e tolerabilidade de rAAVhu68.GLB1 são monitorados por meio de avaliação de eventos adversos (AEs) e eventos adversos graves (SAEs), sinais vitais, exames físicos, estudos de condução nervosa sensorial e avaliações laboratoriais (química, hematologia, estudos de coagulação, análise de CSF). A imunogenicidade do AAV e do produto transgene também é avaliada. As avaliações de eficácia incluem sobrevivência, medidas de desenvolvimento cognitivo, motor e social, mudanças na função visual e EEG, mudanças no volume do fígado e do baço e biomarcadores no CSF, soro e urina.

[00258] O estudo consiste nas três coortes a seguir administradas com rAAVhu68.GLB1 como uma única injeção de ICM:

- Coorte 1 (dose baixa): Três sujeitos elegíveis (indivíduos # 1 a # 3) são inscritos e administrados com a dose baixa de rAAVhu68.GLB1 com um período de observação de segurança de 4 semanas entre o primeiro e o segundo sujeito. Se nenhum gatilho de revisão de segurança (SRTs) for observado, todos os dados de segurança disponíveis serão avaliados por um conselho de segurança independente 4 semanas após o terceiro sujeito da Coorte 1 ser administrado com rAAVhu68.GLB1.

- Coorte 2 (dose alta): se for tomada a decisão de prosseguir, três sujeitos elegíveis (sujeitos # 4 a # 6) estão inscritos e administrados com a dose alta de rAAVhu68.GLB1 com um período de observação de segurança de 4 semanas entre o quarto e o quinto sujeito. Se nenhum SRT for observado, o conselho de segurança independente avalia todos os dados de segurança disponíveis, incluindo dados de segurança de indivíduos na Coorte 1, 4 semanas após o terceiro indivíduo na Coorte 2 ser administrado com rAAVhu68.GLB1.

- Coorte 3 (MTD): Enquanto se aguarda uma recomendação positiva do conselho de segurança, até 6 sujeitos adicionais são inscritos e administrados com uma única dose por ICM de rAAVhu68.GLB1 no MTD. A dosagem para os sujeitos desta coorte não é escalonada com um período de observação de segurança de 4 semanas entre os sujeitos, e uma revisão do conselho de segurança é necessária após a dosagem dos três primeiros sujeitos desta coorte.

E. Critérios de inclusão:

1. > 1 mês de idade e < 18 meses de idade na inscrição
2. Diagnóstico bioquímico e molecular documentado de gangliosidose GM1, com base na identificação de mutações ou deleções homozigóticas ou heterozigóticas compostas no gene GLB1 e atividade da enzima beta-galactosidase abaixo do limite inferior do normal
3. Início dos sintomas documentados aos 6 meses de idade,

com hipotonia no exame ou história desencadeada dos pais/cuidador
OU

Ser pré-sintomático E ter um irmão com diagnóstico confirmado de doença gangliosidose GM1 infantil que teve início dos sintomas aos 6 meses de idade

F. Critérios de exclusão:

1. Qualquer déficit neurocognitivo clinicamente significativo não atribuível à gangliosidose GM1 ou uma causa secundária que pode, na opinião do investigador, confundir a interpretação dos resultados do estudo.

2. Qualquer condição (por exemplo, história de qualquer doença, evidência de qualquer doença atual, qualquer achado no exame físico ou qualquer anormalidade laboratorial) que, na opinião do investigador, colocaria o sujeito em risco indevido ou interferiria na avaliação do produto sob investigação ou interpretação da segurança do indivíduo ou resultados do estudo.

3. Qualquer doença aguda que requeira hospitalização dentro de 30 dias da inscrição.

4. Problemas respiratórios que requerem tratamento ou hospitalização dentro de 30 dias após a inscrição.

5. Qualquer contraindicação para o procedimento de administração de ICM, incluindo contraindicações para imagens fluoroscópicas.

6. Qualquer contraindicação para MRI ou punção lombar.

7. Inscrição em qualquer outro estudo clínico com um produto investigacional dentro de 4 semanas antes da triagem ou dentro de 5 meias-vidas do produto investigacional usado naquele estudo clínico, o que for mais longo (os pacientes recebendo miglustato fora da indicação são elegíveis).

G. Via de administração e procedimento

[00259] rAAVhu68.GLB1 como uma dose única é administrado no Dia 1 aos sujeitos por meio de injeção suboccipital guiada por CT na cisterna magna.

[00260] No Dia 1, a concentração apropriada de rAAVhu68.GLB1 é preparada pela Farmácia Investigacional associada ao estudo. Uma seringa contendo 5,6 mL de rAAVhu68.GLB1 na concentração apropriada é administrada na sala de procedimentos. O seguinte pessoal está presente para a administração do medicamento em estudo: intervencionista realizando o procedimento; anestesiológista e técnico(s) respiratório(s); enfermeiras e assistentes médicos; Técnicos de CT (ou sala de operação); coordenador de pesquisa do local.

[00261] Antes da administração do fármaco de estudo, uma punção lombar é realizada para remover um volume predeterminado de CSF e, em seguida, injetar contraste iodado intratecalmente (IT) para auxiliar na visualização da anatomia relevante da cisterna magna. O contraste intravenoso (IV) pode ser administrado antes ou durante a inserção da agulha como uma alternativa ao contraste intratecal. A decisão de usar contraste IV ou IT fica a critério do intervencionista. O sujeito é anestesiado, intubado e posicionado na mesa de procedimento. O local da injeção é preparado e coberto usando uma técnica estéril. Uma agulha espinhal (22-25 G) é introduzida na cisterna magna sob orientação fluoroscópica. Uma agulha introdutora maior pode ser usada para auxiliar na colocação da agulha. Após a confirmação da colocação da agulha, o conjunto de extensão é conectado à agulha espinhal e pode ser preenchido com CSF. A critério do intervencionista, uma seringa contendo material de contraste pode ser conectada ao conjunto de extensão e uma pequena quantidade injetada para confirmar a colocação da agulha na cisterna magna. Após a colocação da agulha ser confirmada pela orientação da CT +/- injeção de contraste, uma seringa contendo 5,6 mL

de rAAVhu68.GLB1 é conectada ao conjunto de extensão. Os conteúdos da seringa são injetados lentamente durante 1-2 minutos, fornecendo um volume de 5,0 mL. A agulha é lentamente removida do sujeito.

[00262] Uma única dose na cisterna magna (ICM) de rAAVhu68.GLB1 é segura e tolerável até 2 anos após a administração.

[00263] Uma única dose na cisterna magna (ICM) de rAAVhu68.GLB1 melhora a sobrevivência, reduz a probabilidade de dependência de tubo de alimentação aos 24 meses de idade e/ou reduz a progressão da doença conforme avaliada pela idade na realização, idade na perda e porcentagem de crianças que mantêm ou adquirem marcos de desenvolvimento e motores apropriados para a idade.

[00264] O tratamento retarda a perda da função neurocognitiva.

[00265] Todos os documentos citados neste relatório descritivo estão incorporados aqui por referência, assim como o pedido de patente provisório US 62/739.811, depositado em 1 de outubro de 2018, e o pedido de patente provisório US 62/835.178, depositado em 17 de abril de 2019. Da mesma forma, a Listagem de Sequências aqui arquivada, denominada como “18-8537PCT_SequenceListing_ST25.txt”, e as sequências e o texto nela estão incorporados por referência. Embora a invenção tenha sido descrita com referência a modalidades particulares, será apreciado que modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito da invenção. Tais modificações pretendem ser abrangidas pelo escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus adeno-associado (AAV) tendo um capsídeo AA-Vhu68 e um genoma de vetor, caracterizado pelo fato de que compreende um gene GLB1 que codifica β -galactosidase humana sob o controle de sequências regulatórias que direcionam sua expressão em células humanas alvo.

2. Vírus adeno-associado (AAV), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a β -galactosidase humana compreende um peptídeo sinal e uma β -galactosidase madura possuindo a sequência de aminoácidos de 24 a 677 de SEQ ID NO: 4.

3. Vírus adeno-associado (AAV), de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o peptídeo sinal tem a sequência de aminoácidos dos aminoácidos 1 a 23 da SEQ ID NO: 4.

4. Vírus adeno-associado (AAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o gene GLB1 tem uma sequência selecionada a partir de: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8, ou uma sequência em pelo menos 95% a 99,9% idêntica a qualquer uma das SEQ ID NOs: 5 a 8 que codifica a β -galactosidase madura dos aminoácidos 24 a 677 da SEQ ID NO: 4.

5. Vírus adeno-associado (AAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a sequência reguladora compreende um promotor da ubiquitina C humana (UbC).

6. Vírus adeno-associado (AAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o genoma do vetor tem a sequência selecionada de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 ou SEQ ID NO: 16.

7. Vírus adeno-associado (AAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o capsídeo de AAVhu68 é produzido a partir de uma sequência de ácido nucleico

de SEQ ID NO: 1 ou uma sequência que codifica a sequência de aminoácidos prevista de SEQ ID NO: 2, ou em que o AAVhu68 compreende uma população heterogênea de proteínas AAVhu68 vp1 selecionadas de: proteínas vp1 produzidas por expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos predita de 1 a 736 da SEQ ID NO: 2, proteínas vp1 produzidas a partir da SEQ ID NO: 1, ou proteínas vp1 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 1 que codifica a sequência de aminoácidos predita de 1 a 736 da SEQ ID NO: 2,

uma população heterogênea de proteínas AAVhu68 vp2 selecionadas de: proteínas vp2 produzidas por expressão a partir de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos predita de pelo menos cerca dos aminoácidos 138 a 736 da SEQ ID NO: 2, proteínas vp2 produzidas a partir de uma sequência que compreende pelo menos nucleotídeos 412 a 2214 da SEQ ID NO: 1, ou proteínas vp2 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica aos pelo menos nucleotídeos 412 a 2211 da SEQ ID NO: 1 que codifica a sequência de aminoácidos predita de pelo menos cerca dos aminoácidos 138 a 736 da SEQ ID NO: 2, e

uma população heterogênea de proteínas AAVhu68 vp3 selecionadas de: vp3 produzida por expressão a partir de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos predita de pelo menos cerca dos aminoácidos 203 a 736 da SEQ ID NO: 2, proteínas vp3 produzidas a partir de uma sequência que compreende pelo menos nucleotídeos 607 a 2211 da SEQ ID NO: 1, ou proteínas vp3 produzidas a partir de uma sequência de ácido nucleico pelo menos 70% idêntica aos pelo menos nucleotídeos 607 a 2211 da SEQ ID NO: 1 que codifica a sequência de aminoácidos predita de pelo menos cerca dos aminoácidos 203 a 736 da SEQ ID NO: 2.

8. Composição farmacêutica aquosa, caracterizada pelo fato

de que compreende um tampão de formulação e o AAV, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o tampão de formulação compreende:

um fluido cerebrospinal artificial compreendendo solução salina tamponada e um ou mais de sódio, cálcio, magnésio, potássio ou misturas dos mesmos; e

um tensoativo.

10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o tensoativo está presente em 0,0005% em p/p a cerca de 0,001% em p/p da composição farmacêutica.

11. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, caracterizada pelo fato de que a composição está em um pH na faixa de 7,5 a 7,8, ou 6,2 a 7,7, ou cerca de 7.

12. Vírus adeno-associado (AAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou uma composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11, caracterizado pelo fato de que é para uso no tratamento de gangliosidose GM1, adequado para administração a um paciente por meio de uma injeção intracisterna magna (ICM).

13. Vírus adeno-associado (AAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e 12, ou uma composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, caracterizado pelo fato de que é para uso no tratamento de gangliosidose GM1, adequado para administração a um paciente com gangliosidose GM1 ou um paciente que tem gangliosidose infantil que tem 18 meses de idade ou menos.

14. Vírus adeno-associado (AAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e 12 a 13, ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 13, caracterizado pelo fato de que

é para uso no tratamento de gangliosidose GM1, adequado para administração a um paciente em necessidade do mesmo para melhorar os sintomas de GM1 gangliosidose, ou melhorar os sintomas neurológicos da gangliosidose GM1.

15. Vírus adeno-associado (AAV) ou composição, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que é para uso no tratamento de gangliosidose GM1, em que a melhoria da gangliosidose GM1 inclui aumento da expectativa de vida média, diminuição da necessidade de tubo de alimentação, redução na incidência e frequência de convulsões, redução na progressão em direção ao declínio neurocognitivo e/ou melhora no desenvolvimento neurocognitivo.

16. Vírus adeno-associado (AAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e 12 a 15, ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 15, caracterizado pelo fato de que é para uso no tratamento de gangliosidose GM1, em que o AAV ou a composição é administrado por meio de uma injeção suboccipital guiada por CT na cisterna magna.

17. Vírus adeno-associado (AAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e 12 a 16, ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 16, caracterizado pelo fato de que é para uso no tratamento de gangliosidose GM1, em que o AAV ou a composição é administrado em uma dose única.

18. Vírus adeno-associado (AAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e 12 a 17, ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 17, caracterizado pelo fato de que é para uso no tratamento de gangliosidose GM1, em que o AAV é administrado em uma dose de 2×10^{12} GC por paciente a 3×10^{14} GC por paciente, ou uma dose de 8×10^{12} cópias do genoma (GC) por paciente a 3×10^{14} GC por paciente, opcionalmente uma dose de 2×10^{13} GC por paciente a 3×10^{14} GC por paciente, de 8×10^{13} GC por paciente a $3 \times$

10^{14} GC por paciente ou cerca de 9×10^{13} GC por paciente.

19. Vírus adeno-associado (AAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e 12 a 18, ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 18, caracterizado pelo fato de que é para uso no tratamento de gangliosidose GM1, em que a administração compreende a administração de AAV a uma dose de 1×10^{10} GC/g de massa cerebral para $3,4 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral, opcionalmente uma dose de $3,4 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral para $3,4 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral, de $1,0 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral para $3,4 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral, ou cerca de $1,1 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral.

20. Uso de um AAV, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e 12 a 19, ou composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 8 a 19, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para o tratamento da gangliosidose GM1.

21. Método de tratamento de um paciente com gangliosidose GM1, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade eficaz do AAV, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 8 a 11, ao paciente com gangliosidose GM1.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o AAV ou a composição farmacêutica é administrado por meio de uma injeção intracisterna magna (ICM), opcionalmente uma injeção suboccipital guiada por CT na cisterna magna.

23. Método, de acordo com a reivindicação 21 ou 22, caracterizado pelo fato de que o método envolve a administração do AAV ou da composição farmacêutica em uma dose única.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações

21 a 23, caracterizado pelo fato de que o paciente tem gangliosidose infantil que tem 18 meses de idade ou menos.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 24, caracterizado pelo fato de que a administração do AAV ou da composição melhora os sintomas da gangliosidose GM1 ou melhora os sintomas neurológicos da gangliosidose GM1, opcionalmente em que após o tratamento o paciente tem um ou mais de aumento da média de vida, diminuição da necessidade de tubo de alimentação, redução na incidência e frequência de convulsões, redução na progressão em direção ao declínio neurocognitivo e/ou melhora no desenvolvimento neurocognitivo.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 25, caracterizado pelo fato de que o AAV é administrado em uma dose de 2×10^{12} GC por paciente a 3×10^{14} GC por paciente, ou uma dose de 8×10^{12} cópias do genoma (GC) por paciente a 3×10^{14} GC por paciente, opcionalmente uma dose de 2×10^{13} GC por paciente a 3×10^{14} GC por paciente, de 8×10^{13} GC por paciente a 3×10^{14} GC por paciente ou cerca de 9×10^{13} GC por paciente.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 26, caracterizado pelo fato de que o AAV é administrado em uma dose de 1×10^{10} GC/g de massa cerebral a $3,4 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral, opcionalmente uma dose de $3,4 \times 10^{10}$ GC/g de massa cerebral a $3,4 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral, de $1,0 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral a $3,4 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral, ou cerca de $1,1 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral.

FIG 1A

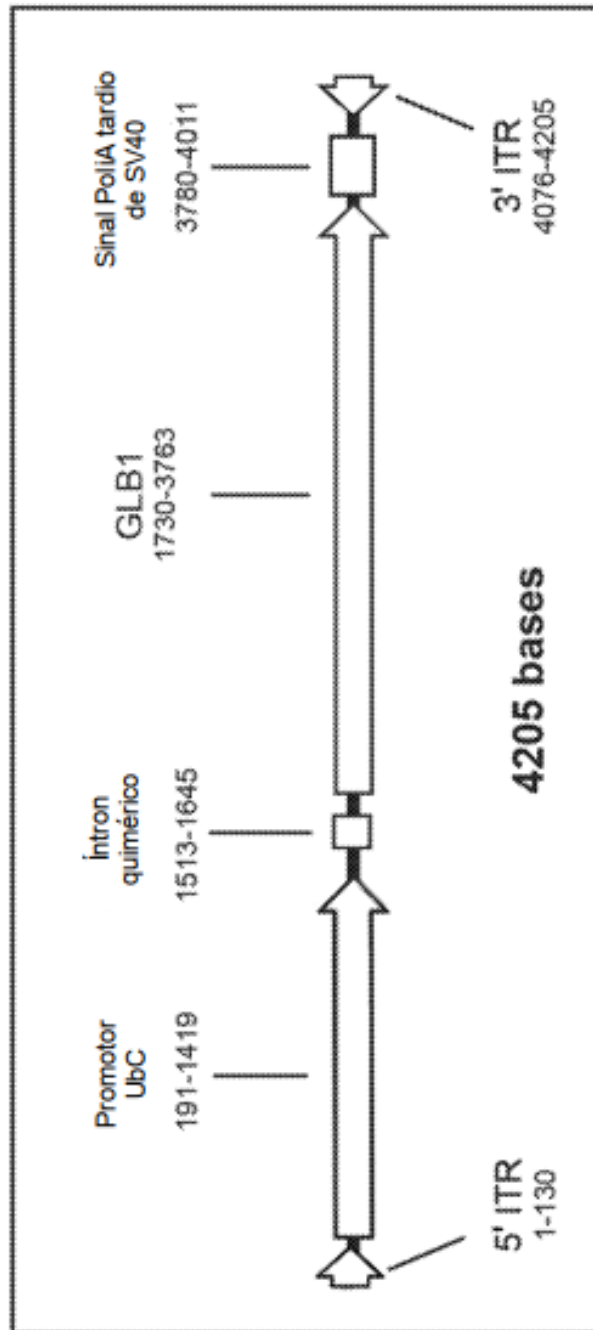


FIG 1B

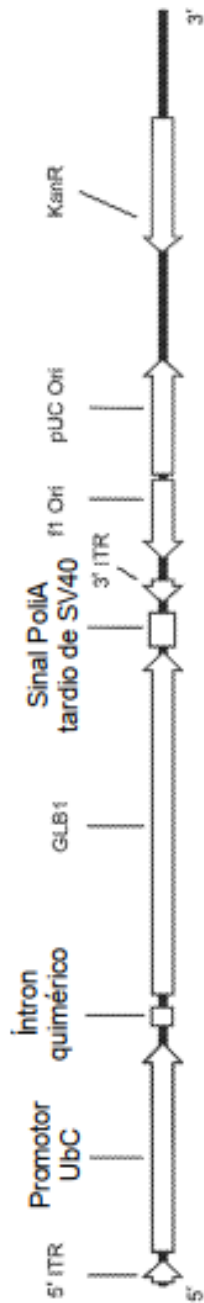


FIG 1C

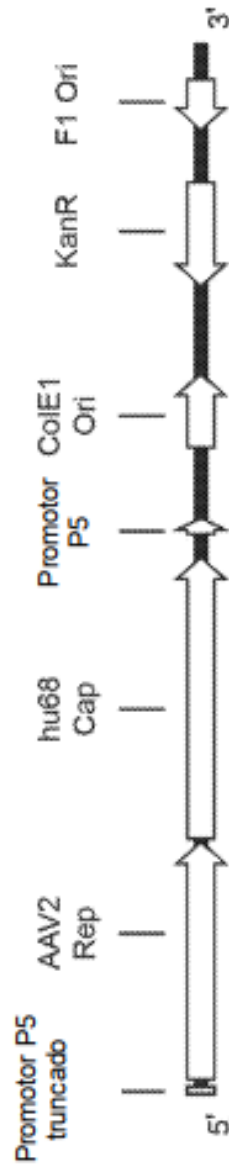


FIG 2A

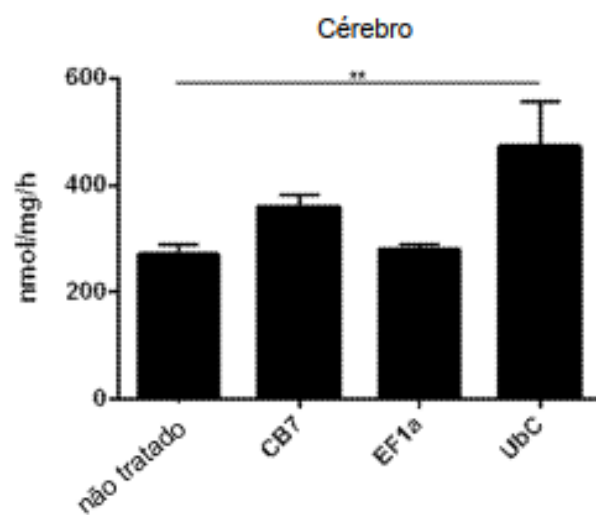


FIG 2B

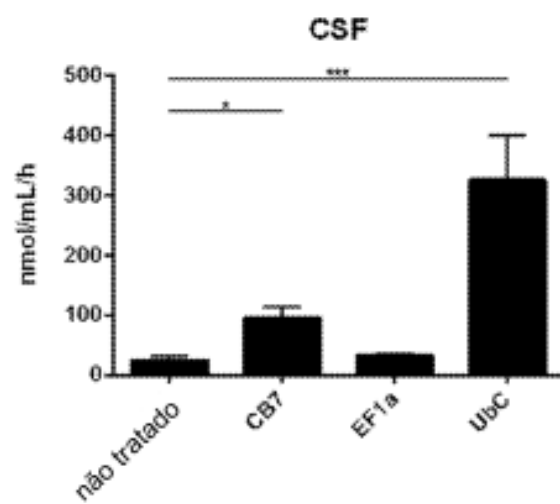
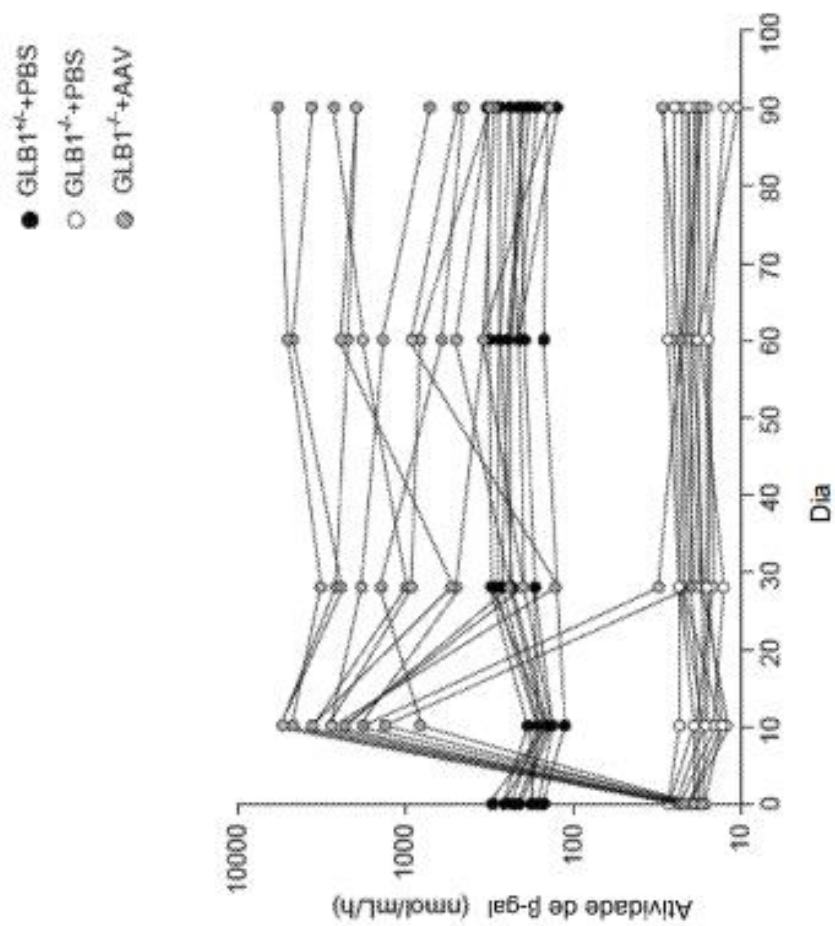


FIG 3A



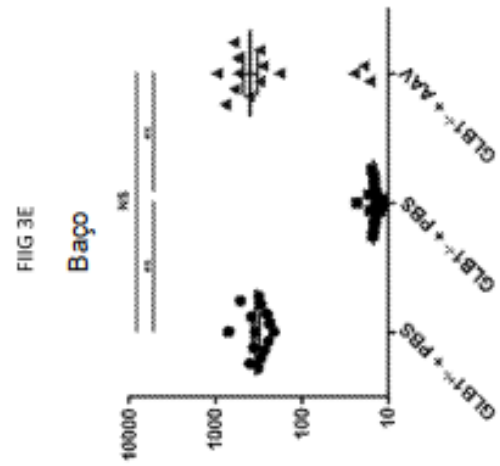
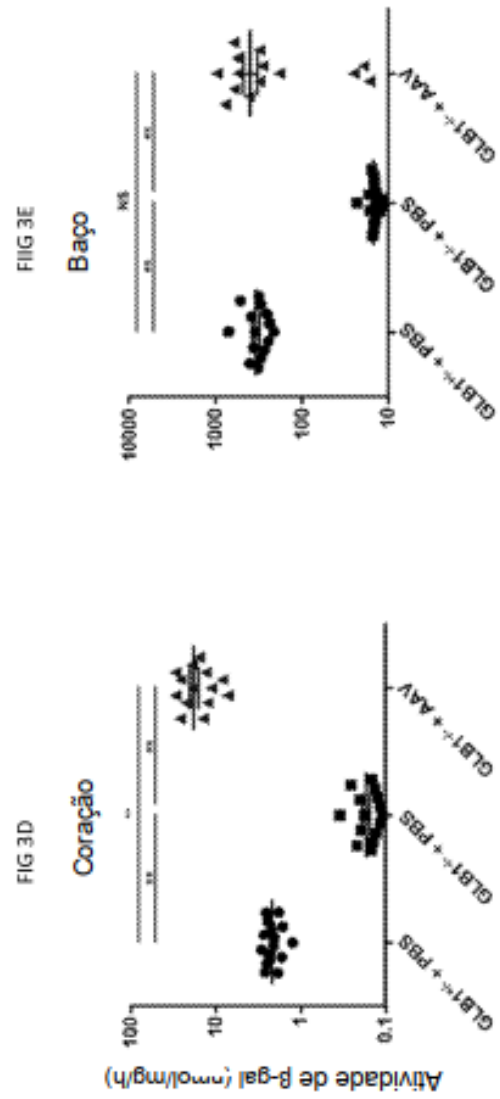
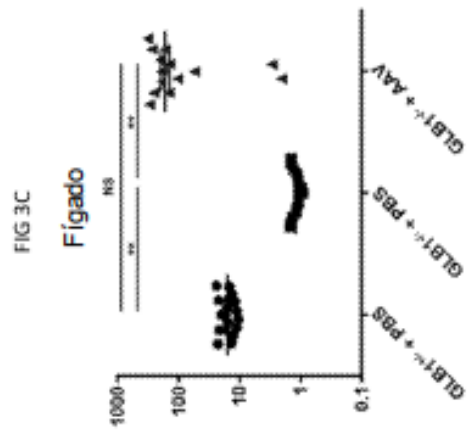
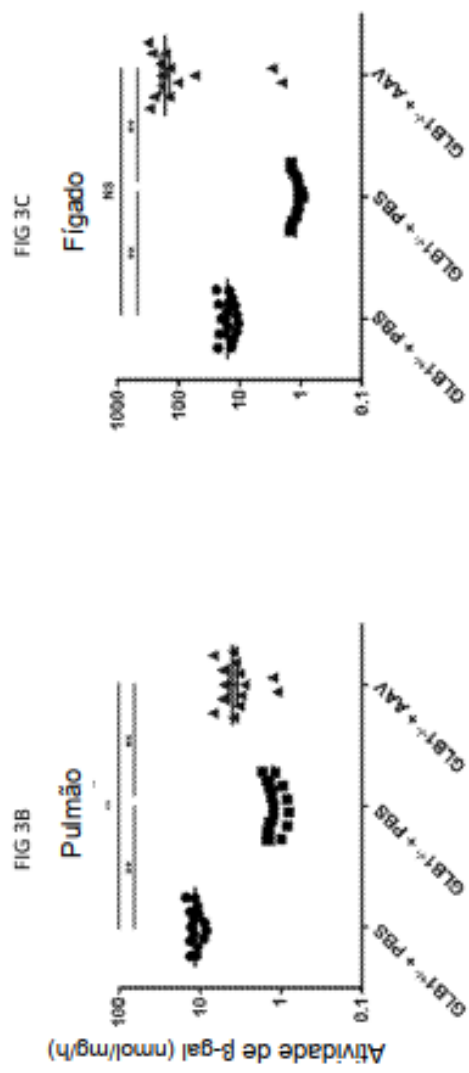


FIG 4A

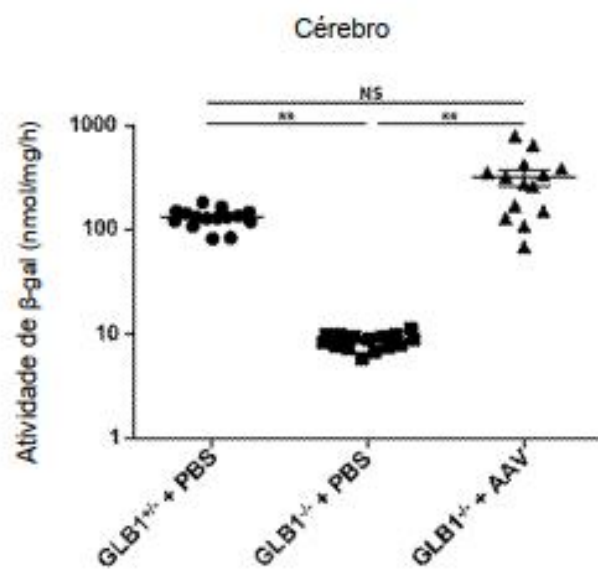
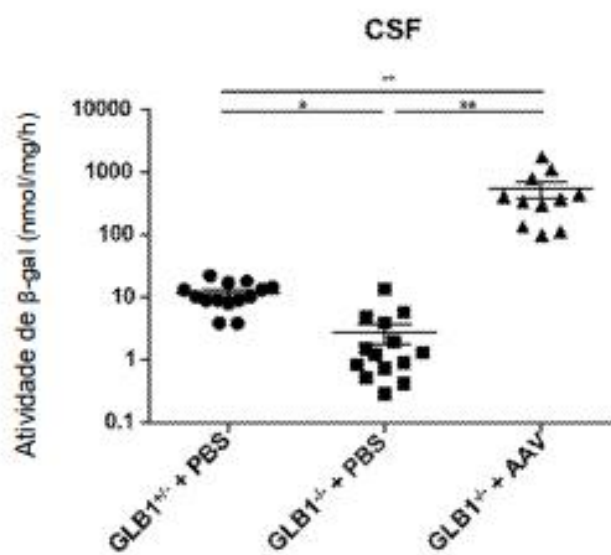


FIG 4B



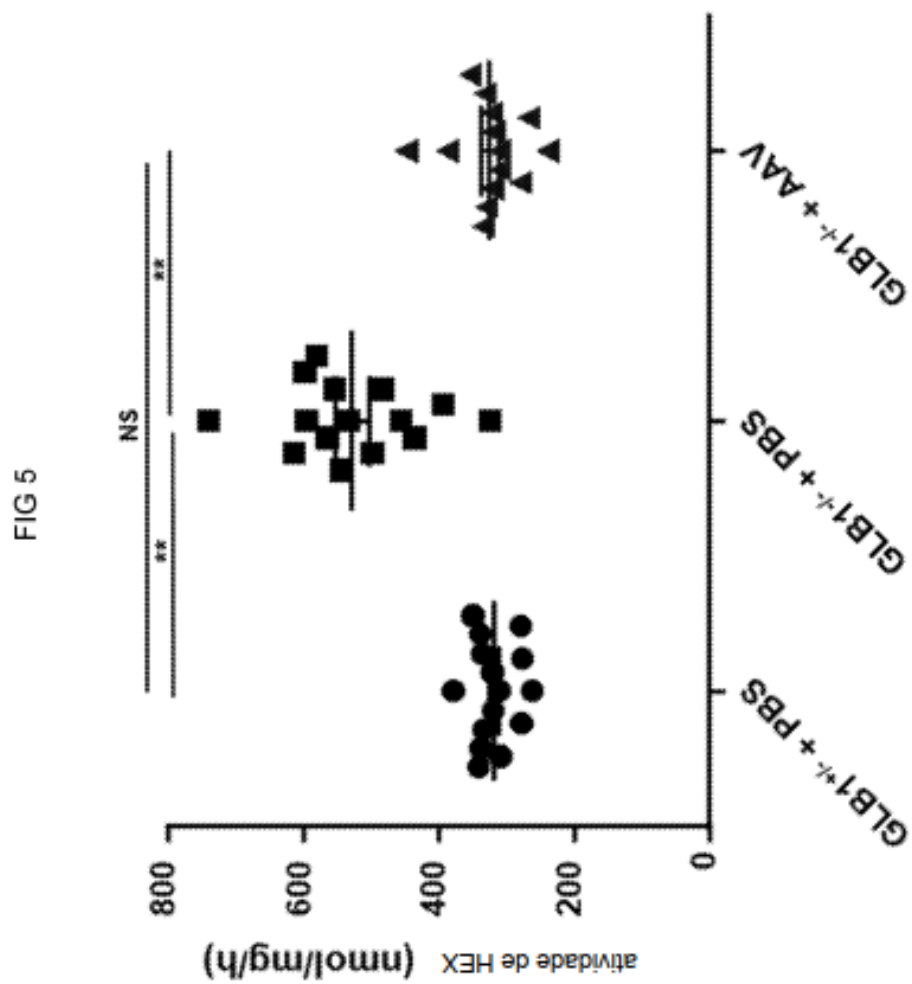
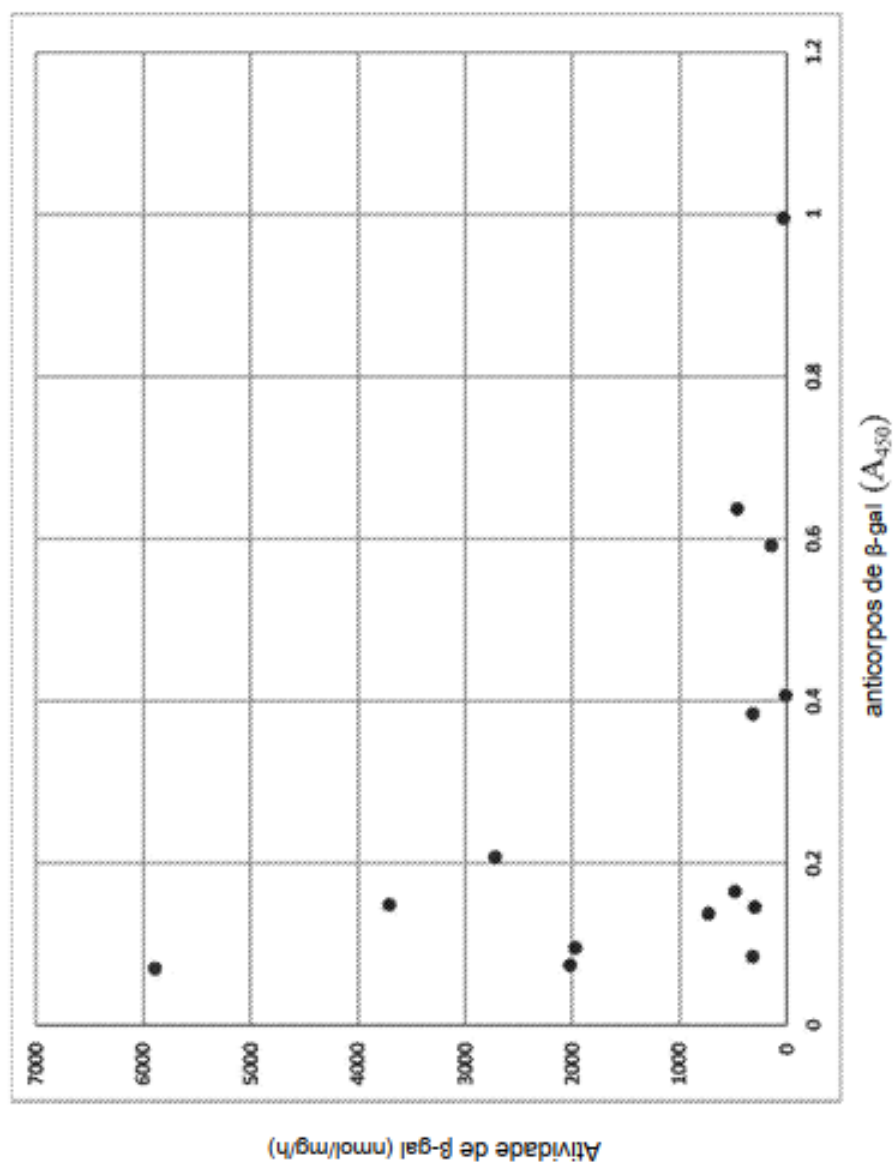


FIG 6



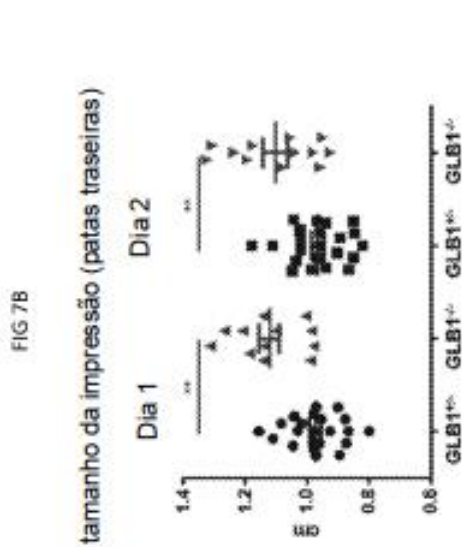
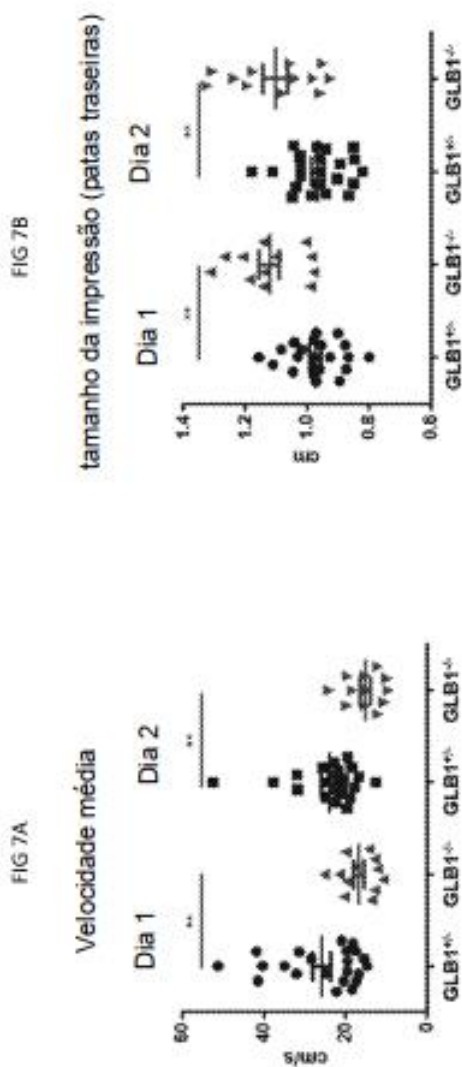


FIG 7C

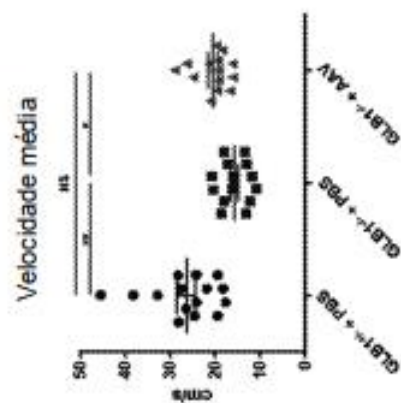


FIG 7D

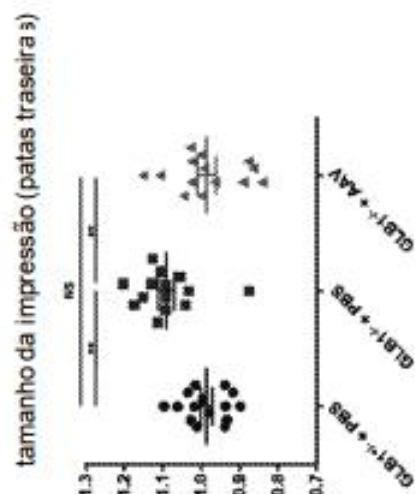


FIG 7E

GLB1^{+/+} + PBS

FIG 7F

GLB1^{+/+} + PBS

FIG 7G

GLB1^{+/+} + AAV

tamanho da impressão vs velocidade da pata traseira

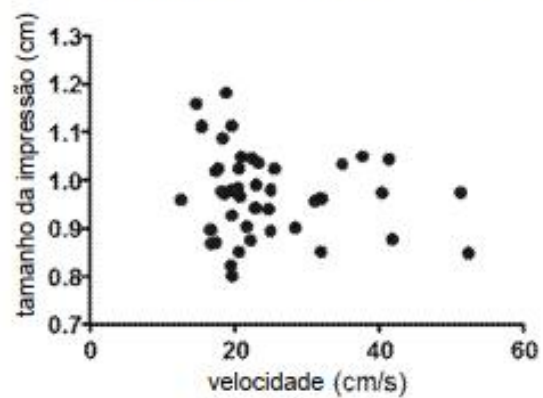


FIG 8B

tamanho vs velocidade da passada

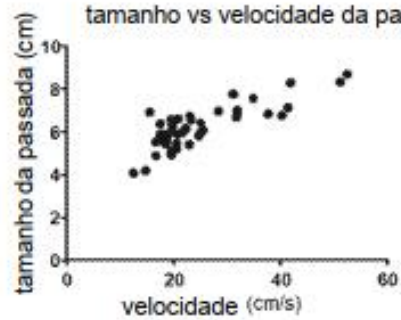


FIG 8A

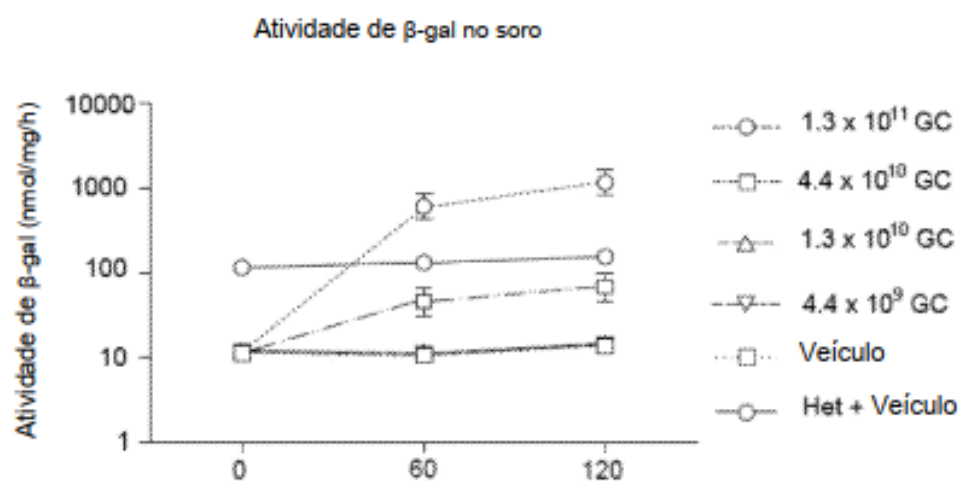


FIG. 9A

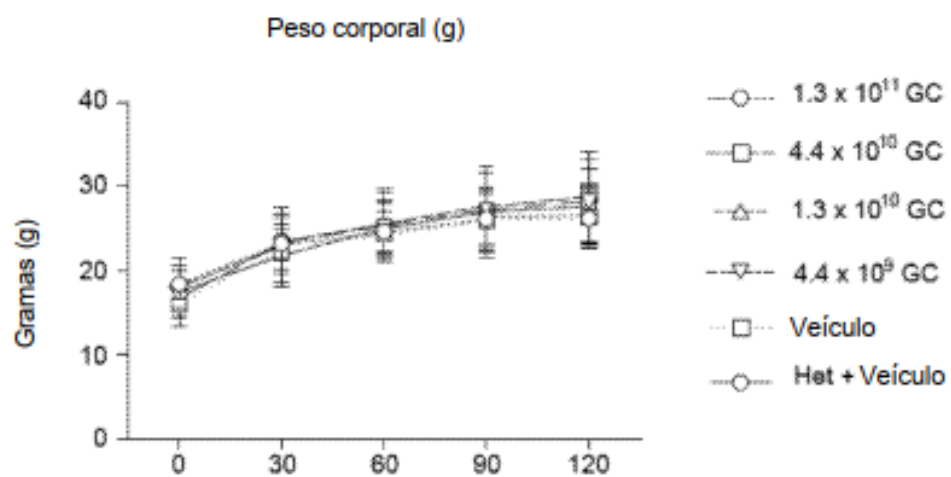


FIG. 9B

FIG 9C

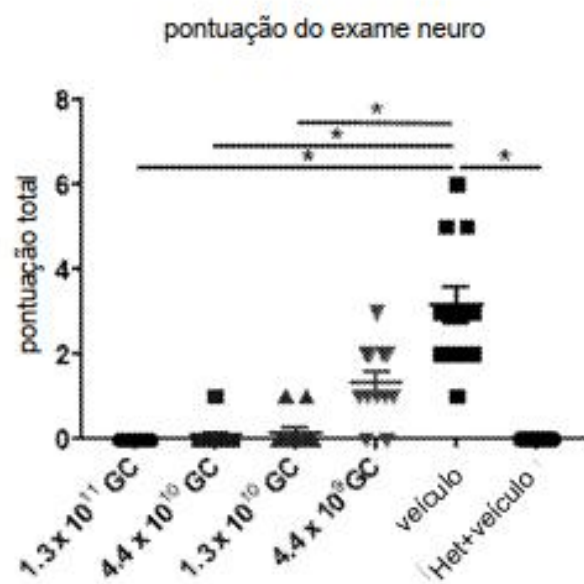


FIG 9D

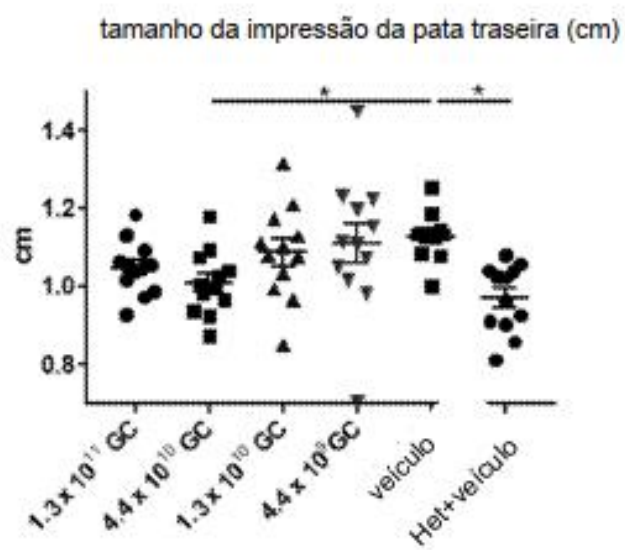


FIG 9E

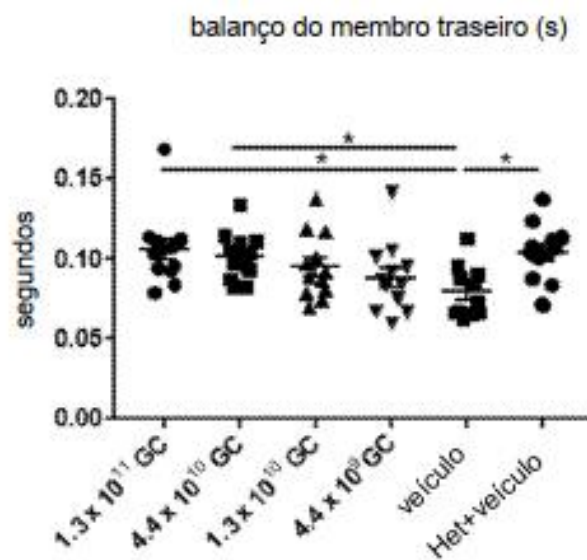
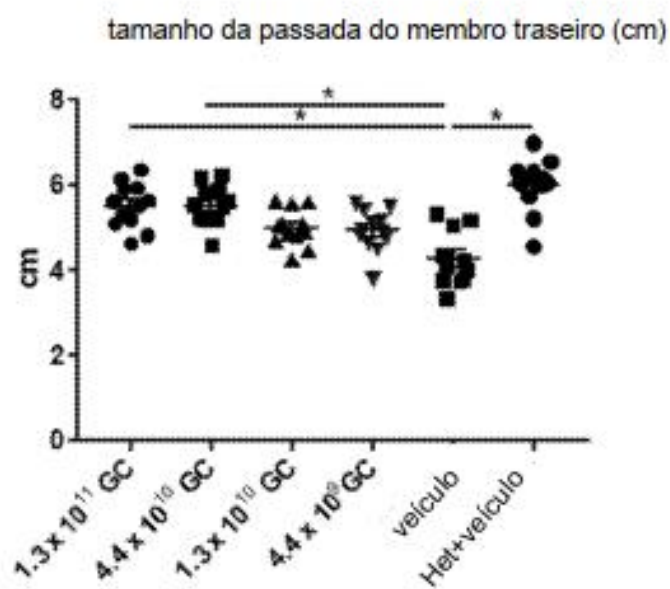


FIG 9F



AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(1)	1	MAADGYLPDWLEDTLSEGIREFWALKPGPFPFPAERHKTQDSRGLVLPQYKYLPGNGLDKGEFVNAADAALAHDKAVDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF	100
	(1)	(1)	MAADGYLPDWLEDTLSEGIREFWALKPGPFPFPAERHKTQDSRGLVLPQYKYLPGNGLDKGEFVNAADAALAHDKAVDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF	
	(1)	(1)	MAADGYLPDWLEDTLSEGIREFWALKPGPFPFPAERHKTQDSRGLVLPQYKYLPGNGLDKGEFVNAADAALAHDKAVDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF	
	(1)	(1)	MAADGYLPDWLEDTLSEGIREFWALKPGPFPFPAERHKTQDSRGLVLPQYKYLPGNGLDKGEFVNAADAALAHDKAVDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF	
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(101)	101	QERLKEDTSFGNLRGRAVFOAKRLLERGLVEEAATAPGKKRPVEQSPQESAGGKSGACPAKXRLNFGQTGDTESVPDQPIGEPPAAPSGVGSG	200
	(101)	(101)	QERLKEDTSFGNLRGRAVFOAKRLLERGLVEEAATAPGKKRPVEQSPQESAGGKSGACPAKXRLNFGQTGDTESVPDQPIGEPPAAPSGVGSG	
	(101)	(101)	QERLKEDTSFGNLRGRAVFOAKRLLERGLVEEAATAPGKKRPVEQSPQESAGGKSGACPAKXRLNFGQTGDTESVPDQPIGEPPAAPSGVGSG	
	(101)	(101)	QERLKEDTSFGNLRGRAVFOAKRLLERGLVEEAATAPGKKRPVEQSPQESAGGKSGACPAKXRLNFGQTGDTESVPDQPIGEPPAAPSGVGSG	
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(201)	201	LTMASGGGAPVADNMEGADGVGSSSGNNHCDSONLGDRTTSTRTNWALPTYNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDNDQR	300
	(201)	(201)	LTMASGGGAPVADNMEGADGVGSSSGNNHCDSONLGDRTTSTRTNWALPTYNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDNDQR	
	(201)	(201)	LTMASGGGAPVADNMEGADGVGSSSGNNHCDSONLGDRTTSTRTNWALPTYNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDNDQR	
	(201)	(201)	LTMASGGGAPVADNMEGADGVGSSSGNNHCDSONLGDRTTSTRTNWALPTYNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDNDQR	
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(301)	301	LINNMWGRPKRLNFKLFNQYKEVTDNNGVKTIANNLTTSTVQVFTDSYQQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLDGSDAVGRSSPYCLEYF	400
	(301)	(301)	LINNMWGRPKRLNFKLFNQYKEVTDNNGVKTIANNLTTSTVQVFTDSYQQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLDGSDAVGRSSPYCLEYF	
	(301)	(301)	LINNMWGRPKRLNFKLFNQYKEVTDNNGVKTIANNLTTSTVQVFTDSYQQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLDGSDAVGRSSPYCLEYF	
	(301)	(301)	LINNMWGRPKRLNFKLFNQYKEVTDNNGVKTIANNLTTSTVQVFTDSYQQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLDGSDAVGRSSPYCLEYF	
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(401)	401	PSQMLRTGNWFOFSYEFENPFFHSSYAHQSQSLDRLMNPIDQVLYYLSKTINGSGCNQQTLLKFSVAGPSNMAVQGRNYPGPSYRQORVSTTVTDNNWSE	500
	(401)	(401)	PSQMLRTGNWFOFSYEFENPFFHSSYAHQSQSLDRLMNPIDQVLYYLSKTINGSGCNQQTLLKFSVAGPSNMAVQGRNYPGPSYRQORVSTTVTDNNWSE	
	(401)	(401)	PSQMLRTGNWFOFSYEFENPFFHSSYAHQSQSLDRLMNPIDQVLYYLSKTINGSGCNQQTLLKFSVAGPSNMAVQGRNYPGPSYRQORVSTTVTDNNWSE	
	(401)	(401)	PSQMLRTGNWFOFSYEFENPFFHSSYAHQSQSLDRLMNPIDQVLYYLSKTINGSGCNQQTLLKFSVAGPSNMAVQGRNYPGPSYRQORVSTTVTDNNWSE	

FIG 10A

AAV9	(501)	FAWPGASSNALNGRNSLUNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDWDADKVMETNNEEEKTTNPVATESYGGVATN#QSAQAQQTGWQNDG
hu.68.VP1	(501)	FAWPGASSNALNGRNSLUNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDWDADKVMETNNEEEKTTNPVATESYGGVATN#QSAQAQQTGWQNDG
hu.31	(501)	FAWPGASSNALNGRNSLUNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDWDADKVMETNNEEEKTTNPVATESYGGVATN#QSAQAQQTGWQNDG
hu.32	(501)	FAWPGASSNALNGRNSLUNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDWDADKVMETNNEEEKTTNPVATESYGGVATN#QSAQAQQTGWQNDG
AAV9	(601)	601 ILPGMWQDRDYLQGPWAKIPHDTGDNFHPSPUMGGFMKHPPPQLKNTVPADPPTAFNKKLNLSRTQYSTGQVSVIEWELOKENSKRWNPFIQ
hu.68.VP1	(601)	ILPGMWQDRDYLQGPWAKIPHDTGDNFHPSPUMGGFMKHPPPQLKNTVPADPPTAFNKKLNLSRTQYSTGQVSVIEWELOKENSKRWNPFIQ
hu.31	(601)	ILPGMWQDRDYLQGPWAKIPHDTGDNFHPSPUMGGFMKHPPPQLKNTVPADPPTAFNKKLNLSRTQYSTGQVSVIEWELOKENSKRWNPFIQ
hu.32	(601)	ILPGMWQDRDYLQGPWAKIPHDTGDNFHPSPUMGGFMKHPPPQLKNTVPADPPTAFNKKLNLSRTQYSTGQVSVIEWELOKENSKRWNPFIQ
AAV9	(701)	701 YTSNYKSNWVEFAN#TEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
hu.68.VP1	(701)	YTSNYKSNWVEFAN#TEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
hu.31	(701)	YTSNYKSNWVEFAN#TEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
hu.32	(701)	YTSNYKSNWVEFAN#TEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

FIG 10B

AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(1) (1) (1) (1)	1 100	ATGGCTGGCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACCTGGAAGGANTTGGAGTGGTGGGCTTTGAACCTGGGGCCCTCTGACCAAGG
			ATGGCTGGCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACCTGGAAGGANTTGGAGTGGTGGGCTTTGAACCTGGGGCCCTCTGACCAAGG
			ATGGCTGGCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACCTCTCTGGAAGGANTTGGAGTGGTGGGCTTTGAACCTGGGGCCCTCTGACCAAGG
			ATGGCTGGCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACCTCTCTGGAAGGANTTGGAGTGGTGGGCTTTGAACCTGGGGCCCTCTGACCAAGG
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(101) (101) (101) (101)	101 200	CGAATCAGGCTATCAGGACACCTGCGGGCTTTGTCTTCCGGTTACAGTACCTTGGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGGGTCAACGC
			CGAATCAGGCTATCAGGACACCTGCGGGCTTTGTCTTCCGGTTACAGTACCTTGGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGGGTCAACGC
			CGAATCAGGCTATCAGGACACCTGCGGGCTTTGTCTTCCGGTTACAGTACCTTGGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGGGTCAACGC
			CGAATCAGGCTATCAGGACACCTGCGGGCTTTGTCTTCCGGTTACAGTACCTTGGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGGGTCAACGC
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(201) (201) (201) (201)	201 300	AGCAGAGCGCGCGCCCTCGAGCAGCAGCAGGCTACGACACGAGCTCAAGGCCGGGAGACACCCCGTACCTCAAGTACACACCCACGCCCGAGCGGCTTC
			AGCAGAGCGCGCGCCCTCGAGCAGCAGCAGGCTACGACACGAGCTCAAGGCCGGGAGACACCCCGTACCTCAAGTACACACCCACGCCCGAGCGGCTTC
			AGCAGAGCGCGCGCCCTCGAGCAGCAGCAGGCTACGACACGAGCTCAAGGCCGGGAGACACCCCGTACCTCAAGTACACACCCACGCCCGAGCGGCTTC
			AGCAGAGCGCGCGCCCTCGAGCAGCAGCAGGCTACGACACGAGCTCAAGGCCGGGAGACACCCCGTACCTCAAGTACACACCCACGCCCGAGCGGCTTC
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(301) (301) (301) (301)	301 400	CAGGAGCGGCTCAAGAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGGCGACGAGCTTCCAGGCCAAAGAGGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTTGGTTGAGG
			CAGGAGCGGCTCAAGAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGGCGACGAGCTTCCAGGCCAAAGAGGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTTGGTTGAGG
			CAGGAGCGGCTCAAGAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGGCGACGAGCTTCCAGGCCAAAGAGGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTTGGTTGAGG
			CAGGAGCGGCTCAAGAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGGCGACGAGCTTCCAGGCCAAAGAGGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTTGGTTGAGG
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(401) (401) (401) (401)	401 500	AAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAGAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGACCGGACTCTCTCGGGGATTTGGCAATCGGGTCTCAGACCCGC
			AAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAGAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGACCGGACTCTCTCGGGATTTGGCAATCGGGTCTCAGACCCGC
			AAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAGAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGACCGGACTCTCTCGGGATTTGGCAATCGGGTCTCAGACCCGC
			AAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAGAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGACCGGACTCTCTCGGGATTTGGCAATCGGGTCTCAGACCCGC

FIG 11A

AAV9 hu.68.VP1	(501)	501	TAAAAAGAGACTCAATTTTCGGTCAGACTGGCGACACAGAGTCAGTCCGAGACCCCTCAACCAATCGGAGAACTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCT	600
hu.31	(501)		TAAAAAGAGACTCAATTTTCGGTCAGACTGGCGACACAGAGTCAGTCCGAGACCCCTCAACCAATCGGAGAACTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCT	
hu.32	(501)		TAAAAAGAGACTCAATTTTCGGTCAGACTGGCGACACAGAGTCAGTCCGAGACCCCTCAACCAATCGGAGAACTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCT	
AAV9 hu.68.VP1	(601)	601	CTTACAATGGCTTCAGGTGGTGGCGACACAGAGTCAGTCCGAGACCCCTCAACCAATCGGAGAACTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCT	700
hu.31	(601)		CTTACAATGGCTTCAGGTGGTGGCGACACAGAGTCAGTCCGAGACCCCTCAACCAATCGGAGAACTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCT	
hu.32	(601)		CTTACAATGGCTTCAGGTGGTGGCGACACAGAGTCAGTCCGAGACCCCTCAACCAATCGGAGAACTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCT	
AAV9 hu.68.VP1	(701)	701	GGCTGGGGGACAGAGTCATCAACCCAGCAACCCGAACTGGGCGCTGGCCACCTTACAAACAATCACTCTTACAAAGCAAAATCTCCAAACAGCACATCTGGAGG	800
hu.31	(701)		GGCTGGGGGACAGAGTCATCAACCCAGCAACCCGAACTGGGCGCTGGCCACCTTACAAACAATCACTCTTACAAAGCAAAATCTCCAAACAGCACATCTGGAGG	
hu.32	(701)		GGCTGGGGGACAGAGTCATCAACCCAGCAACCCGAACTGGGCGCTGGCCACCTTACAAACAATCACTCTTACAAAGCAAAATCTCCAAACAGCACATCTGGAGG	
AAV9 hu.68.VP1	(801)	801	ATCTTCAATGACAACGCCTACTTGGGCTACAGCAACCCCTGGGGGTATTTTGGCTTCAACAGATTCCACTGGCACCTTCTACACACGACATCTGGAGG	900
hu.31	(801)		ATCTTCAATGACAACGCCTACTTGGGCTACAGCAACCCCTGGGGGTATTTTGGCTTCAACAGATTCCACTGGCACCTTCTACACACGACATCTGGAGG	
hu.32	(801)		ATCTTCAATGACAACGCCTACTTGGGCTACAGCAACCCCTGGGGGTATTTTGGCTTCAACAGATTCCACTGGCACCTTCTACACACGACATCTGGAGG	
AAV9 hu.68.VP1	(901)	901	CTCATCAACCAACAACTGGGGATTCCGGGCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAGGTCAAGAGGTTACGGACAAATGGAGTCAAGACCA	1000
hu.31	(901)		CTCATCAACCAACAACTGGGGATTCCGGGCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAGGTCAAGAGGTTACGGACAAATGGAGTCAAGACCA	
hu.32	(901)		CTCATCAACCAACAACTGGGGATTCCGGGCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAGGTCAAGAGGTTACGGACAAATGGAGTCAAGACCA	

FIG 11B

AAV9	(901)	901	CTCATCAACAACACTGGGGATTCCGGGCTTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAAGAGGTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	1000
hu.68.VP1	(901)		CTCATCAACAACAACACTGGGGATTCCGGGCTTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAAGAGGTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.31	(901)		CTCATCAACAACAACACTGGGGATTCCGGGCTTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAAGAGGTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.32	(901)		CTCATCAACAACAACACTGGGGATTCCGGGCTTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAAGAGGTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
AAV9	(1001)	1001	TCGCCAATAACCTTACCAAGCAGCGGTCCAGGCTTCAAGGACTCAGACTATCAGCTCCCGTAGTGTCTCGGGTCGGCTCAGAGGGCTGCCTCCCGCGGTT	1100
hu.68.VP1	(1001)		TCGCCAATAACCTTACCAAGCAGCGGTCCAGGCTTCAAGGACTCAGACTATCAGCTCCCGTAGTGTCTCGGGTCGGCTCAGAGGGCTGCCTCCCGCGGTT	
hu.31	(1001)		TCGCCAATAACCTTACCAAGCAGCGGTCCAGGCTTCAAGGACTCAGACTATCAGCTCCCGTAGTGTCTCGGGTCGGCTCAGAGGGCTGCCTCCCGCGGTT	
hu.32	(1001)		TCGCCAATAACCTTACCAAGCAGCGGTCCAGGCTTCAAGGACTCAGACTATCAGCTCCCGTAGTGTCTCGGGTCGGCTCAGAGGGCTGCCTCCCGCGGTT	
AAV9	(1101)	1101	CCCAAGCGGAGGTTTTTCATGATTCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCCGCGGTGCGTTCGCTCTTTTACTGCGCTGGAATATTTTC	1200
hu.68.VP1	(1101)		CCCAAGCGGAGGTTTTTCATGATTCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCCGCGGTGCGTTCGCTCTTTTACTGCGCTGGAATATTTTC	
hu.31	(1101)		CCCAAGCGGAGGTTTTTCATGATTCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCCGCGGTGCGTTCGCTCTTTTACTGCGCTGGAATATTTTC	
hu.32	(1101)		CCCAAGCGGAGGTTTTTCATGATTCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCCGCGGTGCGTTCGCTCTTTTACTGCGCTGGAATATTTTC	
AAV9	(1201)	1201	CCGTGCGCAATGCTAAGACGGGTAAACAACCTTCCAGTTACGTTACGAGTTTGAAGAGTACCTTTCCATAGCAGCTACGCTCAGAGCCAAAGCCTGGACC	1300
hu.68.VP1	(1201)		CCGTGCGCAATGCTAAGACGGGTAAACAACCTTCCAGTTACGTTACGAGTTTGAAGAGTACCTTTCCATAGCAGCTACGCTCAGAGCCAAAGCCTGGACC	
hu.31	(1201)		CCGTGCGCAATGCTAAGACGGGTAAACAACCTTCCAGTTACGTTACGAGTTTGAAGAGTACCTTTCCATAGCAGCTACGCTCAGAGCCAAAGCCTGGACC	
hu.32	(1201)		CCGTGCGCAATGCTAAGACGGGTAAACAACCTTCCAGTTACGTTACGAGTTTGAAGAGTACCTTTCCATAGCAGCTACGCTCAGAGCCAAAGCCTGGACC	
AAV9	(1301)	1301	GACTAATGAATCCACTCATCGACCAATACCTTGTAATCTCTCAAGACTATTAAAGGTTCTGGACAGATCAACAAGGCTAAAAATTCAGTGTGGCGGG	1400
hu.68.VP1	(1301)		GACTAATGAATCCACTCATCGACCAATACCTTGTAATCTCTCAAGACTATTAAAGGTTCTGGACAGATCAACAAGGCTAAAAATTCAGTGTGGCGGG	
hu.31	(1301)		GACTAATGAATCCACTCATCGACCAATACCTTGTAATCTCTCAAGACTATTAAAGGTTCTGGACAGATCAACAAGGCTAAAAATTCAGTGTGGCGGG	
hu.32	(1301)		GACTAATGAATCCACTCATCGACCAATACCTTGTAATCTCTCAAGACTATTAAAGGTTCTGGACAGATCAACAAGGCTAAAAATTCAGTGTGGCGGG	

FIG 11C

AAV9	(1401)	1401	1500
hu.68.VP1	(1401)	1401	1500
hu.31	(1401)	1401	1500
hu.32	(1401)	1401	1500
AAV9	(1501)	1501	1600
hu.68.VP1	(1501)	1501	1600
hu.31	(1501)	1501	1600
hu.32	(1501)	1501	1600
AAV9	(1601)	1601	1700
hu.68.VP1	(1601)	1601	1700
hu.31	(1601)	1601	1700
hu.32	(1601)	1601	1700
AAV9	(1701)	1701	1800
hu.68.VP1	(1701)	1701	1800
hu.31	(1701)	1701	1800
hu.32	(1701)	1701	1800

AAV9 (1401) ACCAGCAACATGGCTGTCCAGGGAGAGAAACTACATACCTGGAGCCAGCTACCGGACACACACAGTGTCTCAACACTGTGACTCAAAACACACACAGCGAA
 hu.68.VP1 (1401) ACCAGCAACATGGCTGTCCAGGGAGAGAAACTACATACCTGGAGCCAGCTACCGGACACACACAGTGTCTCAACACTGTGACTCAAAACACACACAGCGAA
 hu.31 (1401) ACCAGCAACATGGCTGTCCAGGGAGAGAAACTACATACCTGGAGCCAGCTACCGGACACACACAGTGTCTCAACACTGTGACTCAAAACACACACAGCGAA
 hu.32 (1401) ACCAGCAACATGGCTGTCCAGGGAGAGAAACTACATACCTGGAGCCAGCTACCGGACACACACAGTGTCTCAACACTGTGACTCAAAACACACACAGCGAA
 AAV9 (1501) TTGCTTGGCTTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGTGAAATCCTTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAGGAGAGGACCGGTT
 hu.68.VP1 (1501) TTGCTTGGCTTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGTGAAATCCTTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAGGAGAGGACCGGTT
 hu.31 (1501) TTGCTTGGCTTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGTGAAATCCTTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAGGAGAGGACCGGTT
 hu.32 (1501) TTGCTTGGCTTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGTGAAATCCTTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAGGAGAGGACCGGTT
 AAV9 (1601) TCCTTCCCTTTGCTGGATCTTTAAATTTTGGCAACACAGGAACTGGAGAGACACACAGTGGATGGGACAAAAGTCATGATAACCAACGAGAGAGAAATTAA
 hu.68.VP1 (1601) TCCTTCCCTTTGCTGGATCTTTAAATTTTGGCAACACAGGAACTGGAGAGACACACAGTGGATGGGACAAAAGTCATGATAACCAACGAGAGAGAAATTAA
 hu.31 (1601) TCCTTCCCTTTGCTGGATCTTTAAATTTTGGCAACACAGGAACTGGAGAGACACACAGTGGATGGGACAAAAGTCATGATAACCAACGAGAGAGAAATTAA
 hu.32 (1601) TCCTTCCCTTTGCTGGATCTTTAAATTTTGGCAACACAGGAACTGGAGAGACACACAGTGGATGGGACAAAAGTCATGATAACCAACGAGAGAGAAATTAA
 AAV9 (1701) AACTACTAACCCCGGTAGCAACGGAGTCTCTATGGACAGTGGCCACAAACACAGAGTGCCCAAGCACAGCGCGACAGCCGGCTGGGTTCAAAACCAAGGA
 hu.68.VP1 (1701) AACTACTAACCCCGGTAGCAACGGAGTCTCTATGGACAGTGGCCACAAACACAGAGTGCCCAAGCACAGCGCGACAGCCGGCTGGGTTCAAAACCAAGGA
 hu.31 (1701) AACTACTAACCCCGGTAGCAACGGAGTCTCTATGGACAGTGGCCACAAACACAGAGTGCCCAAGCACAGCGCGACAGCCGGCTGGGTTCAAAACCAAGGA
 hu.32 (1701) AACTACTAACCCCGGTAGCAACGGAGTCTCTATGGACAGTGGCCACAAACACAGAGTGCCCAAGCACAGCGCGACAGCCGGCTGGGTTCAAAACCAAGGA

FIG 11D

AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(1801) (1801) (1801) (1801)	1801	ATACATCCGGGATGGTTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTTGGGCCAAATTCCTCACAGGACGGCAACITTTACCCCTTCTC	1900
			ATACATCCGGGATGGTTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTTGGGCCAAATTCCTCACAGGACGGCAACITTTACCCCTTCTC	
			ATACATCCGGGATGGTTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTTGGGCCAAATTCCTCACAGGACGGCAACITTTACCCCTTCTC	
			ATACATCCGGGATGGTTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTTGGGCCAAATTCCTCACAGGACGGCAACITTTACCCCTTCTC	
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(1901) (1901) (1901) (1901)	1901	TGATGGGAGGGTTTGGAAATGAAGCACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAACGGGCTTCAAGGACAGCT	2000
			TGATGGGAGGGTTTGGAAATGAAGCACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAACGGGCTTCAAGGACAGCT	
			TGATGGGAGGGTTTGGAAATGAAGCACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAACGGGCTTCAATAGGACAGCT	
			TGATGGGAGGGTTTGGAAATGAAGCACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAACGGGCTTCAATAGGACAGCT	
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(2001) (2001) (2001) (2001)	2001	GAACTCTTTTCATCACCCAGTATTTCTACTGSCCAAGTCAGCGTGGAGATGAGTGGGAGCTGCAGAGGAAACAGCAAGGCTGGAACTCCGAGATCCAG	2100
			GAACTCTTTTCATCACCCAGTATTTCTACTGSCCAAGTCAGCGTGGAGATGAGTGGGAGCTGCAGAGGAAACAGCAAGGCTGGAACTCCGAGATCCAG	
			GAACTCTTTTCATCACCCAGTATTTCTACTGSCCAAGTCAGCGTGGAGATGAGTGGGAGCTGCAGAGGAAACAGCAAGGCTGGAACTCCGAGATCCAG	
			GAACTCTTTTCATCACCCAGTATTTCTACTGSCCAAGTCAGCGTGGAGATGAGTGGGAGCTGCAGAGGAAACAGCAAGGCTGGAACTCCGAGATCCAG	
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(2101) (2101) (2101) (2101)	2101	TACACTTCCAACTATTACAGTCTAAATGTTGAAATTTGCTGTTAACTAGTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCATTTGGCACCAGATACCTGACTC	2200
			TACACTTCCAACTATTACAGTCTAAATGTTGAAATTTGCTGTTAACTAGTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCATTTGGCACCAGATACCTGACTC	
			TACACTTCCAACTATTACAGTCTAAATGTTGAAATTTGCTGTTAACTAGTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCATTTGGCACCAGATACCTGACTC	
			TACACTTCCAACTATTACAGTCTAAATGTTGAAATTTGCTGTTAACTAGTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCATTTGGCACCAGATACCTGACTC	
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(2201) (2201) (2201) (2201)	2201 2211	GTAATCTGTAA	
			GTAATCTGTAA	
			GTAATCTGTAA	
			GTAATCTGTAA	

FIG 11E

FIG 12A

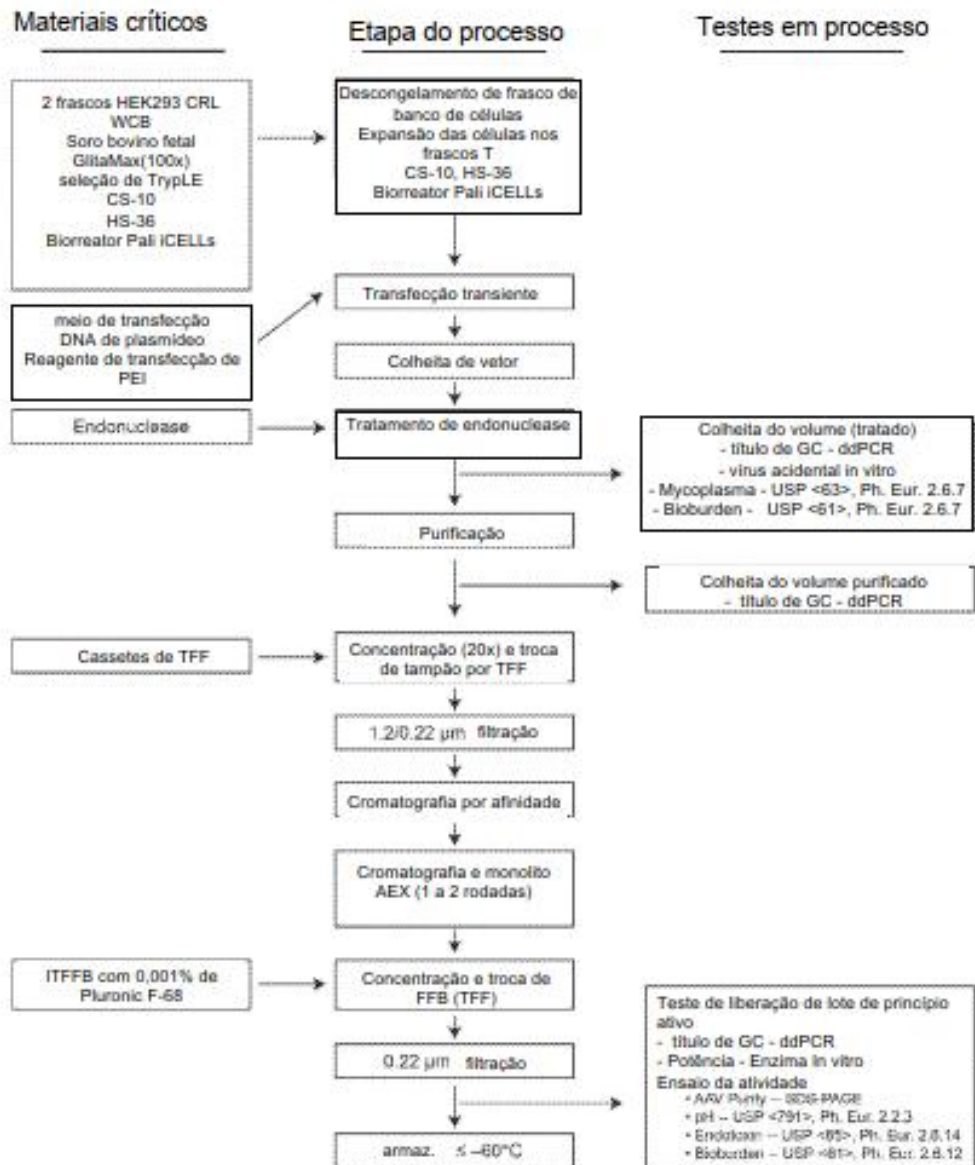
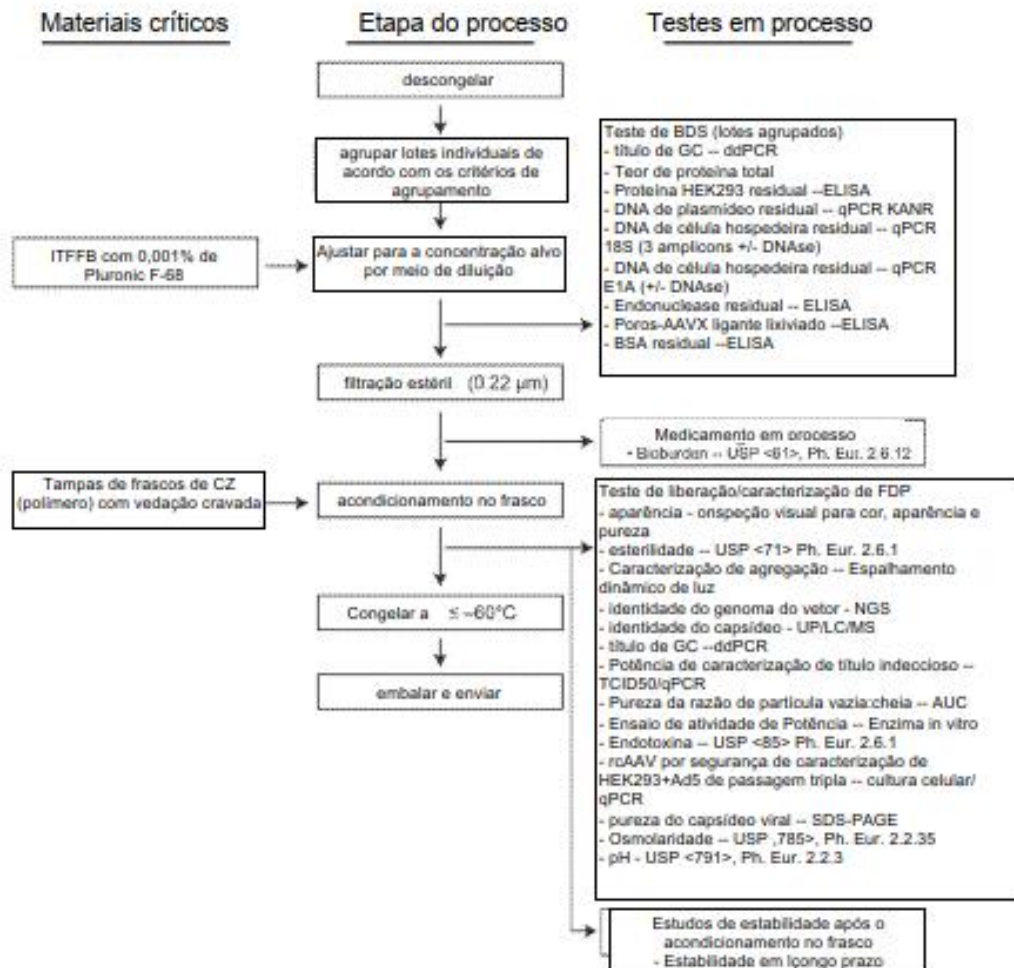


FIG 12B



RESUMO

Patente de Invenção: “**COMPOSIÇÕES ÚTEIS PARA TRATAMENTO DE GANGLIOSIDOSE GM1**”.

Um vírus adenoassociado recombinante (rAAV) compreendendo um capsídeo AAVhu68 e um genoma de vetor compreendendo um gene lisossomal de beta-galactosidase (por exemplo, gene de galactosidase beta 1, *GBL1*) é fornecido (*isto é*, rAAVhu68.GBL1). Também é fornecida uma composição contendo uma quantidade eficaz de rAAVhu68.GBL1 para melhorar os sintomas de gangliosidose GM1, incluindo, por exemplo, aumento da média de vida, diminuição da necessidade de tubo de alimentação, redução na incidência e frequência de convulsões, redução na progressão para declínio neurocognitivo e/ou melhora no desenvolvimento neurocognitivo.

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 DE TRADUÇÃO 30 OU 60
- Data de Geração do Código: 13/05/2021
- Hora de Geração do Código: 15:48:08
- Código de Controle:
 - Campo 1: 3A142FEE6CFF98BC
 - Campo 2: 71717941879C15CD