



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

**(21) BR 112021015050-1 A2**



**(22) Data do Depósito: 31/01/2020**

**(43) Data da Publicação Nacional: 05/10/2021**

**(54) Título:** MÉTODOS DE TRATAMENTO DE VETOR AAV PARA LIPOFUSCINOSE CERÓIDE NEURONAL INFANTIL TARDIA TIPO 2

**(51) Int. Cl.:** A61K 31/436; A61K 38/13; A61K 38/46; A61K 48/00; A61P 37/06; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 01/02/2019 US 62/800.131.

**(71) Depositante(es):** SPARK THERAPEUTICS, INC..

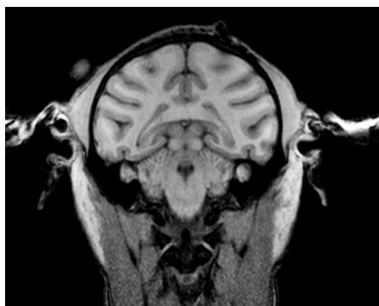
**(72) Inventor(es):** DAVID WILLIAM ANDERSON; MARYANN TOTO; SUE E.I. DASEN.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2020016235 de 31/01/2020

**(87) Publicação PCT:** WO 2020/160486 de 06/08/2020

**(85) Data da Fase Nacional:** 30/07/2021

**(57) Resumo:** MÉTODOS DE TRATAMENTO DE VETOR AAV PARA LIPOFUSCINOSE CERÓIDE NEURONAL INFANTIL TARDIA TIPO 2. São divulgados aqui métodos para tratar um primata com necessidade de tripeptidila peptidase 1 (TPP1), compreendendo (a) fornecer um vetor de vírus adeno-associado recombinante (AAV) compreendendo um ácido nucleico que codifica TPP1; e (b) administrar uma quantidade do vetor AAV recombinante ao sistema nervoso central (SNC) do primata, em que o TPP1 é expresso no primata.



**“MÉTODOS DE TRATAMENTO DE VETOR AAV PARA LIPOFUSCINOSE  
CERÓIDE NEURONAL INFANTIL TARDIA TIPO 2”**

**PEDIDOS RELACIONADOS**

[0001] Este pedido de patente reivindica o benefício de prioridade do Pedido de Patente Provisório dos EUA nº 62/800.131, depositado em 1 de fevereiro de 2019. Todo o conteúdo dos pedidos anteriores é incorporado neste documento por referência, incluindo todos os textos, tabelas, figuras e sequências.

**INTRODUÇÃO**

[0002] A lipofuscinose ceróide neuronal infantil tardia tipo 2 (CLN2), também conhecida como doença de Jansky - Bielschowsky e NCL infantil tardia (LINCL), é uma doença neurodegenerativa progressiva que se apresenta em crianças por volta dos 2 a 4 anos de idade. Os sintomas incluem convulsões, perda do controle motor e da visão, comprometimento cognitivo e de desenvolvimento, culminando em morte nas primeiras duas décadas de vida. O mecanismo patológico subjacente é uma deficiência ou defeito da enzima lisossomal solúvel tripeptidila peptidase-1 (TPP1), devido a mutações no gene correspondente.

[0003] Relatórios indicam que a transdução de vetor de vírus adeno-associado (AAV) de células ependimárias que revestem os ventrículos laterais do cérebro pode fornecer secreção contínua de TPP1 humano no líquido cefalorraquidiano (LCR), entregando assim a proteína TPP1 expressa em todo o sistema nervoso central (Martz, L., *Biocentury Innovation*, 10 de dezembro de 2015). A entrega de AAV2-CAG-TPP1 via transdução ependimal em um modelo canino de CLN2 foi relatada para fornecer modificação da doença e extensão da vida (Katz, M.L., *et al.* (2015). *Sci Transl Med*, 7 (313)).

**DESCRIÇÃO RESUMIDA**

[0004] São divulgados neste documento estudos em primatas não humanos que avaliam a segurança e a tolerabilidade de um vetor AAV2-CAG-TPP1 humano. O vetor AAV foi entregue por injeção unilateral no ventrículo

lateral em 3 doses variando de  $1E13$  a  $2.17E14$  genomas/cérebro do vetor, seguido por 5 e 20 semanas de observação. Mudanças na atividade de TPP1 e níveis de antígeno no LCR desde a linha de base em cada animal foram monitorados. Os níveis de atividade de TPP1 mostraram aumentos de pico em comparação com a linha de base de ~17 vezes na coorte de dose baixa a ~48 vezes na coorte de alta dose. Além disso, os níveis médios de expressão do transgene hTPP1 em todas as doses testadas excederam as faixas de  $K_{\text{absorção}}$  para TPP1 ao longo da duração do estudo. A análise preliminar de tecidos relevantes do sistema nervoso central (SNC) não identificou alterações patológicas associadas à entrega do vetor ou à expressão do transgene TPP1. Em conclusão, a expressão de TPP1 humano após a transdução endimária utilizando um vetor AAV2 em primatas não humanos foi bem tolerada, desde que a expressão da proteína TPP1 no LCR sustentada consistentemente dentro ou excedendo o valor de  $K_{\text{absorção}}$  de cerca de 60 a cerca de 120 ng/mL suficiente para fornecer um efeito terapêutico para animais com CLN2.

[0005] Em certas modalidades, um método para tratar um primata com necessidade de tripeptidila peptidase 1 (TPP1), compreendendo (a) fornecer um vetor de vírus adeno-associado (AAV) recombinante compreendendo um ácido nucleico que codifica TPP1; e (b) administrar uma quantidade do vetor AAV recombinante ao sistema nervoso central (SNC) do primata, em que o TPP1 é expresso no primata.

[0006] Em certas modalidades, o primata é um humano. Em certas modalidades, o ser humano tem lipofuscinose ceróide neuronal infantil tardia (CLN2). Em certas modalidades, o humano tem aproximadamente 1 a 10 anos de idade ou tem mais de 10 anos. Em certas modalidades, o humano tem aproximadamente 2 a 5 anos de idade.

[0007] Em certas modalidades, em métodos para tratar primatas, o vetor AAV recombinante é administrado ao ventrículo lateral ou cisterna magna. Em certas modalidades, o vetor AAV recombinante é administrado ao corno occipital do ventrículo lateral. Em certas modalidades, o vetor AAV

recombinante é administrado unilateralmente a um ventrículo lateral. Em certas modalidades, o vetor AAV recombinante é administrado bilateralmente a cada ventrículo lateral. Em certas modalidades, o vetor AAV recombinante é administrado unilateralmente ou bilateralmente a um ou ambos os ventrículos laterais várias vezes.

[0008] Em certas modalidades, o TPP1 é expresso em níveis aumentados no SNC. Em certas modalidades, o TPP1 é expresso ou entregue em todo o SNC. Em certas modalidades, o TPP1 é expresso em ou entregue a células endimárias. Em certas modalidades, o TPP1 é entregue ao parênquima.

[0009] Em certas modalidades, a expressão de TPP1 é mantida em níveis iguais ou maiores do que os necessários para metade da absorção máxima de TPP1 nos neurônios. Em certas modalidades, a expressão de TPP1 é mantida em níveis iguais ou maiores do que  $K_{\text{absorção}}$ , em que  $K_{\text{absorção}}$  é de pelo menos cerca de 60 ng/mL. Em certas modalidades, a expressão de TPP1 é mantida em níveis iguais ou maiores do que  $K_{\text{absorção}}$ , em que  $K_{\text{absorção}}$  é de pelo menos cerca de 60 ng/mL – 120 ng/mL. Em certas modalidades, a expressão de TPP1 é mantida em níveis maiores do que cerca de 120 ng/mL. Em certas modalidades, a expressão de TPP1 é mantida em níveis superiores a cerca de 150 ng/mL, superiores a cerca de 200 ng/mL, superiores a cerca de 250 ng/mL ou superiores a cerca de 300 ng/mL. Em certas modalidades, a expressão de TPP1 é mantida por pelo menos cerca de 5 semanas, ou pelo menos cerca de 10 semanas, ou pelo menos cerca de 20 semanas no SNC. Em certas modalidades, a expressão detectável de TPP1 ou atividade de TPP1 é mantida por pelo menos 5 semanas, ou pelo menos 10 semanas, ou pelo menos 20 semanas no SNC.

[0010] Em certas modalidades, em métodos de tratamento de um primata, o vetor AAV recombinante é administrado ao SNC a uma dose superior a cerca de  $1,5 \times 10^{13}$  de genomas de vetor AAV; a uma dose de cerca de  $5 \times 10^{13}$  de genomas de vetor AAV ou superior a cerca de  $5 \times 10^{13}$  de

genomas de vetor AAV; a uma dose de cerca de  $1 \times 10^{14}$  de genomas de vetor AAV ou superior a cerca de  $1 \times 10^{14}$  de genomas de vetor AAV; a uma dose de cerca de  $5 \times 10^{14}$  de genomas de vetor AAV ou superior a cerca de  $5 \times 10^{14}$  de genomas de vetor AAV; a uma dose de cerca de  $1 \times 10^{15}$  de genomas de vetor AAV ou superior a cerca de  $1 \times 10^{15}$  de genomas de vetor AAV; ou a uma dose de cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor AAV ou superior a cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor AAV.

[0011] Em certas modalidades, em métodos para tratar um primata, o vetor AAV recombinante é administrado ao SNC em uma faixa de dosagem de cerca de  $1,5 \times 10^{13}$  a cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor; em uma faixa de dosagem de cerca de  $1 \times 10^{14}$  a cerca de  $3 \times 10^{15}$  de genomas de vetor; em uma faixa de dosagem de cerca de  $2 \times 10^{14}$  a cerca de  $2 \times 10^{15}$  de genomas de vetor; em uma faixa de dosagem de cerca de  $2,5 \times 10^{14}$  a cerca de  $7,5 \times 10^{14}$  de genomas de vetor; em uma faixa de dosagem de cerca de  $5 \times 10^{14}$  a cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor; ou em uma faixa de dosagem de cerca de  $1 \times 10^{15}$  a cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor.

[0012] Em certas modalidades, em métodos de tratamento de primatas, o vetor AAV recombinante é administrado ao SNC a uma dose de cerca de  $1 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $2 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $3 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $4 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $5 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $6 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $7 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $8 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $9 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $1 \times 10^{15}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $2 \times 10^{15}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $3 \times 10^{15}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $4 \times 10^{15}$  de genomas de vetor, ou a uma dose de cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor.

[0013] Em certas modalidades, o método reduz, diminui ou inibe um ou mais sintomas de CLN2; ou previne ou reduz a progressão ou piora de

um ou mais sintomas de CLN2; ou estabiliza um ou mais sintomas de CLN2; ou melhora um ou mais sintomas de CLN2.

[0014] Em certas modalidades, um ou mais sintomas são selecionados a partir do grupo que consiste em deficiência visual, desenvolvimento cognitivo prejudicado ou atrofiado, perda de controle motor e convulsões.

[0015] Em certas modalidades, o ácido nucleico que codifica TPP1 compreende um cassete de expressão operacionalmente ligado a um elemento de controle de expressão. Em certas modalidades, o elemento de controle de expressão está posicionado a 5' do ácido nucleico. Em certas modalidades, o elemento de controle de expressão compreende um promotor CAG (SEQ ID NO:3), promotor/intensificador precoce imediato de citomegalovírus (CMV), promotor/intensificador do vírus do sarcoma de Rous (RSV), promotor SV40, promotor dihidrofolato redutase (DHFR), ou promotor de  $\beta$ -actina de galinha (CBA).

[0016] Em certas modalidades, o ácido nucleico heterólogo é posicionado entre uma ou mais repetições terminais invertidas AAV 5' e/ou 3' (ITR(s)). Em certas modalidades, o um ou mais 5' e/ou 3' AAV ITR compreende um AAV ITR mutado, modificado ou variante que não é processado pela proteína Rep de AAV. Em certas modalidades, o um ou mais 5' e/ou 3' AAV ITR(s) compreende um AAV ITR mutado, modificado ou variante que permite ou facilita a formação do genoma do transgene repórter autocomplementar em uma estrutura de sequência de repetição invertida de fita dupla no vetor AAV recombinante. Em certas modalidades, o AAV ITR mutado, modificado ou variante tem uma sequência D deletada e/ou uma sequência de sítio de resolução terminal (TRS) mutada, modificada ou variante.

[0017] Em certas modalidades, o vetor AAV recombinante compreende na orientação 5'  $\rightarrow$  3' de um primeiro AAV ITR; um promotor operável em células de mamíferos; o ácido nucleico heterólogo; um sinal de poliadenilação; e opcionalmente um segundo AAV ITR.

[0018] Em certas modalidades, o um ou mais ITR(s) compreende sorotipo AAV, AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh74 ou Rh10 ITR.

[0019] Em certas modalidades, o vetor AAV recombinante compreende uma sequência VP1, VP2 ou VP3 60% ou mais idêntica a uma sequência VP1, VP2 e/ou VP3 do sorotipo AAV AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh74, Rh10, SPK1 (SEQ ID NO:1) ou SPK2 (SEQ ID NO:2) VP1, VP2 e/ou VP3, ou um híbrido ou quimera de qualquer um dos sorotipos AAV anteriores. Em certas modalidades, o vetor AAV recombinante compreende proteína do capsídeo VP1, VP2 e/ou VP3 com 100% de identidade de sequência com proteína do capsídeo VP1, VP2 e/ou VP3 selecionada do grupo que consiste em AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, Rh10, Rh74, SPK1 (SEQ ID NO:1) e SPK2 (SEQ ID NO:2) proteínas do capsídeo VP1, VP2 e/ou VP3.

[0020] Em certas modalidades, o vetor AAV recombinante compreende ainda uma sequência de poliadenilação posicionada a 3' do ácido nucleico. Em certas modalidades, o ácido nucleico que codifica TPP1, elemento de controle de expressão ou sequência de poliadenilação é CpG reduzido em comparação com o ácido nucleico de tipo selvagem que codifica TPP1, elemento de controle de expressão ou sequência de poliadenilação. Em certas modalidades, a sequência de poliadenilação compreende uma sequência de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (bGH).

[0021] Em certas modalidades, o TPP1 é humano, compreende ou consiste na sequência apresentada como SEQ ID NO:4, ou é uma variante funcional ou forma polimórfica do mesmo.

[0022] Em certas modalidades, o vetor AAV recombinante compreende (a) um ou mais de um capsídeo de AAV, e (b) uma ou mais repetições terminais invertidas de AAV (ITR(s)), em que um ou mais AAV ITS(s) flanqueiam o terminal 5' ou 3' do ácido nucleico ou do cassete de

expressão.

[0023] Em certas modalidades, o vetor AAV recombinante compreende ainda um íntron posicionado a 5' ou 3' de um ou mais ITR(s).

[0024] Em certas modalidades, pelo menos um ou mais de um ou mais ITR(s) e/ou o íntron é modificado para ter CpGs reduzidos.

[0025] Em certas modalidades, o vetor AAV recombinante tem um sorotipo de capsídeo compreendendo um capsídeo de AAV VP1, VP2 e/ou VP3 com 90% ou mais de identidade de sequência para AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74, AAV-2i8, SPK1 (SEQ ID NO:1) ou SPK2 (SEQ ID NO:2) sequências VP1, VP2 e/ou VP3 ou um capsídeo com 95% ou mais de identidade de sequência para AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74, AAV-2i8, SPK1 (SEQ ID NO:1), SPK2 (SEQ ID NO:2) sequências VP1, VP2 e/ou VP3 ou um capsídeo com 100% de identidade de sequência com AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74, AAV- 2i8, SPK1 (SEQ ID NO:1) ou SPK2 (SEQ ID NO:2) sequências VP1, VP2 e/ou VP3.

[0026] Em certas modalidades, o um ou mais ITR(s) compreende um ou mais ITRs de qualquer um de: sorotipos AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10 ou Rh74 AAV ou uma combinação dos mesmos.

[0027] Em certas modalidades, o vetor AAV recombinante está em uma composição farmacêutica que compreende um transportador ou excipiente biologicamente compatível.

[0028] Em certas modalidades, a composição farmacêutica compreende ainda capsídeos de AAV vazios. Em certas modalidades, a razão dos capsídeos de AAV vazios para o vetor AAV recombinante está dentro ou entre cerca de 100: 1-50: 1, de cerca de 50:1-25:1, de cerca de 25:1-10:1, de cerca de 10:1-1:1, de cerca de 1:1-1:10, de cerca de 1:10-1:25, de cerca de 1:25-1:50, ou de cerca de 1:50-1:100. Em certas modalidades, a razão dos

capsídeos de AAV vazios para o vetor AAV recombinante é de cerca de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, ou 10:1.

[0029] Em certas modalidades, a composição farmacêutica compreende ainda um surfactante.

#### DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0030] A **Figura 1** mostra uma imagem de ressonância magnética (MRI) representativa do direcionamento do corno occipital do ventrículo lateral (linha vertical branca).

[0031] As **Figuras 2A e 2B** mostram a expressão rápida da proteína TPP1 humana no LCR. (A) Níveis de TPP1 humano no LCR por 30 dias após a administração do vetor. Todas as doses ( $1,0 \times 10^{13}$  vg,  $5,0 \times 10^{13}$  vg e  $2,17 \times 10^{14}$  vg por animal) proporcionou aumentos mensuráveis nos níveis de proteína TPP1 de 2 semanas pós transdução. Asterisco (\*) indica amostras que foram hemolisadas, potencialmente elevando os resultados. (B) A análise dos níveis de atividade da TPP1 humana no LCR indicou a expressão da proteína funcional.

[0032] As **Figuras 3A e 3B** mostram a expressão e atividade sustentada da proteína TPP1 humana no LCR ao longo de 20 semanas. (A) Níveis de TPP1 humano no LCR ao longo de 20 semanas, após a entrega de AAV2-CAG-hTPP1. Os níveis de expressão de hTPP1 excederam o nível necessário para metade da absorção máxima nos lisossomas de neurônios ( $K_{\text{absorção}}$  é de aproximadamente 60-120 ng/mL) em todos, exceto um animal. Os níveis de expressão para a dose de  $5,0 \times 10^{13}$  vg/animal tiveram uma média de 1,55 vezes acima dos limites superiores de  $K_{\text{absorção}}$  no final do estudo e mostraram uma expressão relativamente consistente da semana 10-20 em uma base por animal. (B) Níveis de atividade de TPP1 humano em LCR. Todos os animais que mostraram expressão sustentada de TPP1 humano no LCR mantiveram níveis elevados de atividade de TPP1 ao longo do período de tempo. Como foi visto para a expressão da proteína TPP1, o nível de atividade médio foi encontrado para ser mais alto nos animais que receberam uma dose

de  $5,0 \times 10^{13}$  vg/animal.

[0033] A **Figura 4** mostra os níveis médios de expressão da proteína TPP no LCR ao longo da duração do curso de tempo.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

[0034] Os "polipeptídeos", "proteínas" e "peptídeos" TPP1 codificados por um "ácido nucleico" ou sequências "de polinucleotídeos" "incluem sequências TPP1 nativas de comprimento total, como com proteínas TPP1 de tipo selvagem de ocorrência natural, bem como TPP1 funcional subsequências, formas modificadas ou variantes de sequência, desde que a subsequência, forma modificada ou variante retenha algum grau de funcionalidade da proteína TPP1 de comprimento total nativo. Em métodos e usos da invenção, tais polipeptídeos TPP1, proteínas e peptídeos codificados pelas sequências de ácido nucleico podem ser, mas não precisam ser idênticos à proteína TPP1 endógena que é defeituosa, ou cuja expressão é insuficiente, ou deficiente no tratamento mamífero.

[0035] Um polipeptídeo TPP1 ou polinucleotídeo que codifica TPP1 pode incluir um ou mais resíduos de aminoácidos ou modificação de nucleotídeos, respectivamente, por exemplo e sem limitação, um ou mais resíduos de aminoácidos ou substituição de nucleotídeos (*por exemplo*, 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-500, 500-750, 750 -850 ou mais resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos).

[0036] Um exemplo de uma modificação de aminoácido é uma substituição conservativa de aminoácido ou uma deleção (*por exemplo*, subsequências ou fragmentos) de uma sequência de referência, *por exemplo*, em TPP1. Em certas modalidades, uma sequência de TPP1 modificada ou variante retém pelo menos parte de uma função ou atividade da sequência de TPP1 não modificada.

[0037] Todas as formas de mamíferos e não mamíferos de ácidos nucleicos que codificam TPP1, incluindo outras formas de mamíferos da TPP1,

estão expressamente incluídas, conhecidas ou desconhecidas.

[0038] Conforme usado no presente documento, o termo "vetor" refere-se a uma pequena molécula de ácido nucleico transportadora, um plasmídeo, vírus (*por exemplo*, vetor AAV) ou outro veículo que pode ser manipulado por inserção ou incorporação de um ácido nucleico. Esses vetores podem ser usados para manipulação genética (*ou seja*, "vetores de clonagem"), para introduzir/transferir polinucleotídeos nas células e para transcrever ou traduzir o polinucleotídeo inserido nas células. Um "vetor de expressão" é um vetor especializado que contém um gene ou sequência de ácido nucleico com as regiões regulatórias necessárias para a expressão em uma célula hospedeira.

[0039] Uma sequência de ácido nucleico de vetor geralmente contém pelo menos uma origem de replicação para propagação em uma célula e, opcionalmente, elementos adicionais, como um ácido nucleico heterólogo (*por exemplo*, ácido nucleico que codifica TPP1), elemento de controle de expressão (*por exemplo*, um promotor, intensificador), intron, uma repetição terminal invertida (ITR), marcador selecionável (*por exemplo*, resistência a antibióticos), sinal de poliadenilação.

[0040] Um vetor viral é derivado de ou baseado em um ou mais elementos de ácido nucleico que compreendem um genoma viral. Os vetores virais específicos incluem vírus adeno-associados (AAV) e vetores lentivirais.

[0041] O termo "recombinante", como um modificador de vetor, como o vetor AAV recombinante (rAAV), bem como um modificador de sequências, como ácidos nucleicos e polipeptídeos recombinantes, significa que as composições foram manipuladas (*ou seja*, projetadas) em um modo que geralmente não ocorre na natureza. Um exemplo particular de um vetor AAV recombinante seria quando uma sequência de ácido nucleico que não está normalmente presente no genoma de AAV de tipo selvagem é inserida dentro do genoma de AAV. Embora o termo "recombinante" nem sempre seja usado aqui em referência a vetores AAV, bem como sequências, como ácidos

nucleicos, formas recombinantes incluindo polinucleotídeos, são expressamente incluídas apesar de qualquer omissão.

[0042] Um "vetor AAV recombinante" ou "rAAV" é derivado do genoma de tipo selvagem de AAV usando métodos moleculares para remover o genoma de tipo selvagem do genoma de AAV e substituindo por uma sequência de ácido nucleico não nativa, referida como um heterólogo ácido nucleico. Normalmente, para AAV, uma ou ambas as sequências de repetição terminal invertida (ITR) do genoma de AAV são retidas no vetor AAV. O rAAV é distinto de um genoma de AAV, uma vez que todo ou parte do genoma de AAV foi substituído por uma sequência não nativa (não AAV) em relação ao ácido nucleico genômico de AAV. A incorporação de uma sequência não nativa, portanto, define o vetor AAV como um vetor "recombinante", que pode ser referido como um "vetor rAAV".

[0043] Uma sequência de rAAV pode ser empacotada - referida neste documento como uma "partícula" - para infecção subsequente (transdução) de uma célula, *ex vivo*, *in vitro* ou *in vivo*. Quando uma sequência de vetor AAV recombinante é encapsidada ou empacotada em uma partícula AAV, a partícula também pode ser referida como um "vetor rAAV" ou "partícula rAAV". Essas partículas de rAAV incluem proteínas que encapsidam ou empacotam o genoma do vetor e, no caso de AAV, são referidas como proteínas do capsídeo.

[0044] Um "genoma de vetor" ou convenientemente abreviado como "vg" refere-se à porção da sequência do plasmídeo recombinante que é finalmente empacotada ou encapsidada para formar uma partícula viral (*por exemplo*, rAAV). Nos casos em que plasmídeos recombinantes são usados para construir ou fabricar vetores recombinantes, o genoma do vetor não inclui a porção do "plasmídeo" que não corresponde à sequência do genoma do vetor do plasmídeo recombinante. Esta porção do genoma não vetorial do plasmídeo recombinante pode ser referida como a "estrutura do plasmídeo", que é importante para a clonagem e amplificação do plasmídeo, um processo

que é necessário para a propagação e produção do vírus recombinante, mas não é empacotado ou encapsidado em partículas de vírus (*por exemplo*, AAV). Assim, um "genoma de vetor" se refere ao ácido nucleico que é empacotado ou encapsidado por vírus (*por exemplo*, AAV).

[0045] Conforme usado neste documento, o termo "sorotipo" em referência a um vetor AAV significa um capsídeo que é sorologicamente distinto de outros sorotipos de AAV. A distinção sorológica é determinada com base na falta de reatividade cruzada entre anticorpos para um AAV em comparação com outro AAV. As diferenças de reatividade cruzada são geralmente devido a diferenças nas sequências da proteína do capsídeo/determinantes antigênicos (*por exemplo*, devido às diferenças de sequência VP1, VP2 e/ou VP3 dos sorotipos de AAV).

[0046] De acordo com a definição tradicional, um sorotipo significa que o vírus de interesse foi testado contra soro específico para todos os sorotipos existentes e caracterizados para atividade neutralizante e nenhum anticorpo foi encontrado para neutralizar o vírus de interesse. À medida que mais isolados de vírus de ocorrência natural são descobertos e/ou mutantes de capsídeo gerados, pode haver ou não diferenças sorológicas com qualquer um dos sorotipos atualmente existentes. Assim, nos casos em que o novo vírus (*por exemplo*, AAV) não tem diferença sorológica, esse novo vírus (*por exemplo*, AAV) seria um subgrupo ou variante do sorotipo correspondente. Em muitos casos, o teste de sorologia para atividade neutralizante ainda precisa ser realizado em vírus mutantes com modificações na sequência do capsídeo para determinar se eles são de outro sorotipo de acordo com a definição tradicional de sorotipo. Consequentemente, por uma questão de conveniência e para evitar a repetição, o termo "sorotipo" refere-se amplamente a vírus sorologicamente distintos (*por exemplo*, AAV), bem como vírus (*por exemplo*, AAV) que não são sorologicamente distintos que podem estar dentro de um subgrupo ou uma variante de um determinado sorotipo.

[0047] Os vetores/partículas de rAAV incluem qualquer cepa ou

sorotipo viral. Por exemplo e sem limitação, um genoma de vetor rAAV ou partícula (capsídeo, como VP1, VP2 e/ou VP3) pode ser baseado em qualquer sorotipo de AAV, como AAV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -rh74, -rh10 ou AAV-2i8, por exemplo. Esses vetores/partículas de rAAV podem ser baseados na mesma cepa ou sorotipo (ou subgrupo ou variante) ou ser diferentes uns dos outros. Por exemplo e sem limitação, um genoma de vetor de rAAV ou partícula (capsídeo) com base em um genoma de sorotipo pode ser idêntico a uma ou mais das proteínas de capsídeo que empacotam o vetor. Além disso, um genoma de vetor rAAV pode ser baseado em um genoma de sorotipo AAV distinto de uma ou mais das proteínas do capsídeo que empacotam o genoma do vetor, caso em que pelo menos uma das três proteínas do capsídeo poderia ser um sorotipo diferente de AAV, *por exemplo*, AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, -rh74, -rh10, AAV-2i8, SPK1 (SEQ ID NO:1), SPK2 (SEQ ID NO:2), ou sua variante, por exemplo. Mais especificamente, um genoma de vetor rAAV2 pode compreender AAV2 ITRs, mas capsídeos de um sorotipo diferente, como AAV1, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, -rh74, -rh10, AAV-2i8, SPK1 (SEQ ID NO:1), SPK2 (SEQ ID NO:2) ou variante dos mesmos, por exemplo. Consequentemente, os vetores de rAAV incluem sequências de gene/proteína idênticas às sequências de gene/proteína características de um determinado sorotipo, bem como sorotipos "mistos", que também podem ser referidos como "pseudótipos".

[0048] Em certas modalidades, um vetor rAAV inclui ou consiste em uma sequência de capsídeo de pelo menos 70% ou mais (*por exemplo*, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, etc.) idênticos a um ou mais AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, -rh74, -rh10, AAV-2i8, SPK1 (SEQ ID NO:1), ou SPK2 (SEQ ID NO:2) proteínas do capsídeo (sequências VP1, VP2 e/ou VP3). Em certas modalidades, um vetor rAAV inclui ou consiste em uma sequência de

pelo menos 70% ou mais (*por exemplo*, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, etc.) idêntico a um ou mais AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, -rh74 ou -rh10 ITR(s).

[0049] Em certas modalidades, os vetores/partículas de rAAV incluem variantes de AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 e AAV-2i8 dos mesmos (*por exemplo*, variantes de ITR e capsídeo, tais como inserções, adições, substituições e deleções de aminoácidos), por exemplo, conforme estabelecido em WO 2013/158879 (Pedido Internacional PCT/US2013/037170), WO 2015/013313 (Pedido Internacional PCT/US2014/047670) e US 2013/0059732 (Pedido dos EUA de nº 13/594.773).

[0050] Partículas de rAAV, como AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, -rh74, -rh10, AAV-2i8, SPK1 (SEQ ID NO:1), SPK2 (SEQ ID NO:2) e variantes, híbridos e sequências quiméricas podem ser construídas usando técnicas recombinantes que são conhecidas por um técnico no assunto, para incluir uma ou mais sequências de polinucleotídeos heterólogas (transgenes) flanqueadas com uma ou mais sequências AAV ITR funcionais na extremidade 5' e/ou 3'. Os vetores rAAV tipicamente retêm pelo menos uma sequência(s) de flanqueamento funcional ITR, conforme necessário para o resgate, replicação e empacotamento do vetor recombinante em uma partícula de vetor rAAV. Um genoma de vetor rAAV incluiria, portanto, sequências necessárias em cis para replicação e empacotamento (*por exemplo*, sequências ITR funcionais).

[0051] As células hospedeiras para a produção de partículas de AAV recombinantes incluem, mas não estão limitadas a microorganismos, células de levedura, células de inseto e células de mamíferos que podem ser, ou foram, usadas como recipientes de vetores de rAAV heterólogos. Podem ser utilizadas células da linha celular humana estável, HEK293 (prontamente disponível através, *por exemplo*, da American Type Culture Collection sob o

número de acesso ATCC CRL1573). Em certas modalidades, uma linha celular de rim embrionário humano modificado (*por exemplo*, HEK293), que é transformada com fragmentos de DNA de adenovírus tipo 5 e expressa os genes adenovirais E1a e E1b, é usada para gerar partículas AAV recombinantes. A linha de células HEK293 modificada é prontamente transfectada e fornece uma plataforma particularmente conveniente para a produção de partículas de rAAV. Outras linhas de células hospedeiras apropriadas para a produção de AAV recombinante são descritas no Pedido Internacional PCT/2017/024951.

[0052] Em certas modalidades, as funções auxiliares de AAV são introduzidas na célula hospedeira por transfecção da célula hospedeira com um construto auxiliar de AAV antes ou simultaneamente com a transfecção de um vetor de expressão de AAV. Os construtos auxiliares de AAV são, portanto, às vezes usados para fornecer pelo menos expressão transitória de genes rep e/ou cap de AAV para complementar as funções de AAV ausentes necessárias para a transdução de AAV produtiva. Os construtos auxiliares de AAV geralmente não possuem AAV ITRs e não podem se replicar nem empacotar. Estes construtos podem estar na forma de um plasmídeo, fago, transposon, cosmídeo, vírus ou virião. Uma série de construtos auxiliares de AAV foi descrita, tais como os plasmídeos comumente usados pAAV/Ad e pIM29 + 45 que codificam produtos de expressão Rep e Cap. São conhecidos vários outros vetores que codificam produtos de expressão Rep e/ou Cap.

[0053] Os métodos de geração de vetores/partículas AAV recombinantes capazes de transduzir células de mamíferos são conhecidos na técnica. Por exemplo, vetores/partículas AAV recombinantes podem ser produzidos como descrito na Patente dos EUA nº 9.408.904; e Pedidos Internacionais PCT/US2017/025396 e PCT/US2016/064414.

[0054] Os termos "ácido nucleico" e "polinucleotídeo" são usados de forma intercambiável neste documento para referirem-se a todas as formas de ácido nucleico, oligonucleotídeos, incluindo ácido desoxirribonucleico (DNA)

e ácido ribonucleico (RNA). Os ácidos nucleicos incluem DNA genômico, cDNA e DNA antissenso, e mRNA emendado (spliced) ou não, tRNA rRNA e DNA ou RNA inibitório (RNAi, *por exemplo*, RNA(sh) em gancho de cabelo curto ou pequeno, microRNA (miRNA), RNA(si) interferente pequeno ou curto, RNA de trans-splicing ou RNA antissenso. Os ácidos nucleicos incluem polinucleotídeos de ocorrência natural, sintéticos e intencionalmente modificados ou alterados (*por exemplo*, ácido nucleico variante).

[0055] Os ácidos nucleicos, como o genoma do vetor, cDNA, DNA genômico, RNA e fragmentos dos mesmos, podem ser simples, duplos ou triplex, lineares ou circulares e podem ter qualquer comprimento. Ao discutir os ácidos nucleicos, uma sequência ou estrutura de um ácido nucleico particular pode ser descrita neste documento de acordo com a convenção de fornecer a sequência na direção 5' para 3'.

[0056] Um "transgene" é usado neste documento para se referir convenientemente a um ácido nucleico heterólogo que se destina ou foi introduzido em uma célula ou organismo. Os transgenes incluem qualquer ácido nucleico heterólogo, como um ácido nucleico que codifica TPP1.

[0057] O termo "transduzir" e suas variações gramaticais referem-se à introdução de uma molécula, como um vetor rAAV, em uma célula ou organismo hospedeiro. O ácido nucleico/transgene heterólogo pode ou não ser integrado ao ácido nucleico genômico da célula receptora. O ácido nucleico heterólogo introduzido também pode existir na célula receptora ou organismo hospedeiro extracromossomicamente, ou apenas transitoriamente.

[0058] Uma "célula transduzida" é uma célula na qual o transgene foi introduzido. Consequentemente, uma célula "transduzida" (*por exemplo*, em um mamífero, como uma célula ou tecido ou célula de órgão), significa uma mudança genética em uma célula após a incorporação, por exemplo, de um ácido nucleico (*por exemplo*, um transgene) na célula. Assim, uma célula "transduzida" é uma célula, ou uma progênie da mesma, na qual um ácido nucleico exógeno (*por exemplo*, ácido nucleico que codifica TPP1) foi

introduzido. A(s) célula(s) podem ser propagadas e a proteína introduzida expressa. Para usos e métodos de terapia genética, uma célula transduzida pode estar em um indivíduo, como um mamífero, um primata ou um ser humano.

[0059] Um "elemento de controle de expressão" refere-se a sequência(s) de ácido nucleico que influenciam a expressão de um ácido nucleico operacionalmente ligado. Os elementos de controle de expressão, conforme estabelecido neste documento, incluem promotores e intensificadores. Sequências de vetor, incluindo vetores AAV, podem incluir um ou mais "elementos de controle de expressão". Normalmente, tais elementos são incluídos para facilitar a transcrição de polinucleotídeo heterólogo adequado e, conforme a tradução apropriada (*por exemplo*, um promotor, intensificador, sinal de splicing para íntrons, manutenção da fase de leitura correta do gene para permitir a tradução em fase do mRNA e, códons de parada, etc.). Tais elementos normalmente agem em cis, referido como um elemento de "ação cis", mas também podem agir em trans.

[0060] O controle de expressão pode ser efetuado no nível de transcrição, tradução, splicing, estabilidade de mensagem, etc. Normalmente, um elemento de controle de expressão que modula a transcrição é justaposto perto da extremidade 5' (*ou seja*, "a montante") de um ácido nucleico transcrito. Os elementos de controle de expressão também podem estar localizados na extremidade 3' (*ou seja*, "a jusante") da sequência transcrita ou dentro do transcrito (*por exemplo*, em um íntron). Os elementos de controle de expressão podem estar localizados adjacentes ou a uma distância da sequência transcrita (*por exemplo*, 1-10, 10-25, 25-50, 50-100, 100 a 500 ou mais nucleotídeos do polinucleotídeo), mesmo em distâncias consideráveis. No entanto, devido às limitações de comprimento dos vetores AAV, os elementos de controle de expressão estarão tipicamente dentro de 1 a 1000 nucleotídeos do local de início da transcrição do ácido nucleico heterólogo.

[0061] Funcionalmente, a expressão de ácido nucleico

operacionalmente ligado é pelo menos em parte controlável pelo elemento (*por exemplo*, promotor) de tal modo que o elemento modula a transcrição do ácido nucleico e, conforme apropriado, a tradução do transcrito. Um exemplo específico de um elemento de controle de expressão é um promotor, que geralmente está localizado a 5' da sequência de ácido nucleico transcrita. Um promotor normalmente aumenta uma quantidade expressa a partir de ácido nucleico operacionalmente ligado em comparação com uma quantidade expressa quando não existe promotor.

[0062] Um "intensificador", conforme usado neste documento, pode referir-se a uma sequência que está localizada adjacente ao ácido nucleico heterólogo. Elementos intensificadores estão normalmente localizados a montante de um elemento promotor, mas também funcionam e podem estar localizados a jusante de ou dentro de uma sequência. Assim, um elemento intensificador pode estar localizado em 10 – 50 pares de bases, 50 – 100 pares de bases, 100 – 200 pares de bases ou 200 – 300 pares de bases ou mais pares de bases a montante ou a jusante de uma sequência de ácido nucleico heterólogo. Elementos intensificadores normalmente aumentam a expressão de um ácido nucleico operacionalmente ligado acima da expressão proporcionada por um elemento promotor.

[0063] Uma construto de expressão ou cassete pode compreender elementos reguladores que servem para dirigir a expressão em uma célula ou tipo de tecido particular. Os elementos de controle de expressão (*por exemplo*, promotores) incluem aqueles ativos em um determinado tecido ou tipo de célula, referidos neste documento como "promotores/elementos de controle de expressão específicos de tecido". Elementos de controle de expressão de tecido específico são tipicamente ativos em células ou tecidos específicos (*por exemplo*, fígado). Os elementos de controle de expressão são tipicamente ativos em células, tecidos ou órgãos específicos porque são reconhecidos por proteínas ativadoras da transcrição, ou outros reguladores da transcrição, que são únicos para uma célula, tecido ou tipo de órgão específico.

Esses elementos reguladores são conhecidos pelos técnicos no assunto (ver, *por exemplo*, Sambrook *et al.* (1989) e Ausubel *et al.* (1992)).

[0064] Os elementos de controle de expressão também incluem promotores/intensificadores ubíquos ou promíscuos que são capazes de dirigir a expressão de um polinucleotídeo em muitos tipos de células diferentes. Tais elementos incluem, mas não estão limitados às sequências promotoras/intensificadoras iniciais imediatas do citomegalovírus (CMV), as sequências promotoras/intensificadoras do vírus do sarcoma de Rous (RSV) e os outros promotores/intensificadores virais ativos em uma variedade de tipos de células de mamíferos, ou sintéticos elementos que não estão presentes na natureza (*ver, por exemplo*, Boshart *et al.*, *Cell*, 41:521-530 (1985)), o promotor SV40, o promotor di-hidrofolato redutase, o promotor citoplasmático  $\beta$ -actina e o promotor fosfoglicerol quinase (PGK).

[0065] Elementos de controle de expressão também podem conferir expressão de uma maneira que é regulável, isto é, um sinal ou estímulo aumenta ou diminui a expressão do polinucleotídeo heterólogo operacionalmente ligado. Um elemento regulável que aumenta a expressão do polinucleotídeo operacionalmente ligado em resposta a um sinal ou estímulo também é referido como um "elemento induzível" (*ou seja*, é induzido por um sinal). Exemplos particulares incluem, mas não estão limitados a, um promotor induzível por hormônio (*por exemplo*, esteroide). Normalmente, a quantidade de aumento ou diminuição conferida por tais elementos é proporcional à quantidade de sinal ou estímulo presente; quanto maior for a quantidade de sinal ou estímulo, maior será o aumento ou diminuição na expressão. Elementos de controle de expressão regulável incluem, por exemplo e sem limitação, o promotor de metalotionina de ovelha induzível por zinco (MT); o promotor do vírus do tumor mamário de camundongo induzível por hormônio esteroide (MMTV); o sistema promotor da polimerase T7 (WO 98/10088); o sistema represável por tetraciclino (Gossen, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)); o sistema induzível por tetraciclino (Gossen, *et al.*,

*Science*. 268:1766-1769 (1995); ver também Harvey, *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:512-518 (1998)); o sistema induzível por RU486 (Wang, *et al.*, *Nat. Biotech.* 15:239-243 (1997) e Wang, *et al.*, *Gene Ther.* 4:432-441 (1997)]; e o sistema induzível por rapamicina (Magari, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 100:2865-2872 (1997); Rivera, *et al.*, *Nat. Medicine.* 2:1028-1032 (1996)). Outros elementos de controle reguláveis que podem ser usados na invenção são aqueles que são regulados por um estado fisiológico específico, *por exemplo*, temperatura, fase aguda, desenvolvimento.

[0066] Os elementos de controle de expressão também incluem o(s) elemento(s) nativo(s) para o polinucleotídeo heterólogo. Um elemento de controle nativo (*por exemplo*, promotor) pode ser usado na invenção quando se deseja que a expressão do polinucleotídeo heterólogo imite a expressão nativa. O elemento nativo pode ser usado na invenção quando a expressão do polinucleotídeo heterólogo é para ser regulada temporalmente ou de desenvolvimento, ou de uma maneira específica de tecido, ou em resposta a estímulos transcricionais específicos. Outros elementos de controle de expressão nativa, tais como íntrons, locais de poliadenilação ou sequências de consenso Kozak também podem ser usados.

[0067] O termo "operacionalmente ligado" significa que as sequências regulatórias necessárias para a expressão de uma sequência de ácido nucleico são colocadas nas posições apropriadas em relação à sequência de modo a efetuar a expressão da sequência de ácido nucleico. Esta mesma definição é algumas vezes aplicada ao arranjo de sequências de ácido nucleico e elementos de controle de transcrição (*por exemplo*, promotores, intensificadores e elementos de terminação) em um vetor de expressão, *por exemplo*, vetor rAAV.

[0068] No exemplo de um elemento de controle de expressão em ligação operável com um ácido nucleico, a relação é tal que o elemento de controle modula a expressão do ácido nucleico. Mais especificamente, *por exemplo* e sem limitação, duas sequências de DNA operativamente ligadas

significam que os dois DNAs estão dispostos (cis ou trans) em tal relação que pelo menos uma das sequências de DNA é capaz de exercer um efeito fisiológico sobre a outra sequência.

[0069] Consequentemente, elementos adicionais para vetores incluem, sem limitação, um elemento de controle de expressão (*por exemplo*, promotor/intensificador), um sinal de terminação de transcrição ou códon de terminação, regiões não traduzidas 5' ou 3' (*por exemplo*, sequências de poliadenilação (poliA)) que flanqueiam uma sequência, tal como uma ou mais cópias de uma sequência AAV ITR ou um íntron.

[0070] Outros elementos incluem, por exemplo e sem limitação, sequências de polinucleotídeos de enchimento ou recheio, por exemplo, para melhorar o empacotamento e reduzir a presença de ácido nucleico contaminante. Os vetores de AAV normalmente aceitam inserções de DNA tendo uma faixa de tamanho que é geralmente de cerca de 4 kb a cerca de 5,2 kb, ou ligeiramente mais. Assim, para sequências mais curtas, inclusão de um recheio ou enchimento para ajustar o comprimento para próximo ou no tamanho normal da sequência genômica do vírus aceitável para o empacotamento do vetor AAV na partícula do vírus. Em certas modalidades, uma sequência de ácido nucleico de enchimento/recheio é um segmento não traduzido (não codificado por proteína) de ácido nucleico. Para uma sequência de ácido nucleico inferior a 4,7 Kb, a sequência de polinucleotídeos de enchimento ou recheio tem um comprimento, que quando combinado (*por exemplo*, inserido em um vetor) com a sequência, tem um comprimento total entre cerca de 3,0-5,5 Kb, ou entre cerca de 4,0-5,0 Kb, ou entre cerca de 4,3-4,8 Kb.

[0071] O termo "isolado", quando usado como um modificador de uma composição, significa que as composições são feitas pela mão do homem ou são separadas, completamente ou pelo menos em parte, de seu ambiente *in vivo* de ocorrência natural. Geralmente, as composições isoladas são substancialmente isentas de um ou mais materiais com os quais normalmente

se associam na natureza, por exemplo e sem limitação, uma ou mais proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos, membrana celular.

[0072] O termo "isolado" não exclui combinações produzidas manualmente pelo homem, por exemplo e sem limitação, uma sequência de rAAV ou partícula de rAAV que empacota ou encapsula um genoma de vetor AAV e uma formulação farmacêutica. O termo "isolado" também não exclui formas físicas alternativas da composição, tais como híbridos/quimeras, multímeros/oligômeros, modificações (*por exemplo*, fosforilação, glicosilação, lipidação) ou formas derivatizadas, ou formas expressas em células hospedeiras produzidas manualmente pelo homem.

[0073] O termo "substancialmente puro" refere-se a uma preparação compreendendo pelo menos 50-60% em peso do composto de interesse (*por exemplo*, ácido nucleico, oligonucleotídeo, proteína, etc.). A preparação pode compreender pelo menos 75% em peso, ou pelo menos 85% em peso, ou cerca de 90-99% em peso, do composto de interesse. A pureza é medida por métodos apropriados para o composto de interesse (por exemplo, métodos cromatográficos, eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, análise por HPLC e similares).

[0074] A frase "consistindo essencialmente em", quando refere-se a uma sequência de nucleotídeos ou sequência de aminoácidos particular, significa uma sequência tendo as propriedades de uma determinada SEQ ID NO. Por exemplo e sem limitação, quando usada em referência a uma sequência de aminoácidos, a frase inclui a sequência per se e modificações moleculares que não afetariam as características básicas e novas da sequência.

[0075] Ácidos nucleicos, vetores de expressão (*por exemplo*, genomas de vetor AAV), plasmídeos, incluindo ácidos nucleicos que codificam TPP1 podem ser preparados usando métodos de tecnologia de DNA recombinante. A disponibilidade da informação da sequência de nucleotídeos permite a preparação de moléculas de ácido nucleico isoladas da invenção por

uma variedade de meios. Os ácidos nucleicos que codificam TPP1 podem ser feitos usando várias técnicas de clonagem padrão, tecnologia de DNA recombinante, via expressão celular ou tradução *in vitro* e técnicas de síntese química. A pureza dos polinucleotídeos pode ser determinada por meio de sequenciamento, eletroforese em gel e similares. Por exemplo, e sem limitação, os ácidos nucleicos podem ser isolados usando hibridização ou técnicas de triagem de banco de dados baseadas em computador. Tais técnicas incluem, mas não estão limitadas a: (1) hibridização de DNA genômico ou bibliotecas de cDNA com sondas para detectar sequências de nucleotídeos homólogas; (2) triagem de anticorpos para detectar polipeptídeos com características estruturais compartilhadas, por exemplo e sem limitação, usando uma biblioteca de expressão; (3) reação em cadeia da polimerase (PCR) em DNA genômico ou cDNA usando iniciadores capazes de emparelhar a uma sequência de ácido nucleico de interesse; (4) pesquisas de computador em bancos de dados de sequência para sequências relacionadas; e (5) triagem diferencial de uma biblioteca de ácido nucleico subtraída.

[0076] Os ácidos nucleicos podem ser mantidos como DNA em qualquer vetor de clonagem conveniente. Em certas modalidades, os clones são mantidos em um vetor de clonagem/expressão de plasmídeo, tal como pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), que é propagado em uma célula hospedeira de *E. coli* adequada. Alternativamente, os ácidos nucleicos podem ser mantidos em vetores adequados para expressão em células de mamíferos, por exemplo e sem limitação, um vetor AAV. Nos casos em que a modificação pós-tradução afeta a função da proteína, a molécula de ácido nucleico pode ser expressa em células de mamíferos.

[0077] Em certas modalidades, os vetores de rAAV podem compreender opcionalmente elementos reguladores necessários para a expressão do ácido nucleico heterólogo em uma célula posicionada de modo a permitir a expressão da proteína codificada na célula hospedeira. Esses elementos reguladores requeridos para a expressão incluem, mas não estão

limitados a, sequências promotoras, sequências intensificadoras e sequências de iniciação da transcrição conforme estabelecido neste documento e conhecido pelo técnico no assunto.

[0078] Métodos e usos da invenção incluem a entrega (transdução) de ácido nucleico (transgene) em células hospedeiras, incluindo células em divisão e/ou não divisão. Os ácidos nucleicos, vetor de rAAV, métodos, usos e formulações farmacêuticas da invenção são adicionalmente úteis em um método de entrega, administração ou fornecimento de sequência codificada por ácido nucleico heterólogo a um indivíduo em necessidade, como um método de tratamento. Desta forma, o ácido nucleico é transcrito e uma proteína produzida *in vivo* em um indivíduo. O indivíduo pode se beneficiar ou precisar da proteína porque o indivíduo tem uma deficiência da proteína, ou porque a produção da proteína no indivíduo pode conferir algum efeito terapêutico, como um método de tratamento ou de outra forma.

[0079] A invenção é útil em animais, incluindo aplicações médicas humanas e veterinárias. Os indivíduos adequados incluem, portanto, mamíferos, tais como humanos, bem como mamíferos não humanos. O termo "indivíduo" se refere a um animal, normalmente um mamífero, como humanos, primatas não humanos (macacos, gibões, gorilas, chimpanzés, orangotangos, macacos), um animal doméstico (cães e gatos) e animais experimentais (camundongos, rato, coelho, porquinho-da-índia). Os indivíduos humanos incluem indivíduos fetais, neonatais, infantis, juvenis e jovens adultos. Os indivíduos incluem modelos de doenças animais, por exemplo e sem limitação, camundongos e outros modelos animais de deficiências de proteína/enzima, como CLN2.

[0080] Os indivíduos apropriados para o tratamento de acordo com a invenção incluem aqueles que têm ou estão em risco de ter uma deficiência ou insuficiência de TPP1, ou produzir um TPP1 aberrante, parcialmente funcional ou não funcional. Os indivíduos podem ser testados quanto à expressão e/ou atividade de TPP1 para determinar se tais indivíduos

são apropriados para o tratamento de acordo com os métodos da invenção. Os indivíduos também podem ser testados quanto à mutação no ácido nucleico endógeno que codifica TPP1. Certas mutações genéticas são conhecidas por reduzir ou destruir a atividade da TPP1. Os indivíduos apropriados para o tratamento de acordo com a invenção também incluem aqueles indivíduos que se beneficiariam de TPP1. Os indivíduos tratados podem ser monitorados após o tratamento periodicamente, *por exemplo*, a cada 1-4 semanas, 1-6 meses, 6-12 meses, ou 1, 2, 3, 4, 5 ou mais anos.

[0081] Os ensaios para detectar e/ou medir a atividade de TPP1 são conhecidos na técnica, incluindo ensaios descritos em Liu *et al.*, 2017, Clin. Chem., 63: 1118-1126, doi: 10.1373/clinchem.2016.269167 e Barcenas *et al.*, 2014, Anal. Chem., 87: 7962–7968.

[0082] Os indivíduos podem ser testados para uma resposta imune, *por exemplo*, anticorpos contra AAV. Os candidatos podem, portanto, ser rastreados antes do tratamento de acordo com um método da invenção. Os indivíduos também podem ser testados para anticorpos contra AAV após o tratamento e, opcionalmente, monitorados por um período de tempo após o tratamento. Os indivíduos que desenvolvem anticorpos AAV podem ser tratados com um agente imunossupressor ou outro regime conforme estabelecido neste documento.

[0083] Os indivíduos apropriados para o tratamento de acordo com a invenção também incluem aqueles que têm ou estão em risco de produzir anticorpos contra AAV (anticorpos anti-AAV). Os vetores rAAV podem ser administrados ou entregues a tais indivíduos usando várias técnicas. Por exemplo, e sem limitação, o capsídeo vazio de AAV (*isto é*, AAV sem genoma de vetor) pode ser distribuído para se ligar aos anticorpos anti-AAV no indivíduo, permitindo assim que o vetor rAAV compreendendo o ácido nucleico heterólogo para transduzir células do indivíduo.

[0084] Conforme estabelecido aqui, rAAV são úteis como vetores de terapia genética, pois podem penetrar nas células e introduzir ácido

nucleico/material genético nas células. Como os AAV não estão associados a doenças patogênicas em humanos, os vetores de rAAV são capazes de distribuir sequências de polinucleotídeos heterólogas (*por exemplo*, proteínas e agentes terapêuticos) a pacientes humanos sem causar patogênese ou doença substancial de AAV.

[0085] Os vetores rAAV possuem uma série de características desejáveis para tais aplicações, incluindo tropismo para células em divisão e não divisão. A experiência clínica inicial com esses vetores também não demonstrou toxicidade sustentada e as respostas imunes são tipicamente mínimas ou indetectáveis. Os AAV são conhecidos por infectar uma ampla variedade de tipos de células *in vivo* por endocitose mediada por receptor ou por transcitose. Esses sistemas de vetores foram testados em humanos visando muitos tecidos, como sistema nervoso central, cérebro, epitélio retinal, fígado, músculo esquelético, vias aéreas, articulações e células-tronco hematopoiéticas.

[0086] Pode ser desejável introduzir um vetor rAAV que pode fornecer, por exemplo e sem limitação, múltiplas cópias de TPP1 e, portanto, maiores quantidades de proteína TPP1. Os vetores e métodos de rAAV aprimorados para a produção desses vetores foram descritos em detalhes em uma série de referências, patentes e pedidos de patentes, incluindo: Wright J.F. (Hum Gene Ther 20: 698-706, 2009).

[0087] Os vetores de rAAV podem ser administrados a um paciente por meio de infusão em um transportador biologicamente compatível, por exemplo e sem limitação, por meio de injeção intracraniana. Os vetores de rAAV podem ser administrados sozinhos ou em combinação com outras moléculas. Conseqüentemente, os vetores de rAAV e outras composições, agentes, fármacos, produtos biológicos (proteínas) podem ser incorporados em composições farmacêuticas. Tais composições farmacêuticas são úteis para, entre outras coisas, administração e liberação a um indivíduo *in vivo* ou *ex vivo*.

[0088] Em certas modalidades, as composições farmacêuticas

também contêm um transportador ou excipiente farmacêuticamente ou biologicamente aceitável. Tais excipientes incluem qualquer agente farmacêutico que por si só não induz uma resposta imune prejudicial ao indivíduo que recebe a composição e que pode ser administrado sem toxicidade indevida.

[0089] Conforme usado neste documento, o termo "farmacêuticamente aceitável" e "fisiologicamente aceitável" significa uma formulação biologicamente aceitável, gasosa, líquida ou sólida, ou uma mistura da mesma, que é adequada para uma ou mais vias de administração, liberação *in vivo* ou contato. Uma composição "farmacêuticamente aceitável" ou "fisiologicamente aceitável" é um material que não é biologicamente ou de outra forma indesejável, *por exemplo*, o material pode ser administrado a um indivíduo sem causar efeitos biológicos indesejáveis substanciais. Assim, tal composição farmacêutica pode ser usada na invenção, por exemplo, na administração de um ácido nucleico, vetor, partícula viral ou proteína a um indivíduo.

[0090] Excipientes farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, líquidos, tais como água, solução salina, glicerol, açúcares e etanol. Sais farmacêuticamente aceitáveis também podem ser incluídos nos mesmos, por exemplo e sem limitação, sais de ácidos minerais, tais como cloridratos, bromidratos, fosfatos, sulfatos e similares; e os sais de ácidos orgânicos, tais como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos e similares. Adicionalmente, substâncias auxiliares, tais como agentes umectantes ou emulsionantes, substâncias tampão de pH e similares, podem estar presentes em tais veículos.

[0091] A composição farmacêutica pode ser fornecida como um sal e pode ser formada com muitos ácidos, incluindo, mas não se limitando a, clorídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Os sais tendem a ser mais solúveis em solventes aquosos ou outros solventes protônicos do que as formas de base livre correspondentes. Em outros casos,

uma preparação pode ser um pó liofilizado que pode conter qualquer um ou todos os seguintes: 1-50 mM de histidina, 0,1% -2% de sacarose e 2-7% de manitol, em uma faixa de pH de 4.5 a 5,5, que é combinado com o buffer antes do uso.

[0092] As composições farmacêuticas podem ser formuladas para serem compatíveis com uma via particular de administração ou liberação, conforme estabelecido neste documento ou conhecido por um técnico no assunto. Assim, as composições farmacêuticas incluem transportadores, diluentes ou excipientes adequados para administração por várias vias.

[0093] As composições adequadas para administração parentérica compreendem soluções, suspensões ou emulsões aquosas e não aquosas do composto ativo, cujas preparações são normalmente estéreis e podem ser isotônicas com o sangue do destinatário pretendido. As composições compreendem, por exemplo e sem limitação, água, solução salina tamponada, solução de Hanks, solução de Ringer, dextrose, frutose, etanol, óleos animais, vegetais ou sintéticos. As suspensões aquosas para injeção podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol ou dextrano.

[0094] Além disso, as suspensões dos compostos ativos podem ser preparadas como suspensões de injeção de óleo apropriadas. Os solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos graxos, tais como óleo de gergelim, ou ésteres de ácidos graxos sintéticos, como oleato de etila ou triglicerídeos, ou lipossomas. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizadores ou agentes adequados que aumentam a solubilidade dos compostos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

[0095] Cossolventes e adjuvantes podem ser adicionados à formulação. Os co-solventes podem conter grupos hidroxila ou outros grupos polares, por exemplo e sem limitação, álcoois, tais como álcool isopropílico; glicóis, tais como propilenoglicol, polietilenoglicol, polipropilenoglicol, éter de glicol; glicerol; álcoois de polioxietileno e ésteres de ácidos graxos de

polioxietileno. Os adjuvantes incluem, por exemplo e sem limitação, surfactantes, tais como lecitina de soja e ácido oleico; ésteres de sorbitano, tais como trioleato de sorbitano; e polivinilpirrolidona.

[0096] Após as composições farmacêuticas terem sido preparadas, elas podem ser colocadas em um recipiente apropriado e rotuladas para tratamento. Tal rótulo pode incluir quantidade, frequência e método de administração.

[0097] As composições farmacêuticas e sistemas de liberação apropriados para as composições, métodos e usos da invenção são conhecidos na técnica (*vide, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (2003) 20<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA. Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12<sup>a</sup> ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel e Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001) 11<sup>a</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; e Poznansky *et al.*, Drug Delivery Systems (1980), R. L. Juliano, ed., Oxford, N. Y., pp. 253-315).

[0098] Uma "quantidade eficaz" ou "quantidade suficiente" refere-se a uma quantidade que fornece, em doses únicas ou múltiplas, sozinhas ou em combinação, com uma ou mais outras composições (agentes terapêuticos ou imunossuppressores, tais como um fármaco), tratamentos, protocolos, ou agentes de regimes terapêuticos, uma resposta detectável de qualquer duração de tempo (longo ou curto prazo), um resultado esperado ou desejado ou um benefício para um indivíduo de qualquer grau mensurável ou detectável ou por qualquer duração de tempo (*por exemplo*, por minutos, horas, dias, meses, anos ou curado).

[0099] As doses podem variar e dependem do tipo, início, progressão, gravidade, frequência, duração ou probabilidade da doença para a qual o tratamento é direcionado, o desfecho clínico desejado, tratamentos

anteriores ou simultâneos, saúde geral, idade, sexo, raça ou competência imunológica do indivíduo e outros fatores que serão apreciados pelo técnico no assunto. A quantidade, número, frequência ou duração da dose pode ser proporcionalmente aumentada ou reduzida, conforme indicado por quaisquer efeitos colaterais adversos, complicações ou outros fatores de risco do tratamento ou terapia e o estado do indivíduo. O técnico no assunto apreciará os fatores que podem influenciar a dosagem e o tempo necessário para fornecer uma quantidade suficiente para fornecer um benefício terapêutico ou profilático.

[0100] A dose para atingir um efeito terapêutico, *por exemplo*, a dose em genomas de vetor por quilograma de peso corporal (vg/kg) do indivíduo ou paciente, ou a dose em genomas de vetor por cérebro (vg/cérebro) do indivíduo ou paciente, ou a dose em genomas de vetor entregues ao SNC (vg/SNC) do indivíduo ou paciente, irá variar com base em vários fatores, incluindo, mas não se limitando a: via de administração, o nível de expressão de polinucleotídeo heterólogo necessário para atingir um efeito terapêutico, a doença específica tratada, qualquer resposta imune do hospedeiro ao vetor viral, uma resposta imune do hospedeiro ao polinucleotídeo heterólogo ou produto de expressão (proteína) e a estabilidade da proteína expressa.

[0101] Geralmente, as doses serão maiores do que cerca de  $1,5 \times 10^{13}$  de genomas de vetor AAV recombinante. Por exemplo, uma dose de cerca de  $5 \times 10^{13}$  de genomas de vetor AAV recombinante ou superior a cerca de  $5 \times 10^{13}$  de genomas de vetor AAV recombinante; uma dose de cerca de  $1 \times 10^{14}$  de genomas de vetor AAV recombinante ou superior a cerca de  $1 \times 10^{14}$  de genomas de vetor AAV recombinante; uma dose de cerca de  $5 \times 10^{14}$  de genomas de vetor AAV recombinante ou superior a cerca de  $5 \times 10^{14}$  genomas de vetor AAV recombinante; uma dose de cerca de  $1 \times 10^{15}$  genomas de vetor AAV recombinante ou superior a cerca de  $1 \times 10^{15}$  genomas de vetor AAV recombinante; e uma dose de cerca de  $5 \times 10^{15}$  genomas de vetor AAV recombinante ou superior a cerca de  $5 \times 10^{15}$  genomas de vetor AAV

recombinante.

[0102] Em certas modalidades, os genomas do vetor AAV recombinante são administrados em uma faixa de dosagem de cerca de  $1,5 \times 10^{13}$  a cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas do vetor AAV recombinante; uma faixa de dosagem de cerca de  $1 \times 10^{14}$  a cerca de  $3 \times 10^{15}$  de genomas de vetor AAV recombinante; uma faixa de dosagem de cerca de  $2 \times 10^{14}$  a cerca de  $2 \times 10^{15}$  de genomas de vetor AAV recombinante; uma faixa de dosagem de cerca de  $2,5 \times 10^{14}$  a cerca de  $7,5 \times 10^{14}$  de genomas de vetor AAV recombinante; uma faixa de dosagem de cerca de  $5 \times 10^{14}$  a cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor AAV recombinante; e uma faixa de dosagem de cerca de  $1 \times 10^{15}$  a cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor AAV recombinante.

[0103] Em certas modalidades, os genomas de vetor de rAAV são administrados em uma dose de cerca de  $1 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, administrados em uma dose de cerca de  $2 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, administrados em uma dose de cerca de  $3 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, administrados em uma dose de cerca de  $4 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, administrados em uma dose de cerca de  $5 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, administrados em uma dose de cerca de  $6 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, administrados em uma dose de cerca de  $7 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, administrados em uma dose de cerca de  $8 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, administrados em uma dose de cerca de  $9 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, administrado a uma dose de cerca de  $1 \times 10^{15}$  de genomas de vetor, administrado a uma dose de cerca de  $2 \times 10^{15}$  de genomas de vetor, administrado a uma dose de cerca de  $3 \times 10^{15}$  de genomas de vetor, administrado a uma dose de cerca de  $4 \times 10^{15}$  de genomas de vetor, ou administrada com uma dose de cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor.

[0104] Em certas modalidades, as doses serão maiores do que cerca de  $1,5 \times 10^{13}$  rAAV vg/cérebro do indivíduo ou paciente. Por exemplo, uma dose de cerca de  $5 \times 10^{13}$  rAAV vg/cérebro ou superior a cerca de  $5 \times 10^{13}$  rAAV vg/cérebro; uma dose de cerca de  $1 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro ou superior a cerca

de  $1 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro; uma dose de cerca de  $5 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro ou superior a cerca de  $5 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro; uma dose de cerca de  $1 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro ou superior a cerca de  $1 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro; e uma dose de cerca de  $5 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro ou superior a cerca de  $5 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro.

[0105] Em certas modalidades, o rAAV vg é administrado a uma faixa de dosagem de cerca de  $1,5 \times 10^{13}$  a cerca de  $5 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro; uma faixa de dosagem de cerca de  $1 \times 10^{14}$  a cerca de  $3 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro; uma faixa de dosagem de cerca de  $2 \times 10^{14}$  a cerca de  $2 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro; uma faixa de dosagem de cerca de  $2,5 \times 10^{14}$  a cerca de  $7,5 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro; uma faixa de dosagem de cerca de  $5 \times 10^{14}$  a cerca de  $5 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro; e uma faixa de dosagem de cerca de  $1 \times 10^{15}$  a cerca de  $5 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro.

[0106] Em certas modalidades, o rAAV vg é administrado a uma dose de cerca de  $1 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro, administrado a uma dose de cerca de  $2 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro, administrado a uma dose de cerca de  $3 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro, administrado a uma dose de cerca de  $4 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro, administrado a uma dose de cerca de  $5 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro, administrado a uma dose de cerca de  $6 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro, administrado a uma dose de cerca de  $7 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro, administrado a uma dose de cerca de  $8 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro, administrado a uma dose de cerca de  $9 \times 10^{14}$  rAAV vg/cérebro, administrado a uma dose de cerca de  $1 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro, administrado a uma dose de cerca de  $2 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro, administrado a uma dose de cerca de  $3 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro, administrado a uma dose de cerca de  $4 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro, ou administrado a uma dose de cerca de  $5 \times 10^{15}$  rAAV vg/cérebro.

[0107] Uma "forma de dosagem unitária", tal como aqui utilizada, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para o indivíduo a ser tratado; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada opcionalmente em associação com um transportador

farmacêutico (excipiente, diluente, veículo ou agente de enchimento) que, quando administrado a uma ou mais doses, é calculado para produzir um efeito desejado (*por exemplo*, efeito profilático ou terapêutico). As formas de dosagem unitária podem estar dentro, por exemplo, de ampolas e frascos, que podem incluir uma composição líquida, ou uma composição em um estado seco por congelamento ou liofilizado; um transportador líquido estéril, por exemplo, pode ser adicionada antes da administração ou liberação *in vivo*. As formas de dosagem unitária individual podem ser incluídas em kits ou recipientes multi-dose. As partículas de rAAV e suas composições farmacêuticas podem ser embaladas em formas de dosagem unitária única ou múltipla para facilidade de administração e uniformidade de dosagem.

[0108] As doses de uma "quantidade eficaz" ou "quantidade suficiente" para o tratamento (*por exemplo*, para melhorar ou fornecer um benefício terapêutico ou melhora) normalmente são eficazes para fornecer uma resposta a um, vários ou todos os sintomas adversos, consequências ou complicações da doença, um ou mais sintomas adversos, distúrbios, doenças, patologias ou complicações, por exemplo, causados por ou associados à doença, em uma extensão mensurável, embora diminuir, reduzir, inibir, suprimir, limitar ou controlar a progressão ou agravamento da doença seja um resultado satisfatório.

[0109] Uma quantidade eficaz ou uma quantidade suficiente pode, mas não precisa ser fornecida em uma única administração, pode exigir múltiplas administrações e, pode, mas não precisa ser, administrada sozinha ou em combinação com outra composição (*por exemplo*, agente), tratamento, protocolo ou regime terapêutico. Por exemplo, a quantidade pode ser aumentada proporcionalmente conforme indicado pela necessidade do indivíduo, tipo, status e gravidade da doença tratada ou efeitos colaterais (se houver) do tratamento. Além disso, uma quantidade eficaz ou uma quantidade suficiente não precisa ser eficaz ou suficiente se dada em doses únicas ou múltiplas sem uma segunda composição (*por exemplo*, outro fármaco ou

agente), tratamento, protocolo ou regime terapêutico, uma vez que doses, quantidades ou duração adicionais acima e além dessas doses, ou composições adicionais (*por exemplo*, fármacos ou agentes), tratamentos, protocolos ou regimes terapêuticos podem ser incluídos a fim de serem considerados eficazes ou suficientes em um determinado indivíduo. As quantidades consideradas eficazes também incluem quantidades que resultam em uma redução do uso de outro tratamento, regime terapêutico ou protocolo, como a administração de ácido nucleico que codifica TPP1 para o tratamento de uma deficiência de TPP1 (*por exemplo*, CLN2).

[0110] Conseqüentemente, os métodos e usos da invenção também incluem, entre outras coisas, métodos e usos que resultam em uma necessidade reduzida ou uso de outro composto, agente, droga, regime terapêutico, protocolo de tratamento, processo ou remédio. Assim, de acordo com a invenção, métodos e usos para reduzir a necessidade ou uso de outro tratamento ou terapia são fornecidos.

[0111] Uma quantidade eficaz ou uma quantidade suficiente não precisa ser eficaz em cada um dos indivíduos tratados, nem na maioria dos indivíduos tratados em um determinado grupo ou população. Uma quantidade eficaz ou uma quantidade suficiente significa eficácia ou suficiência em um determinado indivíduo, não em um grupo ou na população em geral. Como é típico para tais métodos, alguns indivíduos exibirão uma resposta maior, ou menor ou nenhuma resposta a um determinado método de tratamento ou uso.

[0112] A administração ou liberação *in vivo* a um indivíduo pode ser realizada antes do desenvolvimento de um sintoma adverso, condição, complicação, etc., causado por ou associado à doença. Por exemplo, uma tela (*por exemplo*, genética) pode ser usada para identificar tais indivíduos como candidatos para composições, métodos e usos da invenção. Tais indivíduos, portanto, incluem aqueles selecionados como positivos para uma quantidade insuficiente ou uma deficiência em um produto de gene funcional (*por exemplo*, deficiência de TPP1), ou que produzem um produto de gene aberrante,

parcialmente funcional ou não funcional (*por exemplo*, TPP1).

[0113] A administração ou liberação *in vivo* a um indivíduo de acordo com os métodos e usos da invenção, conforme divulgados neste documento, pode ser praticada em 1 - 2, 2 - 4, 4 - 12, 12 - 24 ou 24 - 72 horas após um indivíduo ter sido identificado como tendo a doença direcionada para tratamento, tendo um ou mais sintomas da doença ou ter sido rastreado e identificado como positivo, conforme estabelecido neste documento, embora o indivíduo não tenha um ou mais sintomas da doença. Claro, os métodos e usos da invenção podem ser praticados 1 - 7, 7 - 14, 14 - 24, 24 - 48, 48 - 64 ou mais dias, meses ou anos após um indivíduo ter sido identificado como tendo a doença direcionada para tratamento, tem um ou mais sintomas da doença, ou foi rastreado e é identificado como positivo conforme estabelecido neste documento.

[0114] O termo "melhorar" significa uma melhora detectável ou mensurável na doença de um indivíduo ou sintoma da mesma, ou uma resposta celular subjacente. Uma melhora detectável ou mensurável inclui uma diminuição subjetiva ou objetiva, redução, inibição, supressão, limite ou controle na ocorrência, frequência, gravidade, progressão ou duração da doença, ou complicação causada por ou associada à doença, ou uma melhora em um sintoma ou uma causa subjacente ou uma consequência da doença, ou uma reversão da doença.

[0115] Para CLN2, uma quantidade eficaz seria uma quantidade que inibe, reduz ou melhora a deficiência visual, desenvolvimento cognitivo prejudicado ou atrofiado, perda de controle motor ou convulsões. Uma quantidade eficaz também seria uma quantidade que estabiliza ou inibe ou evita o agravamento de um sintoma adverso de CLN2.

[0116] As doses terapêuticas dependerão, entre outros fatores, da idade e do estado geral do indivíduo, da gravidade da doença ou distúrbio. Uma quantidade terapeuticamente eficaz em humanos cairá em uma faixa relativamente ampla que pode ser determinada por um médico com base na

resposta de um paciente individual.

[0117] Composições, tais como composições farmacêuticas, podem ser distribuídas a um indivíduo, de modo a permitir a produção da proteína codificada. Em certas modalidades, as composições farmacêuticas compreendem material genético suficiente para permitir que um receptor produza uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína no indivíduo.

[0118] As composições podem ser formuladas e/ou administradas em qualquer transportador farmacêutico biocompatível estéril, incluindo, mas não se limitando a, solução salina, solução salina tamponada, dextrose e água. As composições podem ser formuladas e/ou administradas a um paciente sozinhas ou em combinação com outros agentes (*por exemplo*, cofatores) que influenciam a hemostasia.

[0119] Métodos de tratamento da invenção incluem entrega e administração sistemicamente, regionalmente ou localmente, ou por qualquer via, por exemplo, por injeção ou infusão. A distribuição das composições farmacêuticas *in vivo* pode geralmente ser realizada por meio de injeção. Por exemplo, vetores/partículas de rAAV podem ser administrados por via intracraniana, por exemplo, no SNC, em particular, por exemplo, em uma porção do cérebro, tal como um ventrículo lateral.

[0120] Métodos de tratamento e vetores de rAAV de acordo com a invenção incluem terapias de combinação que incluem o uso adicional de qualquer composto, agente, fármaco, tratamento ou outro regime ou protocolo terapêutico tendo uma atividade ou efeito terapêutico, benéfico, aditivo, sinérgico ou complementar desejado. Composições e tratamentos de combinação exemplares incluem segundos ativos, tais como, biológicos (proteínas), agentes (*por exemplo*, agentes imunossupressores) e fármacos. Esses produtos biológicos (proteínas), agentes, fármacos, tratamentos e terapias podem ser administrados ou realizados antes, substancialmente ao mesmo tempo ou após qualquer outro método ou tratamento de acordo com a

invenção.

[0121] O composto, agente, fármaco, tratamento ou outro regime terapêutico ou protocolo podem ser administrados como uma composição de combinação, ou administrados separadamente, tal como simultaneamente ou em série ou sequencialmente, antes ou após da liberação ou administração de um ácido nucleico, vetor, ou partícula de rAAV. A invenção, portanto, fornece combinações nas quais um método de tratamento de acordo com a invenção está em uma combinação com qualquer composto, agente, fármaco, regime terapêutico, protocolo de tratamento, processo, remédio ou composição, estabelecidos neste documento ou conhecidos por um técnico no assunto. O composto, agente, fármaco, regime terapêutico, protocolo de tratamento, processo, remédio ou composição pode ser administrado ou realizado antes, substancialmente ao mesmo tempo ou após a administração de um ácido nucleico, vetor ou partícula de rAAV administrado a um paciente de acordo com a invenção.

[0122] Em certas modalidades, pelo menos um agente imunossupressor é administrado a um indivíduo antes, substancialmente ao mesmo tempo ou após a administração de um vetor rAAV ao indivíduo. Em certas modalidades, um agente imunossupressor é agente anti-inflamatório. Em certas modalidades, um agente imunossupressor é um esteroide. Em certas modalidades, um agente imunossupressor é prednisona, ciclosporina (*por exemplo*, ciclosporina A), micofenolato, rituximabe ou um derivado dos mesmos.

[0123] As estratégias para reduzir (superar) ou evitar a imunidade humoral ao AAV na transferência de genes incluem a administração de altas doses de vetor, o uso de capsídeos vazios de AAV como iscas para adsorver anticorpos anti-AAV, a administração de fármacos imunossupressores para diminuir, reduzir, inibir, prevenir ou erradicar a resposta imune humoral a AAV, alterando o sorotipo do capsídeo AAV ou manipulando o capsídeo AAV para ser menos suscetível a anticorpos neutralizantes, uso de ciclos de troca de

plasma para adsorver imunoglobulinas anti-AAV, reduzindo assim o título de anticorpo anti-AAV e uso de técnicas de entrega como cateteres de balão seguidos de lavagem com solução salina. Tais estratégias são descritas em Mingozi *et al.*, 2013, *Blood*, 122: 23-36.

[0124] A razão exemplar de capsídeos vazios de AAV para o vetor rAAV pode estar dentro ou entre cerca de 100:1-50:1, de cerca de 50:1-25:1, de cerca de 25:1-10:1, de cerca de 10:1- 1:1, de cerca de 1:1-1:10, de cerca de 1:10-1: 25, de cerca de 1: 25-1: 50, ou de cerca de 1: 50-1:100. As razões também podem ser cerca de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 ou 10:1.

[0125] As quantidades de capsídeos vazios de AAV para administrar podem ser calibradas com base na quantidade (título) de anticorpos de AAV produzidos em um determinado indivíduo.

[0126] Os anticorpos AAV podem ser pré-existentes e podem estar presentes em níveis que reduzem ou bloqueiam a transdução do vetor de transferência de gene TPP1 de células alvo. Alternativamente, os anticorpos AAV podem desenvolver após exposição a AAV ou administração de um vetor AAV. Se tais anticorpos se desenvolverem após a administração de um vetor AAV, esses indivíduos também podem ser tratados em conformidade.

[0127] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente entendido por alguém técnico no assunto à qual esta invenção pertence. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos neste documento possam ser usados na prática ou no teste da presente invenção, métodos e materiais adequados são descritos neste documento.

[0128] Todas as patentes, pedidos de patentes, publicações e outras referências, citações do GenBank e citações da ATCC citados neste documento são incorporadas por referência em sua totalidade. Em caso de conflito, o relatório descritivo, incluindo as definições, prevalecerá.

[0129] Todos os recursos divulgados neste documento podem ser combinados em qualquer combinação. Cada recurso divulgado no relatório

descritivo pode ser substituído por um recurso alternativo que serve a um propósito igual, equivalente ou semelhante. Assim, a menos que expressamente indicado de outra forma, as características divulgadas (*por exemplo*, ácido nucleico que codifica TPP1, cassetes de expressão compreendendo ácidos nucleicos que codificam TPP1 e partículas de rAAV compreendendo o ácido nucleico que codifica TPP1) são um exemplo de um gênero de características equivalentes ou semelhantes.

[0130] Conforme usado neste documento, as formas singulares "um(a)", "e" e "o(a)" incluem referentes plurais, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Assim, por exemplo, a referência a "um ácido nucleico" inclui uma pluralidade de tais ácidos nucleicos, a referência a "um vetor" inclui uma pluralidade de tais vetores e a referência a "um vírus" ou "partícula" inclui uma pluralidade de tais vírus/partículas.

[0131] Conforme usado neste documento, todos os valores numéricos ou faixas numéricas incluem inteiros dentro de tais faixas e frações dos valores ou dos inteiros dentro de faixas, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Assim, para ilustrar, a referência a 86% ou mais identidade inclui 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, etc., bem como 86,1%, 86,2%, 86,3%, 86,4%, 86,5%, etc., 87,1%, 88,2%, 88,3%, 88,4%, 88,5%, etc., e assim por diante.

[0132] Referência a um número inteiro com mais (maior) ou menos que inclui qualquer número maior ou menor que o número de referência, respectivamente. Assim, por exemplo, uma referência a um superior a  $1,5 \times 10^{13}$ , inclui  $1,6 \times 10^{13}$ ,  $1,7 \times 10^{13}$ ,  $1,8 \times 10^{13}$ ,  $1,9 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $2,1 \times 10^{13}$ ,  $2,2 \times 10^{13}$ ,  $2,3 \times 10^{13}$ ,  $2,4 \times 10^{13}$ ,  $2,5 \times 10^{13}$ ,  $2,6 \times 10^{13}$ ,  $2,7 \times 10^{13}$ ,  $2,8 \times 10^{13}$ ,  $2,9 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $3,1 \times 10^{13}$ ,  $3,2 \times 10^{13}$ , etc.

[0133] Conforme usado neste documento, todos os valores numéricos ou faixas incluem subfaixas e frações dos valores e inteiros dentro de tais faixas e subfaixas e o 1 errado, bem como o arquivo ok, graças às frações dos inteiros dentro de tais faixas, a menos que o contexto indique

claramente o contrário. Assim, para ilustrar, a referência a um faixa numérico, como 1-10 inclui 1 – 2, 1 – 3, 1 – 4, 1 – 5, 1 – 6, 1 – 7, 1 – 8, 1 – 9, 2 – 3, 2 – 4, 2 – 5, 2 – 6, 2 – 7, 2 – 8, 2 – 9, 2 – 10, 3 – 4, 3 – 5, 3 – 6, 3 – 7, 3 – 8, 3 – 9, 3 – 10, etc.; e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, bem como 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, etc. e assim por diante. A referência a uma faixa de 1-50, portanto, inclui 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc., até e incluindo 50, bem como 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, etc., 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, etc. e assim por diante.

[0134] A referência a uma série de faixas inclui faixas que combinam os valores dos limites de diferentes faixas dentro da série. Assim, para ilustrar a referência a uma série de faixas, por exemplo, de 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-850, a referência inclui faixas de 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 10-30, 10-40, 10-50, 10-60, 10-70, 10-80, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 50-75, 50-100, 50-150, 50-200, 50-250, 100-200, 100-250, 100-300, 100-350, 100-400, 100-500, 150-250, 150-300, 150-350, 150-400, 150-450, 150-500, etc.

[0135] A invenção é geralmente divulgada neste documento usando linguagem afirmativa para descrever as numerosas modalidades da invenção. A invenção também inclui especificamente modalidades nas quais um determinado assunto é excluído, no todo ou em parte, como substâncias ou materiais, etapas e condições do método, protocolos ou procedimentos. Por exemplo, em certas modalidades da invenção, materiais e/ou etapas do método são excluídos. Assim, embora a invenção geralmente não seja expressa neste documento em termos do que a invenção não inclui aspectos que não estão expressamente excluídos na invenção, são divulgados neste documento.

[0136] Uma série de modalidades da invenção foram descritas. No entanto, um técnico no assunto, sem se afastar do espírito e escopo da invenção, pode fazer várias alterações e modificações na invenção para adaptá-la a vários usos e condições. Consequentemente, os seguintes

exemplos pretendem ilustrar mas não limitar o âmbito da invenção reivindicado de qualquer forma.

### EXEMPLOS

#### EXEMPLO 1

[0137] Primatas não humanos adultos *Macaca mulatta* (machos e fêmeas) foram utilizados neste estudo. Os grupos de tratamento foram: controle (apenas veículo); Dose baixa ( $1,0 \times 10^{13}$  vg/animal); Dose Média ( $5,0 \times 10^{13}$  vg/animal); e Dose Elevada ( $2,17 \times 10^{14}$  vg/animal).

[0138] Por Grupo de Tratamento Números de Animais: Controle (n = 3 por ponto de tempo), Baixa Dose (N = 3 por ponto de tempo), Dose Média (n = 3 por ponto de tempo) e Dose Alta (n = 4 por ponto de tempo). Os pontos de tempo foram 30 dias e 90 dias.

[0139] Administração de AAV2-CAG-hTTP1: administração unilateral guiada por ressonância magnética no corno occipital do ventrículo lateral (Figura 1; linha vertical) usando uma agulha espinhal (22G, 3,5" Quinke BD). Um volume total de 4 mL foi entregue a ( $100 \mu\text{L}/\text{min}$ ).

[0140] A análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) incluiu ensaio de atividade enzimática TPP1 e ensaio de expressão de proteína TPP1 humana (WES Western).

#### EXEMPLO 2

[0141] Este exemplo inclui uma descrição de dados que indicam a expressão e a atividade de curto e longo prazo de TPP1 humano no SNC após a entrega intraventricular de AAV2-CAG-humanoTPP1.

[0142] O TPP humano foi segregado no LCR de primatas não humanos após a entrega de um vetor AAV-CAG-humanoTPP1 (também referido como AAV-CAG-hTPP1) direcionado às células ependimárias dos ventrículos laterais no SNC. Após a entrega do vetor AAV, houve expressão mensurável e sustentada de TPP1 humano ao longo de um curso de tempo de 20 semanas (Figuras 2A, 3A e 4). Além disso, os níveis de expressão de TPP1 em todas as 3 doses do vetor AAV resultaram em níveis dentro ou excedendo

$K_{\text{absorção}}$  para TPP1, conforme relatado anteriormente (Vuilleminot, B.R., *et al.* (2014) *Toxicol Appl Pharmacol*, 277(1), 49-57). Isso indica que a absorção celular prolongada e contínua para o parênquima nesses animais é provável (Katz, M. L., *et al.* (2015) *Sci Transl Med*, 7(313); Tecedor, L. (2018) *16ª Conferência Internacional sobre NCL*, Londres, Reino Unido.). A análise da atividade TPP1 confirma a viabilidade funcional da proteína TPP1 expressa (Figuras 2B e 3B). A análise preliminar de tecidos post-mortem em animais que receberam AAV2-CAG-hTPP1, não indicou alterações patológicas significativas em comparação com os animais de controle que receberam apenas diluente. A análise da absorção de tecido de hTPP1 expressa nos animais está sendo realizada.

[0143] Estes estudos demonstram uma abordagem eficaz de terapia genética direcionada ao ependimal que resultou na expressão de TPP1 humano a partir das células ependimárias do ventrículo lateral para o tratamento da lipofuscinose ceróide neuronal infantil tardia.

### EXEMPLO 3

Capsídeo Spk1 VP1 (SEQ ID NO: 1):

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGR  
 GLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLYRN  
 HADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPV  
 EPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDPQPIGEPAAAPSG  
 VGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTW  
 ALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDW  
 QRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQL  
 PYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQM  
 LRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTA  
 GTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGA  
 TKYHLNGRDSLNVNPGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNVDYSS  
 VMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQN  
 RDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFN

QAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVN  
TEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

Capsídeo Spk2 VP1 (SEQ ID NO: 2):

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALQPGAPKPKANQQHQDNAR  
GLVLPGYKYLGPNGLDKGEVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYN  
HADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPV  
DQSPQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAAPTS  
LGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDREVITSTRT  
WALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ  
RLINNNWGFPRPKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANLNTSTVQVFTDSEYQLP  
YVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQM  
LRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLNRTQGTTSGT  
TNQSRLLSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQQRLSKTANDNNNSNFPWTA  
ASKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDN  
VMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQD  
RDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTF  
SPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSVNVDFTV  
DTNGVYSEPRPIGTRYLTRPL

Sequência do promotor CAG (SEQ ID NO: 3):

ATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAAT  
GGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAAT  
GACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG  
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA  
TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCT  
GGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACA  
TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCT  
GCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATT  
TATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGG  
CGCGCGCCAGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGGGCGGGGGCGGGGGCGA  
GGCGGAGAGGTGCGGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGT

TTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAG  
CGCGCGGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCC  
CGCTCCGCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGCGT  
TACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAA  
TTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAG  
CCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGG  
GGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGC  
GCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGC  
GCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCG  
GTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTG  
CGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACC  
CCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGT  
GCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGG  
GGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGG  
CCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGC  
GGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTG  
CGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAAT  
CTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGT  
GCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGC  
CGCGCCGCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGG  
GGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTG  
GCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCT  
TCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATC  
ATTTTGGCAA

TPP1 (SEQ ID NO: 4, humano):

MGLQACLLGLFALILSGKCSYSPEPDQRRTLPPGWVSLGRADPEE  
ELSLTFALRQQNVERLSELVQAVSDPSSPQYGKYLLENVADLVRPSPLTLHT  
VQKWLLAAGAQKCHSVITQDFLTCWLSIRQAELLLPGAEFHHYVGGPTETHV  
RSPHPYQLPQALAPHVDFVGGGLHRFPPTSSLRQRPEPQVTGTVGLHLGVTPS  
VIRKRYNLTSQDVSGTSNNSQACAQFLEQYFHDSDLAQFMRLFNGNFAHQ

ASVARVVGQQGRGRAGIEASLDVQYLMSAGANISTWVYSSPGRHEGQEPFL  
QWLMLLSNESALPHVHTVSYGDDEDSLSSAYIQRVNTELMKAAARGLTLLFAS  
GDSGAGCWSVSGRHQFRPTFPASSPYVTTVGGTSFQEPFLITNEIVDYISGG  
GFSNVFPRPSYQEEAVTKFLSSSPHLPPSSYFNASGRAYPDVAALSDGYWV  
SNRVPIPWVSGTSASTPVFGGILSLINEHRILSGRPPLGFLNPRLYQQHGAGLF  
DVTRGCHESCLDEEVEGQGFCSGPGWDPVTGWGTPNFPALLKTLLNP

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar um primata com necessidade de tripeptidila peptidase 1 (TPP1), **caracterizado** por compreender:
  - (a) fornecer um vetor de vírus adeno-associado (AAV) recombinante compreendendo um ácido nucleico que codifica TPP1; e
  - (b) administrar uma quantidade do referido vetor AAV recombinante ao sistema nervoso central (SNC) do referido primata, em que o referido TPP1 é expresso no referido primata.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo referido primata ser um humano.
3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo referido ser humano ter lipofuscinose ceróide neuronal infantil tardia (CLN2).
4. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo referido humano ter aproximadamente 1 a 10 anos de idade ou ser mais velho do que 10 anos.
5. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo referido humano ter aproximadamente 2 a 5 anos de idade.
6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pela referida administração ser ao ventrículo lateral ou cisterna magna.
7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pela referida administração ser ao corno occipital do referido ventrículo lateral.
8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo referido vetor AAV recombinante ser administrado unilateralmente a um ventrículo lateral.
9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo referido vetor AAV recombinante ser administrado bilateralmente a cada ventrículo lateral.
10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo referido vetor AAV recombinante ser administrado

unilateralmente ou bilateralmente a um ou ambos os ventrículos laterais múltiplas vezes.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo referido TPP1 ser expresso em níveis aumentados no referido SNC.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo referido TPP1 ser expresso ou entregue em todo o SNC.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizado** pelo referido TPP1 ser expresso em ou entregue a células ependimárias.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado** pelo referido TPP1 ser entregue ao parênquima.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado** pela referida expressão de TPP1 ser mantida em níveis iguais ou maiores do que os necessários para metade da absorção máxima de TPP1 nos neurônios.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado** pela referida expressão de TPP1 ser mantida em níveis iguais ou maiores que  $K_{\text{absorção}}$ , em que  $K_{\text{absorção}}$  é de pelo menos cerca de 60 ng/mL.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado** pela referida expressão de TPP1 ser mantida em níveis iguais ou maiores que  $K_{\text{absorção}}$ , em que  $K_{\text{absorção}}$  é de pelo menos cerca de 60 ng/mL a 120 ng/mL.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado** pela referida expressão de TPP1 é mantida em níveis maiores do que cerca de 120 ng/mL.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado** pela referida expressão de TPP1 ser mantida em níveis

maiores do que cerca de 150 ng/mL, maiores do que cerca de 200 ng/mL, maiores do que cerca de 250 ng/mL ou maiores do que cerca de 300 ng/mL.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, **caracterizado** pela expressão de TPP1 ser mantida por pelo menos cerca de 5 semanas, ou pelo menos cerca de 10 semanas, ou pelo menos cerca de 20 semanas no SNC.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, **caracterizado** pela expressão detectável de TPP1 ou atividade de TPP1 ser mantida por pelo menos 5 semanas, ou pelo menos 10 semanas, ou pelo menos 20 semanas no SNC.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, **caracterizado** pelo referido vetor AAV recombinante ser administrado ao referido SNC, a uma dose superior a cerca de  $1,5 \times 10^{13}$  de genomas de vetor AAV; a uma dose de cerca de  $5 \times 10^{13}$  de genomas de vetor AAV ou superior a cerca de  $5 \times 10^{13}$  genomas de vetor AAV; a uma dose de cerca de  $1 \times 10^{14}$  de genomas de vetor AAV ou superior a cerca de  $1 \times 10^{14}$  de genomas de vetor AAV; a uma dose de cerca de  $5 \times 10^{14}$  de genomas de vetor AAV ou superior a cerca de  $5 \times 10^{14}$  de genomas de vetor AAV; a uma dose de cerca de  $1 \times 10^{15}$  de genomas de vetor AAV ou superior a cerca de  $1 \times 10^{15}$  de genomas de vetor AAV; ou a uma dose de cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor AAV ou superior a cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor AAV.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, **caracterizado** pelo referido vetor AAV recombinante ser administrado ao referido SNC em uma faixa de dosagem de cerca de  $1,5 \times 10^{13}$  a cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor; em uma faixa de dosagem de cerca de  $1 \times 10^{14}$  a cerca de  $3 \times 10^{15}$  de genomas de vetor; em uma faixa de dosagem de cerca de  $2 \times 10^{14}$  a cerca de  $2 \times 10^{15}$  de genomas de vetor; em uma faixa de dosagem de cerca de  $2,5 \times 10^{14}$  a cerca de  $7,5 \times 10^{14}$  de genomas de vetor; em uma faixa de dosagem de cerca de  $5 \times 10^{14}$  a cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor; ou em uma faixa de dosagem de cerca de  $1 \times 10^{15}$  a cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de

vetor.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, **caracterizado** pelo referido vetor AAV recombinante ser administrado ao referido SNC a uma dose de cerca de  $1 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $2 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $3 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $4 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $5 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $6 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $7 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $8 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $9 \times 10^{14}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $1 \times 10^{15}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $2 \times 10^{15}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $3 \times 10^{15}$  de genomas de vetor, a uma dose de cerca de  $4 \times 10^{15}$  de genomas de vetor, ou a uma dose de cerca de  $5 \times 10^{15}$  de genomas de vetor.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 24, **caracterizado** pelo referido método reduzir, diminuir ou inibir um ou mais sintomas do referido CLN2; ou prevenir ou reduzir a progressão ou agravamento de um ou mais sintomas do referido CLN2; ou estabilizar um ou mais sintomas do referido CLN2; ou melhorar um ou mais sintomas do referido CLN2.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo referido um ou mais sintomas serem selecionados a partir do grupo que consiste em: deficiência visual, desenvolvimento cognitivo prejudicado ou atrofiado, perda de controle motor e convulsões.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, **caracterizado** pelo referido ácido nucleico que codifica TPP1 compreender um cassete de expressão operacionalmente ligado a um elemento de controle de expressão.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo referido elemento de controle de expressão estar posicionado a 5' do referido

ácido nucleico.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 ou 28, **caracterizado** pelo referido elemento de controle de expressão compreender um promotor CAG (SEQ ID NO: 3), promotor/intensificador precoce imediato de citomegalovírus (CMV), promotor/intensificador do vírus do sarcoma de Rous (RSV), promotor SV40, promotor di-hidrofolato redutase (DHFR) ou promotor da  $\beta$ -actina de galinha (CBA).

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, **caracterizado** pelo referido ácido nucleico heterólogo estar posicionado entre uma ou mais repetições terminais invertidas AAV 5' e/ou 3' (ITR(s)).

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, **caracterizado** pelo referido um ou mais AAV ITR(s) compreender(em) um AAV ITR mutado, modificado ou variante que não é processado pela proteína Rep de AAV.

32. Método, de acordo com a reivindicação 30, **caracterizado** pelo referido um ou mais AAV ITR(s) compreender um AAV ITR mutado, modificado ou variante que permite ou facilita a formação do genoma do transgene repórter autocomplementar em uma estrutura de sequência de repetição invertida de fita dupla no referido AAV recombinante vetor.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado** pelo referido AAV ITR mutado, modificado ou variante ter uma sequência D deletada e/ou uma sequência de sítio de resolução terminal (TRS) mutada, modificada ou variante.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 33, **caracterizado** pelo referido vetor AAV recombinante compreender em na orientação de 5'  $\rightarrow$  3' de um primeiro AAV ITR; um promotor operável em células de mamíferos; o ácido nucleico heterólogo; um sinal de poliadenilação; e opcionalmente um segundo AAV ITR.

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 33, **caracterizado** pelo referido um ou mais ITR(s) compreende(rem) sorotipos AAV AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9,

AAV10, AAV11, AAV12, Rh74 ou Rh10ITR.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, **caracterizado** pelo referido vetor AAV recombinante compreender uma sequência VP1, VP2 ou VP3 60% ou mais idêntica a uma sequência VP1, VP2 e/ou VP3 do sorotipo AAV AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh74, Rh10, SPK1 (SEQ ID NO:1) ou SPK2 (SEQ ID NO:2) VP1, VP2 e/ou VP3, ou um híbrido ou quimera de qualquer um dos serotipos de AAV anteriores.

37. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, **caracterizado** pelo referido vetor AAV recombinante compreender proteína do capsídeo VP1, VP2 e/ou VP3 tendo 100% de identidade de sequência com a proteína do capsídeo VP1, VP2 e/ou VP3 selecionada a partir do grupo que consiste em AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, Rh10, Rh74, SPK1 (SEQ ID NO:1) e SPK2 (SEQ ID NO:2) proteínas do capsídeo VP1, VP2 e/ou VP3.

38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, **caracterizado** pelo referido vetor AAV recombinante compreender ainda uma sequência de poliadenilação posicionada a 3' do referido ácido nucleico.

39. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 38, **caracterizado** pelo referido ácido nucleico que codifica TPP1, elemento de controle de expressão ou sequência de poliadenilação ser CpG reduzido em comparação com ácido nucleico de tipo selvagem que codifica TPP1, elemento de controle de expressão ou sequência de poliadenilação.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 ou 39, **caracterizado** pela referida sequência de poliadenilação compreender uma sequência de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (bGH).

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 34, **caracterizado** pelo referido TPP1 ser humano, compreende ou consiste na sequência apresentada como SEQ ID NO:4, ou é uma variante funcional ou a forma polimórfica da mesma.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41, **caracterizado** pelo referido vetor AAV recombinante compreender:

- (a) um ou mais de um capsídeo de AAV, e
- (b) uma ou mais repetições de terminal invertido de AAV (ITR(s)), em que o referido um ou mais AAV ITR(s) flanqueiam o terminal 5' ou 3' do referido ácido nucleico ou do referido cassete de expressão.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, **caracterizado** por compreender ainda um íntron posicionado em 5' ou 3' do(s) referido(s) um ou mais ITR(s).

44. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 42 ou 43, **caracterizado** por pelo menos um ou mais dos referidos um ou mais ITR(s) e/ou o referido íntron é modificado para ter CpGs reduzidos.

45. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 44, **caracterizado** pelo referido vetor AAV recombinante tem um sorotipo de capsídeo compreendendo um capsídeo de AAV VP1, VP2 e/ou VP3 com 90% ou mais de identidade de sequência para AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74, AAV-2i8, SPK1 (SEQ ID NO:1) ou SPK2 (SEQ ID NO:2) sequências VP1, VP2 e/ou VP3 ou um capsídeo tendo 95% ou mais de identidade de sequência com AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74, AAV-2i8, SPK1 (SEQ ID NO:1), SPK2 (SEQ ID NO:2) sequências de VP1, VP2 e/ou VP3 ou um capsídeo com 100% de identidade de sequência com AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74, AAV-2i8, SPK1 (SEQ ID NO:1) ou SPK2 (SEQ ID NO:2) sequências VP1, VP2 e/ou VP3.

46. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 46, **caracterizado** pelo referido um ou mais ITR(s) compreender um ou mais ITRs de qualquer um de: sorotipos AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10 ou Rh74 AAV, ou uma combinação dos mesmos.

47. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 46, **caracterizado** pelo referido vetor AAV recombinante estar em uma composição farmacêutica compreendendo um transportador ou excipiente biologicamente compatível.

48. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pela referida composição farmacêutica compreender ainda capsídeos de AAV vazias.

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pela razão dos referidos capsídeos vazios de AAV para o referido vetor AAV recombinante está dentro ou entre cerca de 100:1-50:1, de cerca de 50:1-25:1, de cerca de 25:1-10:1, de cerca de 10:1-1:1, de cerca de 1:1-1:10, de cerca de 1:10-1:25, de cerca de 1:25-1:50, ou de cerca de 1:50-1:100.

50. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pela razão dos referidos capsídeos vazios de AAV para o referido vetor AAV recombinante é de cerca de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 ou 10:1.

51. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 50, **caracterizado** pela referida composição farmacêutica compreender ainda um surfactante.

**Figura 1**

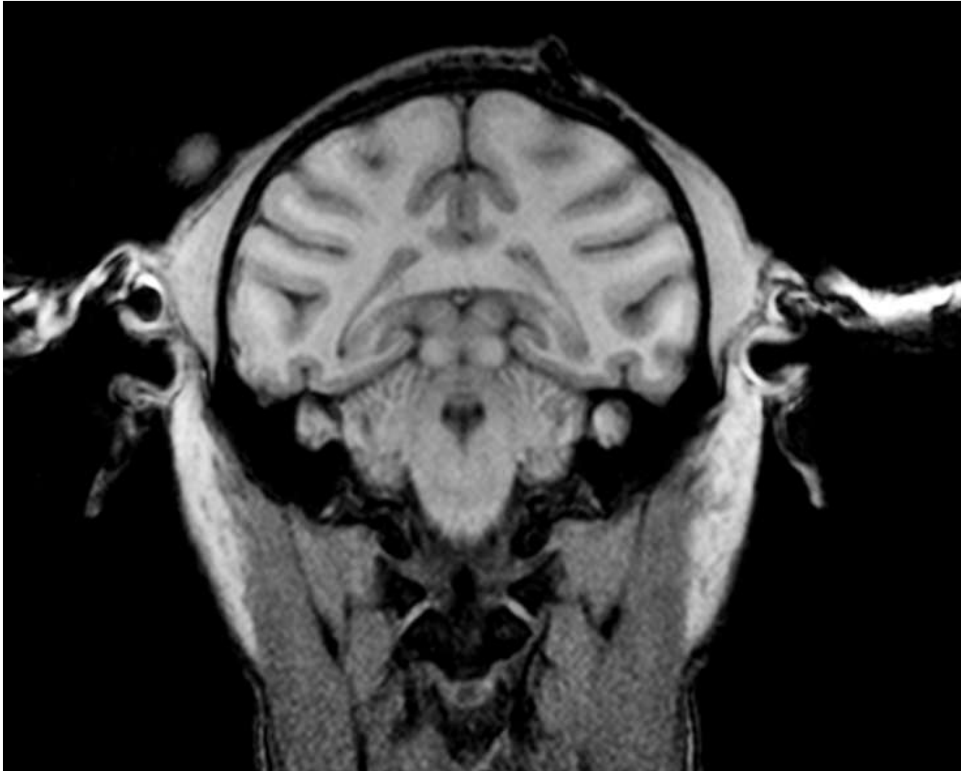


Figura 2A

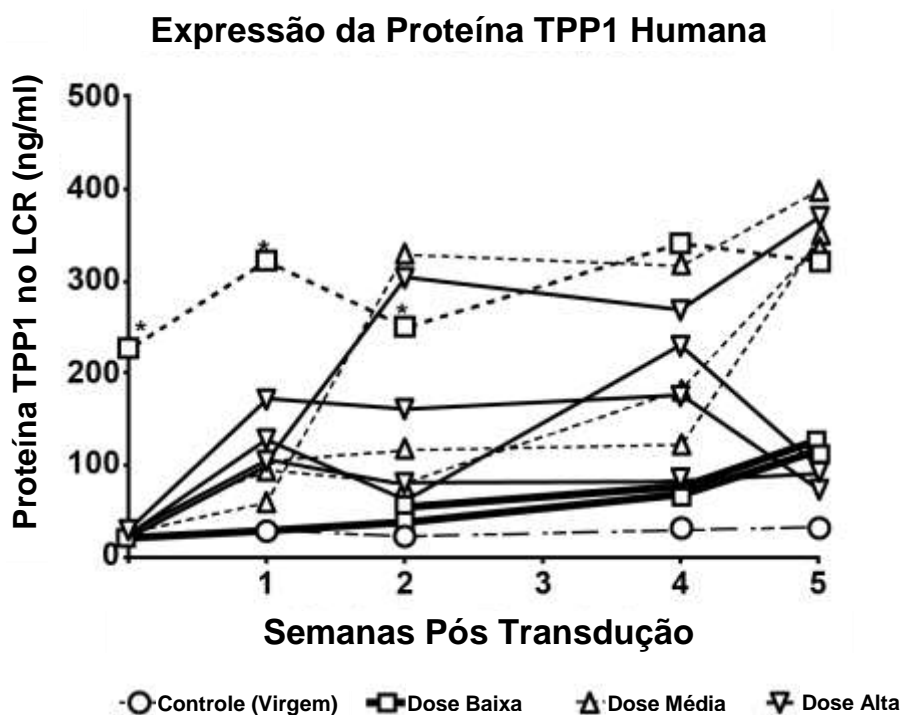


Figura 2B

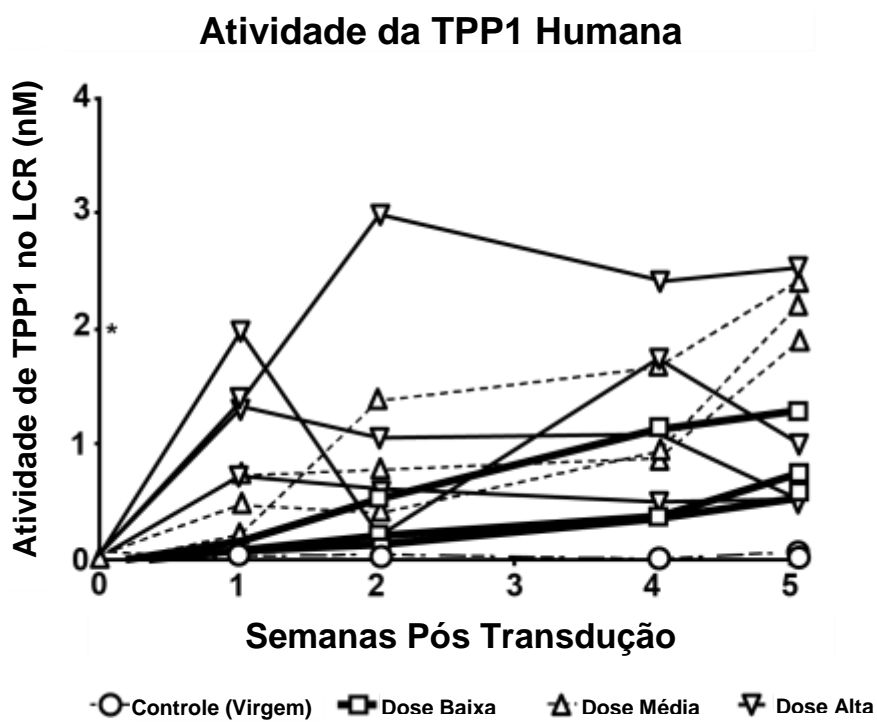


Figura 3A

## Expressão da Proteína TPP1 Humana

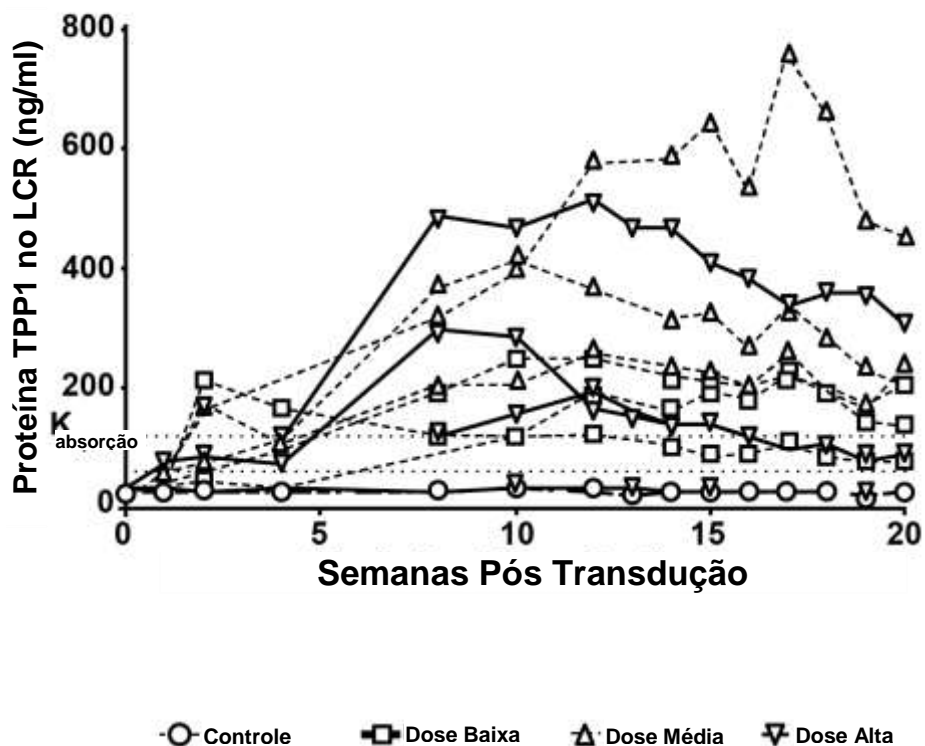
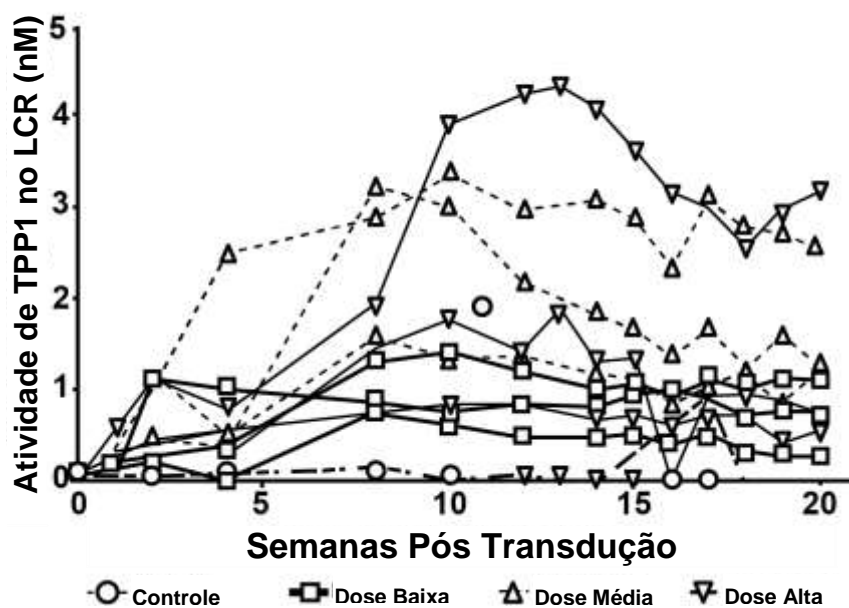
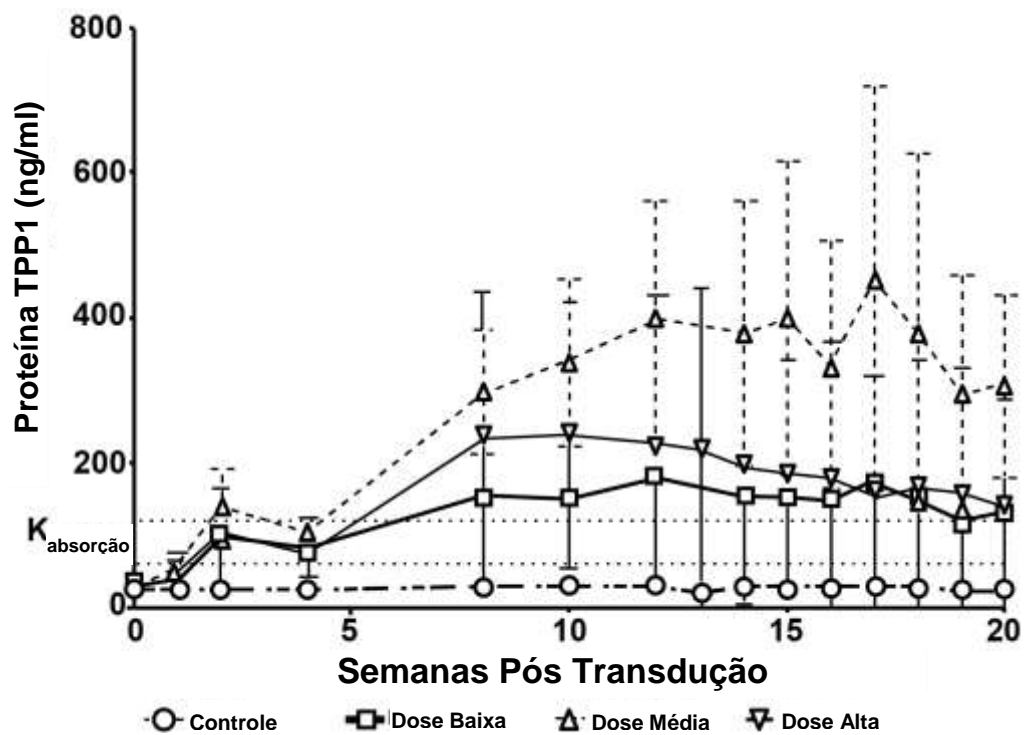


Figura 3B

## Atividade da TPP1 Humana



**Figura 4**  
**Expressão da Proteína TPP1 no LCR**



**RESUMO**

**“MÉTODOS DE TRATAMENTO DE VETOR AAV PARA LIPOFUSCINOSE  
CERÓIDE NEURONAL INFANTIL TARDIA TIPO 2”**

São divulgados aqui métodos para tratar um primata com necessidade de tripeptidila peptidase 1 (TPP1), compreendendo (a) fornecer um vetor de vírus adeno-associado recombinante (AAV) compreendendo um ácido nucleico que codifica TPP1; e (b) administrar uma quantidade do vetor AAV recombinante ao sistema nervoso central (SNC) do primata, em que o TPP1 é expresso no primata.

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.txt
- Data de Geração do Código: 30/07/2021
- Hora de Geração do Código: 10:48:36
- Código de Controle:
  - Campo 1: 56A4E8BD785B0CFF
  - Campo 2: DFA5AA1A5755324F